

Transkriptionsregulation der selenfreien
Hydrogenasen in *Methanococcus voltae*:
Identifikation cis-regulatorischer Elemente
und eines beteiligten Regulatorproteins

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Steffen Müller
aus Waiblingen

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 1996 bis Oktober 2000 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Professor Dr. A. Klein durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als
Dissertation am __. __. ____ angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Klein

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. K. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung am __. __. ____

Aus den während dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

Sorgenfrei, O., Müller, S., Pfeiffer, M., Sniezko, I. und Klein, A.

The [NiFe]-hydrogenases of *Methanococcus voltae*: genes, enzymes, and regulation.

Arch. Microbiol. 167 (1997): 189-195

Noll, I., Müller, S. und Klein, A.

Transcriptional regulation of genes encoding the selenium-free [NiFe]-hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae* involves positive and negative control elements.

Genetics 152 (1999): 1335-1341

Erklärung

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt habe, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Diese Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch zu keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

Steffen Müller

Vom betrachteten Ding muß eine Linie ausgehen,
die es mit dem betrachtenden Ding verbindet.
Aus dem stummen Haufen der Dinge muß etwas kommen:
Ein Zeichen, ein Anruf, ein Wink.
Ein Ding tritt aus der Masse anderer Dinge hervor,
um etwas zu bedeuten.

Italo Calvino, „Herr Palomar“

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis.....	8
2	Zusammenfassung.....	9
3	Einleitung.....	10
4	Materialien.....	19
4.1	Feinchemikalien.....	19
4.2	Biochemikalien.....	19
4.3	Gase.....	20
4.4	Kits,Konzentratoren und Schleudersäulen.....	20
4.5	Oligonukleotide.....	21
4.6	Enzyme.....	23
4.7	Membranen.....	23
4.8	Chromatographie.....	24
4.9	Sonstige Materialien.....	24
4.10	Geräte.....	24
4.11	Software.....	25
4.12	Verwendete Stämme von E. coli und M. voltae.....	25
4.13	Nährmedien.....	26
4.14	Plasmide.....	29
5	Methoden.....	35

5.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	35
5.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Methanococcus voltae</i>	36
5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Methanococcus voltae</i>	36
5.4 Quantifizierung von DNA und RNA.....	37
5.5 DNA-Gelelektrophorese.....	37
5.6 RNA-Gelelektrophorese.....	38
5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
5.8 Ortsgerichtete Mutagenese durch Fusions-PCR.....	39
5.9 Radioaktive Markierung von DNA.....	40
5.10 Alkalischer Transfer von RNA.....	41
5.11 Methylenblau-Färbung von RNA.....	42
5.12 DNA-RNA-Hybridisierung.....	42
5.13 Sequenzierung von DNA.....	42
5.14 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	43
5.15 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA.....	44
5.16 Kultivierung von <i>Methanococcus voltae</i>	44
5.17 Transformation von <i>Methanococcus voltae</i>	45
5.18 Herstellung von Proteinextrakt aus <i>M. voltae</i>	47
5.19 Proteinbestimmung.....	48
5.20 β -Glucuronidase-Enzymtests.....	49
5.21 Proteingelelektrophorese.....	52
5.22 Färbung von Proteingelen.....	53
5.23 Western blot.....	55
5.24 Affinitätschromatographie.....	56
5.25 Gelretardationsexperimente.....	62
6 Ergebnisse.....	64

6.1 Die isolierten Promotoren sind dereprimiert.....	64
6.2 Eine 11 bp große Sequenz vor beiden Promotoren vermittelt eine Aktivierung der Transkription.....	67
6.3 Die Undecamersequenz wird spezifisch durch einen Proteinkomplex aus <i>M. voltae</i> erkannt.....	79
6.4 Das Aktivatorprotein ist auch in selenhaltigen Zellen vorhanden..	85
6.5 Das Bindeprotein ist nicht TBP.....	88
6.6 Reinigung des Aktivatorproteins zur Homogenität.....	92
7 Diskussion.....	99
7.1 Analyse der Reportergenexpression der untersuchten Promotormutanten.....	99
7.2 Identifizierung des Aktivatorproteins.....	103
7.3 Modell der Bindung des Aktivators.....	105
7.4 Mechanismus der Aktivierung.....	107
8 Ausblick.....	112
9 Literaturverzeichnis.....	113

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
C6-MMT	C6-Monomethoxytrityl (1-Aminoethyl-monomethoxytrityl)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
DOTAP	<i>N</i> -(1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid
DTT	Dithiothreitol
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin
IR	Intergene Region
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PCR	Polymerase Chainreaction, Polymerasekettenreaktion
P _{mcr}	Promotor der <i>mcr</i> -Gengruppe aus <i>M. voltae</i>
pNPG	p-Nitrophenyl- α -D-glucuronid
RT	Raumtemperatur
StdI	Standard I (Medium)
T _{mcr}	Terminator der <i>mcr</i> -Gengruppe aus <i>M. voltae</i>
UPM	Umdrehungen pro Minute

2 ZUSAMMENFASSUNG

Methanococcus voltae besitzt mehrere Selenoproteine, darunter die an der Methanogenese beteiligten [NiFe]-Hydrogenasen. Sowohl die F₄₂₀-reduzierende Hydrogenase Fru, als auch die F₄₂₀-nichtreduzierende Hydrogenase Vhu haben ein Selenocystein als Bestandteil des aktiven Zentrums. Bei Abnahme der Selenkonzentration in seiner Umwelt sind daher selenfreie Isoenzyme der Hydrogenasen für diesen Organismus essentiell. Im Genom von *M. voltae* befinden sich zwei Gengruppen die für diese Isoenzyme kodieren. Die Operons *frc* und *vhc* werden aus einer gemeinsamen intergenen Region transkribiert und sind bei Anwesenheit von Selen negativ reguliert. Die Transkripte dieser Gengruppen können erst bei Selenmangel detektiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der selenabhängigen Regulation dieser selenfreien Isoenzyme zu untersuchen. Es konnte dabei gezeigt werden, daß zusätzlich zu einer negativen Transkriptionsregulation auch eine Aktivierung der Transkription nach Selenentzug stattfindet.

Eine mögliche Erkennungssequenz für das Aktivatorprotein wurde identifiziert, die sich stromaufwärts der TATA-Box beider Promotoren befindet. Mutationen in dieser Sequenz wurden auf die Veränderung der Expression eines Reportergens hin untersucht. Es wurde Kooperativität beider Bindestellen bei der Aktivierung gezeigt.

Anhand von Gelretardationsexperimenten wurde nachgewiesen, daß in partiell gereinigtem Zellextrakt von *M. voltae* ein Protein existiert, das spezifisch an diese Erkennungssequenz bindet. Durch Affinitätschromatographie wurde ein 55 kD großes Protein gereinigt werden, bei dem es sich wahrscheinlich um das Aktivatorprotein handelt.

3 EINLEITUNG

Die Archaea stellen die dritte Domäne der Organismen neben den Bacteria und den Eukarya dar. Sie werden anhand von 16S rRNA Analysen in die Gruppen der Crenarchaeota und Euryarchaeota unterteilt (Woese und Fox, 1977; Woese et al., 1990). Aufgrund ihrer vielfältigen, zum Teil extremen Habitate (Pace, 1997; DeLong, 1998) und der Ähnlichkeit ihrer Transkriptionsmaschinerie zu der der Eukarya gehören sie zu den meist untersuchten Organismen.

Archaea gehören zu den Prokaryoten, sie sind einzellige Organismen ohne Zellkern mit einem kleinen zirkulären Genom zwischen 1.6 und 4 Megabasen. Bei der Untersuchung der basalen Transkriptionsmaschinerie konnte gezeigt werden, daß die beteiligten Faktoren hohe Ähnlichkeit zu eukaryotischen Proteinen besitzen. So ist der Aufbau von RNA-Polymerase aus Archaea mit bis zu 14 Untereinheiten wesentlich komplexer als bei bakterielle RNA-Polymerasen. Die Homologie einzelner Untereinheiten zu Untereinheiten der RNA-Polymerase II aus Eukaryoten ist größer als die zu bakteriellen RNA-Polymeraseuntereinheiten (Zillig et al., 1992; Langer et al., 1995).

Zur Initiation der Transkription werden zusätzlich zur RNA-Polymerase zwei weitere Faktoren benötigt. Diese beiden Proteine sind homolog zu den eukaryotischen Faktoren TBP (TATA-bindendes Protein) und TFIIB (Transkriptions-Faktor IIB). Die Proteine TBP und TFIIB sind in Archaea für die Promotorerkennung verantwortlich (Hausner et al., 1996). Analog zu Eukaryoten erfolgt die Rekrutierung der RNA-Polymerase erst im Anschluss an die Erkennung des Promotors durch TBP/TFIIB, im Gegensatz zu Bakterien bei denen die Promotorerkennung durch einen σ -Faktor vermittelt wird, der Bestandteil des RNA-Polymerase Holoenzym ist (Wösten, 1998).

Die Promotoren von Archaea setzen sich aus der TATA-Box und einem ungefähr 23 Basenpaare stromabwärts gelegenen Initiatorelement zusammen (Soppa, 1999a; Thomm, 2000). Stromaufwärts im Anschluss an die TATA-Box befindet sich das purinreiche Transkriptions-Faktor-B-Erkennungs Element (BRE). Es bestimmt die Richtung der Transkription (Bell et al., 1999a; Soppa, 1999b). Das Initiatorelement enthält den Transkriptionsstart (Abbildung 1).

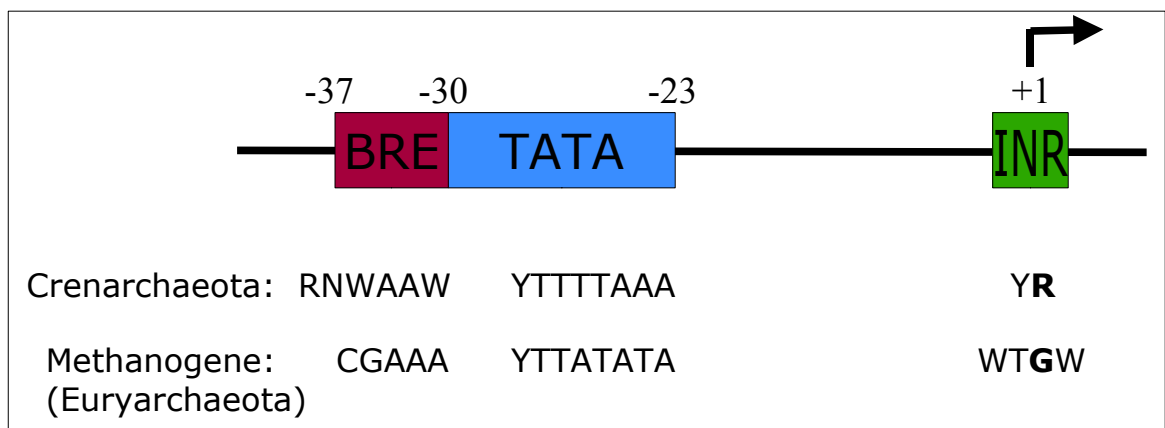


Abbildung 1: Promotorstruktur bei Archaea. Der Initiator (INR, grün) umgibt den Transkriptionsstart. Stromaufwärts zentriert um die Position -26 befindet sich das TATA-Box Element (TATA, blau), im Anschluß daran befindet sich stromaufwärts das BRE-Element (BRE, rot). Die Konsensussequenzen für die einzelnen Gruppen der Archaea sind unterhalb der Grafik angegeben, fett gedruckte Buchstaben stellen den Transkriptionsstart dar.

Methanococcus voltae gehört zur Gruppe der Euryarchaeota und ist ein mesophiles, moderat halophiles methanogenes Archaeon mit einem Genom von 1.9 Megabasen (Sitzmann und Klein, 1991). Der Energiestoffwechsel der strikt anaeroben methanogenen Archaea beruht auf der Synthese von Methan aus einer kleinen Gruppe von Ausgangssubstanzen. Als Ausgangssubstrate der Methanogenese dienen molekularer Wasserstoff und Kohlendioxid, Formiat, Acetat, Methanol sowie Methylamin (Blaut, 1994; Ferry, 1999). Diese Ausgangssubstanzen stellen Endprodukte von eubakteriellen und eukaryotischen Fermentations- und Oxidationsprozessen dar und werden über C1-

Intermediate zu Methan reduziert. *Methanococcus voltae* kann sowohl auf Formiat als auch ausschließlich chemolithotroph, d.h. mit CO₂ und Wasserstoff, wachsen (Abbildung 2)(Whitman et al., 1982).

Bei der Reduktion von CO₂ zu CH₄ werden 8 Elektronen benötigt, die aus der Oxidation von molekularem Wasserstoff mit Hilfe von Hydrogenasen erhalten werden. Hydrogenasen katalysieren hierzu die heterolytische Spaltung des molekularen Wasserstoffs zu Protonen und Elektronen. Diese Enzyme werden nach unterschiedlichen Kriterien klassifiziert. Die Einordnung der Hydrogenasen erfolgt zum einen über den Metallgehalt des aktiven Zentrums und zum anderen über den terminalen Redoxakzeptor.

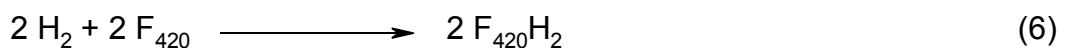
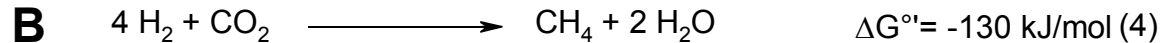
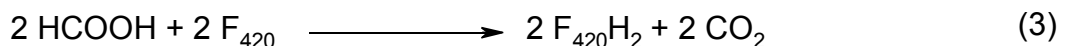
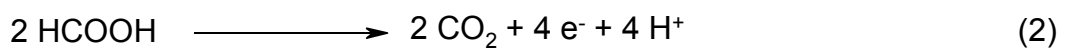
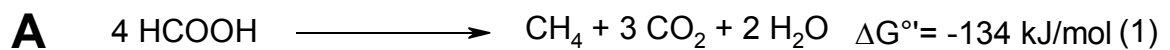


Abbildung 2: Methanogenese ausgehend von Formiat (A) bzw. CO₂ und H₂ (B). Gleichungen (1) und (4) stellen die Nettogesamtreaktion dar. Gleichungen (2), (3), (5) und (6) die Reduktionsequivalente liefernden Schritte.

Metallfreie Hydrogenasen setzen molekularen Wasserstoff über einen kofaktorabhängigen Mechanismus um (Zirngibl et al., 1992; Klein et al., 1995; Berkessel und Thauer, 1995). Des weiteren sind [Fe]-Hydrogenasen (Hagen et al., 1986; Adams, 1990) und [NiFe]-Hydrogenasen bekannt (Graf und Thauer, 1981; Cammack, 1988; Ragsdale, 1998). Diese Enzyme katalysieren die heterolytische Wasserstoffspaltung mit Hilfe ihres Metallzentrums.

Zusätzlich zum metallhaltigen primären Reaktionszentrum enthalten Hydrogenasen Eisen-Schwefel-Cluster, über die der Transport der Elektronen zum terminalen Elektronenakzeptor erfolgt.

Nickel-Eisen-Hydrogenasen werden aufgrund der Art der Liganden des Metallzentrums noch weiter unterteilt: Einige dieser Enzyme enthalten Selenocystein wohingegen eine zweite Gruppe an der homologen Position ein Cystein besitzt (Yamazaki, 1982; Teixeira et al., 1987; Sorgenfrei et al., 1997b). Selenocystein wird hierbei durch UGA kodiert. Es wird vermutet, daß für den Einbau von Selenocystein in Archaea zusätzlich eine Sekundärstruktur im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA benötigt wird (Wilting et. al., 1997).

In methanogenen Archaea dient ein 8-Hydroxy-5-desazaflavin, Faktor F_{420} , als terminaler Elektronenakzeptor einer Gruppe von [NiFe]-Hydrogenasen. Der Elektronenakzeptor der zweiten Gruppe ist nicht bekannt. In *Methanosarcina mazei* Gö1 wurde ein Methanophenazin identifiziert, das als Elektronenakzeptor sowohl der F_{420} -reduzierenden als auch der F_{420} -nichtreduzierenden Hydrogenase funktioniert (Abken et al., 1998). *Methanococcus voltae* besitzt vier Gengruppen, die für Nickel-Eisen-hydrogenasen kodieren. Die Gengruppen *fru* und *vhu* kodieren für Enzyme die in der großen Untereinheit ein Selenocystein besitzen. Die Gengruppen *frc* und *vhc* kodieren für selenfreie Isoenzyme und haben an den homologen Positionen ein Cysteincodon (Abbildung 3)(Halboth und Klein, 1992).

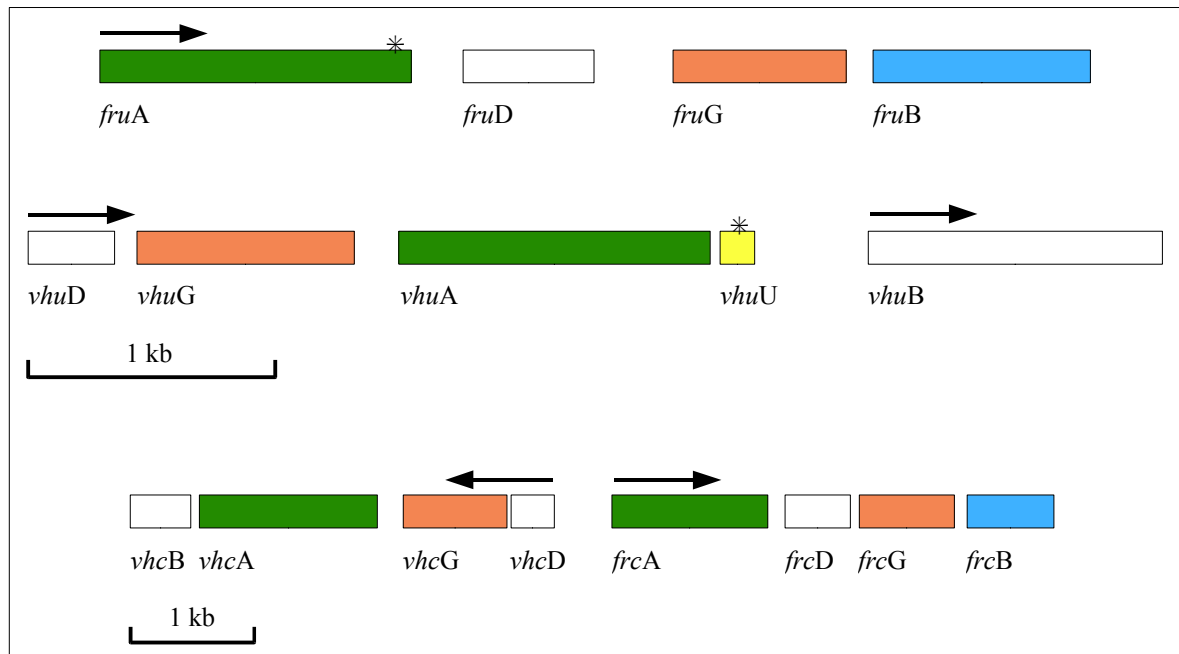


Abbildung 3: Anordnung der Gengruppen der [NiFe]-Hydrogenase aus *Methanococcus voltae*. Homologe Gene sind in identischen Farben hervorgehoben. Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Sterne geben die Position der in-frame UGA Codons wieder. Die A-Gene kodieren für die große Untereinheit mit dem aktiven Zentrum der Hydrogenase. Die G-Gene kodieren die kleine Untereinheit der Hydrogenase mit den [FeS]-Clustern. Die Gengruppe *vhu* stellt eine Besonderheit dar, hier ist das Gen für die große Untereinheit geteilt: Der C-terminale Teil ist ein separates Gen, *vhuU*.

Die Produkte von *fru* und *frc* sind F_{420} -reduzierende Hydrogenasen wohingegen *vhu* und *vhc* für F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenasen kodieren. Die selenhaltigen Proteine Fru und Vhu konnten gereinigt werden und sind biochemisch (Muth et al., 1987; Sorgenfrei et al., 1993) und spektroskopisch gut untersucht (Sorgenfrei et al., 1996; Sorgenfrei et al., 1997a). Eine Reinigung der selenfreien Isoenzyme Frc und Vhc war bisher nicht erfolgreich.

Eine Besonderheit stellt die sehr kleine Untereinheit VhuU dar. Sie ist homolog zum C-Terminus der großen Untereinheit der anderen Hydrogenasen und enthält mit dem Selenocystein einen Liganden des aktiven Zentrums. Deletionsversuche haben gezeigt, daß diese Untereinheit essentiell für *M. voltae* zu sein scheint. Alle Mutanten, die durch den Versuch eines Genaustausches unter Verlust von *vhuU* erhalten wurden, tragen sowohl die Deletion als auch das intakte Gen (Pfeiffer et al., 1998b).

Die Gengruppen der selenfreien Hydrogenasen *frc* und *vhc* werden aus einer gemeinsamen intergenen Region von 453 Basenpaaren transkribiert (Abbildung 4). Ihre Transkripte wurden nur nach Selenentzug detektiert. Die Transkription der selenhaltigen Hydrogenasen findet hingegen konstitutiv statt (Berghöfer et al., 1994). Die Promotorfusion der intergenen Region in beiden Transkriptionsrichtungen an das Gen für die β -Glucuronidase (*uidA*) aus *Escherichia coli* zeigte, daß alle cis-Elemente die für die negative Regulation benötigt werden in dieser Region liegen (Beneke et al., 1995).

```

1  CACATTTTCACCTCATTAGATAATCTAATATAGTCAATAGGTATTCTAATTTCTCATATG
   GTGTAAAAGTGGAGTAATCTATTAGATTATATCAGTTATCCATAAGATTAAGAGTAATAC
                                     ↑
61  TCTATAATGCTAACTAATATATATAATAACAATTTTTAAATCGAAATCAAAAGGTTTATAT
   AGATATTACGATTGATTATATATATTATGTTAAAAATTTAGCTTTAGTTTTCCAAATATA

121  AGAAAATTTTAAAGACATTATATTGAATTATTAATATGGTTAATAATATTTCTAATATCT
   TCTTTTAAAATTTCTGTAATATAACTTAATAATTATACCAATTATTATAAAGATTATAGA

181  ATTAAATAAAGAAATACCATATTAGATTTTTTAAATATATATTTAAATGTTTACTGATATG
   TAATTTATTTCTTTATGGTATAATCTAAAAAATTATATATAAAATTTACAAATGACTATAC

241  TGAATTGTTTATTTTAAATTACAAAATAAAAACTAAACATCTATATAAACACATAATTGA
   ACTTAACAAATAAAATTTAATGTTTTATTTTTGATTTGTAGATATATTTGTGTATTAAC

301  CTAATTTGTGACTTTTAAATAAAAAATATCTGTAAAAAATTCCTAATAACTTAAACTACCG
   GATTAAACACTGAAAATTTATTTTTATAGACATTTTTTAAAGAATTATTGAATTTGATGGC
                                     ↓
361  ATAAATACTAGTTAAATTAAAATATAATAAACTAAAATGACTAATGACTAATGACTAAAT
   TATTTATGATCAATTTAATTTTATATTATTTGATTTTACTGATTACTGATTACTGATTTA

421  AAAATACTAATTGTGGCTTAACAAATAGGTGATTTAATG
   TTTTATGATTAACACCGAATTGTTTATCCACTAAATTAC

```

Abbildung 4: Sequenz der intergenen Region zwischen den Gengruppen *vhc* und *frc*. Die Startcodons der beiden Gengruppen sind fett und kursiv hervorgehoben: GTG für die *vhc*-Gengruppe und ATG für die *frc*-Gengruppe. Die Shine-Dalgarno Sequenzen sind unterstrichen. Die Pfeile weisen auf den Transkriptionsstart hin (Müller, 1996). Die TATA-Boxen sind kursiv gedruckt und grau hinterlegt. Orange hinterlegt ist die dreimalige Wiederholung einer auffälligen Heptamersequenz, die den Initiator der *frc*-Gengruppe überlappt.

Weitere Untersuchungen führten zur Entdeckung zweier an der negativen Regulation beteiligter Sequenzbereiche in der intergenen Region. Überlappend mit dem Initiatorelement der *frc*-Gengruppe findet sich eine dreifache Wiederholung einer Heptamersequenz. Mutationen innerhalb dieser Sequenz führen zu einer schwachen Expression der

β -Glucuronidase auch in Anwesenheit von Selen im Medium. Die Deletion eines 63 Basenpaare großen Fragments innerhalb der intergenen Region (Pos. 174-236 in Abbildung 4) führt zur kompletten Aufhebung der negativen Regulation in Anwesenheit von Selen (Noll, 1999).

Eine mögliche Beteiligung der sehr kleinen Untereinheit *vhuU* an der negativen Regulation als Selensensor und Korepressor konnte nicht nachgewiesen werden (Pfeiffer et al., 1998a).

Die Expression von Hydrogenasen wird in verschiedenen Organismen durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Sie werden sowohl metallabhängig, redoxabhängig, wasserstoffabhängig als auch wachstumsphasenabhängig reguliert.

Die Regulation der Hydrogenaseexpression ist besonders in Eubakterien gut untersucht. So werden die Hydrogenasen 1 und 2 (Hya und Hyb) in *E. coli* bei anaerobem Wachstum durch ArcA induziert. Bei Anwesenheit von Nitrat wird ihre Transkription durch die Zwei-Komponenten-Systeme NarL/NarX bzw. NarP/NarQ reprimiert (Richard et al., 1999). In *Ralstonia eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus* H16) wurde eine Sensorhydrogenase HoxBC entdeckt, die zusammen mit einer Histidinkinase HoxJ und dem Transkriptionsaktivator HoxA die wasserstoffabhängige Regulation der Hydrogenasen steuert (Lenz et al., 1997). In *Rhodobacter capsulatus* wurde ebenfalls eine wasserstoffabhängige Regulation der Hydrogenase HupSL durch den Aktivator HupR gefunden (Dischert et al., 1999). Im selben Organismus wurde eine negative Regulation der Hydrogenaseexpression durch das RegA/B-Zweikomponentensystem gefunden (Elsen et al., 2000).

In Archaea konnte eine wasserstoffabhängige Regulation für die Hydrogenasen aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H gezeigt werden (Reeve et al., 1997). Für die Hydrogenasen aus *Methanothermobacter marburgensis* (früher *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg) wurde eine Nickel-abhängige Regulation demonstriert (Afting et al., 1998). Nach Limitierung von Nickel

wurde ein Verlust der Aktivität der F₄₂₀-reduzierenden und eine Reduktion der Aktivität der F₄₂₀-nichtreduzierenden Hydrogenase bei gleichzeitiger Induktion der metallfreien Hydrogenasen gemessen.

Neben den Hydrogenasen unterliegen auch andere an der Methanogenese beteiligte Gengruppen einer strengen Transkriptionskontrolle. Die Transkription einzelner Gene ist sowohl wachstumsphasenabhängig als auch substratabhängig reguliert (Sowers, 1993; Morgan et al., 1996; Nölling und Reeve, 1996). In *Methanothermobacter marburgensis* wurde außerdem eine metallabhängige Regulation der Hydrogenasen und der Formylmethanofuran-Dehydrogenasen (Hochheimer et al., 1996) beobachtet.

Eine selenabhängige Regulation konnte bisher außer in *M. voltae* nur für die Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *Methanopyrus kandleri* (Vorholt et al., 1997) gezeigt werden. Für das methanogene Archaeon *Methanococcus vannielii* läßt sich eine solche Regulation postulieren, da in diesem Organismus eine selenhaltige und eine selenfreie Form der Formiat-Dehydrogenase gefunden wurden (Jones und Stadtman, 1981). Über den Mechanismus und die an der Regulation beteiligten Proteine in Archaea ist noch sehr wenig bekannt. Nur einige regulierte Promotoren und Regulatorproteine sind charakterisiert (Voorhorst et al., 1999; Hochheimer et al., 1999). Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um negative Regulation (Cohen-Kupiec et al., 1997; Cohen-Kupiec et al., 1998; Chien et al., 1998).

Positive Regulation und die daran beteiligten Regulatorproteine wurde in Archaea erst in zwei Fällen beschrieben (Shand und Betlach, 1991; Krüger et al., 1998).

Mechanismen der Regulation in Archaea wurden bisher ausschließlich für Repressorproteine untersucht. Der metallabhängige Repressor Mdr1 aus *Archaeoglobus fulgidus* verhindert die Rekrutierung der RNA-Polymerase (Bell et al., 1999b), wohingegen der Lrs14 Repressor aus *Sulfolobus solfataricus* die Promotorerkennung durch TBP verhindert (Napoli et al., 1999; Bell et al., 2000).

Eine vergleichende Analyse der vorhandenen Genomsequenzen von *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Pyrococcus horikoshii* (Bult et al., 1996; Smith et al., 1997; Klenk et al., 1997; Kawarabayasi et al., 1998) zeigt, daß ein Großteil der in diesen Genomen vorhandenen möglichen DNA-bindenden Proteine zur Klasse der Helix-Turn-Helix-Proteine (HTH-Proteine) gehören (Aravind und Koonin, 1999). Die Homologien der DNA-Bindedomäne zu eubakteriellen HTH-Bindedomänen ist hierbei größer als zu denen der Eukarya. Auch die bisher bekannten Regulatorproteine aus Archaea zeigen, ganz im Gegensatz zur basalen Transkriptionsmaschinerie, eine höhere Homologie zu bakteriellen Regulatoren (Bell et al., 1999b). Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Transkriptionsregulation der selenfreien Hydrogenasen und die Identifizierung daran beteiligter Regulatorproteine.

4 MATERIALIEN

4.1 Feinchemikalien

Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

ProtoGel™ Acrylamid:Bisacrylamid 37.5:1 in H ₂ O	Biozym (Hess. Oldendorf)
Sequagel XR	Biozym (Hess. Oldendorf)
Sequalgel Complete, Puffer Reagens	Biozym (Hess. Oldendorf)
GTG Agarose	Sigma (Deisenhofen)

4.2 Biochemikalien

poly[d(I-C)]	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteingrößenstandard (6.5 kD - 172 kD)	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
DNA Größenstandards	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
RNA Größenstandards	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DOTAP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Escort™ Transfektionsreagenz (DOTAP:DOPE 1:1)	Sigma (Deisenhofen)
Leupeptin	Serva (Heidelberg)
Pepstatin A	Serva (Heidelberg)
Pefabloc	Serva (Heidelberg)
Puromycindihydrochlorid	ICN (Eschwege)
Vancomycinhydrochlorid	ICN (Eschwege)
Ampicillin Natriumsalz	BIOMOL (Hamburg)
p-Nitrophenylglucuronid (pNPG)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Difco Bacto Agar	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
RNase Block	Stratagene (Amsterdam, NL)

4.3 Gase

Gase wurden bei der Firma Messer Griesheim (Darmstadt) bezogen.

Gasgemisch CO₂/H₂ (20%/80%; Reinheit 4.5, 3.0)

Gasgemisch N₂/CO₂/H₂ (75%/20%/5%; Reinheit 4.3, 4.5, 4.6)

Formiergas N₂/H₂ (95%/5%; Reinheit 4.6, 3.0)

Stickstoff (Reinheit 4.6)

Schwefelwasserstoff (Reinheit 99.3%)

4.4 Kits, Konzentratoren und Schleudersäulen

Innerhalb dieser Arbeit wurden die folgenden Kits sowie Konzentratoren und Schleudersäulen zur Aufreinigung von Nukleinsäuren und Proteinen sowie zur Sequenzierung benutzt:

Centricon[®] Plus-20, Centricon[®]-10 und Minicon-10 Mikrokonzentratoren, Amicon (Witten)

ECL Western Blotting Detection Kit, Amersham (Braunschweig)

Mobispin S200 Sephacrylsäulen, Mobitec (Göttingen)

Nucleobond[®] -Plasmid Kit, Machery & Nagel (Düren)

Proteinbestimmungsreagenz, Biorad (München)

QIAamp Blood and Tissue Kit, Qiagen (Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen (Hilden)

QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden)

RNA-Clean, AGS (Heidelberg)

Thermosequenase Flourescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham (Braunschweig)

TOPO-TA Cloning Kit, Invitrogen (Groningen, NL)

4.5 Oligonukleotide

5'-Infrarotfarbstoff-markierte Oligonukleotide für die Sequenzierung wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Alle anderen Oligonukleotide wurden entweder bei MWG Biotech (Ebersberg) oder bei Interactiva (Ulm) hergestellt.

Name	Sequenz	Kommentar
affioligo53	5'-ATA TAA TGT CTT TAA AAT TTT CTA TAT AAA CCT TTT GAT TTC GAT TTA AAA TAT AAT GTC TTT AAA ATT TTC TAT ATA AAC CTT TTG ATT TCG ATT TAA A-3'	5'-Biotin Herstellung der spezifischen DNA zur Kopplung an Streptavidin-Sepharose
affioligo35	5'-TTT AAA TCG AAA TCA AAA GGT TTA TAT AGA AAA TTT TAA AGA CAT TAT ATT TTA AAT CGA AAT CAA AAG GTT TAT ATA GAA AAT TTT AAA GAC ATT ATA T-3'	Herstellung der spezifischen DNA zur Kopplung an die Streptavidin-Sepharose
Naktivator53	5'-GTC TTT AAA ATT TTC TAT ATA AAC CTT TTG ATT TCG ATT TGT CTT TAA AAT TTT CTA TAT AAA CCT TTT GAT TTC GAT TT-3'	5'-C6-MMT (Aminolinker) Herstellung der spezifischen DNA zur Kopplung an NHS- Sepharose
aktivator35	5'-AAA TCG AAA TCA AAA GGT TTA TAT AGA AAA TTT TAA AGA CAA ATC GAA ATC AAA AGG TTT ATA TAG AAA ATT TTA AAG AC-3'	Herstellung der spezifischen DNA zur Kopplung an NHS- Sepharose
frcmut-fwd	5'-CTA AAC AGA TAG AGA ACA ACA TAA TTG ACT AAT TTG TGA C-3'	Mutagenese des <i>frc</i> - proximalen Aktivator- elements
frcmut-rev	5'-GTC ACA AAT TAG TCA ATT ATG TTG TTC TCT ATC TGT TTA G-3'	Mutagenese des <i>frc</i> - proximalen Aktivator- elements
guster- Sau96-fwd	5'-CTG GAT TGG GGC CAA CTC CTA CC-3'	Amplifikation des <i>uidA</i> -Gens (C-Terminus) mit dem <i>mcr</i> - Terminator aus Mipfgt
tergus-BspE- rev	5'-ATT CGA GTC CGG AAC CCC CAG TG-3'	Amplifikation des <i>uidA</i> -Gens (C-Terminus) mit dem <i>mcr</i> - Terminator aus Mipfgt
IR-ClaI	5'-AGT GTG TCA GCC ATC GAT TCA CCT C-3'	Amplifikation der intergenen Region
IR-NsiI	5'-TTT CCC ATG CAT TAA ATC ACC TAT TTG TTA AGC-3'	Amplifikation der intergenen Region
IRftov-Nde- fwd	5'-AGT ACT TCA TAT GTT CAC CTC ATT AG-3'	Drehen der intergenen Region von <i>frc</i> - in <i>vhc</i> - Transkriptionsrichtung
IRftov-Xho- rev	5'-GAC GTA ACT CGA GAT CAC CTA TTT G-3'	Drehen der intergenen Region von <i>frc</i> - in <i>vhc</i> - Transkriptionsrichtung
IRvtof-Nde- fwd	5'-AGT ACT TCA TAT GAT CAC CTA TTT G-3'	Drehen der intergenen Region von <i>vhc</i> - in <i>frc</i> - Transkriptionsrichtung

Name	Sequenz	Kommentar
IRvtof-Xho-rev	5'-GAC GTA ACT CGA GTT CAC CTC ATT AG-3'	Drehen der intergenen Region von <i>vhc</i> - in <i>frc</i> -Transkriptionsrichtung
komp53	5'-ATA TAA TGT CTT TAA AAT TTG ATA GAG AAC ACT TTT GAT TTC GAT TTA AAA TAT AAT GTC TTT AAA ATT TGA TAG AGA ACA CTT TTG ATT TCG ATT TAA A-3'	Herstellung der Kompetitor-DNA für die Affinitätschromatographie
komp35	5'-TTT AAA TCG AAA TCA AAA GTG TTC TCT ATC AAA TTT TAA AGA CAT TAT ATT TTA AAT CGA AAT CAA AAG TGT TCT CTA TCA AAT TTT AAA GAC ATT ATA T-3'	Herstellung der Kompetitor-DNA für die Affinitätschromatographie
mut-fwd	5'-GTC TTT AAA ATT TGA TAG AGA ACA CTT TTG ATT TCG-3'	Mutagenese des <i>vhc</i> -proximalen Aktivator-elements
mut-rev	5'-CGA AAT CAA AAG TGT TCT CTA TCA AAT TTT AAA GAC-3'	Mutagenese des <i>vhc</i> -proximalen Aktivator-elements
m13reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'	5'-IRD800 Sequenzierungsprimer
pac-BspH-fwd	5'-GAC CTT TCA TGA CCG AGT ACA AGC C-3'	Amplifikation des <i>pac</i> -Gens (N-Terminus) mit <i>mcr</i> -Terminator aus Mipfgt
pac-BstE-rev	5'-AGT TCT TGC AGC TCG GTG ACC C-3'	Amplifikation des <i>pac</i> -Gens (N-Terminus) mit <i>mcr</i> -Terminator aus Mipfgt
Pmcr-Acc-fwd	5'-TAG TAG TAG GTA TAC AAA AAC GCC C-3'	Amplifikation des <i>mcr</i> -Promotors aus Mipfgt
Pmcr-Nco-rev	5'-ACT TTA CCA TGG GAA TCA CTC C-3'	Amplifikation des <i>mcr</i> -Promotors aus Mipfgt
pSL-lacZ'	5'-TTG TAA AAC GAC GGC CAG TGC C-3'	5'-IRD800 Sequenzierungsprimer für Plasmide auf Basis von pSL1180
shift-fakt53	5'-AAT AAA AAC TAA ACA TCT ATA TAA ACA CAT AAT TGA CTA AT-3'	Herstellung der <i>frc</i> -spezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
shift-fakt35	5'-ATT AGT CAA TTA TGT GTT TAT ATA GAT GTT TAG TTT TTA TT-3'	Herstellung der <i>frc</i> -spezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
shift-vakt53	5'-AAT GTC TTT AAA ATT TTC TAT ATA AAC CTT TTG ATT TCG ATT-3'	Herstellung der <i>vhc</i> -spezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
shift-vakt35	5'-AAT CGA AAT CAA AAG GTT TAT ATA GAA AAT TTT AAA GAC ATT-3'	Herstellung der <i>vhc</i> -spezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
shift-vmut53	5'-AAT GTC TTT AAA ATT TGA TAG AGA ACA CTT TTG ATT TCG ATT-3'	Herstellung der mutierten <i>vhc</i> -spezifischen DNA für Gelretardationsexperimente

Name	Sequenz	Kommentar
shift-vmut35	5'-AAT CGA AAT CAA AAG TGT TCT CTA TCA AAT TTT AAA GAC ATT-3'	Herstellung der mutierten <i>vhc</i> -spezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
shift-us53	5'-AAT GTC TTT AAA ATT TCG CGC GCG CGC CTT TTG ATT TCG ATT-3'	Herstellung der unspezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
shift-us35	5'-AAT CGA AAT CAA AAG GCG CGC GCG CGA AAT TTT AAA GAC ATT-3'	Herstellung der unspezifischen DNA für Gelretardationsexperimente
SM0R	5'-GGC TTT CTT GTA ACG CGC-3'	Amplifikation der intergenen Region
SM1R	5'-GAT CAA TTC CAC AGT TTT CGC G-3'	Amplifikation der intergenen Region
uida61	5'-ATG CCC ACA GGC CGT CGA G-3'	5'-IRD800 Sequenzierungsprimer für Konstrukte mit <i>uidA</i> -Gen
vhc-Mlu-rev	5'-TTT TTT TTA CGC GTT TCA CCT CAT TAG-3'	Amplifikation der intergenen Region
WPfrc-fwd	5'-TAT GTG AAT TCT TTA TTT TAA AAT TAC-3'	Amplifikation des <i>frc</i> -proximalen Teils der intergenen Region
WPvhc-fwd	5'-AAA TAA AGA ATT CAC ATA TCA GTA AAC-3'	Amplifikation des <i>vhc</i> -proximalen Teils der intergenen Region

4.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen. T4 DNA Ligase wurde von Roche Diagnostics (Mannheim) und von New England Biolabs bezogen.

Taq DNA Polymerase wurde von GibcoBRL Lifetechnologies (Karlsruhe) sowie Eppendorf (Hamburg) gekauft.

Vent Polymerase, Klenow Polymerase (exo⁻) und T4 Polynukleotidkinase wurden von New England Biolabs bezogen.

4.7 Membranen

Es wurden die aufgeführten Membranen für den Transfer von Nukleinsäuren und Proteinen benutzt:

ProBlott PVDF-Membran, Applied Biosystems (Weiterstadt)

Nitrocellulose, Schleicher & Schuell (Dassel)

Nylonmembran Roti Nylon plus, Roth (Karlsruhe)

4.8 Chromatographie

Für die in der Arbeit durchgeführte Affinitätschromatographie wurden folgende Materialien verwendet:

FPLC	Amersham Pharmacia (Freiburg)
FPLC 650E	Waters (Eschborn)
Chromatographiesäule XK 16/20	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Chromatographiesäule Econocolumn	Biorad (München)
Heparin Sepharose CL-6B	Amersham Pharmacia (Freiburg)
N-Hydroxysuccinimid aktivierte Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Streptavidin Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia (Freiburg)

4.9 Sonstige Materialien

Spritzen und Kanülen, B. Braun (Melsungen)

Mikrotiterplatten Maxisorp F16, Nunc (Wiesbaden)

Röntgenfilm X-OMAT/AR, Kodak (Rochester, USA)

4.10 Geräte

Anaerobenzelt, Coy Laboratories (Ann Arbor, USA)

Beckmann Ultrazentrifuge, Beckmann (München) und Rotor 55.2TI

Gelkammer Mini-Protean II, Bio-Rad (München)

Hermle Kühlzentrifuge und Rotoren A 6.14 sowie A 8.24

Mikrotiterplatten-Photometer E-max, Molecular Devices (MWG, Ebersberg)

Sequencer 4000L, Licor (MWG, Ebersberg)

Thermocycler Personal Cycler, Biometra (München)

Transfer-Apparatur Trans-Blot SD, Bio-Rad (München)

UV-VIS Spektrophotometer, Pharmacia (Freiburg)

UV Stratalinker 2400, Stratagene (Amsterdam)

Scintillationszähler TriCarb 1900 CA, Canberra Packard (Frankfurt)

4.11 Software

Datenanalyse Software Origin 4.1, Microcal

Bildanalyse ImageJ 1.19, National Institute of Health

Plasmidzeichenprogramm Plasmid Map Enhancer, Scientific & Educational Software

PDB-File Viewer SwissPDB 3.6, Glaxo Wellcome Experimental Research (Expasy)

VectorNTI Viewer 4.01, InforMax Inc.

4.12 Verwendete Stämme von *E. coli* und *M. voltae*

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17 recA1 relA1 supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argFV169) Φ80lacZΔM15 F⁻</i>	Hanahan, D. (1983)
<i>E. coli</i> XL1	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene (Heidelberg)
<i>M. voltae</i> PS DSM 1537		Deutsche Stammsammlung (Braunschweig)
<i>M. voltae</i> fgt	Pur ^r uidA ⁺	Beneke (1994)
<i>M. voltae</i> vgt	Pur ^r uidA ⁺	Beneke (1994)
<i>M. voltae</i> WPvhc	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> WPfrc	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> WPvm	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRf	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>M. voltae</i> IRv	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRfmvm	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRvmfm	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRfmv	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRvmf	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRfvm	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> IRvfm	Pur ^r uidA ⁺	diese Arbeit

4.13 Nährmedien

4.13.1 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Soweit nicht anders vermerkt wurde zur Herstellung von Medien für *E. coli* Standard I Nährboullion der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Für Platten wurde dem Medium 1.5 % Agar zugegeben.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde GYT-Medium verwendet:

GYT Medium (Tung, W.L. und Chow K. (1995))

0.125 % (w/v) Hefeextrakt

0.25 % (w/v) Trypticase Pepton

in 10 % Glycerin

4.13.2 Aminosäuremedium für *Methanococcus voltae*

2x Lösung A (pro Liter)		50x Lösung B (pro Liter)	
NaCl	40 g	Nitriloessigsäure	750 mg
NaCH ₃ COO	4.1 g	MnSO ₄ · 2 H ₂ O	250 mg
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5.6 g	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	50 mg
KCl	0.68 g	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	50 mg
NH ₄ Cl	0.5 g	NiCl · 6 H ₂ O	45.8 mg
K ₂ HPO ₄	0.35 g	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	4.5 mg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.44 g	H ₃ BO ₄	5 mg
		AlCl ₃ · 6 H ₂ O	4.1 mg
		NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	5 mg

Die Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt und autoklaviert.

	für 100 ml:
Histidin-Lösung (15 mg/ml)	1.5 g Histidin
Na₂S-Lösung (2.5%)	2.5 g Na ₂ S
FeCl₃-Lösung (2.7 mM)	72 mg FeCl ₃ · 6 H ₂ O
Na₂SeO₃-Lösung (1 mM)	27 mg Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O

Die Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt und sterilfiltriert. Die Histidin- und Na₂S-Lösungen wurden unter Stickstoffatmosphäre gelagert.

AS1	AS2	AS3	AS4
10 mg Asparagin	10 mg Alanin	10 mg Arginin	10 mg Prolin
10 mg Aspartat	10 mg Glycin	10 mg Lysin	10 mg Phenylalanin
10 mg Glutamin	10 mg Isoleucin	10 mg Serin	10 mg Tyrosin
10 mg Glutamat	10 mg Leucin	10 mg Threonin	25 mg Tryptophan
	10 mg Valin		
	ad pH 7.0		ad pH 10.5

Die Aminosäuregemische wurden in jeweils 10 ml MilliQ-Wasser aufgenommen und sterilfiltriert.

1000x Vitaminlösung (1 Liter)	
Biotin	20 mg
Folat	20 mg
Pyridoxinhydrochlorid	100 mg
Thiaminhydrochlorid	50 mg
Riboflavin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Liponsäure	50 mg
Panθοthenat	500 mg
Vitamin B12	5 mg

Die Lösung wurde in eine dunkle Flasche sterilfiltriert.

Antibiotika-Stammlösungen:

10 mg/ml Vancomycinhydrochlorid

1 mg/ml Puromycindihydrochlorid

jeweils in MilliQ-Wasser gelöst und in Kulturflaschen unter N₂-Atmosphäre gelagert.

Table 1: Aminosäuremedium (pro Liter)

500 ml 2x Lösung A	je 10 ml der Aminosäuregemische AS1, AS2, AS3, AS4
20 ml 50x Lösung B	1 ml Vitaminlösung
6 ml FeCl ₃ -Lösung	1 mg Resazurin
mit MilliQ-Wasser auf 1 Liter	

Das Medium wurde unter Stickstoffbegasung aufgeköcht und in eine Flasche mit 1 g Cystein und 3 g NaHCO₃ gefüllt. Nach verschließen mit einem Septum wurde ein Gasaustausch mit einem Gemisch aus CO₂/H₂ (20%/80%) vorgenommen. Das Medium wurde im Anaerobenzelt in einer N₂/H₂ (95%/5%) Atmosphäre in Kulturflaschen abgefüllt und nach

Verschließen mit Septumkappen autoklaviert. Zuletzt wurde die Gasatmosphäre gegen 1.4 bar CO₂/H₂-Gasgemisch (20%/80%) ausgetauscht.

Vor dem Inokulieren des Mediums wurden pro 10 ml Medium zugesetzt: 100 µl Histidin-Lösung, 100 µl 2.5% Na₂S-Lösung sowie 100 µl Vancomycin-Lösung.

Zur Anzucht mit Selen wurde dem Medium 100 µl Na₂SeO₃-Lösung pro 10 ml Medium (Endkonzentration 10 µM) zugegeben.

Transformanten wurden zusätzlich mit 100 µl Puromycin-Lösung je 10 ml Medium (Endkonzentration 10 µg/ml) inokuliert.

Zur Plattierung von *M. voltae* wurde dem Medium 1.2% Bacto Agar (Difco) zugesetzt.

4.14 Plasmide

Alle zur Transformation von *Methanococcus voltae* verwendeten Plasmide sind Integrationsvektoren. Die homologe Rekombination in das Genom von *M. voltae* erfolgt über den *hisA'*-Anteil des Vektors in das *hisA*-Gen.

Mipfgt: Das Plasmid wurde von Izabela Noll (1999) aus dem Plasmid Mip Δ lac-fgt (Beneke et al., 1995) durch Mutation eines internen *Nde* I Schnittes innerhalb der intergenen Region hergestellt (Abbildung 5).

Mipvgt: Das Plasmid wurde ebenfalls von Izabela Noll (1999) aus der fgt-Variante durch Drehen der intergenen Region erhalten (Abbildung 6).

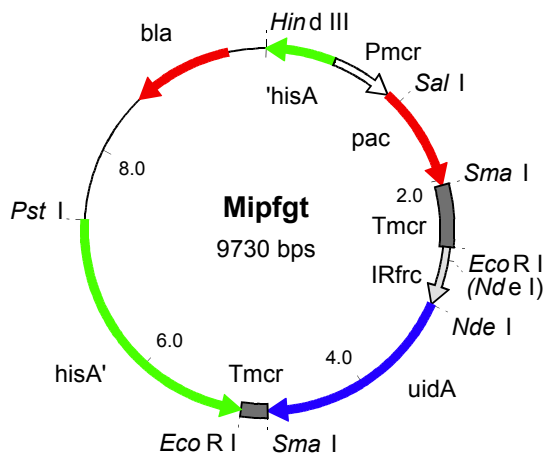


Abbildung 5: **Plasmid Mipfgt**: *bla* Ampicillin-Resistenz; T_{mcr} Terminator der Methyl-CoM-Reduktase aus *M. voltae*; *uidA* β -Glucuronidasegen aus *E.coli*; *pac* Puromycintransacetylase aus *S. alboniger*; *hisA* Isomerase aus *M. voltae*; *IRfrc* intergene Region in *frc*-Transkriptionsrichtung.

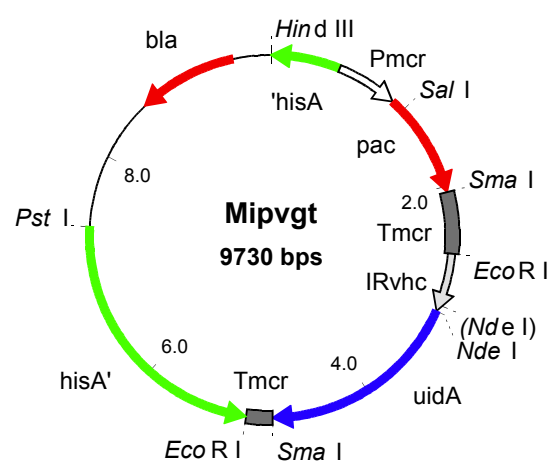


Abbildung 6: **Plasmid Mipvgt**: *bla* Ampicillin-Resistenz; T_{mcr} Terminator der Methyl-CoM-Reduktase aus *M. voltae*; *uidA* β -Glucuronidasegen aus *E.coli*; *pac* Puromycintransacetylase aus *S. alboniger*; *hisA* Isomerase aus *M. voltae*; *IRvhc* intergene Region in *vhc*-Transkriptionsrichtung.

MipWPF (diese Arbeit, Abbildung 7): Das Plasmid wurde aus Mipvgt durch Austausch der intergenen Region mit dem isolierten *frc*-Promotor erhalten. Dieser isolierte Promotor besteht aus dem 212 bp großen *frc*-proximalen Teil der intergenen Region. Der Austausch erfolgte mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoR I* und *Nde I*.

MipWPv (diese Arbeit, Abbildung 7): Das Plasmid wurde aus Mipvgt durch Austausch der intergenen Region mit dem isolierten *vhc*-Promotor erhalten. Dieser isolierte Promotor besteht aus dem 242 bp großen *vhc*-proximalen Teil der intergenen Region. Der Austausch erfolgte mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoR I* und *Nde I*.

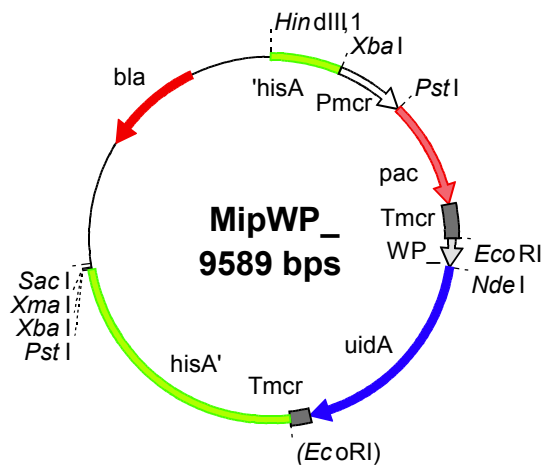


Abbildung 7: Plasmidkarte der Vektoren **MipWPf** und **MipWPv**. *bla* Ampicillin-Resistenz; T_{mcr} Terminator der Methyl-CoM-Reduktase aus *M. voltae*; *uidA* β -Glucuronidasegen aus *E. coli*; *pac* Puromycintransacetylase aus *S. alboniger*; *hisA* Isomerase aus *M. voltae*; WPf *frc*-proximale intergene Region in *frc*-Transkriptionsrichtung; WPv *vhc*-proximale intergene Region in *vhc*-Transkriptionsrichtung

pINT (diese Arbeit, Abbildung 8): Integrationsvektor für *M. voltae*.

Basierend auf pSL1180 (Brosius, 1989) wurde dieser Vektor als Ersatz für die bisherigen Mip-Konstrukte aufgebaut. Er enthält eine direkte Promotor-Genfusion des *mcr*-Promotors aus *M. voltae* mit dem *pac*-Gen aus *S. alboniger*.

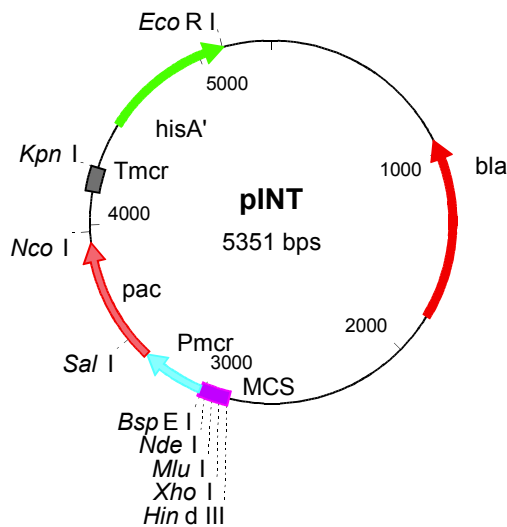


Abbildung 8: **Plasmid pINT**: *bla* Ampicillinresistenz; MCS Multiple Klonierungsstelle; P_{mcr} Promotor der Methyl-CoM-Reduktase aus *M. voltae*; T_{mcr} Terminator der Methyl-CoM-Reduktase aus *M. voltae*; *pac* Puromycintransacetylase aus *S. alboniger*; *hisA'* N-Terminus einer Isomerase aus *M. voltae*.

pIRfmvm (diese Arbeit, Abbildung 9): Das Reportergen *uidA* aus *E. coli* wurde zusammen mit der mutierten intergenen Region über die Schnitte *Mlu* I und *BspE* I in pINT kloniert um die Auswirkungen der Mutation der beiden Aktivatorbindestellen auf die Expression der β -Glucuronidase zu testen. Die intergene Region ist dabei in *frc* Richtung an das *uidA*-Gen fusioniert.

pIRvmfm (diese Arbeit, Abbildung 10): Dieses Plasmid wurde aus pIRfmvm durch Klonierung der in beiden Aktivatorbindestellen mutierten intergenen Region in *vhc*-Richtung über *Xho* I und *Nde* I vor das *uidA*-Gen erhalten.

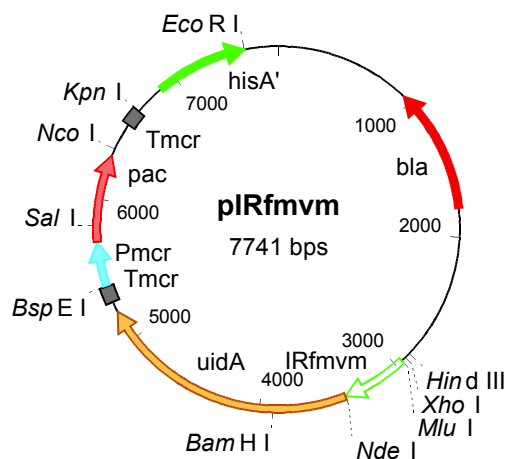


Abbildung 9: **Plasmid pIRfvmv**: Zusätzlich zu den Komponenten in pINT enthält dieser Vektor noch das Gen für die β -Glucuronidase (*uidA*) aus *E. coli*, sowie die in beiden Aktivatorelementen mutierte intergene Region in *frc*-Transkriptionsrichtung vor dem *uidA*-Gen.

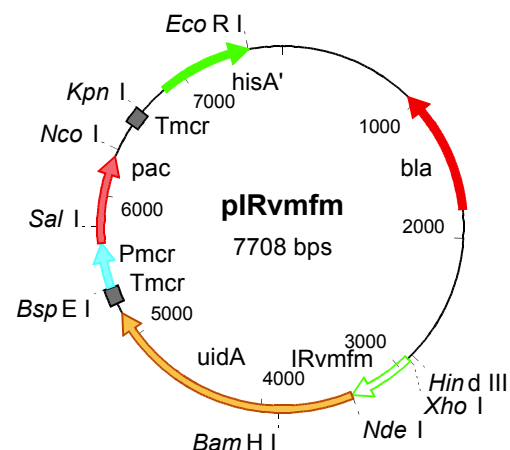


Abbildung 10: **Plasmid pIRvmfm**: Die im Vektor enthaltenen Komponenten entsprechen denen des Plasmides pIRfvmv. Die in beiden Aktivatorboxen mutierte intergene Region ist in *vhc*-Transkriptionsrichtung an das *uidA*-Gen fusioniert.

pIRf und **pIRv** (diese Arbeit): Die Plasmide enthalten die unmutierte intergene Region in *frc*- (pIRf) und *vhc*-Richtung (pIRv). Sie wurden aus pIRvmfm durch Austausch der dort vorhandenen intergenen Region mit der entsprechenden unmutierten IR aus Mipfgt bzw. Mipvgt über *Xho* I und *Nde* I erhalten.

pIRfvmv (diese Arbeit): Das Plasmid enthält die intergene Region in *frc*-Richtung vor dem *uidA*-Gen. Die *frc*-proximale Aktivatorbindestelle enthält Mutationen wohingegen die *frc*-distale Bindestelle die Wildtypsequenz hat. Die Klonierung erfolgte in pIRvmfm durch Austausch der dortigen IR über *Xho* I und *Nde* I.

pIRvmf (diese Arbeit): Dieses Plasmid enthält die intergene Region in *vhc*-Richtung, wobei die *vhc*-proximale Aktivatorbindestelle mutiert und die distale Bindestelle unmutiert sind. Die Klonierung erfolgte ebenfalls durch Austausch der in pIRvmfm enthaltenen Sequenz über *Xho* I und *Nde* I.

pIRfvm (diese Arbeit): Das Plasmid basiert auf pIRvmfm und wurde durch Austausch der intergenen Region in diesem Vektor mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xho* I und *Nde* I erhalten. Der neue Vektor enthält die in der *frc*-distalen Aktivatorbindestelle mutierte intergene Region in *frc*-Transkriptionsrichtung vor dem Gen der β -Glucuronidase.

pIRvfm (diese Arbeit): Der Vektor wurde aus pIRvmfm durch Ersatz der dort enthaltenen intergenen Region mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xho* I und *Nde* I erhalten. Die intergene Region ist in *vhc*-Transkriptionsrichtung vor das *uidA*-Gen kloniert und ist in der *vhc*-distalen Aktivatorbindestelle mutiert.

5 METHODEN

5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

(Birnboim und Doly, 1979)

5.1.1 Analytische Präparation

Tabelle 2: Lösungen für die Plasmidpräparation (nach Machery und Nagel, Düren)

Puffer S1	Puffer S2	Puffer S3
50 mM Tris/HCl (pH 8.0)	200 mM NaOH	2.80 M Kaliumacetat (pH 5.1)
10 mM EDTA	1% SDS	

Von einer frischen Übernachtskultur wurde 1 ml Kulturvolumen bei 15000 UPM für 1 min in einer Hettich Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Zellsediment wurde in 200 µl Puffer S1 resuspendiert und mit 1 µl RNase-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl des Puffers S2 wurde vorsichtig gemixt um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten und eine Freisetzung genomischer DNA zu vermeiden. Zuletzt wurde der Puffer S3 hinzugegeben, abermals vorsichtig gemixt und bei 15000 UPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol versetzt. Nach 15 min Zentrifugation bei 4°C und 15000 UPM wurde die gefällte Plasmid DNA mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals bei 4°C und 15000 UPM zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde abschließend in 50 µl 1 mM TRIS (pH 8.0) aufgenommen.

5.1.2 Präparative Plasmid-DNA Isolierung

Zur quantitativen Präparation von Plasmiden wurden Kulturen von 100 ml bis 200 ml inokuliert und über Nacht bei 37°C und 150 UPM auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte entweder mit dem Nucleobond®-Kit der Firma Macherey und Nagel (Düren) oder mit dem Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen (Hilden).

5.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Methanococcus voltae*

Die Präparation genomischer DNA aus *M. voltae* erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden). Hierzu wurden 1.5 ml einer Kultur mit einer Zelldichte von $0.8-1.0 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ für 5 min bei 15000 UPM in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und die Zellen durch Zugabe von 200 μl H₂O lysiert. Durch Behandlung mit 2 μl RNase (20 mg/ml) für 5 min bei RT wurden vorhandene RNAs entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Methanococcus voltae*

Zur Aufreinigung von RNA wurden alle benötigten Puffer und Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt und die verwendeten Materialien (Pipetten, Gelträger etc.) durch Erhitzen über Nacht bei 180°C RNase frei gemacht.

Zur Präparation der RNA wurde eine 10 ml Kultur von *M. voltae* bis in die späte exponentielle Wachstumsphase inkubiert. Bei einer Zelldichte von $0.8 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ wurde die Kultur im Ethanol-Trockeneisbad schnell gekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch 15 min Zentrifugation bei 5000 UPM in einem A8.24 Rotor mit einer Hermle Kühlzentrifuge sedimentiert und der

Überstand entfernt. Anschließend wurden sie in 1 ml RNA-Clean resuspendiert und mit 100 μ l Chloroform versetzt. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000 UPM in einer Hettich Tischzentrifuge wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reagiergefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Durch erneute Zentrifugation bei 15000 UPM für 15 min wurde die RNA gefällt und nach Abgießen des Isopropanols mit 100 μ l 70% Ethanol gewaschen. Nach einer abschließenden 15 min Zentrifugation bei 15000 UPM wurde die RNA im Vakuum getrocknet und zuletzt in 60 μ l DEPC-Wasser aufgenommen, dem 1 μ l RNase-block (Stratagene) zugegeben wurde.

5.4 Quantifizierung von DNA und RNA

(Ausubel et al., 2000)

Die Messung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte in einem UV/VIS-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht hierbei 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 25 μ g/ml einzelsträngiger DNA oder 33 μ g/ml RNA.

Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm (E_{260}/E_{280}) stellt ein Maß für die Reinheit der Präparation dar. Für DNA sollte der Quotient größer als 1.7 sein für RNA-Präparationen 2.0.

5.5 DNA-Gelelektrophorese

(Ausubel et al., 2000)

Tabelle 3: Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

10x DNA-Probenpuffer	20x TAE-Puffer (1 l)
50% Saccharose (w/v)	0.8 M TRIS (96.8 g)
1 mg/ml Bromphenolblau	Essigsäure (22.1 ml)
2 mg/ml Xylencyanol FF	20 mM EDTA (7.4 g Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O)
2 mg/ml Orange G	
1 mM EDTA	

Zur Auftrennung von DNA auf Agarosegelen wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0.7% (w/v) und 2% (w/v) Agarose verwendet. Fragmente kleiner als 150 Basenpaare wurden mittels 2% (w/v) GTG-Agarosegelen (niedrigschmelzende Agarose) aufgetrennt.

Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm durchgeführt, bis das Orange G aus dem Ladepuffer die untere Gelkante erreicht hat.

5.6 RNA-Gelelektrophorese

(Ausubel et al., 2000)

Tabelle 4: Puffer für die RNA-Gelelektrophorese

2x RNA-Probenpuffer (10 ml)	20x TAE-Puffer
1 ml 20x TAE-Puffer	Der TAE-Puffer wurde wie für die DNA-Elektrophorese angesetzt, es wurde jedoch DEPC-Wasser verwendet.
1.5 ml Formaldehyd (37%)	
4.1 ml Glycerin (98%)	
3.4 ml Formamid	
10 mg Bromphenolblau	

Die Puffer und Lösungen für die RNA-Gelelektrophorese wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Die Gelträger wurden über Nacht bei 160°C gebacken und die Elektrophoresekammer für 15 Minuten mit 10% H₂O₂ gespült. Nach Spülen der Kammer mit DEPC-Wasser wurde die Elektrophorese bei 8 V/cm durchgeführt. Die Proben wurden hierzu 5 min auf 95°C erhitzt und auf Eis gestellt. 15 µl der Probe wurden mit 15 µl Probenpuffer versetzt und für die Elektrophorese eingesetzt. Als Marker diente der RNA Leitermarker 'Broad Range' der Firma MBI Fermentas (Freiburg).

5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Die Polymerasekettenreaktion wurde in Ansätzen von 25 µl durchgeführt. Es wurde *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Lifetechnologies (Karlsruhe) oder Vent-DNA-Polymerase der Firma NEB Biolabs (Schwalbach/Taunus) eingesetzt.

Die Reaktion setzten sich wie folgt zusammen:

- 1 µl dNTPs (Endkonzentration 1 mM pro Nukleotid)
- 2 µl MgCl₂ (Endkonzentration 4 mM)
- 1-2 U der Polymerase
- 1-100 fmol der Template-DNA
- MilliQ-Wasser ad 25 µl.

Die Polymerase wurde erst nach Erhitzen der Reaktion auf 95°C in einem Biometra Personal Cycler zum Ansatz hinzupipettiert.

Die Berechnung der Anlagerungstemperatur der eingesetzten Primer erfolgte nach der Formel $T_m = 69.3 + 0.41 \cdot (\%GC) - 650 / L_{\text{Oligo}}$, L=Länge des Desoxyribonukleotids in Nukleotiden (Britten und Davidson, 1985; Anderson und Young, 1985). Für die Programmierung des Temperaturprofils wurden auf die Schmelztemperatur T_m noch 3°C addiert.

5.8 Ortsgerichtete Mutagenese durch Fusions-PCR

(Horton et al., 1993)

Die Einführung von Mutationen erfolgte durch die Erzeugung zweier unabhängiger PCR Produkte, die am 3'- bzw. 5'-Ende eine komplementäre Sequenz haben, welche die gewünschten Mutationen enthält. In einer zweiten PCR erfolgte dann die Fusion der beiden Fragmente mit Hilfe der

äußeren Primer (Abbildung 11). Der erste Schritt wurde mit *Taq*-Polymerase durchgeführt, wohingegen in der zweiten PCR ein proof-reading Enzym, meist Vent-Polymerase, eingesetzt wurde.

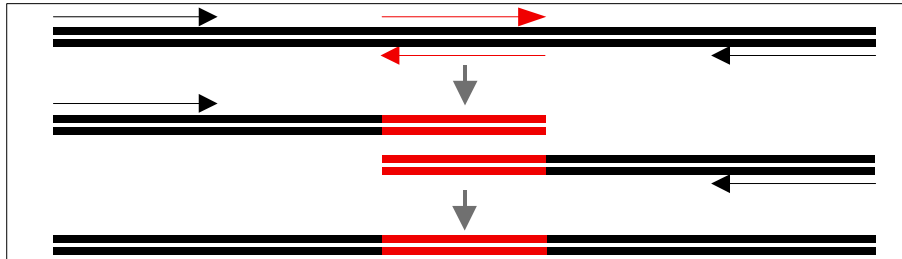


Abbildung 11: **Prinzip der Fusions-PCR:** Im ersten Schritt werden zwei Fragmente erzeugt, die an ihren Enden eine komplementäre Sequenz mit den gewünschten Mutationen enthaltenen. Im zweiten Schritt werden die Fragmente mit Hilfe der äusseren Primer fusioniert.

5.9 Radioaktive Markierung von DNA

(Feinberg und Vogelstein, 1983; Feinberg und Vogelstein, 1984; Ausubel et al., 2000)

5.9.1 Zufallsmarkierung von DNA:

20 ng der zu markierenden DNA wurden zur Denaturierung in 10 μ l Wasser 10 Minuten bei 95°C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 2 μ l Hexanukleotidmix (Roche Diagnostics) sowie 3 μ l einer 10 mM Lösung der Nukleotide dCTP, dGTP und dTTP hinzugegeben. Dieser Mix wurde mit Wasser auf 17 μ l aufgefüllt und nach Zugabe von 2 μ l 32 P markiertem α -dATP mit 1 μ l (2 U) Klenow-Polymerase versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

5.9.2 5'-Markierung von DNA:

Die für die Gelretardationsexperimente benötigten doppelsträngigen Oligodesoxyribonukleotide wurden mit T4 Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert. Zur Markierung wurde eine Verdünnung von 20 pmol/ μ l der DNA hergestellt.

Die Markierungsreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

20 pmol des Doppelstrangoligodesoxyribonukleotids (1 μ l)

2 μ l T4 Polynukleotidkinase 10x Puffer

14 μ l Wasser

2 μ l ^{32}P γ -dATP

1 μ l T4 Polynukleotidkinase (5 U)

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

5.9.3 Aufreinigung ^{32}P -markierter DNA

Die Aufreinigung der markierten DNA erfolgte über MoBiTec S200-Schleudersäulen. Hierzu wurden die Säulen nach Herstellerangaben bei 3000 UPM in einer Hereaus Tischzentrifuge gepackt. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf 100 μ l aufgefüllt und auf die Säulen aufgetragen. Nach 2 min Zentrifugation bei 3000 UPM in einer Hereaus Tischzentrifuge wurde der Durchfluß bei -20°C gelagert.

5.10 Alkalischer Transfer von RNA

(Chomczynski, 1992)

Der alkalische Transfer von RNA aus Agarosegelen erfolgte nach der Methode von Chomczynski. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 5 min in Transferlösung (3 M NaCl; 8 mM NaOH in Wasser) geschwenkt. Der anschließende Transfer erfolgte über einen Zeitraum von 1.5 Stunden. Die Membran wurde nach Abschluss des Transfers für zweimal je 2 min im UV Stratalinker mit UV Licht behandelt um die RNA an die Membran zu koppeln.

5.11 Methylenblau-Färbung von RNA

(Ausubel et al., 2000)

Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Nylonmembran nach der UV-Behandlung für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% Essigsäure und anschließend für 10 Minuten mit Methylenblau-Färbelösung (0.5 M Natriumacetat pH 5.2; 0.04% Methylenblau (w/v) in Wasser)

behandelt. Die gefärbte Membran wurde nun solange mit Wasser gespült, bis die Banden des Markers und der 16S bzw. 23S rRNA sichtbar wurden.

5.12 DNA-RNA-Hybridisierung

(Chomczynski, 1992; Ausubel et al., 2000)

Tabelle 5: Puffer für die Northern-Hybridisierung

Hybridisierungspuffer	Waschpuffer
0.5 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7.2)	0.1 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7.2)
7% SDS	1% SDS

Die Hybridisierung erfolgte mit 50 µl einer ³²P-markierten DNA-Sonde bei 65°C in 20 ml Hybridisierungspuffer über Nacht. Die Sonde wurde vorher durch 10 min Erhitzen auf 95°C und anschließendem Abkühlen auf Eis denaturiert. Die Membran wurde nach Abschluss der Hybridisierung zweimal für 15 Minuten mit 20 ml Waschpuffer bei 65°C gewaschen.

5.13 Sequenzierung von DNA

(Sanger et. al., 1977)

Die Sequenzierung von DNA erfolgte auf einem Licor DNA 4000L Sequencer. Für die Sequenzreaktionen wurde das Thermosequenzase Kit der Firma Amersham (Braunschweig) und IRD800-markierte Oligonukleotidprimer der Firma MWG (Ebersberg) benutzt. Hierzu wurden 0.5 µg DNA pro Kilobasenpaaren des zu sequenzierenden Fragments mit

2 pmol des Sequenzierprimers gemischt und mit Wasser auf 13 μ l aufgefüllt, jeweils 3 μ l dieser Mischung wurden zu 1 μ l der Reaktionsmixturen A, C, G und T gegeben.

Die Sequenzreaktionen wurden in einem Biometra Personal Cycler mit dem folgenden Programm durchgeführt:

- 1) 95°C, 2 min
- 2) 95°C, 20 s
- 3) T_{AN} , 20 s (T_{AN} =Anlagerungstemperatur des Sequenzierprimers)
- 4) 70°C, 30 s, zurück zu 2), 29 mal
- 5) 95°C, 20 s
- 6) 70°C, 30 s, zurück zu 5), 14 mal

Nach dem Ende des Programms wurden jeweils 3 μ l Stopplösung zu den Einzelreaktionen gegeben und anschließend 1-1.5 μ l der Reaktion auf ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

5.14 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

(Hanahan et al. 1991; Tung und Chow, 1995; Hengen, 1996)

400 ml Standard I Medium wurden mit 0.4 ml einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 150 UPM inkubiert. Bei einer optischen Dichte von $OD_{600}=0.7$ wurden die Zellen bei 4°C und 4000 UPM in einer Hermle Kühlzentrifuge mit dem Rotor A6.14 sedimentiert und das Medium entfernt.

Die Zellen wurden in 200 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen und abermals wie oben abzentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in 100 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und nochmals bei 4°C und 4000 UPM abzentrifugiert.

Zuletzt wurden sie in 2 ml eiskaltem GYT-Medium aufgenommen und in Aliquots von 100 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.15 Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

(Hanahan et al., 1991; Tung und Chow, 1995; Hengen, 1996)

50 μ l elektrokompenter Zellen wurden auf Eis mit 1-2 μ l des Ligationsansatzes gemischt und in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten, mit einem Elektrodenabstand von 2 mm, gegeben. Die Elektrotransformation erfolgte bei 2.5 kV, 200 Ohm und 25 μ F mit einem Genepulser von Biorad. Die Zeitkonstante betrug in der Regel zwischen 3.8 ms und 4.6 ms. Der Transformationsansatz wurde mit 700 μ l StdI-Medium versetzt und 30 min bei 37°C und 150 UPM auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50-250 μ l des Ansatzes auf Standard I-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.16 Kultivierung von *Methanococcus voltae*

(Whitman et al., 1982; Leheste, 1996)

Methanococcus voltae wurde strikt anaerob kultiviert (Robb et al., 1995). Sowohl zur Kultivierung des Wildtyps als auch zur Anzucht der Transformanten wurde Aminosäuremedium verwendet. Alle Stämme wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch Chlostridien mit 0.1 mg/ml Vancomycin inokuliert. Transformanten wurden zusätzlich hierzu mit 10 μ g/ml Puromycin selektiert.

Für die Transformation wurde der Wildtyp ohne Selenit im Medium in der exponentiellen Phase (OD_{600} 0.4-0.6) geerntet.

Transformanten wurden bis in die späte exponentielle Wachstumsphase kultiviert (OD_{600} 0.6-0.8) und anschließend in Reportergentests eingesetzt. Zur Untersuchung der Selenabhängigkeit wurden Zellen aus Selenmangel-Medium in Medium mit Selenit inokuliert. Das Minimum der Reportergenexpression wurde dabei nach 5 Passagen mit einem jeweiligen Inokulum von 100 μ l auf 10 ml erreicht.

Zur Plattierung wurde dem Medium 1.2 % Difco Bacto Agar (BD Biosciences) zugegeben und die Platten in einem Anaerobenzelt in einer $N_2/CO_2/H_2$ (75%/20%/5%) Atmosphäre gegossen. Nach der Plattierung wurden die Kulturplatten in einem Anaerobentopf aus dem Zelt ausgeschleust und mit 1.4 bar einer CO_2/H_2 (20%/80%) Atmosphäre versehen. Nach Zugabe von 30 ml H_2S wurde der Anaerobentopf bei 37°C inkubiert und das Wachstum anhand des Druckabfalls im Anaerobentopf kontrolliert.

5.17 Transformation von *Methanococcus voltae*

(Metcalf et al., 1997; Zuidam und Barenholz, 1997)

Die Transfektion von Eukaryotenzellen mittels liposomaler DNA-Komplexe ist eine bekannte und weit verbreitete Methode. Metcalf et al. (1997) haben diese Technik mit dem Lipid DOTAP erfolgreich auf *Methanosarcina mazei* übertragen. Die Adaption dieser Methode auf *Methanococcus voltae* wurde von Izabela Noll (1999) durchgeführt.

Die Lipidmoleküle verpacken hierbei die Plasmid DNA in membrangängige Micellen. Ergebnisse von Zuidam und Barenholz (1997) zeigen jedoch, daß DNA-DOTAP-Komplexe nicht dauerhaft stabil sind und die Plasmid-DNA nicht optimal verpackt wird. Ihre Studien zeigen weiterhin, daß der Zusatz eines Helferlipids (DOPE) die Stabilität, sowie die Qualität der Verpackung deutlich steigern. Die optimalen Verhältnisse liegen hierbei bei DOTAP:DOPE:DNA von 1:1:1 (w/w/w).

Benötigte Puffer und Lösungen:

HEPES-Puffer pH 7.0 wurde mit Resazurin als Redoxindikator versetzt und in Septumflaschen unter Mischgasatmosphäre mit H_2S reduziert.

Anschließend wurde der Rest H_2S im Mischgasstrom (CO_2/H_2 , 80%/20%) ausgetrieben.

Eine isoosmolare 0.68 M Saccharoselösung in HEPES-Puffer (pH 7.0) wurde ebenfalls mit Resazurin versetzt und ebenso reduziert.

Alle folgenden Arbeiten wurden im Anaerobenzelt unter Mischgasatmosphäre durchgeführt.

Zur Transfektion von *M. voltae* wurde eine frische Übernachtskultur mit einer OD_{600} von 0.4-0.6 benutzt. 2.5 μ g Plasmid DNA wurden lyophilisiert und im Anaerobenzelt in 22.5 μ l HEPES-Puffer aufgenommen.

Anschließend wurden in einem frischen anaeroben Plastikgefäß 2.5 μ l des ESCORT™-Transfektionsreagenz zur resuspendierten DNA gegeben und gut durchmischt. Die Mischung wurde ca. 10 min bei RT inkubiert. In Abhängigkeit der optischer Dichte der Zellen wurden zwischen 1 ml und 0.5 ml der Übernachtskultur abzentrifugiert und der Zellniederschlag in 0.5 ml Saccharoselösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann mit der DOTAP/DOPE/DNA-Komplexlösung versetzt und gut durchmischt. Der Transfektionsansatz wurde für 1.5 Stunden bei RT inkubiert und anschließend in Aminosäuremedium ohne Selektionsdruck gegeben. Die Kultur wurde dann über Nacht bei 37°C bei 130 RPM auf dem Schüttler inkubiert. Aminosäuremedium mit Puromycin wurde mit 1 ml dieser Übernachtskultur inokuliert und ebenfalls bei 37°C und 130 RPM auf dem Schüttler inkubiert.

Transformierte Kulturen waren in der Regel nach 3-4 Tagen angewachsen und wurden auf Puromycin-haltigen Aminosäuremedium-Agarplatten zur Vereinzelung der Klone ausgestrichen. Nach 1-2 Wochen Inkubation bei 37°C im Anaerobentopf wurden Einzelklone in Flüssigmedium mit Puromycin angeimpft.

5.18 Herstellung von Proteinextrakt aus *M. voltae*

Tabelle 6: Puffer zur Herstellung von Zellextrakt aus *M. voltae*

Lyse Puffer	100 ml
20 mM HEPES (pH 7.0)	10 ml einer 200 mM Lösung
1% Glycerin	1 g 98%iges Glycerin
5 mM EDTA	1 ml einer 0.5 M Lösung
0.5 mM DTT	1 ml einer 50 mM Lösung
Leupeptin	10 µl einer Lösung von 10 mg/ml
Pefabloc	100 µl einer Lösung von 1 mg/ml
Pepstatin A	100 µl einer ethanolischen Lösung von 1 mg/ml

2-20 g tiefgefrorener *Methanococcus voltae* Zellen wurden in 10-100 ml Lysepuffer für 30 Minuten bei RT unter heftigem Rühren lysiert.

Der Extrakt wurde bei 14000 UPM und 4°C in einer Kühlzentrifuge mit dem Rotor A8.24 von den Zelltrümmern befreit und der so erhaltene Überstand über Nacht bei 45000 UPM in einem 55.2 Ti Rotor in der Ultrazentrifuge von einem Teil der genomischen DNA befreit.

Der Rückstand der Ultrazentrifugation wurde in 10 ml eines Puffer aus 20 mM HEPES (pH 7.0) und 2 M NaCl aufgenommen um Proteine die noch mit der DNA assoziiert sind zu entfernen. Nach erneuter Ultrazentrifugation über Nacht bei 45000 UPM wurde der Überstand mit dem Rest des Proteinextraktes vereinigt und über Nacht in einem Dialyseschlauch gegen 20 mM HEPES (pH 7.0) dialysiert. Zur Reduktion des Auftragsvolumens wurde der Proteinextrakt mit Hilfe einer Rührzelle über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße ankonzentriert. Das Konzentrat wurde mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% versehen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die anaerobe Reinigung wurde das Zellysate mit anaerobem Lysepuffer im Anaerobenzelt hergestellt und direkt bei 45000 UPM in einem 55.2 Ti Rotor in einer Beckmann Ultrazentrifuge von den Zelltrümmern und der genomischen DNA befreit. Der Überstand wurde mit anaerobem Glycerin

bis zu einer Konzentration von 10% versetzt und bei -80°C unter Mischgasatmosphäre (CO_2/H_2 80%/20%) in einer Septumflasche gelagert. Die Rückstand der Ultrazentrifugation wurde in 10 ml eines anaeroben Puffers mit 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 aufgenommen und abermals bei 45000 UPM über Nacht zentrifugiert. Die anschließende Dialyse erfolgte für 6 h gegen 20 mM HEPES pH 7.0 im Anaerobenzelt. Zuletzt wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben und der Extrakt ebenfalls bei -80°C gelagert.

5.19 Proteinbestimmung

(Bradford, 1976; Brogdon und Dickinson, 1983; Ausubel et al., 2000)

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford in Mikrotiterplatten wie folgt durchgeführt:

Zu 60 μl Bradfordreagenz (Biorad) wurden 140 μl Wasser gegeben sowie 100 μl der zu bestimmenden Probe. Als Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 1 μg und 8 μg von BSA in 100 μl Wasser verwendet.

Proteinkonzentrationen von Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden photometrisch bestimmt. Bei Konzentrationen ab 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde die Absorption bei 280 nm zur Messung verwendet. Eine Lösung von 1 mg/ml hat hierbei ungefähr eine Absorption von 1. Bei Konzentrationen im Bereich zwischen 1 μg und 20 μg wurde die Absorption bei 205 nm verwendet. Da hier die Peptidbindung absorbiert können sehr kleine Mengen gemessen werden. Eine Absorption von 3 entspricht hierbei einer Konzentration von 1 mg/ml Protein.

5.20 β -Glucuronidase-Enzymtests

(abgewandelt nach der Vorschrift von Boehringer Mannheim)

5.20.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenol

Der ursprüngliche Reportergentest wurde nach dem stopped-flow Prinzip durchgeführt, d.h. ein Teil der Enzymreaktion wurde entnommen und die Reaktion durch Zugabe einer Lösung von 1 M Na₂CO₃ (pH 11) abgestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm. Zur Bestimmung der Volumenaktivität der Reportergenkonstrukte in einer kontinuierlichen Messung bei pH 7.0 und 25°C war es deshalb nötig den molaren Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenol zu bestimmen.

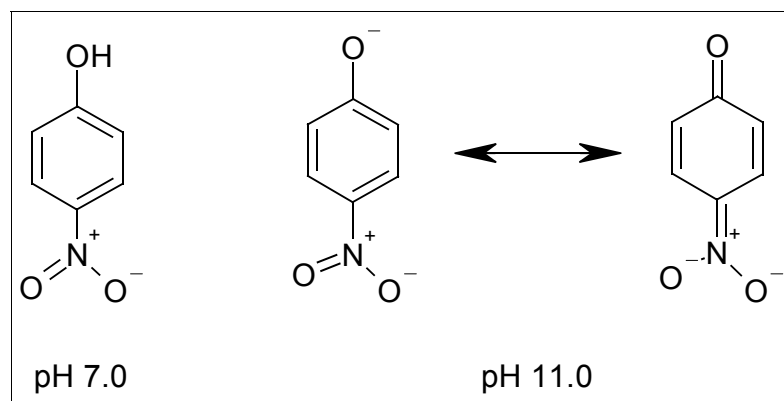


Abbildung 12: ***p*-Nitrophenol bei neutralem und bei basischem pH.**
Durch die Deprotonierung der Hydroxylgruppe vergrößert sich das delokalisierte Elektronensystem und dadurch die Absorptionscharakteristik

Aus der Gleichung für die Extinktion $\Delta E_{405} = \epsilon \cdot d \cdot [p\text{-Nitrophenol}]$ ergibt sich

$$\text{der Extinktionskoeffizient } \epsilon_{405} = \frac{1}{d} \cdot \frac{\Delta E_{405}}{[p\text{-Nitrophenol}]} .$$

Ausgehend von einer 10.1 mM Stammlösung von *p*-Nitrophenol wurde eine Verdünnung von 1:40 angesetzt. Aus dieser wurde eine Verdünnungsreihe aus 7 unabhängigen Verdünnungen zwischen 0.015 $\mu\text{mol/ml}$ und 0.12 $\mu\text{mol/ml}$ *p*-Nitrophenol in Gluctestpuffer

hergestellt. Die Messung der konzentrationsabhängigen Extinktionsänderung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 330 μl mit einem Lichtweg d durch die Probe von 0.9 cm bei 25°C:

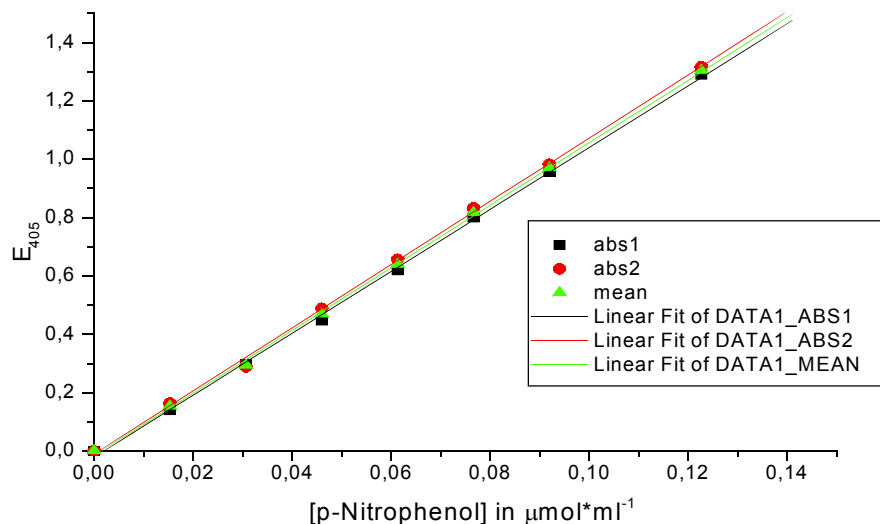


Abbildung 13: Auswertung der konzentrationsabhängigen Extinktionsveränderung von p-Nitrophenol bei 25°C und pH 7.0. abs1 und abs2: Messpunkte der zwei unabhängigen Messungen; mean: Arithmetisches Mittel der beiden Messungen.

Die für die Ausgleichsgeraden ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 7: Konzentrationsabhängige Änderung der Extinktion von p-Nitrophenol. Die Werte wurden mit dem Programm Origin 4.1 anhand der Ausgleichsgeraden durch die Messwerte ermittelt.

Messung	$\frac{\Delta E_{405}}{[p\text{-Nitrophenol}]}$ in $\text{ml}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$	Standardabweichung
abs1	10.61161±0.12788	0.01385
abs2	10.83243±0.14638	0.01585
mean	10.72202±0.11235	0.01217

Zur Berechnung von ε_{405} wurde aufgrund des geringsten Fehlers der Mittelwert beider Messungen herangezogen.

Damit ergibt sich der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 25°C und pH 7.0 zu:

$$\varepsilon_{405} = \frac{10.7 \frac{ml}{\mu mol}}{0.9 cm} = 11.9 \frac{ml}{\mu mol \cdot cm} \quad \text{und damit die Reaktionskonstante}$$

$$k_{Gluc} = \frac{0.33 ml}{11.9 \frac{ml}{\mu mol \cdot cm} \cdot 0.015 ml \cdot 0.9 cm} = 2.05 \frac{\mu mol}{ml}$$

5.20.2 Messung von β -Glucuronidaseaktivität in Mikrotiterplatten

Tabelle 8: Puffer für die Durchführung von Reportergerntests

Phosphatpuffer		Gluctest-Puffer	pNPG-Lösung
A	B		
0.5 M K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O	0.5 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4 ml 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.0	25 mM pNPG
11.4 g in 100 ml H ₂ O	6.9 g in 100 ml H ₂ O	0.7 ml β -Mercaptoethanol	7.9 g in 1 ml H ₂ O
Puffer A mit Puffer B auf pH 7.0 einstellen		ad 100 ml mit H ₂ O	

Die Reportergerntests wurden in 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *M. voltae* bei einer OD₆₀₀ von 0.6-0.8 abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Gluctest-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten geschüttelt. Nach vollständiger Lyse der Zellen wurde der Proteinextrakt zur Entfernung von Zelltrümmern 5 min bei 15000 UPM in einer Hettich Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis in ein neues Reagiergefäß überführt und jeweils 2 Verdünnungen von 1:5 und 1:10 in Gluctest-Puffer angesetzt.

Für den Test wurden pro Probe 300 µl Gluctest-Puffer und 15 µl pNPG-Lösung mit 15 µl der Probe versetzt. Die Messung erfolgte kontinuierlich über den Zeitraum von einer Stunde in 10 Minuten Abständen in einem Mikrotiterplatten Photometer (Molecular Devices) bei 405 nm und Raumtemperatur (25°C).

Die Berechnung der Volumenaktivität erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$\frac{V_{Gesamt}}{\epsilon_{405} \cdot V_{Probe} \cdot l} \cdot \frac{\Delta E_{405}}{t} = 2.05 \frac{\mu mol}{ml} \cdot \frac{\Delta E_{405}}{t}$$

V_{Gesamt} : Gesamtvolumen der Reaktion (330 µl);

ϵ_{405} : molarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol;

V_{Probe} : Volumen der Probe (15 µl),

l : Lichtweg durch den Reaktionsansatz (0.9 cm),

E_{405} : Extinktion bei 405 nm,

t : Zeit.

Die zeitabhängige Extinktionsveränderung wurde über alle gemessenen Zeitpunkte mit dem Programm Origin 4.1 von Microcal berechnet.

5.21 Proteingelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Tabelle 9: Puffer für die denaturierende SDS-PAGE

4x Sammelgel-puffer	Trenngelpuffer	10x SDS-Laufpuffer	2x Probenpuffer
500 mM Tris/HCl, pH 6.8	1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	250 mM Tris	62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8
0.4% (w/v) SDS	0.4% (w/v) SDS	1.92 M Glycin	10% (v/v) Glycerin
		1% (w/v) SDS	10% (w/v) DTT
			2% (w/v) SDS
			0.8% (w/v) Bromphenolblau

Es wurden durchgängig 12% Polyacrylamidgele verwendet. Die Proteine wurde zur sanften Denaturierung 15 min bei RT mit dem Probenpuffer inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 V/cm in einer Biorad Mini-Protean II Gelkammer. Als Marker wurde vorgefärbter Proteingrößenstandard 'Broad Range' von Newengland Biolabs verwendet.

5.22 Färbung von Proteingelen

(Righetti und Drysdale, 1974; Hunkapiller et al., 1983; Blum et al., 1987)

Die Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde bei ausreichender Konzentration der Proteine im Gel mit Coomassie Brilliantblau oder bei niedrigen Proteinkonzentrationen mittels Silberfärbung durchgeführt.

5.22.1 Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliantblau

Tabelle 10: Lösungen zur Coomassie-Färbung von Proteingelen

Coomassie-Färbelösung	Proteingel-Entfärber
0.05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250	7% (v/v) Eisessig
0.8% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	12 (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Eisessig	0,5% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
25% (v/v) Isopropanol	

Die Gele wurden für 30 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend mit Entfärber solange gewaschen bis die gewünschte Färbung eintrat (mindestens 1 Stunde).

5.22.2 Silberfärbung von Proteingelen

Tabelle 11: Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen - Teil A

Fixierer (1 l)	Entwickler (1 l)
500 ml 96% Ethanol	60 g Na ₂ CO ₃
120 ml Eisessig	250 µl Formaldehyd (37%)
0.5 ml Formaldehyd (37%)	20 ml Pretreat-Lösung
ad 1 l mit Wasser	ad 1 l mit Wasser

Tabelle 12: Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen - Teil B

Thiosulfat-Lösung (1 l)	Silber-Färbelösung (1 l)	Stopplösung (1 l)
0.2 g Na ₂ S ₂ O ₃ ·5 H ₂ O	2 g AgNO ₃	50 g Glycin
	750 µl Formaldehyd (37%)	
jeweils ad 1 l mit Wasser		

Das Polyacrylamidgel wurde für 1 Stunde in 40 ml Fixierer geschüttelt und anschließend dreimal für 10 Minuten mit 50% Ethanol gewaschen. Nach einer 1 min Behandlung mit Thiosulfat-Lösung wurde erneut dreimal für jeweils 20 s mit Wasser gewaschen und das Gel dann für 20 min in 40 ml Silber-Färbelösung geschüttelt. Nach erneutem Waschen für zweimal 20 s mit Wasser wurde das Gel mit Entwicklerlösung solange geschüttelt bis der gewünschte Färbungsgrad erreicht war. Die Entwicklung wurde dann durch zweimaliges Waschen für 1 min mit Wasser und schütteln in 40 ml Stopplösung gestoppt. Zuletzt wurde ein letztes Mal für 3 mal 5 min mit Wasser gewaschen.

5.23 Western blot

(Choli et al., 1989)

Tabelle 13: Puffer für den halbtrockenen Proteintransfer auf PVDF-Membran

<i>PVDF-Transferpuffer</i>	<i>10x TBS (Tris-buffered Saline)</i>
25 mM TRIS/HCl pH 8.4	200 mM TRIS/HCl pH 7.6
192 mM Glycin	1.37 M NaCl
20% (v/v) Methanol	

TBS-T: 100 ml 10x TBS, 1 ml Tween-20 ad 1 l.

Für den Transfer der Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Elektroblotapparatur der Firma Biorad benutzt. Hierzu wurde eine PVDF-Membran die mit Methanol angefeuchtet wurde auf vier Lagen mit PVDF-Blotpuffer durchfeuchtetes Whatman-Papier gelegt. Das Trenngel wurde vom Sammelgel getrennt und nach Spülen in PVDF-Blotpuffer auf die Membran gelegt und mit nochmals vier Lagen feuchten Whatman-Papiers abgedeckt. Zur Entfernung etwaiger Luftblasen wurde der Blotaufbau mit einem Reagenzglas vorsichtig angepresst.

Der Transfer wurde für 1-1 ½ Stunden bei 10 mA/cm² durchgeführt. Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe des ECL-Kits der Firma Amersham.

Hierzu wurde die Membran über Nacht in TBS-T-Puffer mit 5% fettfreiem Milchpulver abgesättigt und anschließend dreimal für 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Der primäre Antikörper wurde 1:2000 in TBS-T (10 µl in 20 ml) verdünnt und die Membran für eine Stunde mit dieser Verdünnung unter schütteln inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran für jeweils 10 min mit TBS-T wurde der im Kit enthaltene, an Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung in TBS-T auf die Membran gegeben und zusammen

für eine Stunde unter schütteln inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang für dreimal je 10 min mit TBS-T wurde die Membran für 1 min mit 10 ml einer 1:1 Mischung der Detektionslösungen behandelt. Nach Entfernen der überschüssigen Lösung erfolgte die Detektion mit Hilfe von Röntgenfilmen. Die Expositionszeiten wurden ausgehend von einer Minute solange verlängert bis eine ausreichende Schwärzung des Films entstanden war.

5.24 Affinitätschromatographie

5.24.1 Heparinsepharose-Affinitätschromatographie

(Farooqui, 1980)

Die partielle Reinigung eines Proteinrohextraktes von *M. voltae* wurde mit Heparinsepharose-Säulen durchgeführt. Heparin ist ein Polyanion und fungiert hierbei als DNA-Analogon. DNA-bindende Proteine binden unspezifisch an Heparin und können je nach ihrer Affinität zum Säulenmaterial über einen Salz- oder Heparingradienten eluiert werden. Die Reinigung erfolgte für die Vorversuche mit kleinen Extraktvolumina (bis 10 ml, Extrakt aus 2 g Zellen) mit einer Econocolumn von Biorad. Für große Volumina (bis 100 ml, Extrakt aus 15-20 g Zellen) wurde eine XK16/20 FPLC-Säule von Pharmacia und eine FPLC (Waters oder Pharmacia) verwendet. Als Säulenmaterial für beide Säulen wurde Heparinsepharose CL6B von Pharmacia mit 2 mg/ml Heparin verwendet. Für die Herstellung der Säulen wurde das trockene Säulenmaterial in 20 mM HEPES (pH 7.0) und 20 mM NaCl gequollen und mit 10 Volumen dieses Puffers gewaschen. Die Säule wurde mit 2 ml/min (Econocolumn) bzw. 3 ml/min (FPLC) gepackt.

Reinigung per Schwerkraftfluß (Econocolumn):

Der Extrakt wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf ein Säulenvolumen von 10 ml Heparinsepharose aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina eines Puffers aus 20 mM HEPES pH 7.0 und 20 mM NaCl gespült. Die Elution von gebundenen Proteinen erfolgte mit Hilfe eines Stufengradienten von 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, 300 mM NaCl und 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 für jeweils 5 Säulenvolumina.

Reinigung an der FPLC:

Tabelle 14: Puffer für die Reinigung an der FPLC mit Heparinsepharose CL-6B Fast Flow

Puffer HepA	Puffer HepB
20 mM HEPES (pH 7.0)	20 mM HEPES (pH 7.0)
2 M NaCl	
5 mM EDTA	5 mM EDTA
Leupeptin, Pefabloc, Pepstatin A Endkonzentration 10 µg/ml	Leupeptin, Pefabloc, Pepstatin A Endkonzentration 10 µg/ml

Zur Reinigung an der FPLC wurde der Zellextrakt mit einer Flußrate von 1.0 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumen des Puffers HepB (20 mM HEPES, 5 mM EDTA) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Salzstufengradienten von 200 mM NaCl, 400 mM NaCl, 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 für jeweils 6 Säulenvolumen. Die noch auf der Säule verbliebenen Proteine wurden mit 10 Säulenvolumen des Puffers HepA eluiert.

Alle Reinigungsschritte nach dem Auftragen erfolgten mit einer Flußrate von 2.0 ml/min

5.24.2 Sequenzspezifische DNA-Affinitätschromatographie

(Kadonaga, 1991; Goss und Bard, 1990)

5.24.2.1 Kopplung von DNA an NHS-Sepharose (Nach Herstellerangaben)

Tabelle 15: Puffer für die Kopplung primärer Amine an NHS-Sepharose

Kopplungspuffer	Deaktivierungspuffer	
	A	B
0.1 M HEPES pH 8.0	0.5 M Ethanolamin pH 8.3	0.1 M NaCH ₃ COO pH 4.0
0.5 M NaCl	0.5 M NaCl	0.5 M NaCl

Zur Kopplung von DNA an Sepharose wurde N-Hydroxysuccinimid-aktivierte Sepharose von Pharmacia verwendet. Die zu koppelnde DNA wurde aus zwei einzelsträngigen Primern durch Aneinanderlagerung der beiden Einzelstränge erhalten. Um die Kopplung zu ermöglichen wurde einer der Primer am 5'-Ende mit einem C6-Aminolinker versehen, dieser besitzt eine primäre Aminogruppe an einem Spacerarm aus sechs C-Atomen. Die Kopplung erfolgt mittels Substitution der N-Hydroxysuccinimid-Esterbindung durch eine Peptidbindung mit der primären Aminogruppe der Linker-DNA unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid.

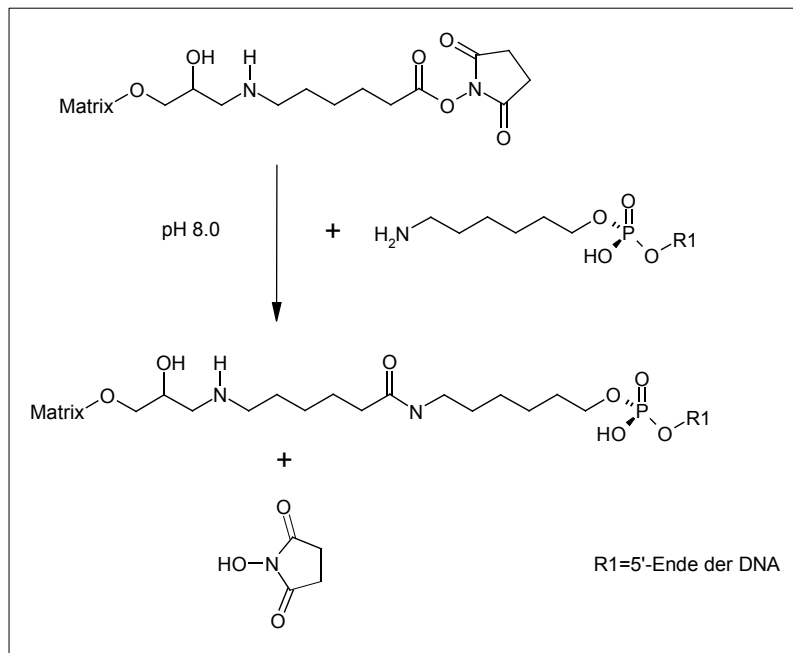


Abbildung 14: **Kopplung einer mit einem Aminolinker markierten DNA an NHS-Sepharose.**

Das in Isopropanol gelagerte Säulenmaterial wurde mit 10 Volumen kalter 1 mM HCl gewaschen, um den Isopropanol zu entfernen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 5 Volumen des Kopplungspuffers equilibriert.

Die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in equimolaren Mengen zusammengegeben und wie folgt in einem Thermocycler aneinandergelagert:

- 1) 95°C, 10 Minuten
- 2) 70°C, 1 Minute
- 3) zurück nach 2), $\Delta T = -1^\circ\text{C}$, 29 mal
- 4) 40°C, 1 Minute
- 5) 4°C, 10 Minuten

Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde in einem halben Säulenvolumen Kopplungspuffer aufgenommen und vollständig auf die NHS-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Einlaufen in das Säulenmaterial wurde über Nacht bei 4°C vorsichtig geschüttelt.

Mit einem Säulenvolumen an Kopplungspuffer wurde das Säulenmaterial gespült und die Effizienz der Kopplung durch Messung der Absorption bei 260 nm überprüft. Hierzu wurde ein Aliquot des Eluats mit 1 M HCl auf pH 2.0 angesäuert, da N-Hydroxysuccinimid ebenfalls bei 260 nm absorbiert. Durch Protonierung verschiebt sich jedoch die Absorption und es kann die reine Absorption der Nukleotide gemessen werden (Goss und Bard, 1990).

Zur Deaktivierung der noch verbliebenen Bindestellen der NHS-Sepharose wurde abwechselnd mit jeweils 5 Säulenvolumen Deaktivierungspuffer A und B mit einer Flußrate von 1 ml/min gewaschen. Dieser Vorgang wurde 5 Mal wiederholt und die Säule danach mit einem Puffer aus 20mM HEPES pH 7.0 und 20 mM NaCl equilibriert.

5.24.2.2 Kopplung von DNA an Streptavidin-Sepharose

Aufgrund der schlechten Kopplungseffizienz bei der kovalenten Bindung der DNA an NHS-Sepharose (< 70%) und der aus der Deaktivierung des Säulenmaterials folgenden Unmöglichkeit einer Neubeladung, wurde Streptavidin-Sepharose von Pharmacia für die Reinigung an der FPLC verwendet. Hierzu wurde eines der Oligodesoxyribonukleotide anstatt mit einem Aminolinker am 5'-Ende mit Biotin markiert. Die Aneinanderlagerung erfolgte wie oben. Zur Kopplung an die Säule wurde die DNA in 2.5 ml eines Puffers aus 100 mM HEPES pH 7.0, 200 mM NaCl und 1% Glycerin mit 1 ml/min auf die Säule gegeben. Die nichtgebundene DNA wurde weitere 2 mal auf die Säule aufgetragen und das Eluat anschließend bei 260 nm untersucht. Die erreichten Kopplungseffizienzen lagen im Durchschnitt bei 90%.

5.24.2.3 Sequenzspezifische Aufreinigung von Transkriptionsfaktoren

Tabelle 16: Puffer für die sequenzspezifische Proteinaufreinigung per Schwerkraftfluß

Affi200	Affi400	Affi600	Affi1000	5x Bindepuffer
200 mM NaCl	400 mM NaCl	600 mM NaCl	1 M NaCl	100 mM HEPES (pH 7.0)
20 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EDTA				1 M NaCl
				5% Glycerin
				5 mM EDTA
				0.5 mM DTT

Zur sequenzspezifischen Aufreinigung des DNA-bindenden Proteins wurde der teilgereinigte Extrakt in Bindepuffer mit 0.1 pmol/ μ l poly[d(I-C)] für 10 min bei RT inkubiert. Die Bindereaktion wurde dann bei 4°C auf die mit dem Puffer Affi200 equilibrierte Säule aufgetragen und nach vollständigem Einlaufen für 15 min auf der Säule stehen gelassen. Anschließend wurde die Säule mit dem Puffer Affi200 für 6 Säulenvolumen gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit jeweils 6 Säulenvolumen der Puffer Affi400, Affi600 sowie Affi1000. Die Säule wurde anschließend mit 10 Säulenvolumen 2 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 gewaschen und mit 5 Säulenvolumen Affi200 rekali­briert.

Der selbe Stufengradient wurde auch an der FPLC verwendet. Die Stufen wurden aus den Puffern HepA und HepB gemischt. Es wurde derselbe Bindepuffer verwendet.

5.25 Gelretardationsexperimente

(Lane et al., 1992)

Tabelle 17: Puffer für Gelretardationsexperimente

5x Bindepuffer	5x Gel- und Laufpuffer
100 mM HEPES (pH 7.0)	200 mM HEPES (pH 7.0)
1 M NaCl	50 mM NaCl
5% Glycerin (w/v)	
0.5 µg/µl poly[d(I-C)]*	
5 mM EDTA (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	
0.5 mM DTT	

*10 A₂₆₀ Units poly[d(I-C)] wurden in 1 ml Wasser gelöst und nach 5 min erhitzen auf 100°C langsam auf 40°C abgekühlt, anschließend wurde die Lösung 5 min im Ultraschallbad behandelt.

Bindet ein Protein unter bestimmten Salzbedingungen an DNA kann dieser Komplex aufgrund seiner Stabilität auf einem nichtdenaturierenden Gel von der freien DNA getrennt werden.

Alle Bindereaktionen dieser Arbeit wurden auf nichtdenaturierenden 5% Polyacrylamidgelen analysiert. Als Sonden dienten doppelsträngige Oligodesoxyribonukleotide die am 5'-Ende mit ³²P markiert wurden. Hierzu wurden komplementäre einzelsträngige Oligodesoxyribonukleotide verwendet die in einem Thermocycler aneinandergelagert wurden. Die Konzentration der einzelsträngigen Oligodesoxyribonukleotide betrug jeweils 200 pmol/µl. Die Anlagerung wurde mit dem folgenden Programm erreicht:

- 1) 95°C 10 min
- 2) 70°C 1 min
- 3) zurück nach 2), ΔT=-1°C, 29 mal
- 4) 40°C 1 min
- 5) 4°C 10 min

Die vollständige Aneinanderlagerung wurde auf einem Agarosegel überprüft. Es wurde keine Einzelstrang-DNA festgestellt.

Die Bindereaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 18: *Bindereaktion ohne bzw. mit Kompetitor-DNA*

ohne Kompetitor	mit Kompetitor
0.1-2 µg Protein (Heparinsepharosefraktionen)	
4 µl 5x-Bindepuffer	
2 µl ³² P-markierte DNA (0.4 pmol)	
-	4-200 pmol Kompetitor-DNA
ad 20 µl mit Wasser	ad 20 µl mit Wasser

Die Bindereaktion wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Während der Bindereaktion wurde ein Vorlauf des Gels bei 30 mA durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x Gel- und Laufpuffer (40 mM HEPES pH 7.0, 10 mM NaCl). Der Gellauf wurde bei 30 mA (8 V/cm) für ca. 4 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde das Gel bei 80°C für 1.5 Stunden auf dem Gelrockner getrocknet und zuletzt der Film aufgelegt.

6 ERGEBNISSE

6.1 Die isolierten Promotoren sind dereprimiert.

Die intergene Region zwischen den Genen der selenfreien Hydrogenasen enthält alle für die negative Regulation der Transkription benötigten cis-regulatorischen Elemente (Beneke et al., 1995).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, daß die sich wiederholende Heptamersequenz, die den Initiator des *frc*-Promotors überlappt, für die negative Regulation der beiden Gengruppen verantwortlich ist (Sorgenfrei et al., 1997b).

6.1.1 Klonierung der Halbpromotoren

In der Erwartung einer Aufhebung der negativen Regulation in *vhc*-Richtung wurde die intergene Region mit Hilfe der PCR in zwei unabhängige Promotorregionen zerlegt. Hierzu wurde mit den Primern WP_{frc}-fwd und SM0R aus Mipfgt der *frc*-Promotor WPf (212 bp) und mit den Primern WP_{vhc}-fwd und SM1R aus Mipvgt der *vhc*-Promotor WPv (242 bp) isoliert.

Die isolierten Promotoren WPf und WPv wurden nach der Aufreinigung mit *EcoR* I und *Nde* I behandelt und vor das *uidA*-Gen des Plasmids Mipvgt kloniert (Abbildung 15). Hierzu wurde die in Mipvgt vorhandene intergene Region durch Behandeln mit *EcoR* I und *Nde* I entfernt. Die resultierenden Plasmide MipWPf und MipWPv wurden mit dem Sequenzierprimer uida61 sequenziert um die korrekte Amplifikation der beiden Promotorfragmente zu überprüfen.

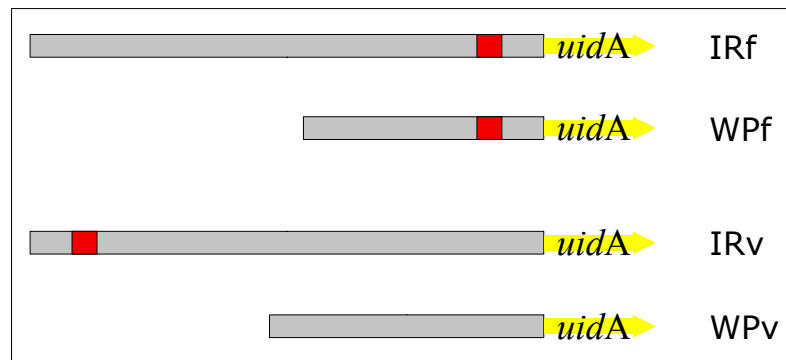


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Promotor-uidA Fusionen in den Plasmiden Mipfgt, MipWPf, Mipvgt und MipWPv. Der gelbe Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung des β -Glucuronidase-Gens an. Der graue Balken entspricht der intergenen Region bzw. deren Fragmente. Die Transkription des *uidA*-Gens erfolgt entweder durch den *frc*-Promotor (Mipfgt, MipWPf) oder den *vhc*-Promotor (Mipvgt, MipWPv). Der rote Kasten gibt die Position der drei Heptamersequenzen wieder. Das Plasmid MipWPf enthält den 212 bp *frc*-proximalen Teil der intergenen Region. Das Plasmid MipWPv enthält den 242 bp *vhc*-proximalen Teil der intergenen Region.

Die Vektoren MipWPf und MipWPv wurden in *Methanococcus voltae* transformiert. Es wurden jeweils 4 Einzelklone von einer Platte in selenfreies Aminosäuremedium überimpft. Anschließend wurden jeweils zwei unabhängige Einzelklone, die positiv auf β -Glucuronidase getestet wurden, in Enzymkinetiken eingesetzt.

6.1.2 Untersuchung der β -Glucuronidase-Expression durch die isolierten *frc*- und *vhc*-Promotoren

Die mit den Vektoren MipWPf und MipWPv transformierten *M. voltae* Stämme WPf und WPv wurden nach dem Animpfen der Einzelkolonien für 5 Passagen in Medium mit bzw. ohne Selenit kultiviert. Reportergerentests wurden erst im Anschluß daran mit jeweils frischen Übernachtskulturen durchgeführt.

Als Referenz diente die Reporterexpression der *M. voltae* Transformanten fgt und vgt (Beneke et al. 1995), die die vollständige intergene Region (IR) in *frc*- bzw. *vhc*-Transkriptionsrichtung vor dem Gen der β -Glucuronidase enthalten.

Die zur Messung verwendeten Zellen wurden bei einer optischen Dichte von OD_{600} 0.6-0.8, d.h. in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Messungen von Zellen die bis zur stationären Phase gezogen wurden führten zu keinen stabilen Messwerten. Die spezifische Aktivität aus diesen Zellen wurde von Messung zu Messung größer, was darauf schließen läßt, daß die β -Glucuronidase in der Zelle akkumuliert.

*Table 19: Spezifische β -Glucuronidase-Aktivität der *M. voltae* Transformanten fgt, WPf, vgt und WPv. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte von mindestens 5 unabhängig durchgeführten Doppelbestimmungen jeweils zweier unabhängiger Verdünnungen des Zellextrakts.*

Transformante	+Se [$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]	-Se [$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]
fgt ¹	$<56 \pm 5^1$	2578 ± 133^1
WPf	727 ± 85	1017 ± 102
vgt	0	2800 ± 228
WPv	884 ± 69	2694 ± 230

¹Die Aktivitätswerte für fgt sind entnommen aus Noll et al. (1999)

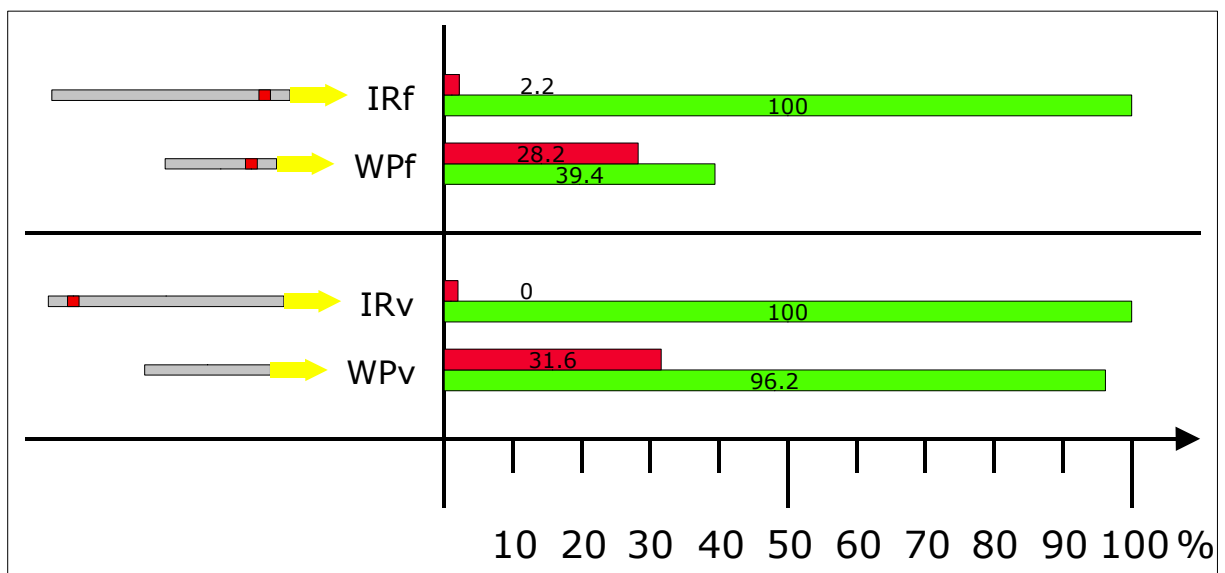


Abbildung 16: β -Glucuronidaseexpression der isolierten Promotoren relativ zum entsprechenden Wildtyppromotor. Die Expression der Wildtyppromotoren in Abwesenheit von Selen wurde als 100% gesetzt. Die Balken geben die relative β -Glucuronidase-Aktivität in Anwesenheit von Selen (ROT) bzw. Abwesenheit von Selen (GRÜN) wieder. Die Zahlen zeigen die prozentuale Aktivität bezogen auf den entsprechenden Wildtyppromotor. Die Promotoren der Transformanten sind links schematisch dargestellt. Der gelbe Pfeil deutet den Start des *uidA*-Gens an. Die roten Boxen symbolisieren die Heptamersequenzen.

Wie aus der Tabelle 19 bzw. der Abbildung 16 ersichtlich wird, ist die Expression des Reportergens in Anwesenheit von Selen in den Transformanten WPf und WPv dereprimiert. Die Aktivität bei Anwesenheit von Selen im Medium lag bei ca. 30% der Expression der kompletten IR in der jeweiligen Transkriptionsrichtung bei Selenmangel.

Die Reporterogenaktivität der Transformante WPf in Abwesenheit von Selen im Medium lag bei 39% der Referenzaktivität der fgt-Transformante, wohingegen die Transformante WPv keine signifikante Veränderung der Expression in Abwesenheit von Selen zeigte.

6.2 Eine 11 bp große Sequenz vor beiden Promotoren vermittelt eine Aktivierung der Transkription

Die unerwartet niedrigen β -Glucuronidaseaktivitäten der Transformanten WPf und WPv in Anwesenheit von Selen ließen mehrere Schlußfolgerungen zu.

Die negative Regulation wird durch die Auftrennung der intergenen Region in zwei unabhängige Promotorregionen aufgehoben. Diese Aufhebung der negativen Regulation ist entweder nicht vollständig, oder es gibt noch einen zweiten Faktor der bei der Regulation der Transkription eine Rolle spielt.

Die Heptamersequenzen scheinen keine signifikante Rolle bei der negativen Regulation zu spielen, andernfalls würde man für die Reporterexpression der Transformante WPf bei Anwesenheit von Selen ein ähnliches Niveau wie bei der Transformante fgt erwarten, da beide Promotoren die vermutete Repressorbindestelle in Form der Heptamere enthalten.

Die veränderte Expression der Transformante WPf in Abwesenheit von Selen deutete auf eine mögliche Aktivierung der Transkription hin, wobei das mögliche Aktivatorelement im *vhc*-proximalen Promotorbereich liegen müßte.

Eine genaue Analyse der Sequenz der intergenen Region zeigte, daß eine 11 bp große Sequenz sowohl stromaufwärts des *frc*-Promotors als auch stromaufwärts des *vhc*-Promotors zu finden war (Abbildung 17). Für den *frc*-Promotor liegt die Sequenz 96 bp stromaufwärts der TATA-Box, für den *vhc*-Promotor beträgt die Distanz 37 Basenpaare (gemessen jeweils von der Mitte der Sequenz).

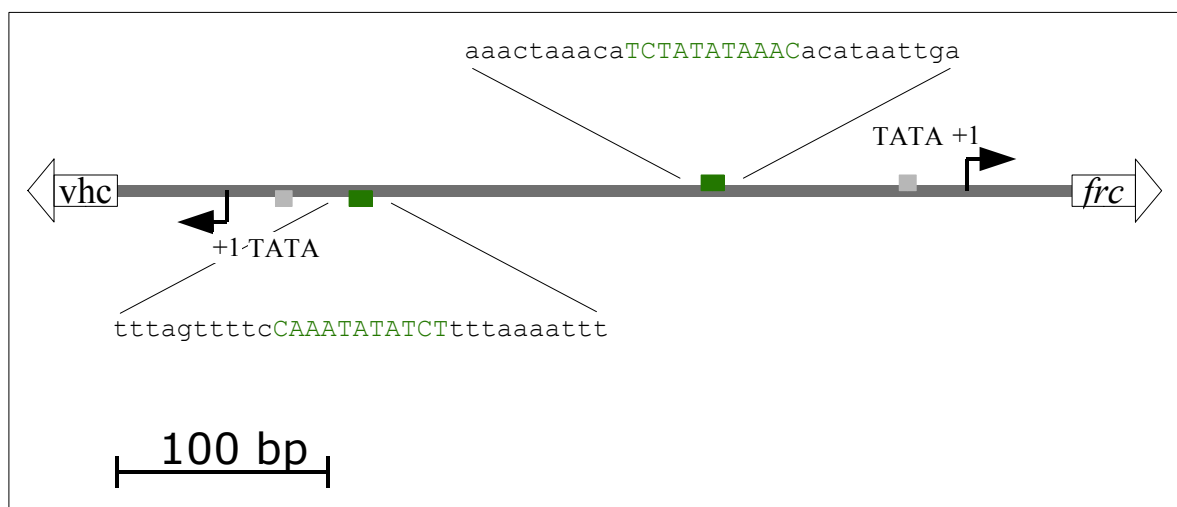


Abbildung 17: Position der 11 bp großen Sequenzmotive in der intergenen Region. Als grüne Rechtecke sind die Positionen der beiden 11 bp großen Sequenzen relativ zu den TATA-Boxen (hellgraue Rechtecke) und dem jeweiligen Transkriptionsstart dargestellt. Oberhalb bzw. unterhalb der Grafik ist die Sequenz der jeweiligen Bereiche dargestellt. Die 11 bp Sequenz ist in grün hervorgehoben.

6.2.1 Konstruktion eines Integrationsvektors für *M. voltae*

Die bisher verwendeten Integrationsvektoren auf Basis des Mip1-Vektors (Gernhardt et al., 1990) und das darauf basierende Reportergensystem Mipuid (Beneke et al., 1995) sind schlecht dokumentiert und enthalten kaum singuläre Restriktionsschnitte zur Klonierung. Deshalb wurde basierend auf dem Vektor pSL1180 (Brosius, 1989) ein neuer Integrationsvektor aufgebaut.

Das resultierende Plasmid ist mit 7.7 kB deutlich kleiner als alle Mipuid-Konstrukte und seine gesamte Sequenz ist bekannt. Des weiteren besteht die Resistenzkassette aus einer direkten Fusion des *mcr*-Promotors mit dem *pac*-Gen aus *Streptomyces alboniger*. In den Mip-Konstrukten

enthielt die Promotor-Kassette zusätzlich zum Promotor noch die ersten 13 Aminosäuren des *mcrA*-Gens aus *M. voltae* sowie den kompletten *Streptomyces pac*-Promotor. Durch die Tatsache, daß der C-Terminus des *hisA*-Gens nicht auf dem neuen Plasmid vorhanden ist, kann die korrekte Integration in das Genom von *M. voltae* durch eine PCR mit einem Primer im Plasmid und einem Gegenprimer im C-Terminus von *hisA* überprüft werden.

Das neue Vektorkonstrukt ist somit wesentlich besser zur Klonierung und Transformation von *Methanococcus voltae* geeignet.

Das für die homologe Rekombination in *M. voltae* benötigte Fragment des *hisA*-Gens wurde aus Mipfgt durch Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *Pac* I und *EcoR* I erhalten. Zusammen mit einem 215 bp großen *Hind* III-*Pvu* I Fragment der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Plasmids pSL1180 wurde das 802 bp große *hisA'* Fragment in den mit *Hind* III und *EcoR* I behandelten Vektor pSL1180 kloniert (Abbildung 18).

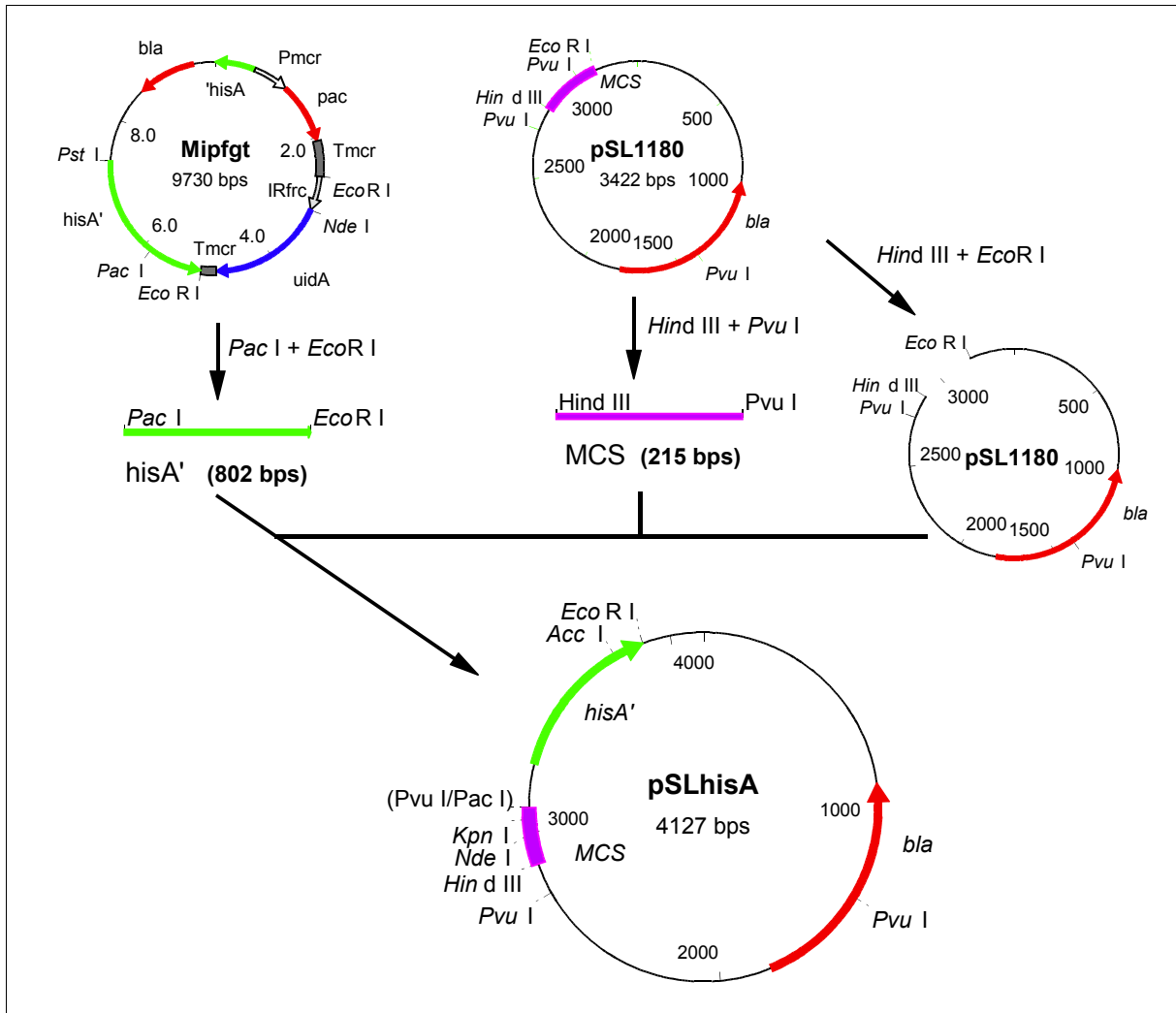


Abbildung 18: Klonierungsschema der Konstruktion des neuen Integrationsvektors pINT - Teil A

Für die Fusion des *mcr*-Promotors an das *pac*-Gen war es nötig sowohl den Promotor, als auch den N-terminalen Teil des Resistenzgens aus Mipfgt zu amplifizieren. Für den *mcr*-Promotor wurden hierzu die Primer Pmcr-Acc-fwd und Pmcr-Nco-rev verwendet. Der N-Terminus des *pac*-Gens wurde aus dem gleichen Plasmid mit den Primern pac-BspH-fwd und pac-BstE-rev amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden nach der Aufreinigung über ein Agarose Gel mit *Acc I* und *Nco I* sowie mit *BspH I* und *Sal I* behandelt. Das 300 bp große Promotorfragment und das 110 bp große *pac*-Fragment wurden in den mit *Acc I* und *Sal I* behandelten Vektor pSL1180 kloniert, wobei die mit *Nco I* und *BspH I* behandelten Enden aneinander ligieren. Das resultierende Plasmid wurde pSLppac genannt (Abbildung 8).

Aus pSLppac wurde die Promotor-Gen-Fusion durch Behandlung mit *Nde* I und *Sal* I als 447 bp großes Fragment erhalten. Der C-Terminus des *pac*-Gens zusammen mit dem Terminator der *mcr*-Gengruppe wurde aus Mipfgt durch Behandlung mit *Sal* I und *Kpn* I als 846 bp großes Fragment erhalten. Beide Fragmente wurden in das mit *Nde* I und *Kpn* I behandelte Plasmid pSLhisA' kloniert. Der resultierende neue Integrationsvektor wurde pINT genannt (Abbildung 8). Alle Konstrukte wurden sequenziert um die PCR-Produkte zu überprüfen. Es wurden keine Fehler festgestellt.

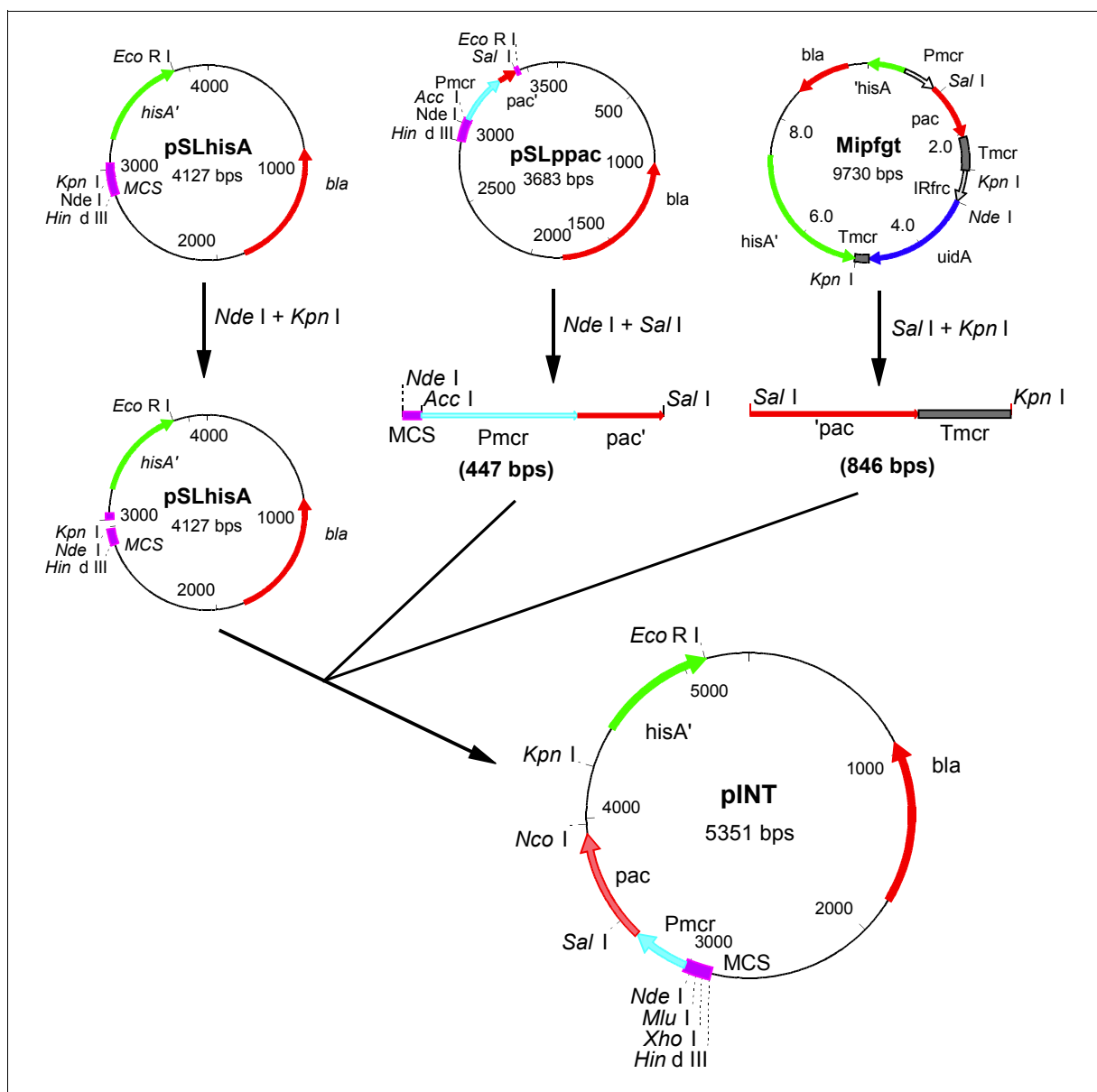


Abbildung 19: Klonierungsschema der Konstruktion des neuen Integrationsvektor pINT - Teil B

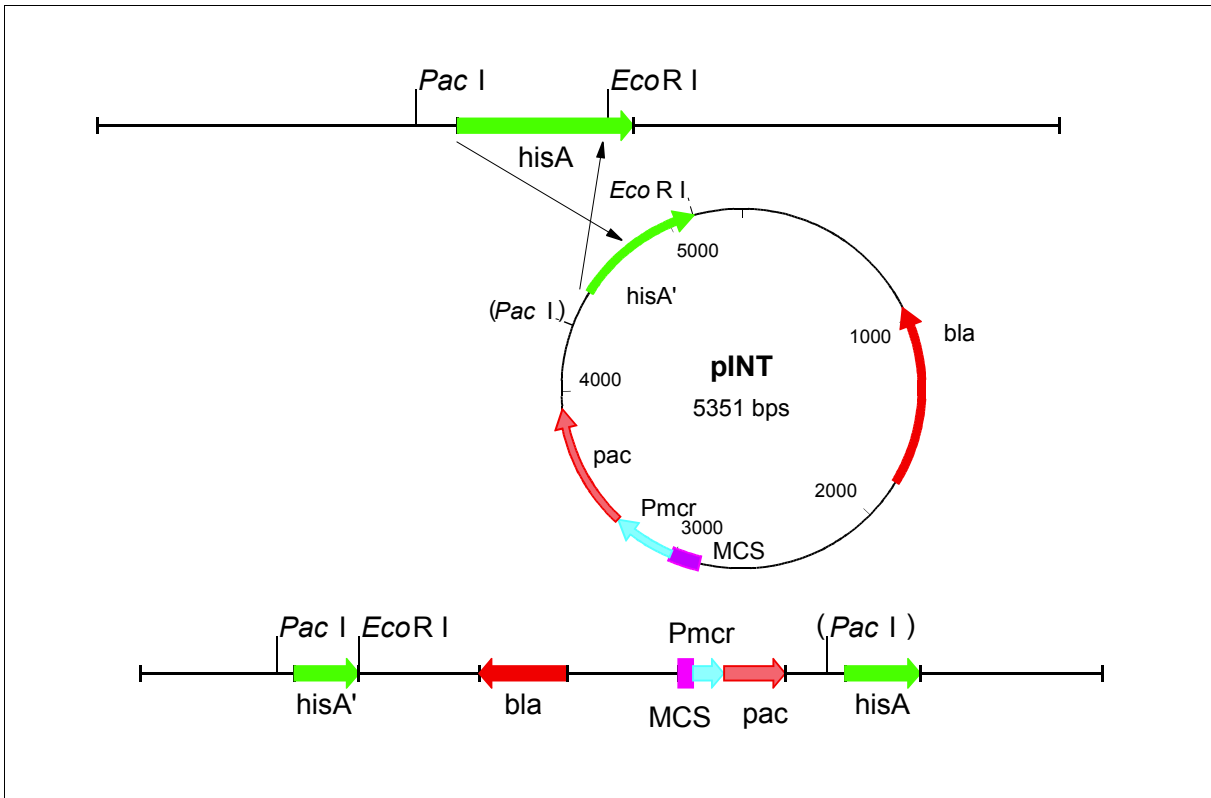


Abbildung 20: **Integration eines pINT-Vektors in das *M. voltae* Chromosom.** Die Integration der auf pINT basierenden Vektoren erfolgt über homologe Rekombination des genomischen *hisA*-Gens mit dem C-terminal verkürzten *hisA'*-Anteil auf dem Plasmid.

Die auf pINT basierenden Vektoren sind Integrationsvektoren. Da für *M. voltae* kein Replikationsursprung bekannt ist muß ein Transformationsvektor mit Hilfe der homologen Rekombination in das Chromosom von *M. voltae* integrieren, hierzu enthält pINT den Promotor und den N-Terminus des *hisA*-Gens. Homologe Rekombination über die im Vektor vorhandene Sequenz führt zu einem C-terminal verkürzten Gen sowie zu einer kompletten, funktionellen Kopie am Ende der Integrationsstelle (Abbildung 20).

6.2.2 Mutagenese der Undecamersequenz vor beiden Promotoren

Um die Relevanz der 11 bp Sequenz für die Expression der selenfreien Hydrogenasen zu testen wurden Basenaustausche (Purinnukleotid nach Pyrimidinnukleotid und umgekehrt) in 6 der 11 Basenpaare vorgenommen. Die Sequenz TCTATATAAAC wurde zu GATAGAGAACA mutiert (Austausche sind unterstrichen).

6.2.2.1 Herstellung der in beiden Sequenzmotiven mutierten intergenen Region

Die Mutagenese erfolgte mit Hilfe der Fusions-PCR. Die intergene Region wurde aus Mipfgt Primern IR-ClaI und *fm*ut-rev sowie *fm*ut-fwd und IR-NsiI amplifiziert. Die Primer *fr*cmut-fwd und *fr*cmut-rev enthalten die gewünschten Basenaustausche in der *fr*c-proximalen Sequenz. Die beiden so erhaltenen 321 bp bzw 196 bp großen Fragmente wurden anschließend durch PCR mit den Primern IR-ClaI und IR-NsiI fusioniert (Abbildung 21) und mit Hilfe des TA-Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor PCR2.1 kloniert. Der resultierende Vektor *pf*mut enthält die im *fr*c-proximalen Sequenzmotiv mutierte intergene Region. Das Plasmid wurde anschließend sequenziert um die Richtigkeit der Mutagenese zu kontrollieren.

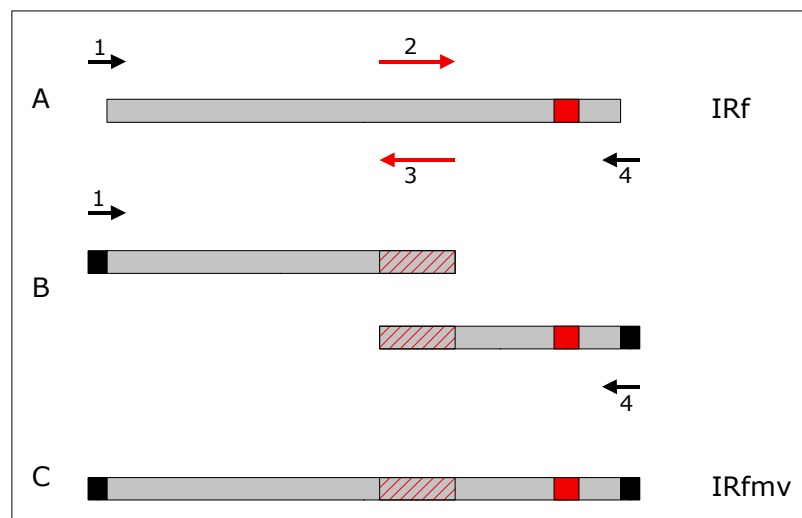


Abbildung 21: Mutagenese des *fr*c-proximalen Sequenzmotivs durch Fusions-PCR. Die Abbildung zeigt schematisch, wie die Mutagenese des *fr*c-proximalen Sequenzmotivs durchgeführt wurde. Die nummerierten Pfeile stehen für die Primer. 1: IR-ClaI; 2: *fr*cmut-fwd; 3: *fr*cmut-rev; 4: IR-NsiI. Die rote Box steht für die Heptamersequenzen. Die rot gestreifte Box stellt die mutierte Sequenz dar. **A:** Einführung der Mutationen über nicht homologe Primer 2 bzw 4. **B:** Fusion der zwei aus der ersten PCR erhalten Fragmente mit den Primern 1 und 4. **C:** Mutierte intergene Region

Aus dem Vektor *pf*mut wurde mit den Primern *WP**fr*c-fwd und *mut*-rev der *fr*c-proximale Teil der intergenen Region als 360 bp großes Fragment erhalten. Der *v**h*c-proximale Teil wurde mit den Primeren *mut*-fwd und *v**h*c-MluI-rev amplifiziert. Die Fusion beider Fragmente erfolgte durch eine

weitere PCR mit den beiden äußeren Primern WP*frc*-fwd und vhc-MluI-rev. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Mlu*I behandelt und über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurde die nunmehr in beiden 11 bp Sequenzmotiven mutierte intergene Region in den ebenfalls mit *Nde*I und *Mlu*I behandelten Vektor pINT kloniert. Der resultierende Vektor wurde pINT-IRfmvm genannt.

Das N-Terminus des Gens der β -Glucuronidase (*uidA*) wurde aus Mipfgt durch Behandeln mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Sau*96I erhalten. Der C-Terminus des Gens zusammen mit dem Terminator der Methyl-CoM-Reduktase wurde ebenfalls aus Mipfgt durch PCR mit den Primern guster-*Sau*96I-fwd und tergus-*Bsp*E-rev erhalten (Abbildung 22). Das 1031 bp große PCR-Produkt wurde mit *Sau*96I und *Bsp*EI behandelt und zusammen mit dem N-Terminale Fragment in den mit *Nde*I und *Bsp*EI behandelten Vektor pINTIRfmvm kloniert. Das endgültige Reporter-genkonstrukt wurde pIRfmvm genannt und enthält die in beiden Sequenzmotiven mutierte IR in *frc*-Transkriptionsrichtung vor dem Gen der β -Glucuronidase (Abbildung 23).

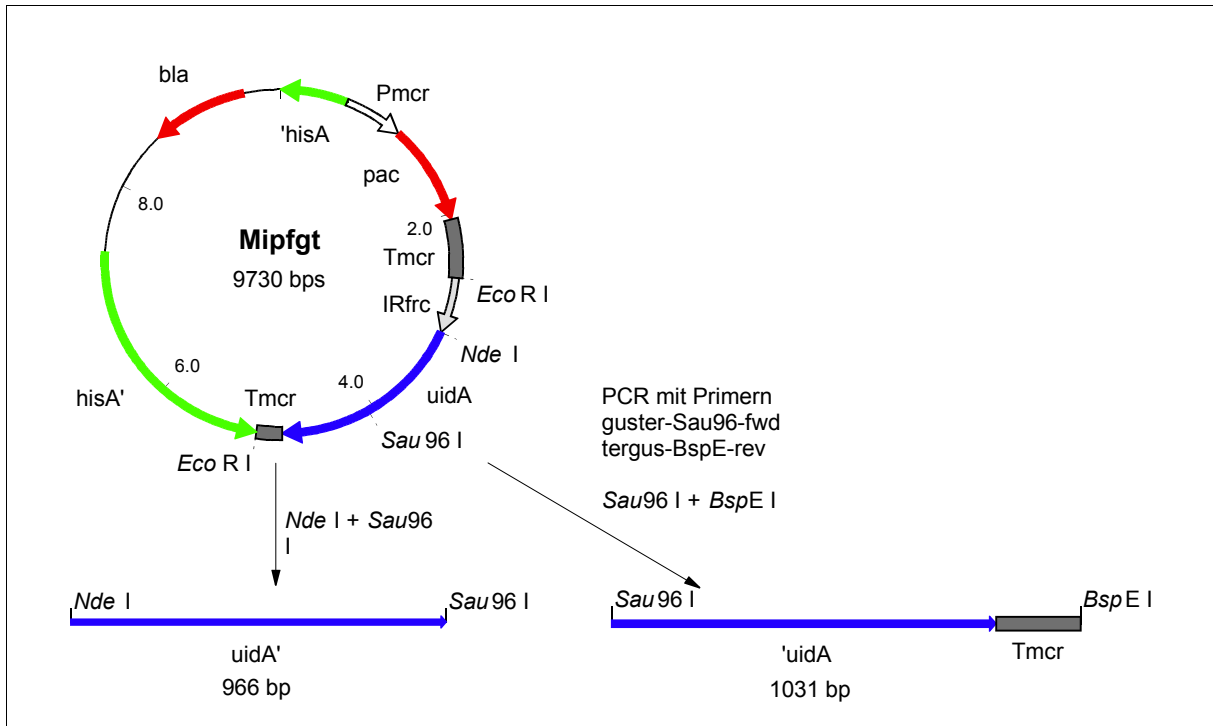


Abbildung 22: **Klonierung der uidA Fragmente aus Mipfgt.** Für die Durchführung von Reportergentests mit pINT basierenden Vektoren mußte das Gen der β -Glucuronidase in den Vektor kloniert werden. Hierzu wurde das N-terminale Fragment durch Behandlung mit *NdeI* und *Sau96I* erhalten. Der C-Terminus sowie der Terminator der Methyl-CoM-Reduktase wurde mit Hilfe der PCR mit den Primern *guster-Sau96-fwd* und *tergus-BspE-rev* amplifiziert. Beide Fragmente wurden nach ihrer Aufreinigung über Agarosegele und behandeln mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen in den Vektor pINTIRfvmv kloniert.

Der korrespondierende Vektor pIRvmfm mit der IR in *vhc*-Transkriptionsrichtung (Abbildung 23) wurde durch Umdrehen der intergenen Region mittels PCR mit den Primern *IRftov-Nde-fwd* und *IRftov-Xho-rev* und anschließende Klonierung des aufgereinigten und mit *NdeI* und *XhoI* behandelten PCR-Produktes in den mit *NdeI* und *XhoI* behandelten Vektor pIRfvmv erhalten.

6.2.2.2 Herstellung der Referenz-Plasmide pIRf und pIRv

Als Kontrolle und Referenz wurde die unmutierte intergene Region (Abbildung 23) aus dem Plasmid Mipfgt mit den Primern *IRvtof-Nde-fwd* und *IRvtof-Xho-rev* sowie aus dem Plasmid Mipvgt mit den Primern *IRftov-Nde-fwd* und *IRftov-Xho-rev* amplifiziert. Beide Fragmente wurden ebenfalls nach Aufreinigung des PCR-Produktes mit *NdeI* und *XhoI* behandelt und in den mit *NdeI* und *XhoI* behandelten Vektor pIRvmfm kloniert.

6.2.2.3 Herstellung der nur in einem Sequenzmotiv mutierten intergenen Region

Die nur im *frc*-proximalen Sequenzmotiv mutierte intergene Region wurde aus p*fmut* mit Hilfe der Primer IRvtof-Nde-fwd und IRvtof-Xho-rev sowie IRftov-Nde-fwd und IR-ftov-Xho-rev amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte IRfmv und IRvfm wurden wie oben nach behandeln mit *Nde*I und *Xho*I in den mit *Nde*I und *Xho*I behandelten Vektor pIRvmfm kloniert. Die resultierenden Vektoren pIRfmv und pIRvfm enthalten die intergene Region in *frc*- bzw. *vhc*-Transkriptionsrichtung mit einem intakten *vhc*-proximalen und einem mutierten *frc*-proximalen Sequenzmotiv (Abbildung 23).

Die im *vhc*-proximalen Sequenzmotiv mutierte intergene Region wurde aus dem Plasmid pIRv ebenfalls durch Fusions-PCR erhalten. Hierzu wurde mit den Primern IRftov-Xho-rev und mut-rev der *frc*-proximale Teil der intergenen Region erhalten und mit den Primern mut-fwd und IRftov-Nde-fwd der *vhc*-proximale Teil der IR. Die Primer mut-fwd und mut-rev tragen hierbei die Mutationen im *vhc*-proximalen Sequenzmotiv. Die Fusion beider Fragmente erfolgte mit den beiden Primern IRftov-Xho-rev und IRftov-Nde-fwd. Die Klonierung erfolgte wie oben in den mit *Nde*I und *Xho*I behandelten Vektor pIRvmfm. Aus dem hierdurch resultierenden Vektor pIRvmf wurde die IR mit den Primern IRvtof-Nde-fwd und IRvtof-Xho-rev amplifiziert und nach Behandeln mit *Nde*I und *Xho*I in den entsprechend geöffneten Vektor pIRfmvm kloniert. Der resultierende Vektor wurde pIRfvm genannt.

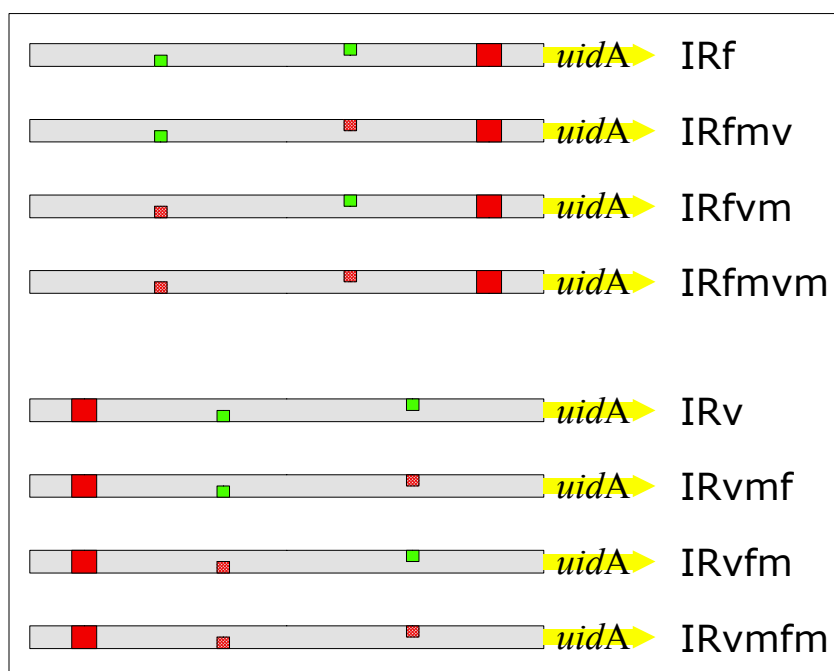


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Promotor-*uidA* Fusion in den Plasmiden pIRf, pIRfmv, pIRfvm, pIRfmvm, pIRv, pIRvmf, pIRvfm und pIRvmfm. Die rote Box stellt die Heptamersequenzen dar. Die grüne Box steht für das 11 bp Sequenzmotiv. Die rot durchkreuzte Box stellt das mutierte Sequenzmotiv dar. Der gelbe Pfeil deutet den Start des β -Glucuronidasegens *uidA* hin. IRfxxx: Intergene Region in *frc*-Transkriptionsrichtung; IRvxxx: Intergene Region in *vhc*-Transkriptionsrichtung.

Die so hergestellten Plasmide wurden mit dem Primer pSL-lacZ' sequenziert um die korrekte Amplifikation der einzelnen Fragmente zu überprüfen und anschließend in *Methanococcus voltae* transformiert.

6.2.3 Analyse der Expression von β -Glucuronidase in den Promotormutanten.

Es wurden jeweils zwei Transformanten der Stämme IRf, IRfmv, IRfvm, IRfmvm, IRv, IRvmf, IRvfm und IRvmfm inokuliert und nach 5 Passagen in Medium mit bzw. ohne Selenit in Reportergerätesten eingesetzt. Zur Messung wurde darauf geachtet, daß die Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase waren (OD_{600} von 0.6-0.8). Es wurde jeweils 1 ml Kulturvolumen abzentrifugiert und eine Doppelbestimmung zweier unabhängiger Verdünnungen durchgeführt.

Tabelle 20: Spezifische Aktivität der β -Glucuronidase bei Transkription durch den *frc*-Promotor

Transformante	+Se [nmol*min⁻¹*mg⁻¹]	-Se [nmol*min⁻¹*mg⁻¹]
IRf	32±2	2248±250
IRfmv	20±2	1287±101
IRfvm	2±1	113±17
IRfmvm	3±1	7±1

Tabelle 21: Spezifische Aktivität der β -Glucuronidase bei Transkription durch den *vhc*-Promotor

Transformante	+Se [nmol*min⁻¹*mg⁻¹]	-Se [nmol*min⁻¹*mg⁻¹]
IRv	6±1	2167±162
IRvmf	0	252±29
IRvfm	0	287±30
IRvmfm	0	167±22

Die Mutation beider 11 bp Sequenzmotive führt in beiden Transkriptionsrichtungen zu einem dramatischen Verlust an Reporterogenaktivität in Abwesenheit von Selen. Ein Aktivitätsverlust wird auch bei den Einzelmutanten beobachtet. Der Vergleich der beiden Einzelmutanten zeigt, insbesondere für den *frc*-Promotor, dass Mutationen im *frc*-proximalen Sequenzelement zu geringeren Auswirkungen auf die Reporterexpression führen als Mutationen im *vhc*-proximalen Sequenzmotiv. Bei der Expression der β -Glucuronidase in Anwesenheit von Selen sind keine Auswirkungen der Mutationen festzustellen (Tabelle 20, Tabelle 21 und Abbildung 24).

Insgesamt scheinen beide Sequenzelemente gemeinsam eine Aktivierung der Transkription in Abwesenheit von Selen zu vermitteln.

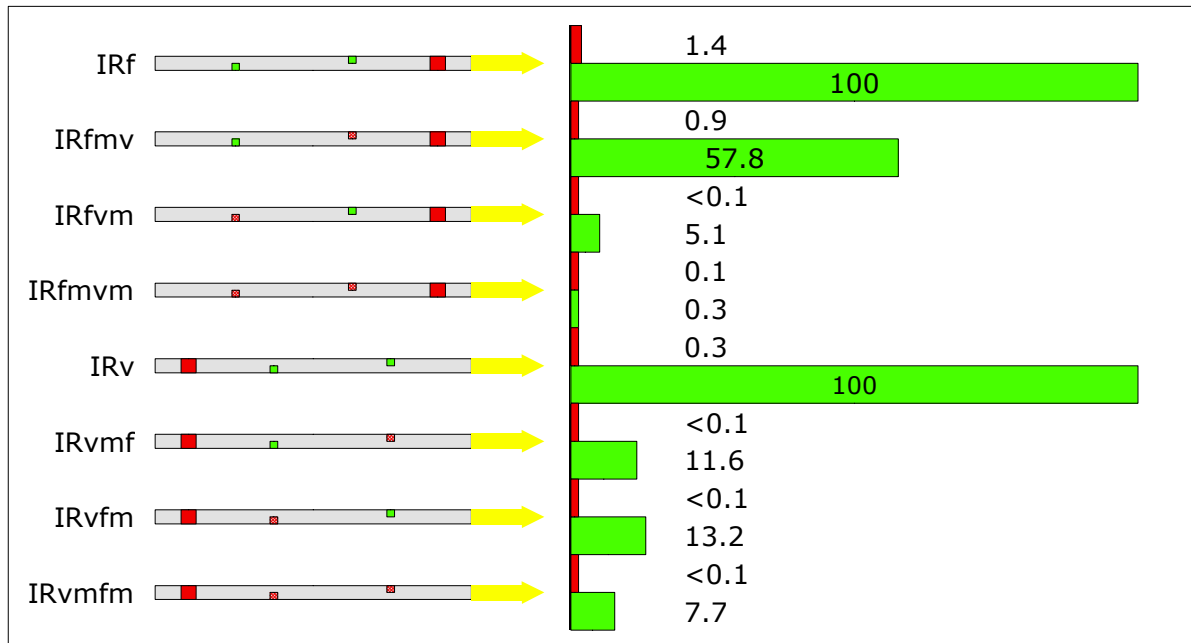


Abbildung 24: **Relative β-Glucuronidaseexpression der Promotormutanten.** Die Grafik zeigt die prozentuale β-Glucuronidaseaktivität der einzelnen Promotormutanten relativ zur Aktivität des Wildtyp-promotors. Die Promotor-Gen-Fusionen sind links schematisch dargestellt. Der gelbe Pfeil deutet den Beginn des *uidA*-Gens an. Die kleinen grünen Boxen stehen für das nicht mutierte 11 bp Sequenzmotiv. Die kleinen roten Boxen stehen für das mutierte 11 bp Sequenzmotiv. Die große rote Box stellt die Heptamersequenzen dar.

6.3 Die Undecamersequenz wird spezifisch durch einen Proteinkomplex aus *M. voltae* erkannt

Nachdem durch Reportergentests gezeigt werden konnte, daß die 11 bp großen Sequenzmotive eine Aktivierung der Expression der β-Glucuronidase vermitteln, wurde versucht den Faktor zu identifizieren, der diese Sequenz spezifisch erkennt. Hierzu wurden Gelretardationsexperimente mit doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Da das *vhc*-proximale Aktivatorelement nach Auswertung der Reportergentests die Hauptbindestelle zu sein scheint, wurden die Oligonukleotide vom Sequenzbereich um das *vhc*-proximale Sequenzmotiv abgeleitet.

6.3.1 Partielle Reinigung eines Proteinrohextraktes aus *M. voltae*

Da aus Zellrohextrakt kein spezifisches Retardationsexperiment erhalten werden konnte, wurde der Zellextrakt über eine Heparin-Sepharose Säule partiell aufgereinigt. Für die ersten Tests wurde hierzu eine offene Säule mit 5 ml Heparin-Sepharose CL-6B (2 mg/ml Heparin) verwendet.

Sowohl die Zellyse als auch die Reinigung erfolgten aerob aus 600 ml einer stationär gewachsener *M. voltae* Kultur. Die an die Heparinsepharose gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines Stufengradienten von 100 mM, 200 mM, 300 mM und 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0. von der Säule eluiert. Anhand der Absorption bei 280 nm wurden die proteinhaltigen Fraktionen jeder Salzstufe identifiziert und jeweils über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße gemeinsam ankonzentriert und entsalzt.

Der Großteil der gebundenen Proteine eluiert bei 100 mM NaCl, dies konnte sowohl anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt werden, als auch in der anschließenden Analyse der einzelnen Fraktionen auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 25). Anhand des Proteingels war auch zu erkennen, daß die Trennung auf der Heparinsäule nicht sehr scharf war, da einige Proteinbanden identischer Größe in mehr als einer Fraktion auftraten.

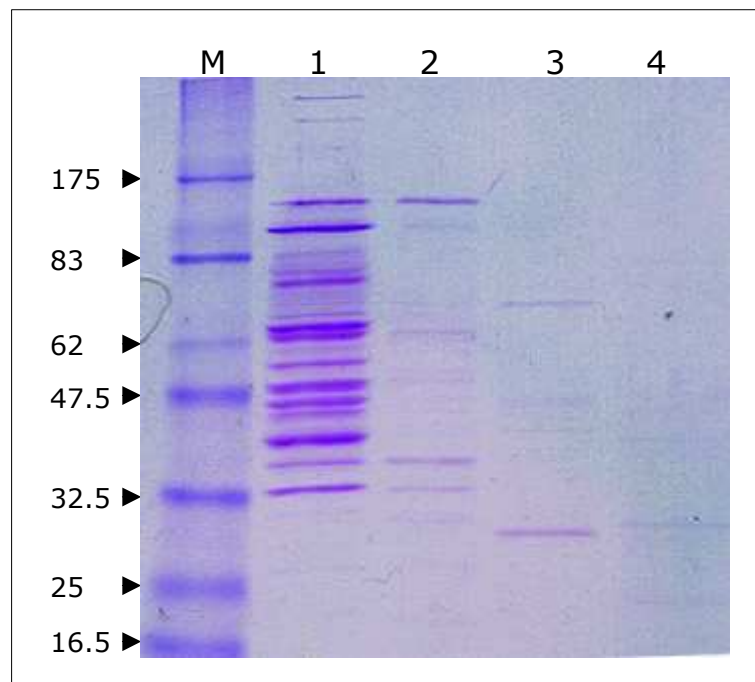


Abbildung 25: SDS-Proteingel der Fraktionen der Heparin-sepharosesäule. Die 4 von der Heparinsepharose eluierten Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Es wurden jeweils 10 μ l der ankonzentrierten Fraktionen aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Pfeile bezeichnen die Größen der Markerbanden in kD. Spur M: Proteinmarker; Spur 1: 100 mM NaCl Fraktion; Spur 2: 200 mM NaCl Fraktion; Spur 3: 300 mM NaCl Fraktion; Spur 4: 1 M NaCl Fraktion.

6.3.2 Gelretardationsexperimente der Heparin-sepharosefraktionen

Die Fraktionen von der Heparinsepharose wurden in einem Gelretardationsexperiment eingesetzt. Als DNA wurden doppelsträngige Oligonukleotide von 42 bp Länge verwendet, deren Sequenz von der *vhc*-proximalen Aktivatorbindestelle abgeleitet wurde. Sie wurden so ausgewählt, daß sich stromaufwärts und stromabwärts des Sequenzmotivs noch jeweils weitere 15 bzw. 16 Basenpaare befinden (Position 98-139 der intergenen Region in Abbildung 4). Die spezifische DNA vakt wurde aus den Oligodesoxyribonukleotiden shift-vakt53 und shift-vakt35 hergestellt und entspricht der Wildtypsequenz. Als Kontrolle der Spezifität der Bindung diente die DNA vmut, sie enthält die mutierte Aktivatorbindestelle und wurde aus den Oligodesoxyribonukleotiden shift-vmut53 und shift-vmut35 erhalten. Eine weitere unspezifische DNA vus wurde aus den

Oligodesoxyribonukleotiden shift-us53 und shift-us35 erhalten und enthält anstatt der Aktivatorbindestelle die Sequenz CGCGCGCGCGC. Die drei Oligonukleotide wurde mit T4 Polynukleotidkinase am 5'-Ende mit ^{32}P markiert. Die Bindereaktion wurde mit $3\ \mu\text{l}$ ($\sim 0.2\ \mu\text{g}$) der jeweiligen Fraktionen und $2\ \mu\text{l}$ ($0.4\ \text{pmol}$) der markierten DNA bei 37°C für 30 min in Bindepuffer durchgeführt. Es wurde ein 5% natives Acrylamidgel zur Auftrennung der Bindereaktion verwendet. Nach Trocknen des Gels wurde über Nacht ein Autoradiogramm angefertigt.

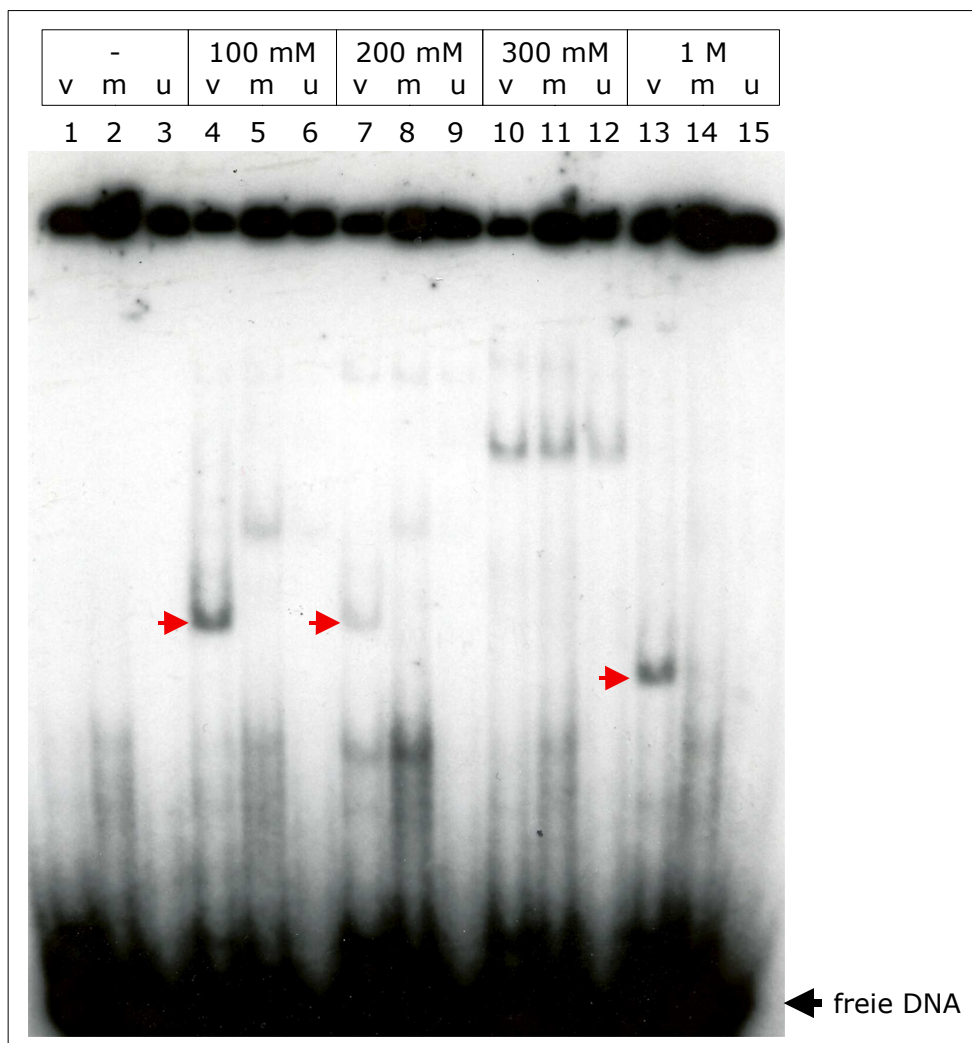


Abbildung 26: Gelretardation der Proteinfraktionen der Heparinsepharosesäule. Autoradiographie des nativen Acrylamidgels der Bindereaktionen der vier Proteinfraktionen aus der Heparinsepharose-Reinigung. Als DNA wurden die ^{32}P -markierten Oligonukleotide vakt (v), vmut (m) und vus (u) eingesetzt. Die Spuren 1-3 dienen zur Kontrolle und enthalten in der Bindereaktion die jeweilige DNA ohne Protein. Spuren 3-6: Bindereaktionen der 100 mM NaCl Fraktion; Spuren 7-9: Bindereaktionen der 200 mM NaCl Fraktion; Spuren 11-12: Bindereaktionen der 300 mM NaCl Fraktion und Spuren 13-15: Bindereaktionen der 1 M NaCl Fraktion. Die roten Pfeile weisen auf mögliche spezifisch retardierte Banden hin.

Nur die Fraktionen 100 mM und 1 M NaCl zeigten eine retardierte Bande die mit der mutierten und der unspezifischen DNA nicht zu sehen war. Die schwache Bande in der 200 mM NaCl Fraktion ist von ihrer apparenten Laufweite identisch mit der der Vorgängerfraktion (Abbildung 26). Da im Proteingel Banden identischer Größe in der 100 mM Fraktion und der 200 mM Fraktion zu sehen sind, ist davon auszugehen, daß es sich wahrscheinlich um das selbe Protein handelt (Abbildung 25).

In einem zweiten Gelretardationsexperiment wurden die Fraktionen, die mit 100 mM NaCl und 1 M NaCl von der Säule eluierten, auf die Spezifität der Bindung an die DNA untersucht. Die Bindereaktion wurde hierzu mit der ^{32}P markierten spezifischen DNA vakt durchgeführt unter Zugabe eines 10 fachen Überschusses der unmarkierten spezifischen DNA vakt bzw. eines 10 fachen oder 100 fachen Überschusses der unmarkierten mutierten DNA vmut.

Der Kompetitionsversuch zeigte eindeutig, daß nur in der 100 mM NaCl Fraktion ein Protein vorhanden war, daß spezifisch an die Aktivatorbindestelle bindet. Bei einem 10 fachen Überschuß an spezifischer DNA vakt war in der 100 mM Fraktion keine retardierte Bande mehr zu sehen wohingegen in der 1 M Fraktion noch eine schwache Bindung festgestellt werden konnte. Die Kompetition mit der mutierten DNA vmut führte in der 100 mM Fraktion mit keiner der beiden getesteten Konzentrationen zu einer Änderung des Bindungsverhaltens. Die Zugabe der mutierten DNA zur Bindereaktion der 1 M NaCl Fraktion führte jedoch bei einem 100 fachen Überschuß zum Verlust der Bindung (Abbildung 27).

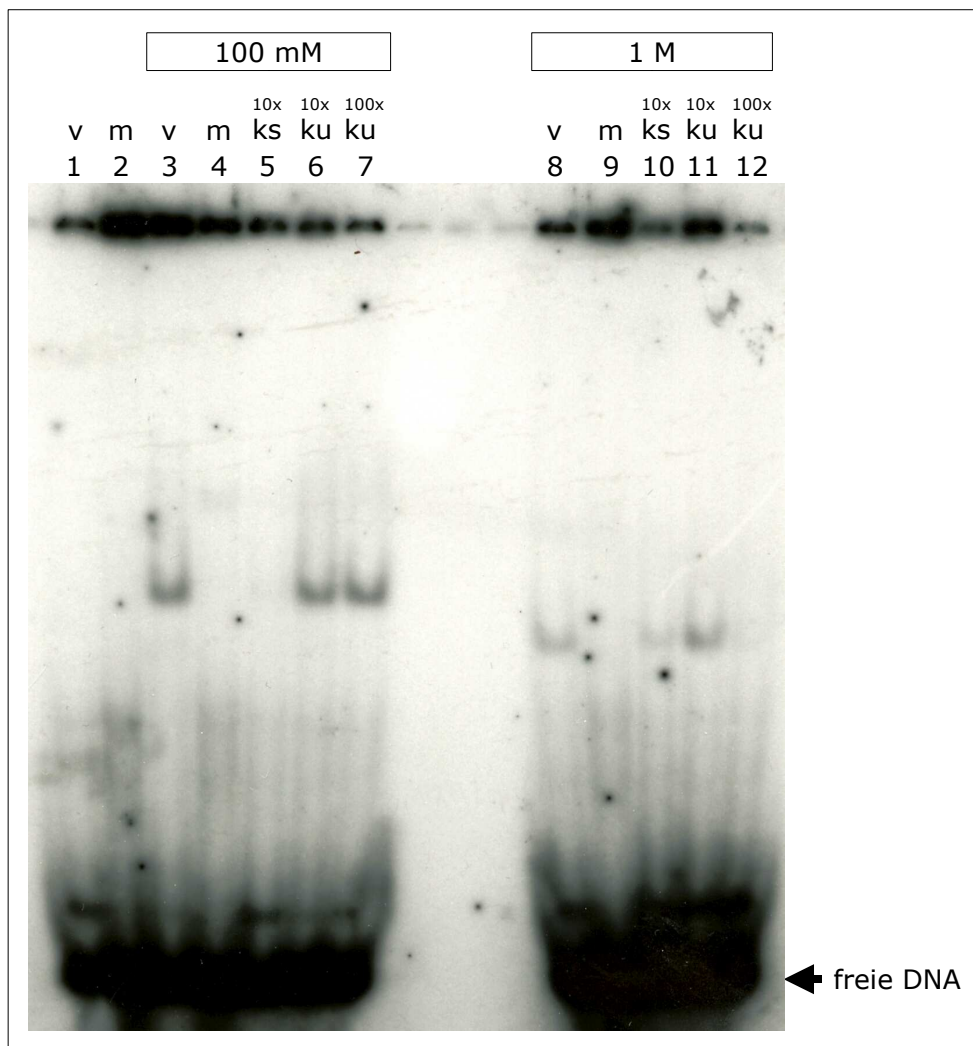


Abbildung 27: Überprüfung der Spezifität der Gelretardation der 100 mM und 1 M NaCl Fraktionen aus der Heparinsepharosereinigung. Autoradiographie des nativen Polyacrylamidgels der Bindereaktionen mit spezifischer (ks) und unspezifischer Kompetitor-DNA (ku). Es wurden die ^{32}P -markierte Oligonukleotide vakt (v) und vmut (m) eingesetzt. Die Spuren 1 und 2 enthalten die Bindereaktionen der jeweiligen DNA ohne Zugabe von Protein. Die Spuren 3 bis 7 entsprechen den Bindereaktionen der 100 mM NaCl Fraktion. In den Spuren 8 bis 12 sind die Bindereaktionen der 1 M NaCl Fraktion aufgetragen. Die Konkurrenz erfolgte mit einem 10 fachen Überschuß an unmarkierter DNA vakt (10x ks), sowie mit einem 10 fachen (10x ku) bzw. 100 fachen (100x ku) Überschuß der mutierten DNA vmut.

6.4 Das Aktivatorprotein ist auch in selenhaltigen Zellen vorhanden.

Mit 2 g stationär mit Selen gewachsener *M. voltae* Zellen wurde ebenfalls eine partielle Reinigung durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten von 100 mM NaCl, 200 mM NaCl und 1 M NaCl. Nach Konzentration der proteinhaltigen Fraktionen über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße wurden 4 µl (2 µg) Protein der 100 mM NaCl und 200 mM NaCl Fraktionen aus dieser Reinigung in einem Gelretardationsexperiment eingesetzt. Als Referenz wurden 3 µl (0.2 µg) der 100 mM NaCl Fraktion aus der Reinigung selenfreien Zellextraktes eingesetzt. Im Folgenden werden die Fraktionen der Reinigung aus selenfreiem Zellextrakt mit dem Index -Se und die der Reinigung aus selenhaltigem Zellextrakt mit dem Index +Se bezeichnet.

Zur Kontrolle der Spezifität einer etwaigen Bindung an die DNA vakt wurden mit den beiden Fraktionen aus der Reinigung des selenhaltigen Zellextraktes zusätzlich Bindereaktionen an die markierte DNA vakt unter Zugabe von spezifischem Kompetitor (10 facher Überschuß an unmarkierter DNA vakt) sowie unspezifischem Kompetitor (10 bzw 100 facher Überschuß an unmarkierter DNA vmut) durchgeführt (Abbildung 28).

Die Autoradiographie des getrockneten Gels zeigte, daß auch bei der Reinigung aus selenhaltigem Zellextrakt in der 100 mM_(+Se) bzw. 200 mM_(+Se) NaCl Fraktion ein Protein vorhanden war, das spezifisch die Aktivatorbindestelle erkennt und bindet.

Zusätzlich war mit der 100 mM_(+Se) NaCl Fraktion eine zusätzliche Bande zu erkennen. Die untere schwächere Bande entspricht der in der 100 mM_(-Se) NaCl Fraktion auftretenden Bande. Nach Zugabe eines 10 fachen Überschusses an unmarkierter DNA vakt zur Bindereaktion verschwand die obere Bande und die Intensität der unteren nahm zu. Dies ließ auf die Bildung eines multimeren Proteinkomplexes schließen.

Es zeigte sich, daß auch bei der Aufreinigung des selenhaltigen Zell-extraktes das spezifisch bindende Protein bei 100 mM NaCl nicht vollständig von der Säule eluiert wurde. Die 200 mM_(+Se) Fraktion enthielt ein zur unteren Bande der 100 mM_(+Se) Fraktion identisch retardiertes Signal.

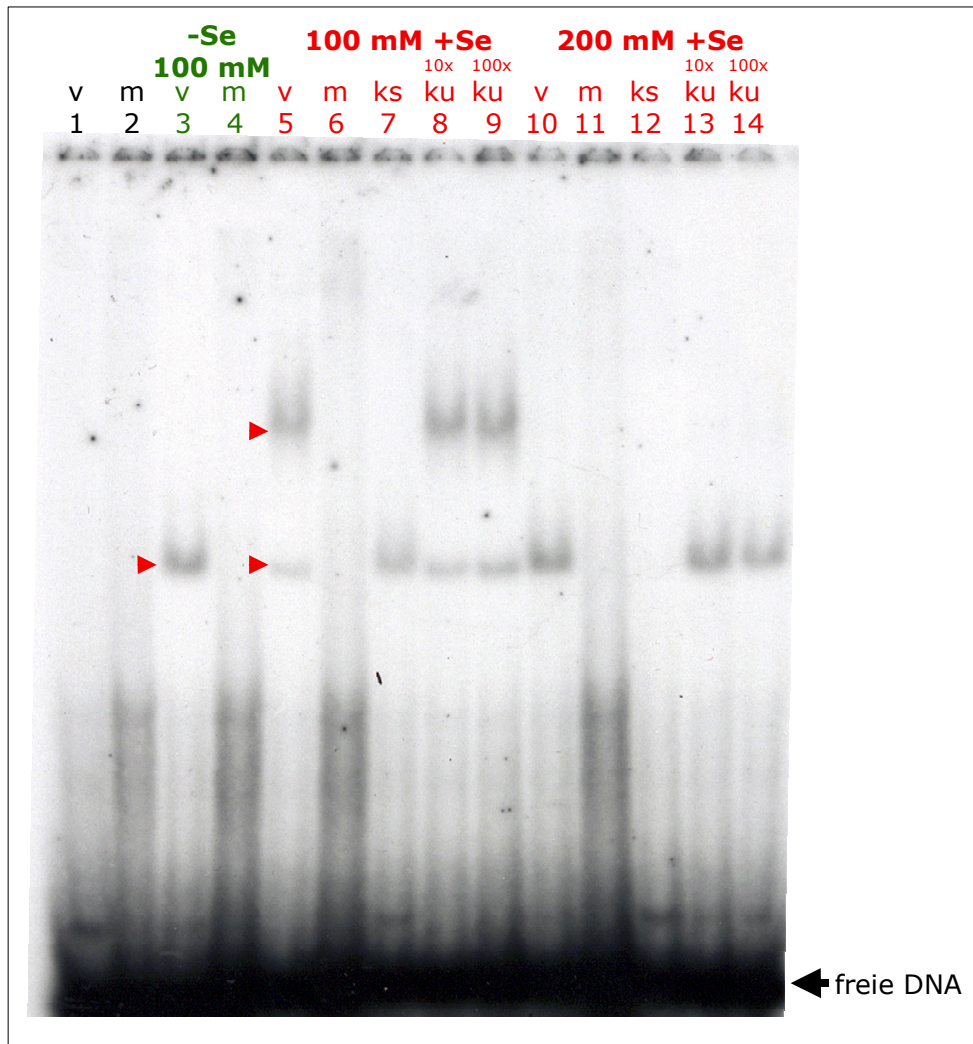


Abbildung 28: Gelretardationsexperiment mit Proteinfractionen aus Zellen die ohne bzw. mit Selen gezogen wurden. Autoradiographie eines nativen Polyacrylamidgels der Bindereaktionen der 100 mM_(-Se) NaCl Fraktion, sowie der 100 mM_(+Se) NaCl und 200 mM_(+Se) NaCl Fraktionen. v: ³²P-markierten DNA vakt; m: ³²P-markierte DNA vmut. Die Konkurrenz erfolgte mit einem 10 fachen Überschuß der DNA vakt (ks) bzw. einem 10 fachen (10x ku) oder 100 fachen (100x ku) Überschuß der DNA vmut. Spuren 1 und 2: Kontrolle, Bindereaktionen der DNA Fragmente ohne Zugabe von Protein; Spuren 3 und 4: Referenz, Bindereaktion der 100 mM_(-Se) NaCl Fraktion; Spuren 5-9: Bindereaktion der 100 mM_(+Se) NaCl Fraktion; Spuren 10-14: Bindereaktion 200 mM_(+Se) NaCl Fraktion. Rote Pfeile zeigen auf die spezifisch retardierten Banden

Diese zusätzliche Bande trat auch bei höheren Konzentrationen der $100 \text{ mM}_{(-\text{Se})}$ Fraktion auf. Konkurrenz mit einem 10 fachen Überschuß an spezifischer DNA führt in der Bindereaktion der $100 \text{ mM}_{(+\text{Se})}$ Fraktion zum Verlust der oberen Bande, wohingegen die Intensität der unteren Bande zunahm. Erst ein 100 facher Überschuß an spezifischer DNA führt zum Verlust jeglicher Bindung an die markierte DNA (Abbildung 29).

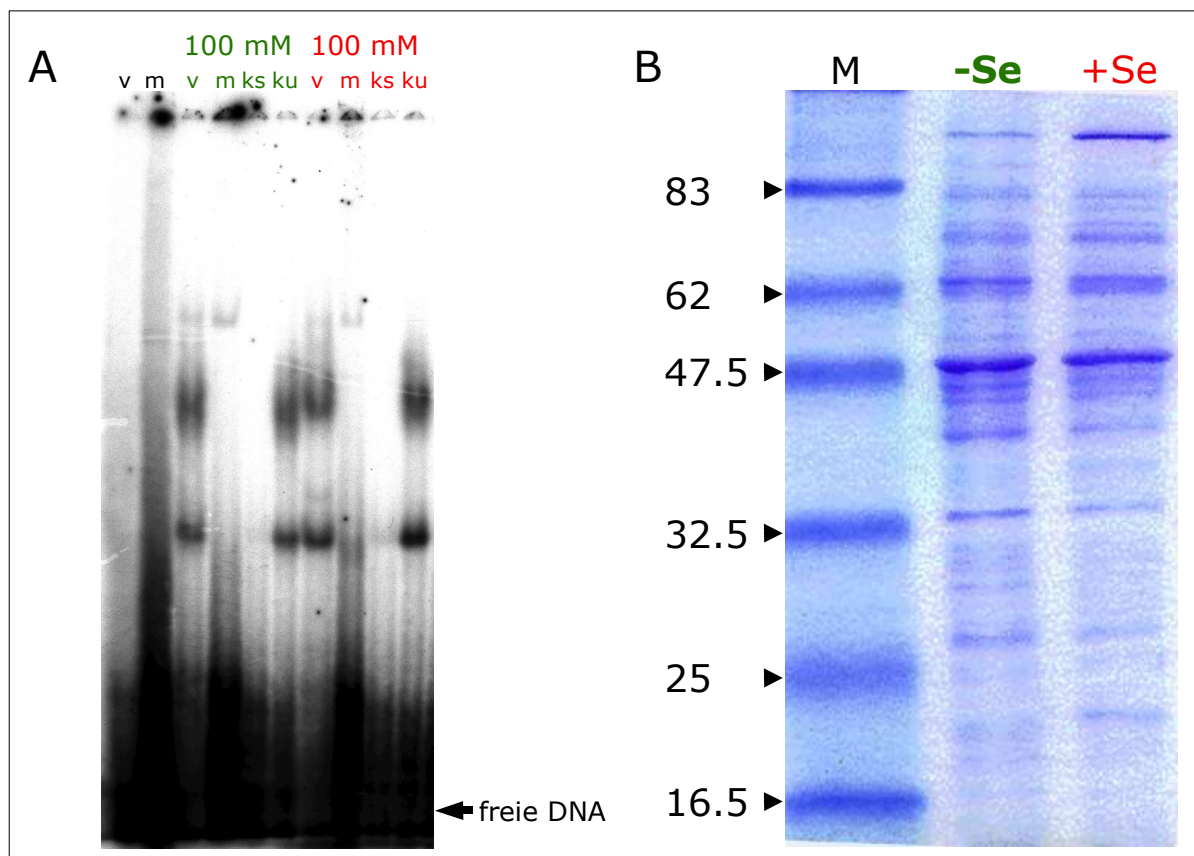


Abbildung 29: Vergleichende Analyse gleicher Proteinkonzentrationen der $100 \text{ mM}_{(-\text{Se})}$ und $100 \text{ mM}_{(+\text{Se})}$ Fraktionen. A: Autoradiographie eines Gelretardationsexperiments mit jeweils $2 \mu\text{g}$ Protein der beiden Fraktionen. v: DNA vakt; m: DNA vmut. ks: Konkurrenz mit 100 fachen Überschuß an unmarkierter DNA vakt; ku: Konkurrenz mit 100 fachen Überschuß an unmarkierter DNA vmut. Spur 1 und 2: Kontrolle, markierte DNA ohne Zugabe von Protein; Spuren 3-6: $100 \text{ mM}_{(-\text{Se})}$ Fraktion; Spuren 7-10: $100 \text{ mM}_{(+\text{Se})}$ Fraktion. B: SDS-Acrylamidgel der $100 \text{ mM}_{(-\text{Se})}$ Fraktion (grün) und der $100 \text{ mM}_{(+\text{Se})}$ Fraktion (rot). Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Pfeile geben die Größe der Markerbanden in kD an. M: Proteinmarker.

6.5 Das Bindeprotein ist nicht TBP

Die Aktivatorbindestelle enthält eine Konsensus TATA-Box (TTTATATA). Stromabwärts dieser möglichen TATA-Boxen befindet sich im richtigen Abstand von ca. 23 bp ein mögliches Initiatorelement (Abbildung 30). Es war deshalb wichtig auszuschließen, daß es sich hier um einen sekundären Promotor handelt. Weiterhin mußte gezeigt werden, daß das spezifisch bindende Protein nicht TATA-bindendes Protein (TBP) ist.

```

61 TCTATAATGCTAACTAATATATATAATAACAATTTTTAAATCGAAATCAAAGGTTTATAT
AGATATTACGATTGATTATATATATTTATGTTAAAAATTTAGCTTTAGTTTTCCAAATATA

121 AGAAAATTTTAAAGACATTATATTGAATTATTAATATGGTTAATAATATTTCTAATATCT
GCTTTTAAAATTTCTGTAATATAACTTAATAATTATACCAATTATTATAAAGATTATAGA

181 ATTAATAAAAGAAATACCATATTAGATTTTTTAAATATATATTTAAATGTTTACTGATATG
TAATTTATTTCTTTATGGTATAATCTAAAAAATTATATATAAAATTTACAAATGACTATAC

241 TGAATTGTTTATTTTAAATTACAAAATAAAAACTAAACATCTATATAAACACATAATTGA
ACTTAACAAATAAAATTTAATGTTTTATTTTTGATTTGTAGATATATTTGTGTATTAACT
  
```

Abbildung 30: Ausschnitt aus der Sequenz der intergenen Region. In grün sind die beiden Aktivatorbindestellen markiert. Die dort auf dem jeweiligen Gegenstrang enthaltenen Konsensus-TATA-Boxen sind fett und unterstrichen dargestellt. Die zugehörigen möglichen Initiatorelemente sind zusätzlich noch kursiv dargestellt. Die TATA-Box des *vhc*-Promotors ist dunkelgrau hinterlegt. Der hellgrau hinterlegte Bereich entspricht der in der Gelretardation eingesetzten spezifischen DNA vakt.

6.5.1 Es gibt nur ein *uidA*-Transkript in *M. voltae* Transformanten

Die im *vhc*-proximalen 11 bp Sequenzelement enthaltene TATA-Box (Pos. 114-120) stellt zusammen mit dem möglichen Initiatorelement an Position 143-146 einen potentiellen Promotor für die *frc*-Gengruppe dar. Deshalb wurde zur Überprüfung, ob es zusätzlich zu dem mit Primerverlängerung kartierten Transkriptionsstart (Müller, 1996) noch einen zweiten Startpunkt gibt, Gesamt-RNA aus der *M. voltae* Transformante IRf isoliert.

Da die Transkripte der selenfreien Hydrogenasen nur sehr schwer zu detektieren sind (Berghöfer et al., 1994), wurde das β -Glucuronidase Transkript in einem Northern-Blot Experiment zur Analyse verwendet. Die möglichen beiden Transkripte unterscheiden sich hinreichend um sie auf einem 0.8 % Agarosegel auftrennen zu können (Tabelle 22). Als Sonde diente ein 514 bp großes *Nde* I-*Bam*H I-Fragment des *uidA*-Gens aus pIRf.

Tabelle 22: Längen der möglichen Transkriptionsprodukte.

Promotor	<i>uidA</i>-Transkriptlänge
P _{frc1} (mit Primerverlängerung kartiert)	2019 bp
P _{frc2} (in <i>vhc</i> -proximaler Aktivatorbindestelle enthaltene TATA-Box mit zugehörigem Initiator)	2280 bp

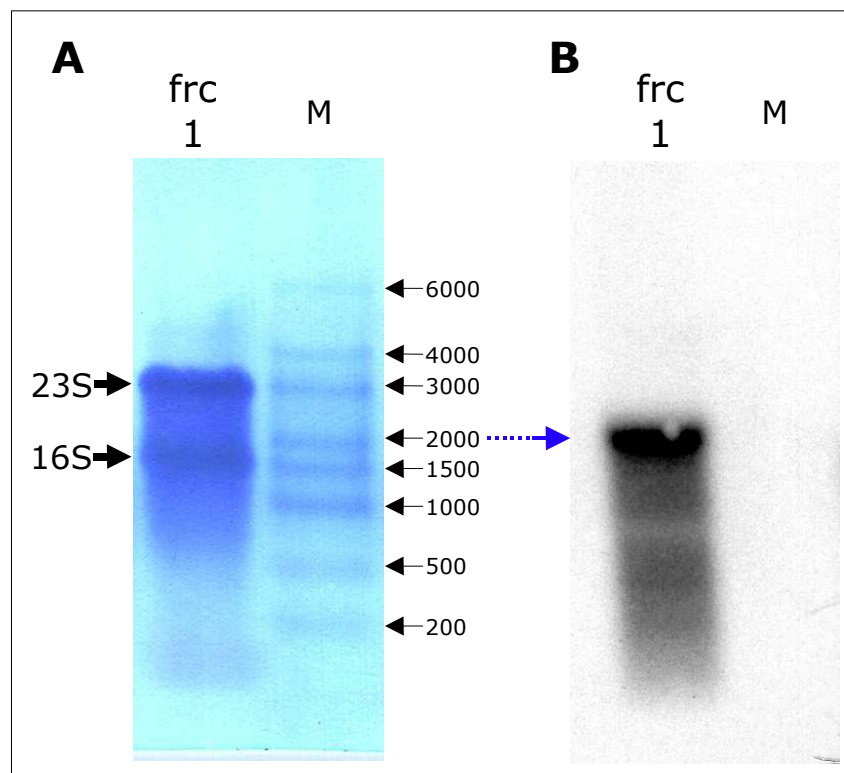


Abbildung 31: Analyse der mRNA-Länge der *uidA*-Transkripte in den *M. voltae* Transformanten IRf und IRv. **A:** Methylenblaufärbung des Northern-Blots. Spur 1: 18 µg GesamtRNA aus der Transformante IRf, *uidA* Transkription durch *frc*-Promotor; M: RNA Leitermarker 'Broad Range' (MBI Fermentas). Die Pfeile links weisen auf die Banden der 16S (~1.5 kb) und der 23S rRNA (~3.0 kb) hin. Die Pfeile rechts zeigen die Größe der Markerbanden in Basenpaaren an. **B:** Autoradiographie des mit einer ³²P markierten *uidA*-Sonde hybridisierten Northern-Blots. Spur 1: *uidA*-Transkript des *frc*-Promotors bei ~2.0 kb

Die Autoradiographie des Blots zeigte eindeutig, daß nur ein *uidA*-Transkript des *frc*-Promotors existiert. Die errechnete Größe von ca. 2.0 kb entspricht der Transkriptlänge die für den kartierten Promotor erwartet wurde (Abbildung 31).

6.5.2 TBP ist nicht in der spezifisch retardierenden Fraktion

Da die Aktivatorbindestelle einen TATA-Box umfaßt, bestand die Möglichkeit, daß das Bindeprotein in den Heparinfraktionen TATA-bindendes Protein (TBP) war. Deshalb wurden alle Fraktionen der aus selenfrei kultivierten Zellen durchgeführten Reinigung in einem Western-Blot Assay auf das Vorhandensein von TBP untersucht. Hierzu wurde ein

polyklonaler Antikörper gegen TBP aus *Thermococcus celer* und als Positivkontrolle TBP aus *Methanococcus thermolithotrophicus* verwendet. Zur Detektion wurde das ECL Kit von Amersham und ein an Rettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper benutzt.

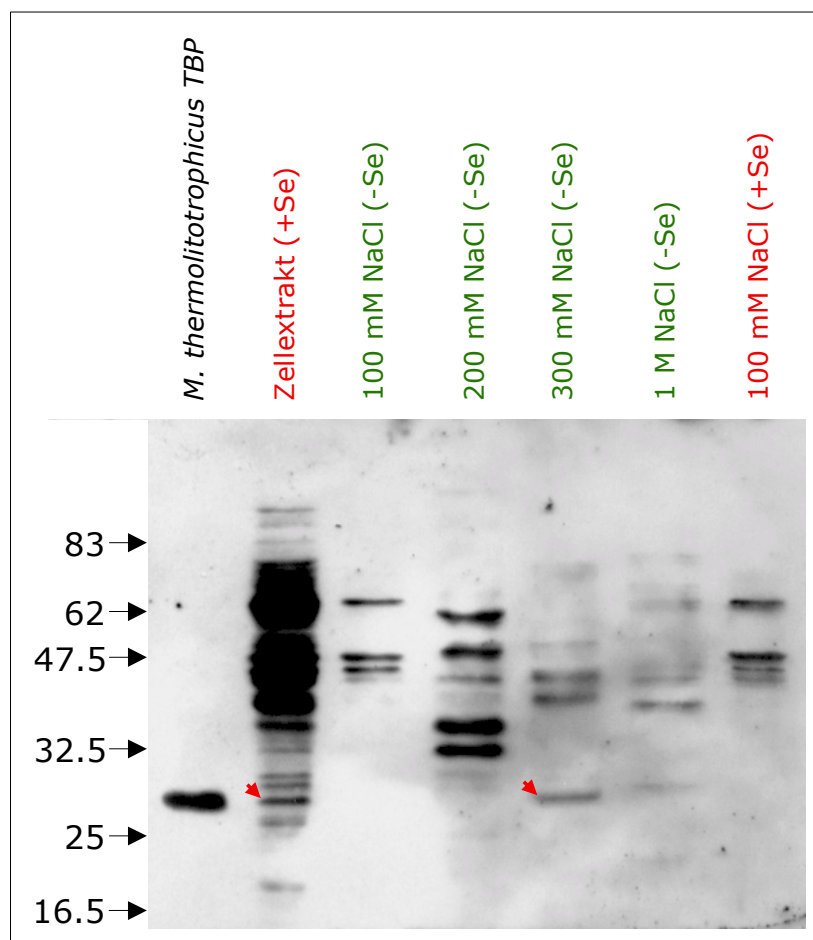


Abbildung 32: Autoradiographie des Westernblots aller Heparinfraktionen. Spur 1: 1 µg *M. thermolithotrophicus* TBP. Spur 2: 5 µg Zellextrakt. Spur 3-6: Jeweils 2.5 µg der angezeigten Fraktionen (-Se). Spur 7: 2.5 µg der 100 mM NaCl Fraktion (+Se). Rote Pfeile markieren mögliche TBP-Banden in den Fraktionen. Die Pfeile links stehen für den Proteinstandard (Zahlen in kD)

Der Westernblot zeigt, daß sowohl im Zellextrakt als auch in der 300 mM NaCl Fraktion ein Protein existiert, das die gleiche Größe wie *M. thermolithotrophicus* TBP (20 kD, apparente Größe 26 kD) besitzt. Eine entsprechende Bande ist weder in der 100 mM_(-Se) NaCl Fraktion noch in der 100 mM_(+Se) NaCl Fraktion zu finden (Abbildung 32).

6.6 Reinigung des Aktivatorproteins zur Homogenität

Nachdem nachgewiesen wurde, daß *M. voltae* einen Proteinkomplex enthält, der spezifisch an die Aktivatorbindestelle bindet, wurde aus selenfrei gezogenen Zellen der Versuch unternommen, den Aktivator zur Homogenität zu reinigen. Da angenommen wurde, daß ein Transkriptionsfaktor nicht in hoher Kopienzahl in der Zelle vorhanden ist, wurde für die Heparinsepharosechromatographie, Zellextrakt von 15-20 g Zellen verwendet.

6.6.1 Aerobe Reinigung des Aktivatorproteins

Alle Reinigungsschritte wurden aerob mit einem Zellextrakt aus 15 g Zellen, die bis zur stationären Phase gewachsen waren, durchgeführt. Die Reinigung erfolgte an einer FPLC mit einem Säulenvolumen von 15 ml Heparinsepharose. Da ein linearer Salzgradient zu keiner scharfen Trennung der Proteine führte wurde wieder ein Stufengradient benutzt. Ausgehend von den Ergebnissen der Vorversuche wurden Stufen mit 200 mM, 400 mM und 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 verwendet. Die proteinhaltigen Fraktionen jeder Stufe wurden gepoolt und in einer Rührzelle mit 10 kD Ausschlußgröße unter Druck auf ein Volumen von 5-10 ml ankonzentriert und entsalzt.

6.6.1.1 Sequenzspezifische Affinitätschromatographie des Aktivatorproteins

Die weitere Aufreinigung des Aktivators im Anschluß an die Heparinsepharosesäule erfolgte über sequenzspezifische Affinitätschromatographie mit einem kovalent über einen Aminolinker an die Säule gekoppelten doppelsträngigen Oligonukleotid. Die DNA wurde durch Aneinanderlagerung der beiden 100 bp großen Oligodesoxyribonukleotide Naktivator53 und aktivator35 erhalten. Diese beiden Oligodesoxyribonukleotide enthalten ein Dimer einer 50 bp großen, von der *vhc*-proximalen Bindestelle abgeleitete Sequenz. Am 5'-Ende des Oligonukleotids Naktivator53 befindet sich ein Aminolinker an einem Arm aus 6

Kohlenstoffatomen. Die Kopplung der DNA erfolgte kovalent an das Säulenmaterial mit anschließender Deaktivierung der verbleibenden NHS-Ester. Es wurden 25 nmol der DNA zur Kopplung eingesetzt, die Kopplungseffizienz betrug ca. 65 %.

Die Reinigung erfolgte mit einer offenen Säule mit einem Säulenvolumen von 5 ml Heparinsepharose.

Die 200 mM_(-se) NaCl Fraktion wurde mit 1 ml 10 x Bindepuffer und poly(d[I-C]) bis zu einer Endkonzentration von 0.03 µg/µl (~0.1 pmol/µl bei einer angenommenen Größe der mit Ultraschall fragmentierten Kompetitor-DNA von ca. 500 bp) als unspezifischem Kompetitor versetzt und auf 10 ml Gesamtvolumen gebracht. Diese Bindereaktion wurde 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluß wurde gesammelt und weitere zweimal auf die Säule aufgetragen um eine höhere Effizienz der Bindung zu erreichen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit jeweils 10 Säulenvolumina eines Stufengradienten von 400 mM, 600 mM und 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 von der Säule eluiert.

Da aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration keine Absorption bei 280 nm gemessen werden konnte und die Salzkonzentration des Puffers eine Messung der Peptidbindung bei 205 nm unmöglich machte wurden alle Fraktionen einer Salzstufe mit über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße um den Faktor 10 auf 5 ml ankonzentriert.

Zur Analyse der einzelnen Salzfraktionen wurde 1 ml der vereinten Fraktion nochmals über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße auf 100 µl ankonzentriert. Von diesem Konzentrat wurden 10 µl auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Fraktionen der Salzstufen von 1 M NaCl und 2 M NaCl zeigten nach einer Silberfärbung des Gels eine Proteinbande (Abbildung 33).

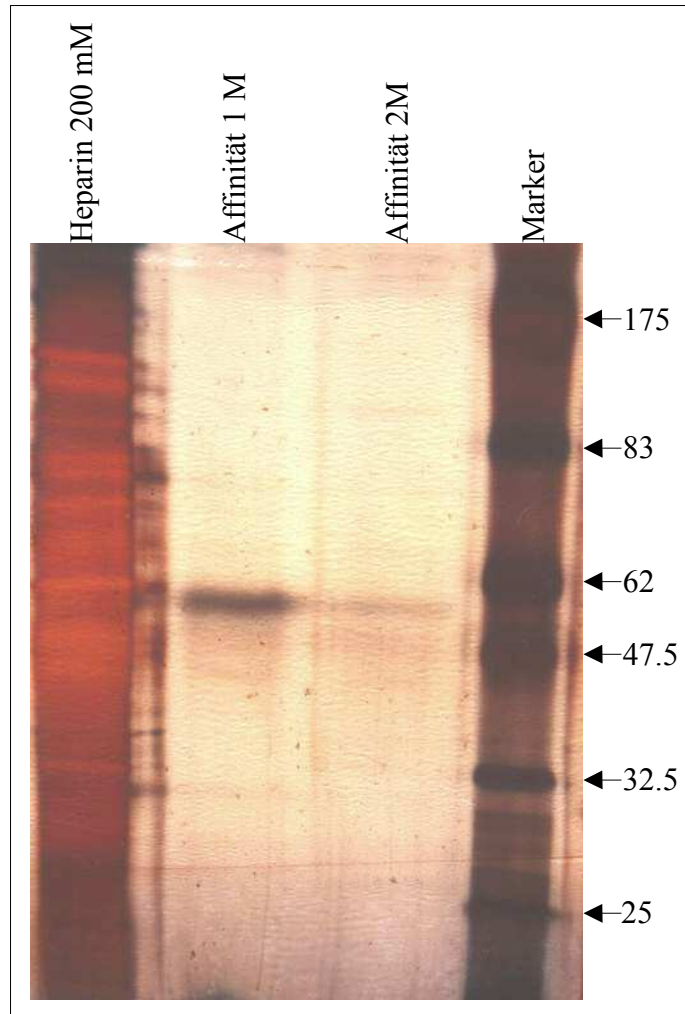


Abbildung 33: Analyse der Proteinfraktionen der Affinitätschromatographie. Das 12% SDS-Acrylamidgel wurde mit Silber gefärbt. Die Spuren sind mit den Namen der Fraktionen bezeichnet. Die Pfeile rechts geben die Größe der Markerbanden in kD an.

Eine Auswertung des Gels mit den Programmen ImageJ und Origin 4.1 zur Bestimmung der Größe des Proteins anhand der Migration der Markerbanden ergab eine Größe von ca. 55 kD für das Protein in der 1 M NaCl Fraktion. Alle Versuche mit dem gereinigten 55 kD Protein eine Bindung an das Aktivatorelement zu zeigen, waren erfolglos.

6.6.2 Anaerobe Aufreinigung des Aktivatorproteins

Die Reinigung des Aktivatorproteins wurde aufgrund des Verdachts, es könnte sich um ein redoxempfindliches Protein handeln wiederholt. Alle Reinigungsschritte wurden diesmal anaerob durchgeführt. Zur Steigerung der Ausbeute wurden darauf geachtet, die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu ernten. Es wurde erwartet, daß die Anzahl der Aktivatormoleküle auf Grund erhöhter Expression dann größer ist. Der Zellextrakt wurde im Anaerobenzelt aus 20 g Zellen hergestellt. Die partielle Reinigung des Extraktes über eine Heparinsepharosesäule erfolgte ebenfalls im Anaerobenzelt mit einer FPLC. Der Stufengradient wurde wie bei der aeroben Aufreinigung gewählt. Die 200 mM NaCl Fraktion wurde anaerob in einer Rührzelle mit 10 kD Ausschlußgröße auf ein Volumen von 10 ml ankonzentriert und entsalzt. Die so erhaltene Proteinfraction wurde mit 2 ml 10x Bindepuffer und zur Kompetition unspezifisch bindender Proteine mit 20 nmol einer DNA, die aus den Oligodesoxyribonukleotiden komp53 und komp35 erhalten wurde, versetzt. Die DNA entspricht derjenigen die an die Säule gekoppelt wurde, enthält jedoch die mutierte Aktivatorbindestelle. Zusätzlich wurde poly[d(I-C)] in einer Endkonzentration von 0.1 pmol/ μ l als unspezifischer Kompetitor eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Bindereaktion betrug 20 ml. Sie wurde für 15 min bei RT im Anaerobenzelt inkubiert.

Als Säulenmaterial diente Streptavidinsepharose an die 50 nmol einer 100 bp großen DNA aus den Oligodesoxyribonukleotiden affioligo53 und affioligo35 gekoppelt wurde. Das Oligodesoxyribonukleotid affioligo53 wurde hierzu am 5'-Ende mit Biotin markiert. Die Kopplungseffizienz betrug 95%.

Die Bindereaktion wurde mit 1 ml/min auf die Säule (Säulenvolumen 5 ml) aufgetragen. Der Durchfluß wurde für 30 min bei 1 ml/min durch die Säule rezirkuliert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Proteine mit 200 mM NaCl in 20 mM HEPES pH 7.0 und 5 mM EDTA eluiert. Die Elution

gebundener Proteine erfolgte wie bei der aeroben Reinigung mit 6 Säulenvolumina eines Stufengradienten von 400 mM, 600 mM und 1 M NaCl in 20 mM HEPES pH7.0 und 5 mM EDTA.

Die erhaltenen Fraktionen wurde nach Salzstufen getrennt im Anaerobenzelt mit einer Rührzelle (10 kD Ausschlußgröße) auf 10 ml ankonzentriert und entsalzt. Die Lagerung erfolgte in Septumflaschen unter CO₂/H₂ Atmosphäre (80%/20%) bei 4°C.

6.6.2.1 Analyse der Fraktionen der Affinitätschromatographie

Jeweils 1 ml der Fraktionen wurde über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße auf 100 µl ankonzentriert. Zur Analyse auf einem 12% SDS-Acrylamidgel wurden 10 µl dieses Konzentrats verwendet.

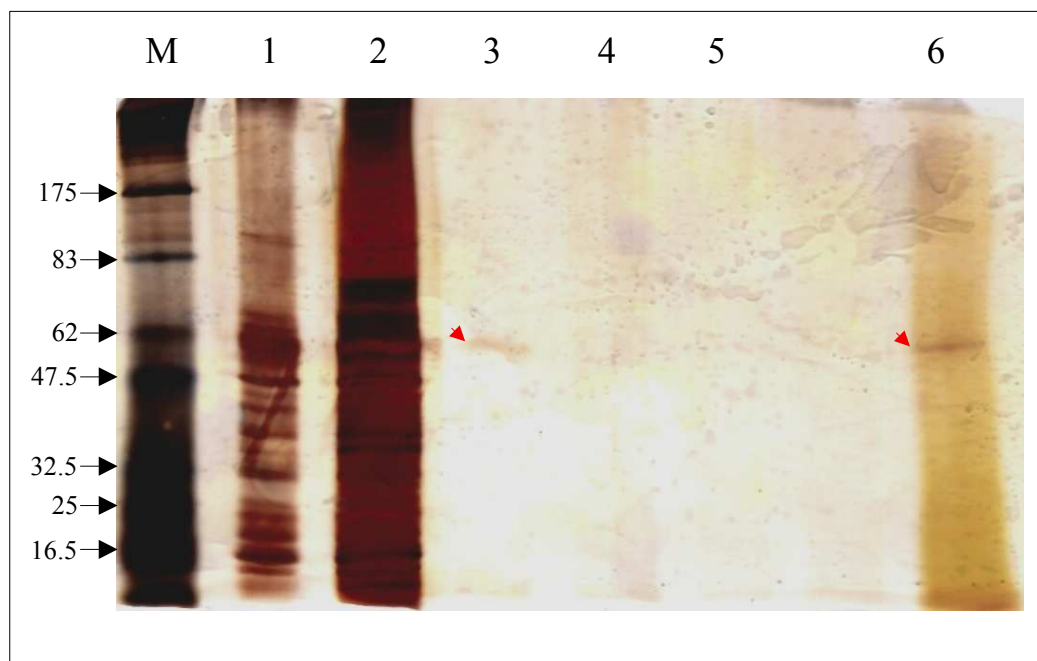


Abbildung 34: Analyse der aus der Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen. Silberfärbung eines 12% SDS-Acrylamidgels. M: Proteingrößenstandard, Pfeile zeigen die Größe der Markerbanden in kD an; Spur 1: 0.5 µg der 200 mM_(-se) NaCl Fraktion der vorangegangenen Heparinsepharosechromatographie; Spur 2: 200 mM NaCl Durchfluß der Affinitätschromatographie; Spur 3: 400 mM NaCl Fraktion; Spur 4: 600 mM NaCl Fraktion; Spur 5: 1 M NaCl Fraktion; Spur 6: 2 M NaCl Fraktion. Rote Pfeile kennzeichnen das 55 kD Protein.

Im Gegensatz zur aeroben Aufreinigung eluierte das 55 kD Protein bei 400 mM NaCl von der Säule (Abbildung 34).

Bei der aeroben Reinigung erfolgte die Elution bei 1 M NaCl.

Die Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden zusammen mit den ^{32}P markierten DNAs vakt (v) und vmut (m) in Bindereaktionen eingesetzt. Hierzu wurden 2 ml der Fraktion über eine Membran mit 10 kD Ausschlußgröße auf 50 μl ankonzentriert und jeweils 4 μl davon eingesetzt. Die Bindereaktionen wurden anschließend auf einem nativen 5% Acrylamidgel aufgetrennt. Die Autoradiographie der Gelretardation zeigte, daß das 55 kD Protein aus der 400 mM NaCl Fraktion mit der spezifischen DNA vakt eine retardierte Bande ergab, die mit der mutierten DNA vmut nicht auftrat. Weiterhin war zu sehen, daß auch im 200 mM NaCl Durchfluß der Affinitätssäule noch erhebliche Mengen dieses Proteins vorhanden waren (Abbildung 35). Die Gelretardation mit der 2 M NaCl Fraktion führte zu einem der 400 mM NaCl Fraktion entsprechenden Ergebnis, jedoch war die Intensität der retardierten Bande sehr gering (nicht gezeigte Daten). In allen anderen Fraktionen war, wie nach Analyse der Fraktionen auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu erwarten, keine retardierte Bande zu sehen. Die konzentrierte 400 mM NaCl Fraktion wurde anschließend in einem Konkurrenzexperiment mit unmarkierter DNA vakt bzw vmut eingesetzt um die Spezifität der Bindung zu kontrollieren. Es zeigte sich, daß mit einem 200 bzw 400 fachen Überschuß an unmarkierter spezifischer DNA keine Bindung an die ^{32}P markierte DNA vakt mehr erfolgte. Die unspezifische Konkurrenz ergab erst bei einem 400 fachen Überschuß an unmarkierter DNA vmut eine leichte Abnahme der Intensität der retardierten Bande (Abbildung 35).

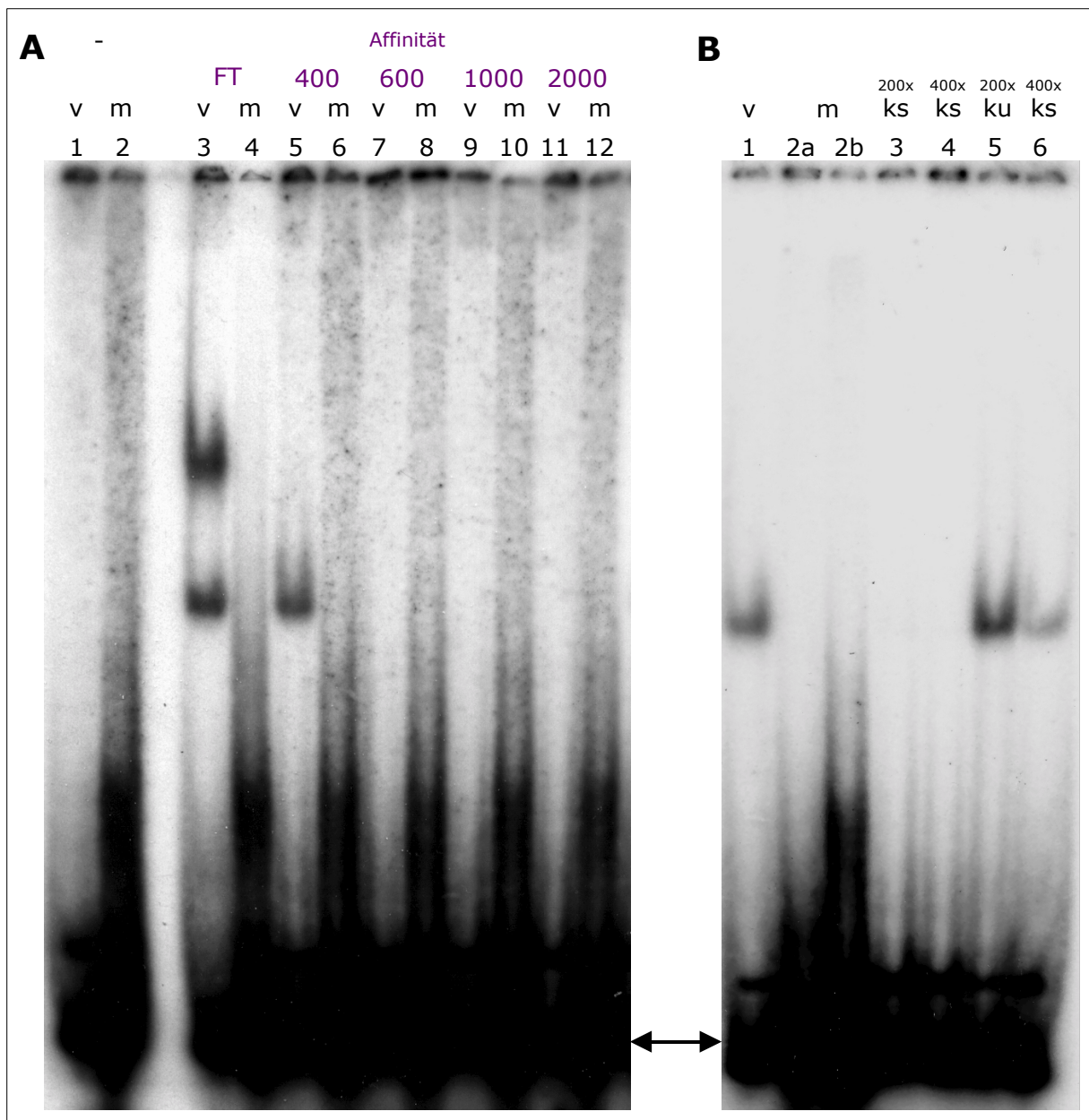


Abbildung 35: Gelretardation mit den Fraktionen von der sequenzspezifischen Affinitätsäule.

A: Die Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden in einem Gelretardationsexperiment eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie des getrockneten Gels. Die Spuren 1 und 2 enthalten als Negativkontrolle die Bindereaktion der spezifischen DNA vakt (v) bzw. der mutierten DNA vmut (m) ohne Zusatz von Protein. Die Spuren 3 bis 12 enthalten die Bindereaktion der Affinitätschromatographiefraktionen. Spur 3 und 4: Durchfluß (FT) der Affinitätschromatographie bei 200 mM NaCl; Spur 5 und 6: 400 mM NaCl Fraktion; Spuren 7 und 8: 600 mM NaCl Fraktion; Spuren 9 und 10: 1 M NaCl Fraktion; Spuren 11 und 12: 2 M NaCl Fraktion.

B: Konkurrenzexperiment mit der 400 mM Fraktion der Affinitätschromatographie. Autoradiographie des getrockneten Gels. Spur 1 und 2a/b: Bindereaktion ohne Zusatz von Kompetitor-DNA (v=DNA vakt, m=DNA vmut); Spur 3 und 4: spezifische Konkurrenz mit 200 bzw 400 fachem Überschuß an unmarkierter DNA vakt (200x ks bzw 400x ks); Spur 5 und 6: Konkurrenz mit 200 bzw 400 fachem Überschuß an mutierter DNA vmut (200x ku bzw. 400x ku). Der schwarze Pfeil markiert die freie DNA

7 DISKUSSION

Methanococcus voltae besitzt vier Gengruppen die für [NiFe]-Hydrogenasen mit unterschiedlichem Selengehalt kodieren. Die Hydrogenasen Fru und Vhu haben ein Selenocystein als Bestandteil des aktiven Zentrums. Die Gengruppen *frc* und *vhc* kodieren für selenfreie Isoenzyme die an der homologen Position ein Cysteincodon besitzen und sind bei Anwesenheit von Selen im Medium negativ reguliert. Die Regulation der Transkription der beiden selenfreien Hydrogenasen erfolgt über cis-regulatorische Elemente die sich in der gemeinsame intergene Region befinden, aus der heraus die Gengruppen divergierend transkribiert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der selenabhängigen Regulation der beiden selenfreien Hydrogenasen und die Identifizierung von daran beteiligten transregulatorischen Faktoren.

7.1 Analyse der Reportergenexpression der untersuchten Promotormutanten

Die intergene Region wurde zur Untersuchung der beiden Promotoren in zwei voneinander unabhängige Fragmente geteilt. Reportergenfusionen mit dem β -Glucuronidasegen aus *E. coli* und anschließende Transformation von *M. voltae* mit diesen Konstrukten zeigte, daß in Anwesenheit von Selen im Medium die negative Regulation dieser nun von einander unabhängigen Promotoren aufgehoben ist. Die Aktivität des Reportergens erreichte jedoch nicht den Wert der mit der gesamten intergenen Region bei Abwesenheit von Selen gemessen wurde.

Im Einklang mit parallelen Untersuchungen zur negativen Regulation (Noll et al., 1999) ist die Tatsache, daß die Heptamersequenzen keinen bzw. einen sehr geringen Einfluß auf die Expression des Reportergens in Anwesenheit von Selen haben. Die Aufhebung der negativen Regulation war bei beiden isolierten Promotoren in der selben Größenordnung. Die

gemessene β -Glucuronidaseaktivität lag bei ca. 30% der intakten intergenen Region in der jeweiligen Transkriptionsrichtung bei Abwesenheit von Selen, obwohl die Transformante WPf (isolierter *frc*-Promotor) im Gegensatz zur Transformante WPv (isolierter *vhc*-Promotor) die Heptamersequenzen trägt. Somit hätte man bei einer Beteiligung der Heptamere an der negativen Regulation eine, im Vergleich zum isolierten *vhc*-Promotor, geringere Derepression erwartet.

Ein erster Hinweis auf eine mögliche Aktivierung der Transkription der selenfreien Hydrogenasen ergibt sich aus dem Befund, daß der isolierte *frc*-Promotor auch eine Verringerte β -Glucuronidaseexpression in Abwesenheit von Selen aufweist.

Die Suche nach weiteren beteiligten cis-regulatorischen Elementen führte zur Identifizierung eines 11 bp großen Sequenzmotivs, das sich stromaufwärts beider Promotoren befindet. Es wurde eine Mutagenese dieses Sequenzmotivs durchgeführt, um die Relevanz für die Expression der beiden Gengruppen zu testen. Hierzu wurde die intergene Region in beiden Transkriptionsrichtungen mit variierender Zusammensetzung aus mutiertem bzw. unmutiertem *frc*- bzw. *vhc*-proximalem Sequenzmotiv an das β -Glucuronidasegen fusioniert und die Expression des Reportergens in *M. voltae* untersucht.

Die negative Regulation war von den Auswirkungen der Mutationen nicht betroffen, sie wirkten sich jedoch in Abwesenheit von Selen auf beide Promotoren unterschiedlich aus.

Der Verlust der *vhc*-proximalen Bindestelle hat eine drastische Reduktion der Reporterexpression bei beiden Promotoren zur Folge. Ein Verlust des *frc*-proximalen Aktivatorelements führte im Fall des *vhc*-Promotors zu einem ähnlich starken Aktivitätsabfall wie im Fall des *vhc*-proximalen Elements. Der *frc*-Promotor erreichte hingegen 60% der vollen Aktivität. Der Verlust beider Bindestellen und somit der Verlust der Aktivierung resultierte in einem beinahe vollständigen Verlust der Expression durch den *frc*-Promotor. Die Expression durch den *vhc*-Promotor wurde im Vergleich zu den Einzelmutanten weiter reduziert.

Die Aktivierung scheint für die Funktion beider Promotoren essentiell zu sein. Beide Promotoren benötigen das Zusammenwirken beider Aktivator-elemente um die volle Expression zu gewährleisten. Im Fall des *vhc*-Promotors sind beide Bindestellen wichtig für eine ausreichende Aktivierung der Transkription. Die Expression durch den *frc*-Promotor erreicht hingegen schon durch die *vhc*-proximale Bindestelle ein hohes Niveau.

Die Messungen der Reporteraktivität zeigen, daß durch das 11 bp Element eine Aktivierung der Transkription in Abwesenheit von Selen vermittelt wird und daß eine Kooperativität beider Bindestellen bei der Aktivierung existiert.

Kooperative Bindung von Regulatorproteinen, auch an weit auseinanderliegende Bindestellen, wurde z.B. für den Repressor der aeroben Expression der Photosysteme I und II in *Rhodobacter capsulatus* sowie für den Lac-Repressor in *E. coli* gefunden. In *R. capsulatus* bindet der Repressor CrtJ an zwei Operatoren in der Promotorregion des *puc*-Operons (Photosystem II) die 240 bp auseinander liegen. Komplette Repression der *puc*-Expression wird nur bei Bindung an beide Operatoren erreicht, die von CrtJ mit unterschiedlicher Affinität gebunden werden (Elsen et al., 1998). Die Repression durch den LacR wird durch kooperative Bindung an drei Operatoren O1, O2 und O3 erreicht. Der Operator O1 wird mit hoher Affinität von LacR gebunden. Die Affinität zu O3, der 92 bp stromaufwärts liegt, ist um den Faktor 300 geringer. Veränderungen der Sequenz der Operatoren O2 und O3, oder des Abstandes der Hilfsoperatoren O3 zu O1, führen zu einer bis zu 100 fachen Reduktion der Repression (Müller-Hill, 1998).

Vergleicht man die Messergebnisse mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse (Noll et al., 1999) so ergibt sich eine Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Aktivatormutanten und den entsprechenden Deletionsmutanten.

Die einzige Ausnahme stellt die Aktivität des *vhc*-Promotors mit mutiertem *frc*-proximalen Aktivatorelement dar (IRvfm). Die entsprechende Deletionsmutante zeigte hier nur geringe Auswirkungen auf die Reporterexpression in Abwesenheit von Selen. Auch der isolierte *vhc*-Promotor der Transformante WPv zeigte nur eine geringe Veränderung der Reporterexpression durch den Verlust des *frc*-proximalen Teils der intergenen Region (Abbildung 36).

Der isolierte *frc*-Promotor (WPf) hat ebenfalls eine deutlich höhere β -Glucuronidaseexpression als die Mutante IRfvm (*vhc*-proximale Bindestelle mutiert, *frc*-proximale Bindestelle nicht mutiert). Der Unterschied zwischen der Aktivatormutante IRfvm und der entsprechenden Deletionsmutante (Noll et al., 1999) ist nicht so gravierend wie im Fall des *vhc*-Promotors (Abbildung 36).

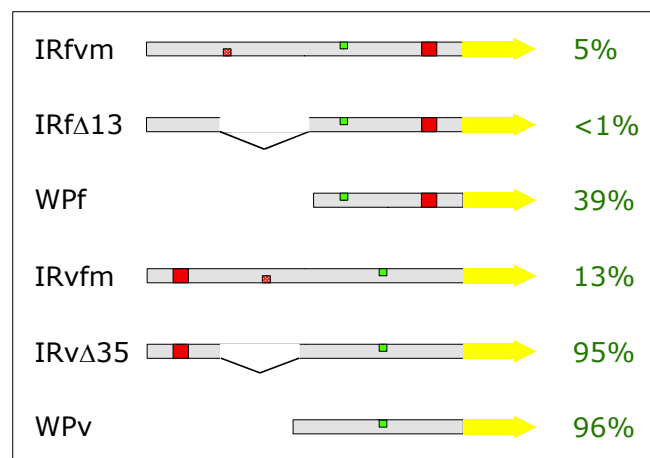


Abbildung 36: Vergleich der relativen Reporterexpression der unterschiedlichen Mutanten. Die Grafik zeigt die Werte der Reporterexpression in Abwesenheit von Selen relativ zur Wildtyp-IR in der jeweiligen Transkriptionsrichtung. Die Werte für die Deletionsmutanten IRfΔ13 und IRvΔ35 sind entnommen aus Noll et al. (1999)

Deletionen in der intergenen Region haben einen Einfluß auf die Aktivierung. Der Verlust von Sequenzbereichen die stromaufwärts des jeweiligen Aktivatorelements liegen, führt zu einer veränderten Expression im Vergleich zu den Aktivatormutanten. Die Deletion dieser Sequenzbereiche scheint einen Effekt auf das Expressionsverhalten des

jeweiligen Promotors zu haben, der unabhängig vom Verlust der Aktivierung ist. Dies bedeutet, daß für die Betrachtung der Aktivierung in vivo die Integrität der intergenen Region wichtig ist, da außer den Aktivatorelementen auch andere Sequenzbereiche einen Einfluß auf die positive Regulation durch den Aktivator haben.

7.2 Identifizierung des Aktivatorproteins

Anhand von Gelretardationsexperimenten mit Proteinfractionen, die über Heparinsepharose-Chromatographie erhalten wurden, konnte gezeigt werden, daß in *M. voltae* ein Proteinkomplex existiert, der die Aktivatorbindestelle spezifisch erkennt. Die Bindung erfolgt spezifisch an die 11 bp große Sequenz, da eine identische DNA mit mutiertem 11 bp Sequenzmotiv zu keiner retardierten Bande, d.h. keiner Bindung, führte. Die Versuche wurden mit einer DNA durchgeführt die vom *vhc*-proximalen Sequenzmotiv abgeleitet wurde. Eine Bindung an das *frc*-proximale Bindemotiv konnte nicht gezeigt werden.

Zusammen mit den Ergebnissen der Reportergentests, deutet dies auf eine unterschiedliche Affinität des Aktivator Komplexes zu beiden Bindestellen hin. Das *vhc*-proximale Aktivatorelement stellt die primäre Bindestelle dar. Die schon bei niedrigen lokalen Konzentrationen des Aktivator Komplexes besetzt wird und im Fall des *frc*-Promotors zu einer schnellen Induktion der Expression führt. Erst bei steigender lokaler Konzentration wird durch kooperative Bindung eines zweiten Komplexes, über eine Erhöhung der Affinität zur zweiten Bindestelle, die Besetzung des *frc*-proximalen Aktivatorelements erreicht und somit die volle Expression beider Gengruppen.

Die weitere Aufreinigung der entsprechenden Proteinfraction über sequenzspezifische Affinitätschromatographie führte zur Entdeckung eines 55 kD Proteins, das spezifisch an das Aktivatorelement bindet.

Die Ausbeute des gereinigten Proteins war aus aerob gereinigtem Zellextrakt von stationär gewachsenen Zellen deutlich kleiner als bei der anaeroben Reinigung aus exponentiell gewachsenen Zellen. Zur Analyse auf dem SDS-Polyacrylamidgel und in der Gelretardation wurde im ersten Fall die Fraktion 500 fach ankonzentriert um eine Bande in der Silberfärbung zu sehen, wohingegen bei der Reinigung aus exponentiell gewachsenen Zellen eine 60 fache Konzentration ausreichend war. Dies deutet auf eine höhere Konzentration des 55 kD Proteins in exponentiell wachsenden Zellen hin.

Das Auftreten des 55 kD Proteins in unterschiedlichen Fraktionen der Affinitätschromatographie spricht für eine Modifikation des Proteins. Aufgrund der gleichzeitigen Änderung zweier Parameter (aerobe Aufreinigung aus stationär gewachsenen Zellen, anaerobe Aufreinigung aus Zellen in der exponentiellen Phase) kann diese Veränderung nicht exakt einer Ursache zugeordnet werden.

Das unterschiedliche Bindevverhalten des aerob und des anaerob gereinigten Proteins deuten darauf hin, daß es sich um einen redox-sensitives Protein handeln könnte. Ein verändertes Bindevverhalten aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen kann aufgrund der Intensität der Proteinbanden in den SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschlossen werden. So ist die Intensität der Bande des aerob gereinigten Proteins deutlich höher als die des anaerob gereinigten Proteins (Abbildung 33, Abbildung 34). Die Gelretardationsexperimente wurden jeweils mit den gleichen Konzentraten durchgeführt.

Die postulierte sauerstoffempfindliche Komponente des Aktivators ist für die Bindung an die DNA nötig. Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Reinigung des Transkriptionsfaktors Fnr aus *E. coli* beobachtet. Fnr ist ein Redoxregulator in *E. coli*, der bei der Regulation der verschiedensten Gene sowohl als Aktivator, als auch als Repressor eine Rolle spielt. Fnr bindet als Homodimer und enthält einen [4Fe-4S]-Cluster pro Untereinheit, der bei Exposition an Sauerstoff erst zu zwei [2Fe-2S]-Clustern zerfällt, die

dann bei längerer Exposition verloren gehen. Der Verlust des [4Fe-4S]-Clusters geht einher mit dem Verlust der DNA-Bindung (Bauer et al., 1999).

Aufgrund der geringen Konzentration des Aktivatorproteins in der gereinigten Fraktion ist keine charakteristische Farbe der Proteinlösung zu beobachten. Es kann daher anhand der Farbe der Proteinlösung keine Aussage über eine mögliche redoxempfindliche prostetische Gruppe wie [Fe-S]-Cluster oder ein Flavin getroffen werden.

Die Aktivatorbindestelle umfaßt eine Sequenz die dem Konsensus der methanogenen TATA-Box entspricht. Durch Western-Blot Analyse konnte demonstriert werden, daß es sich bei dem Bindeprotein nicht um TBP handelt. Durch Analyse der Reporter-gen mRNA aus der Transformante IRf konnte weiterhin gezeigt werden, daß es sich bei der möglichen TATA-Box im *vhc*-proximalen Aktivatorelement nicht um einen sekundären Promotor handelt. Somit wurde die in der Gelretardation erhaltene Bande mit der von der *vhc*-proximalen Sequenz abgeleiteten DNA nicht durch Bindung von TBP erhalten.

7.3 Modell der Bindung des Aktivators

Anhand der Gelretardationsexperimente ist zu sehen, daß sich bei höheren Konzentrationen des teilgereinigten Proteinextraktes ein zweiter Komplex ausbildet, der zu einer zweiten retardierten Bande führt.

Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich dabei um ein Homodimer des Aktivators, oder um ein Heterodimer mit einem zweiten Protein handelt. Näheren Aufschluß darüber könnte eine kovalente Kopplung des Proteinkomplexes an die DNA durch UV-Behandlung und eine anschließende Proteingelelektrophorese erbringen. Durch native Gelelektrophorese des gereinigten Proteins könnte festgestellt werden ob es sich im nativen Zustand um ein Homodimer handelt.

Die intergene Region hat einen sehr hohen AT-Gehalt von 82%. Dieser wird unter anderem durch viele poly-A und poly-T Blöcke erreicht. Es ist bekannt, daß diese zu einer intrinsischen Krümmung der DNA führen (Nelson et al., 1987; Crothers et al., 1990). Entsprechende Ergebnisse wurden für die intergene Region aus elektrophoretischen Mobilitätstests erhalten (Müller, unveröffentlichte Ergebnisse). Modelliert man die Struktur der gesamten intergenen Region so ergibt dies eine zentrale intrinsische Krümmung der DNA (Abbildung 37). Zusätzlich zu dieser Krümmung ist es möglich, daß die Struktur der intergenen Region durch Verpackung der DNA in Nukleosomen weiter verändert ist.

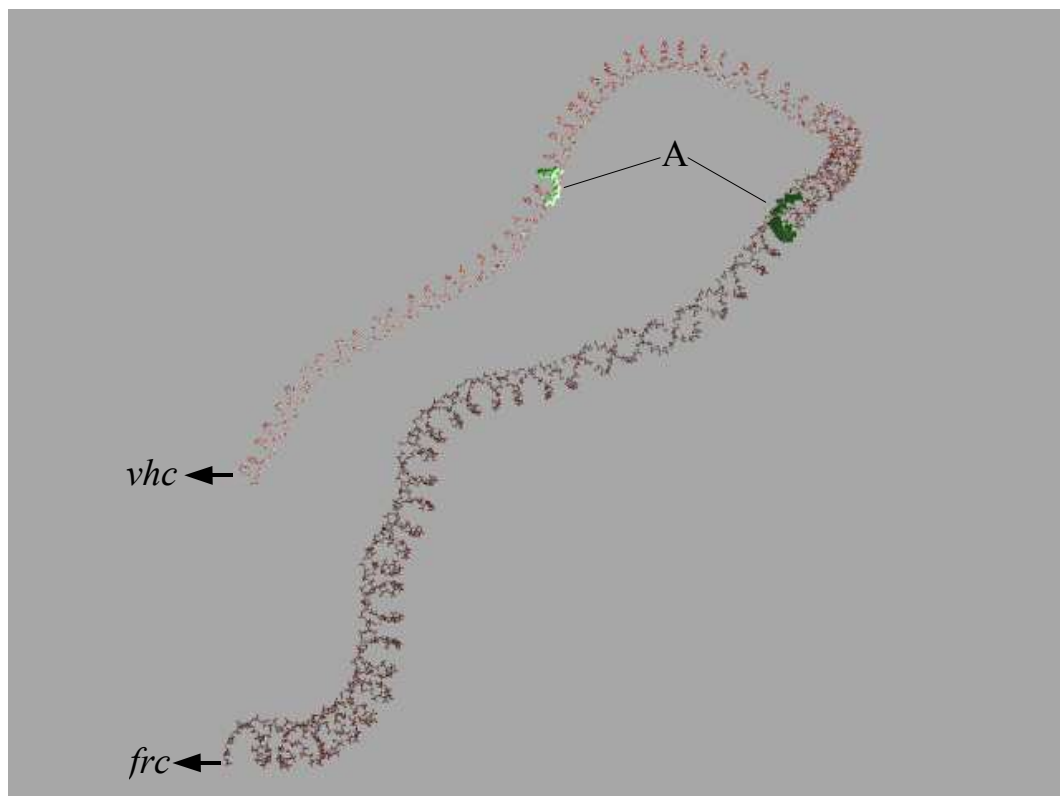


Abbildung 37: Modellierte Struktur der intergenen Region. Die Struktur der intergenen Region wurde nach dem Elektrophorese Model (Bolshoy et al., 1991) auf dem model.it-Server berechnet (http://www2.icgeb.trieste.it/~dna/model_it.html). Die Pfeile deuten die Richtung der Transkription an. In grün, raumerfüllend dargestellt und mit A bezeichnet ist die Aktivatorbindestelle.

Diese Krümmung führt dazu, daß beide Bindestellen einander gegenüber liegen. Die Berechnung der Struktur basiert ausschließlich auf Ablenk-winkeln einzelner Dinukleotide von der geraden Helixachse, wie sie aus Elektrophoresedaten gewonnen wurden (Bolshoy et al., 1991).

Anhand der Reportergentests und der Gelretardationsexperimente läßt sich folgende Hypothese der Bindung des Aktivatorkomplexes erstellen: Die Bindung erfolgt primär an der *vhc*-proximalen Bindestelle. Die Bindung des Aktivatorkomplexes führt zu einer Induktion der Transkription in *frc*-Transkriptionsrichtung. Die intrinsische Krümmung der DNA und eine eventuelle weitere Krümmung durch die Bindung des ersten Komplexes führt zur Rekrutierung eines zweiten Aktivatorkomplexes an die *frc*-proximale Bindestelle und zu vollen Induktion beider Promotoren.

7.4 Mechanismus der Aktivierung

Bei sinkender Selenkonzentration in seiner Umwelt wird ein Punkt erreicht, an dem die Verfügbarkeit von Selen für die Synthese der selenhaltigen Hydrogenasen limitierend wird. *Methanococcus voltae* verfügt mit den Gengruppen der selenfreien Hydrogenasen über die Möglichkeit die sinkende Verfügbarkeit der selenhaltigen Enzyme auszugleichen. Bei geringerer Syntheserate oder Verlust der selenhaltigen Enzyme stehen für die Methanogenese nicht mehr genügend Reduktionsequivalente zur Verfügung. Aufgrund der möglichen Redoxempfindlichkeit des 55 kD Proteins läßt sich vermuten, daß der Aktivator das Redoxpotential innerhalb der Zelle überwacht und bei geringer Verfügbarkeit von Redoxequivalenten aktiv wird. Dies erklärt das Vorhandensein des Aktivators unabhängig von der Anwesenheit von Selen.

Die doppelte Kontrolle der Transkription der selenfreien Hydrogenasen sowohl durch negative als auch durch positive Regulation legt nahe, daß eine graduelle Ergänzung der selenhaltigen durch selenfreie Hydrogenasen erreicht werden kann.

Ein entsprechender Mechanismus wurde für die Cytochrom o und Cytochrom d Oxidasen (Cyo und Cyd) aus *E. coli* in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration gefunden. Im Fall der Cytochrom o- und Cytochrom d-Oxidasen wird dies durch die Transkriptionsfaktoren Fnr und ArcA erreicht (Cotter und Gunsalus, 1992; Cotter et al., 1997). Cytochrom

d-Oxidase hat eine höhere Affinität zu Sauerstoff als Cytochrom o-Oxidase. Beide Gengruppen werden je nach Verfügbarkeit von Sauerstoff reguliert. Im aeroben Bereich erfolgt ausschließlich die Expression des *cyoABCDE* Operons. Bei abnehmender Sauerstoffkonzentration erfolgt die graduelle Expression des *cydAB* Operons. Fnr wirkt hierbei als Repressor beider Cytochromoxidasen in Abwesenheit von Sauerstoff. ArcA reprimiert die anaerobe Expression der Cytochrom o-Oxidase und aktiviert die aerobe und anaerobe Cytochrom d-Oxidase Expression.

Die frühe Induktion der *frc*-Transkription bei niedrigen lokalen Aktivorkonzentrationen (nur *vhc*-proximale Bindestelle besetzt) reflektiert die unterschiedlichen Aufgaben der durch die beiden Promotoren transkribierten Hydrogenasen. Zusätzlich zur Bereitstellung von Reduktionsequivalenten in Form von $F_{420}H_2$ für die Reduktion von N^5,N^{10} -methenyl- H_4MPT zu N^5,N^{10} -methylen- H_4MPT und weiter zu N^5 -methyl- H_4MPT , ist die F_{420} -reduzierende Hydrogenase in *M. voltae* auch an der Reduktion des, neben Methan, als Endprodukt entstehenden Heterodisulfids (CoB-S-S-CoM) beteiligt (Brodersen et al., 1999). In *Methanothermobacter marburgensis* wird diese Funktion von der F_{420} -nichtreduzierenden Hydrogenase übernommen (Setzke et al., 1994). Ein Verlust der selenhaltigen F_{420} -reduzierenden Hydrogenase bei Selenmangel wirkt sich somit an zwei unterschiedlichen Stellen der Methanogenese aus. Die bisher in Archaea identifizierten Regulatorproteine sind, im Gegensatz zu den basalen Transkriptionsfaktoren, ähnlicher zu Regulatoren eubakterieller Systeme. Die Aktivierung der Transkription in *E. coli* erfolgt entweder über Bindestellen in der Nähe der -10 und -35 Region, oder über Enhancer-Elemente die sich in größerer Distanz zum Kernpromotor befinden. Die Aktivierung wird im ersten Fall durch Wechselwirkung des Aktivators mit der σ^{70} oder der α -Untereinheit des Holoenzym erreicht und führt zu einer Stabilisierung der Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor bzw. zu einer Vereinfachung der Bildung des offenen Komplexes

(Hochschild und Dove, 1998). Im zweiten Fall erfolgt die Interaktion mit dem alternativen Sigmafaktor σ^{54} und führt in der Regel zur Aktivierung des vorher inaktiven Holoenzym (Gralla, 1996).

Die Aktivierung der Transkription in Eukaryoten ist aufgrund der Vielzahl der an der Transkription beteiligten Faktoren deutlich komplexer. Aktivierung kann durch Veränderung der Chromatinstruktur erreicht werden, wodurch der Zugang der basalen Transkriptionsfaktoren zum Promotor erleichtert wird. Dies geschieht durch Acetylierung oder Methylierung der Nukleosomen (Ogbourne und Antalis, 1998), oder durch ATP-abhängige Mobilisierung der Nukleosomen, wie im Fall des Swi/Snf-Komplexes (Sudarsanam und Winston, 2000). Aktivierung bei der Initiation der Transkription erfolgt entweder durch direkte Wechselwirkung des Aktivatorproteins mit TBP, TFIIB, den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) oder dem Mediator (Tijan und Maniatis, 1994; Ranish und Hahn, 1996). Die Wechselwirkung kann auch indirekt über Koaktivatoren erfolgen (Ogbourne und Antalis, 1998; Malik und Roeder, 2000). Die Entfernung der Aktivatorbindestellen zur TATA-Box des entsprechenden Promotors sind sehr unterschiedlich. Um mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren zu können, muß sich der Aktivator-Komplex in räumlicher Nähe dazu befinden. Der Komplex aus TBP und TFB bedeckt einen 24 bp großen Bereich von -19 bis -42, TBP alleine bedeckt nur einen 15 bp großen Bereich von -20 bis -34 (Hausner et al., 1996). Im Fall des *vhc*-proximalen Aktivator-elements an Position -58 bis -68, mit einer Distanz von 27 bp zwischen der Aktivatorbindestelle und der TATA-Box, ist eine direkte Interaktion mit TBP oder TFB möglich. Die Aktivierung könnte somit durch effizientere Promotorerkennung erfolgen. Im Fall des *frc*-Promotors liegt die Aktivatorbindestelle jedoch an Position -116 bis -126 mit einer Distanz von 86 bp zur TATA-Box. Eine Interaktion mit dem TBP/TFB-Komplex oder der RNA-Polymerase ist ohne zusätzliche Faktoren wie z.B. eine starke

Krümmung der DNA (intrinsische Krümmung, Krümmung durch Nukleosomen oder durch Bindung des Aktivorkomplexes) nicht wahrscheinlich.

Aufgrund der Orientierung des *vhc*-proximalen Aktivatorelements auf der, im Vergleich zur TATA-Box, anderen Seite der DNA, scheint eine Interaktion des Aktivators mit TBP unwahrscheinlich (Abbildung 38).

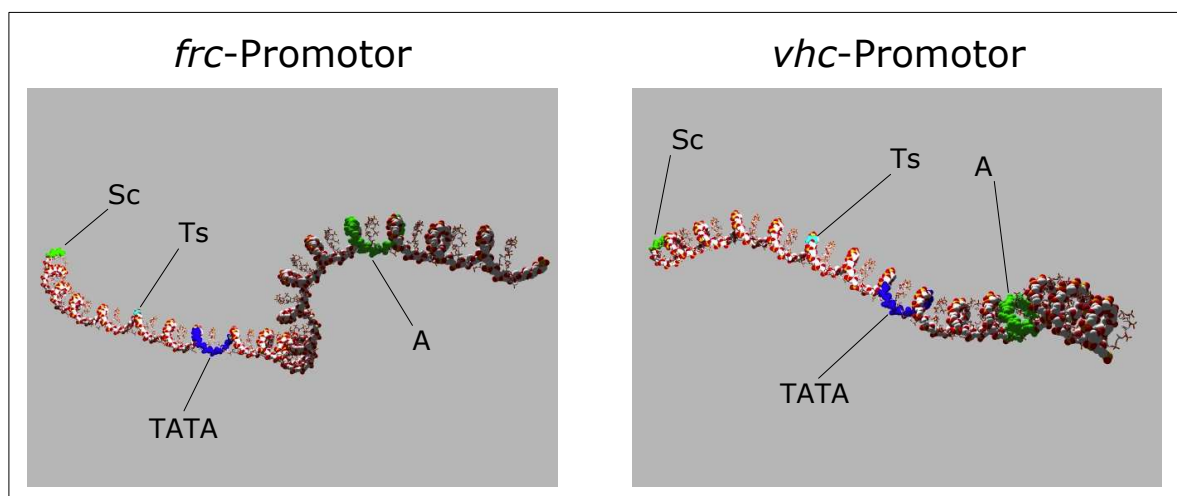


Abbildung 38: **Struktur des *frc*- und *vhc*-Promotors.** Die Strukturen wurden auf dem model.it-Server nach dem Elektrophorese-Modell berechnet. Der obere Strang ist jeweils raumerfüllend dargestellt. In hellgrün ist das Startcodon (Sc), in hellblau der Transkriptionsstart (Ts), in dunkelblau die TATA-Box (TATA) und in hellgrün die Aktivatorbindestelle (A) dargestellt.

Entsprechend der Position der Bindestellen ist es wahrscheinlich, daß auch die Bindung von TBP und Aktivorkomplex auf unterschiedlichen Seiten erfolgt. Eine ausreichende Krümmung der DNA über die kurze Distanz von 27 bp, um dennoch einen Kontakt herzustellen, ist unwahrscheinlich. Im Fall des *frc*-proximalen Aktivatorelements liegen die Aktivatorbindestelle und die TATA-Box auf derselben Seite der DNA. Zusätzlich zur intrinsischen Krümmung der DNA ist auch eine weitere Veränderung der DNA Struktur durch die Bindung des Aktivators möglich. Somit wäre hier die Möglichkeit einer TBP-Aktivator-Wechselwirkung gegeben.

Da die Besetzung der *vhc*-proximalen Aktivatorbindestelle zu einer starken Aktivierung des *frc*-Promotors führt, muß eine Wechselwirkung mit diesem Promotor stattfinden. Eine Induktion des *vhc*-Promotors erfolgt nach der Rekrutierung des zweiten Aktivatorkomplexes an die *frc*-proximale Bindestelle. Die Rekrutierung erfolgt kooperativ durch Erhöhung der Affinität des Aktivatorkomplexes zur zweiten Bindestelle.

Eine Wechselwirkung des Aktivatorkomplexes mit der RNA-Polymerase wird aufgrund der Ähnlichkeit der bisher gefundenen Transkriptionsfaktoren und ihrer Ähnlichkeit zu bakteriellen Regulatoren als wahrscheinlich angesehen. Die Aktivierung könnte somit durch vereinfachte Rekrutierung der RNA-Polymerase oder durch effektivere Bildung des offenen Komplexes erfolgen.

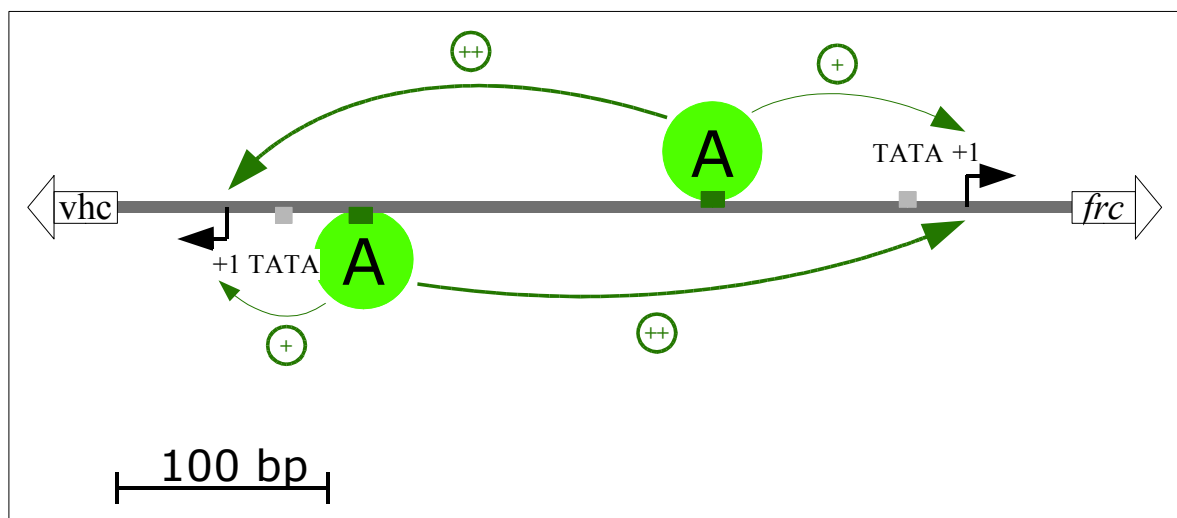


Abbildung 39: Modell der Aktivierung der selenfreien Hydrogenasen *frc* und *vhc*. Die intergene Region ist schematisch dargestellt. Der schwarze Pfeil (+1) gibt den Transkriptionsstart wieder. Die hellgraue Box stellt die TATA-Box dar (TATA). Die Aktivatorbindestellen sind als dunkelgrüne Boxen angegeben. Der hellgrüne Kreis (A) stellt den Aktivatorkomplex dar. Der Grad der Aktivierung des jeweiligen Komplexes auf die verschiedenen Promotoren ist anhand der Dicke der grünen Pfeile dargestellt. Nach Rekrutierung des Aktivators an die *vhc*-proximale Bindestelle erfolgt die Induktion der *frc*-Transkription und die Rekrutierung des zweiten Aktivators an die *frc*-proximale Bindestelle. Durch das Zusammenwirken beider Aktivatorkomplexe erreichen beide Promotoren die volle Aktivität.

8 AUSBLICK

Die genauere Charakterisierung des Aktivatorproteins durch N-terminale Sequenzierung und das anschließende Auffinden des Gens aus einer *M. voltae* Genbank sind sicherlich die primären Ziele weitergehender Arbeit an der positiven Regulation. Aufgrund der aus der DNA-Sequenz des Gens abgeleiteten Proteinsequenz lassen sich Aussagen über den Grund der Sauerstoffempfindlichkeit des Proteins, d.h. mögliche redoxempfindliche Kofaktoren bzw. prostetische Gruppen, treffen. Ein Knockout des Aktivatorgens in den bestehenden Reportergermtransformanten kann zur Bestätigung der Aktivatormutanten herangezogen werden.

Die UV-Vernetzung des Aktivatorkomplexes mit der DNA kann zur weiteren Aufklärung seiner Komponenten beitragen und eine Aussage darüber zulassen, ob ein Homodimer oder ein Heterodimer mit einem zweiten Protein vorliegt.

Durch DNaseI-Footprints kann die genaue Lage des Aktivators auf der intergenen Region und somit die Bindestelle besser definiert werden. Ein weiteres Ziel wird die Aufklärung des genauen Mechanismus der Aktivierung sein. Dies kann durch Transkriptionsassays in vitro und durch DNaseI-Footprints des Aktivators zusammen mit den basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB sowie der RNA-Polymerase erreicht werden, um Wechselwirkungen mit diesen Faktoren festzustellen.

9 LITERATURVERZEICHNISS

Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Baumer, S., Beifuss, U. und Deppenmeier, U.

Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1.

J. Bacteriol. 180 (1998): 2027-2032

Adams, M.W.W.

The structure and mechanism of iron-hydrogenases.

Biochim. Biophys. Acta 1020 (1990): 115-145

Afting, C., Hochheimer, A. und Thauer, R.K.

Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F420 reduction with H₂.

Arch. Microbiol. 169 (1998): 206-210

Anderson, M.L.M. und Young, B.D., Quantitative filter hybridisation. In **Hames, B.D. und Higgins, S.J.** (Hrsg.)

Nucleic acid hybridization - a practical approach (1985), IRL Press, Oxford. 109-136

Aravind, L. und Koonin, E.V.

DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the Archaea.

Nucl. Acids Res. 27 (1999): 4658-4670

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Hrsg.), (2000)

Current protocols in molecular biology.

John Wiley & Sons, New York

Bauer, C.E., Elsen, S. und Bird, T.H.

Mechanisms for redox control of gene expression

Annu. Rev. Microbiol. 53 (1999): 495-523

Bell, S.D., Kosa, P.L., Sigler, P.B. und Jackson, S.P.

Orientation of the transcription preinitiation complex in Archaea.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999a): 13662-13667

Bell, S.D., Cairns, S.S., Robson, R.L. und Jackson, S.P.

Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro.

Mol. Cell 4 (1999b): 971-982

Bell, S.D. und Jackson, S.P.

Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor.

J. Biol. Chem. 275 (2000): 31624-31629

Beneke, S., Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg (1994): Aufbau eines Reportersystems in *Methanococcus voltae* und Untersuchungen über die Regulation der Hydrogenase-Gengruppen *frc* und *vhc*.

Beneke, S., Bestgen, H. und Klein, A.

Use of the *Escherichia coli uidA* gene as a reporter in *Methanococcus voltae* for the analysis of the regulatory function of the intergenic region between the operons encoding selenium-free hydrogenases.
Mol. Gen. Genet. 248 (1995): 225-228

Berghöfer, Y., Agha-Amiri, K. und Klein, A.

Selenium is involved in the negative regulation of the expression of selenium-free [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*.
Mol. Gen. Genet. 242 (1994): 369-373

Berkessel, A. und Thauer, R.K.

On the mechanism of catalysis by a metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: enzymatic transformation of H₂ without a metal and its analogy to the chemistry of alkanes in superacidic solution.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34: 2247-2250

Birnboim, H. C. und Doly, J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. 7 (1979): 1513-1523

Blaut, M.

Metabolism of the methanogens.
Antonie van Leeuwenhoek 66 (1994): 187-208

Blum, H., Beier, H. und Gross, X.

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels.
Electrophoresis 8 (1987): 93-99

Bolshoy, A., McNamara, P., Harrington, R. E. und Trifonov, E. N.

Curved DNA without A-A: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991): 2312-2316

Bradford, M.M.

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

Britten, R.J. und Davidson, E.H., Hybridisation strategy. In **Hames, B.D. und Higgins, S.J.** (Hrsg.)

Nucleic acid hybridization - a practical approach
(1985), IRL Press, Oxford. 109-136

Brodersen, J., Gottschalk, G. und Deppenmeier, U.

Membrane-bound F₄₂₀H₂-dependent heterodisulfide reduction in *Methanococcus voltae*.
Arch. Microbiol. 171 (1999): 115-121

Brogdon, W.G. und Dickinson, C.M.

A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions.

Anal. Biochem. 131 (1983): 499-503

Brosius, J.

Superpolinkers in cloning and expression vectors.

DNA 8 (1989): 759-777

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M. und Venter, J. C.

Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*.

Science 273 (1996): 1058-1073

Cammack, R.

Nickel in metalloproteins.

Adv. Inorg. Chem. 32 (1988): 297-333

Chien, Y., Helmann, J.D. und Zinder, S.H.

Interactions between the promoter regions of nitrogenase structural genes (*nifHDK2*) and DNA-binding proteins from N₂- and ammonium-grown cells of the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227.

J. Bacteriol., 180 (1998): 2723-2738

Choli, T., Kapp, U. und Whittmann-Liebold, B.

Blotting of proteins onto immobilized membranes - *in situ* characterization and comparison with high-performance-liquid-chromatography.

J. Chromatogr. 476 (1989): 59-72

Chomczynski, P.

One hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA.

Anal. Biochem. 201 (1992): 134-139

Cohen-Kupiec, R., Blank, C. und Leigh, J.A.

Transcriptional regulation in Archaea: In vivo demonstration of a repressor binding site in a methanogen.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997): 1316-1320

Cohen-Kupiec, R., Marx, C.J. und Leigh, J.A.

Function and regulation of *glnA* in the methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*.

J. Bacteriol. 181 (1998): 256-261

Cotter, P.A., Melville, S.B., Albrecht, J.A. und Gunsalus, R.P.

Aerobic regulation of cytochrome d oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli*: Roles of Fnr and ArcA in repression and activation. Mol. Microbiol. 25 (1997): 605-615

Cotter, P.A. und Gunsalus, R.P.

Contributions of the *fnr* and *arcA* gene products in coordinate regulation of cytochrome o and d oxidase (*cyoABCDE* and *cydAB*) genes in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 70 (1990): 31-36

Crothers, D.M., Haran, T.E. und Nadeau, J.G.

Intrinsically bent DNA
J. Biol. Chem. 265 (1990): 7093-7096

DeLong, E.

Archeal means and extremes.
Science 280 (1998): 542-543

Dischert, W., Vignais, P.M. und Colbeau, A.

The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. Mol. Microbiol. 34 (1999): 995-1006

Elsen, S., Ponnampalam, S.N. und Bauer, C.E.

CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J. Biol. Chem. 273 (1998): 30762-30769

Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A. und Bauer, C.E.

Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. J. Bacteriol. 182 (2000): 2831-2837

Farooqui, A.A.

Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography. J. Chromatogr. 184 (1980): 335-345

Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132 (1983): 6-13

Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. Anal. Biochem. 137 (1984): 266-267

Ferry, J.G.

Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. FEMS Microbiol. Rev. 23 (1999): 13-38

Gernhardt, P., Possot, O., Foglino, M., Sibold, L. und Klein, A.
Construction of an integration vector for use in the archaebacterium *Methanococcus voltae* and expression of a eubacterial resistance gene.
Mol. Gen. Genet. 221 (1990): 273-279

Goss, T.A. und Bard, M.
High-performance affinity chromatography of DNA.
J. Chromatogr. 508 (1990): 279-287

Graf, E.-G. und Thauer, R.K.
Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, a nickel-containing enzyme.
FEBS Lett. 136 (1981): 165-169

Gralla, J.D.
Activation and repression of *E. coli* promoters.
Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (1996): 526-530

Hagen, W.R., van Berkel-Arts, A., Krüse-Wolters, K.M., Voordouw, G. und Veeger, C.
The iron-sulphur composition of the active site of the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) deduced from its subunit structure and total iron-sulphur content.
FEBS Lett. 203 (1986): 59-63

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

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

Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R.
Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria.
Methods Enzymol. 204 (1991): 63-113

Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C. und Thomm, M.
Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and Transcription Factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase.
J. Biol. Chem. 271 (1996): 30144-30148

Hengen, P.N.
Preparing ultra-competent *Escherichia coli*.
Trends Biochem. Sci. 21 (1996): 75-76

Hochheimer, A., Hedderich, R. und Thauer, R.K.

The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation.

Mol. Microbiol. 31 (1999): 641-650

Hochschild, A. und Dove, S.L.

Protein-Protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription.

Cell 92 (1998)

Horton, R.M., Ho, S.N., Pullen, J.K., Hunt, H.D., Cai, Z. und Pease, L.R.

Gene splicing by overlap extension.

Methods Enzymol. 217 (1993): 270-279

Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrander, F. und Hood, L.E.

Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamid gels for aminoacid sequence analysis.

Methods Enzymol. 91 (1983): 227-236

Jones, J.B. und Stadtman, T.C.

Selenium-dependent and selenium-independent formate dehydrogenases of *Methanococcus vannielii*. Separation of the two forms and characterization of the purified selenium-independent form.

J. Biol. Chem. 256 (1981): 656-663

Kadonaga, J.T.

Purification of Sequence-Specific Binding Proteins by DNA Affinity Chromatography.

Methods Enzymol. 208 (1991): 10-23

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. und Kikuchi, H.

Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3.

DNA Res. 5 (1998): 55-76

Klein, A.R., Fernandez, V.M. und Thauer, R.K.

H₂-forming N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of H₂-formation analyzed using hydrogen isotopes.

FEBS Lett. 368 (1995): 203-206

Klenk, H. P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Venter, J. C., und et al.

The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*.

Nature 390 (1997): 364-370

Krüger, K., Hermann, T., Armbruster, V. und Pfeifer, F.

The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein.

J. Mol. Biol. 279 (1998): 761-771

Laemmli, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227 (1970): 680-685

Lane, D., Prentki, P. und Chandler, M.

Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions.

Microbiol. Rev. 56 (1992): 509-528

Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. und Zillig, W.

Transcription in Archaea: Similarity to that in Eucarya.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995): 5768-5772

Leheste, J.-R., Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg (1996):

Differentielle Proteinsynthese nach Selenentzug bei *Methanococcus voltae*.

Lenz, O., Strack, A., Tran-Betcke, A. und Friedrich, B.

A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species.

J. Bacteriol. 179 (1997): 1655-1663

Malik, S und Roeder, R.G.

Transcriptional activation through mediator-like coaktivators in yeast and metazoan cells.

Trends Biochem. Sci. 25 (2000): 277-283

Metcalf, W.W., Zhang, J.K., Apolinario, E., Sowers, K.R. und Wolfe, R.S.

A genetic system for Archaea of the genus *Methanosarcina*: Liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997): 2626-2631

Morgan, R.M., Pihl, T.D., Nölling, J. und Reeve, J.N.

Hydrogen regulation of growth, growth yields and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H.

J. Bacteriol. 179 (1996): 889-898

Müller-Hill, B.

The function of auxiliary operators
Mol. Microbiol. 29 (1998): 13-18

Müller, S., Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg (1996):

Untersuchung der Promotorregion zwischen den Genen der selenfreien Hydrogenasen bei *Methanococcus voltae*.

Muth, E., Mörschel, E. und Klein, A.

Purification and characterization of an 8-hydroxy-5-deazaflavin- reducing hydrogenase from the archaebacterium *Methanococcus voltae*.
Eur. J. Biochem. 169 (1987): 571-577

Napoli, A., Van der Oost, J., Sensen, C.W., Charlebois, R.L., Rossi, M. und Ciaramella, M.

An Lrp-like protein of the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promotor.
J. Bacteriol. 181 (1999): 1474-1480

Nelson, H.C.M., Finch, J.T., Luisi, B.F. und Klug, A.

The structure of an oligo(dA)-oligo(dT) tract and its biological implications.
Nature 330 (1987): 221-226

Nölling, J. und Reeve, J.N.

Growth- and substrate-dependent transcription of the formate dehydrogenase (*fdhCAB*) operon in *Methanobacterium thermoformicum* Z-245.
J. Bacteriol. 179 (1996): 899-908

Noll, I., Müller, S. und Klein, A.

Transcriptional regulation of genes encoding the selenium-free [NiFe]-hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae* involves positive and negative control elements.
Genetics 152 (1999): 1335-1341

Noll, I.

Cis-elements involved in the regulation of genes encoding the selenium-free [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1999)

Ogbourne, S. und Antalis, T.M.

Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes.
Biochem. J. 331 (1998): 1-14

Pace, N.R.

A molecular view of microbial diversity and the biosphere.
Science 276 (1997): 734-738

Pfeiffer, M., Bingenmann, R. und Klein, A.

Fusion of two subunits does not impair the function of a [NiFeSe]-hydrogenase in the archaeon *Methanococcus voltae*.

Eur. J. Biochem. 256 (1998): 447-452

Pfeiffer, M., Bestgen, H., Bürger, A. und Klein, A.

The vhuU gene encoding a small subunit of a selenium-containing [NiFe]-hydrogenase in *Methanococcus voltae* appears to be essential for the cell.

Arch. Microbiol. 170(6) (1998b): 418-426

Ragsdale S.W.

Nickel biochemistry

Curr. Opin. Chem. Biol. 2 (1998): 208-215

Ranish, J.A. und Hahn, S.

Transcription: Basal factors and activation.

Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (1996): 151-158

Richard, D. J., Sawers, G., Sargent, F., McWalter, L. und Boxer, D. H.

Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*.

Microbiology, 145 (1999): 2903-2912

Reeve, J.N., Nölling, J., Morgan, R.M. und Smith, D.R.

Methanogenesis: Genes, genomes and who's on first.

J. Bacteriol. 179 (1997): 5975-5986

Righetti, P.G. und Drysdale, J.W.

Isoelectric focussing in gels.

J. Chromatogr. 98 (1974): 271-312

Robb, F.T., Place, A., Sowers, K.R., Schreier, H.J., Dasarma, S. und Fleischmann, E.M. (Hrsg.), (1995):

Archaea: A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science 239 (1988): 487-491

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977): 5463-5467

Setzke, E., Hedderich, R., Heiden, S. und Thauer, R.K.

H₂:heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Eur. J. Biochem. 220 (1994): 139-148

Shand RF, Betlach MC.

Expression of the *bop* gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light.

J. Bacteriol. 173 (1991): 4692-4699.

Sitzmann, J. und Klein, A.

Physical and genetic map of the *Methanococcus voltae* chromosome.

Mol. Microbiol. 5 (1991): 505-513

Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J. N., und et al.

Complete genome sequence of *Methanobacterium*

thermoautotrophicum Δ H: functional analysis and comparative genomics.

J. Bacteriol. 179 (1997): 7135-7155

Soppa, J.

Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects.

Mol. Microbiol. 31 (1999a): 1295-1305

Soppa, J.

Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box.

Mol. Microbiol. 31 (1999b): 1589-1601

Sorgenfrei, O., Linder, D., Karas, M. und Klein, A.

A novel very small subunit of a selenium containing [NiFe] hydrogenase of *Methanococcus voltae* is postranslationally processed by cleavage at a defined position.

Eur. J. Biochem. 213 (1993): 1355-1358

Sorgenfrei, O., Duin, E.C., Klein, A. und Albracht, S.P.J.

Interactions of ^{77}Se and ^{13}CO with nickel in the active site of active F_{420} -nonreducing hydrogenase from *Methanococcus voltae*.

J. Biol. Chem. 271 (1996): 23799-23806

Sorgenfrei, O., Duin, E.C., Klein, A. und Albracht, S.P.J.

Changes in the electronic structure around Ni in oxidized and reduced selenium-containing hydrogenases from *Methanococcus voltae*.

Eur. J. Biochem. 247 (1997a): 681-687

Sorgenfrei, O., Müller, S., Pfeiffer, M., Sniezko, I. und Klein, A.

The [NiFe] hydrogenases of *Methanococcus voltae*: genes, enzymes and regulation.

Arch. Microbiol. 167 (1997b): 189-195

Southern, E.M.

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98 (1975): 503-517

Sowers, K.R., Thai, T.T. und Gunsalus, R.P.

Transcriptional regulation of the carbon monoxide dehydrogenase gene (*cdhA*) in *Methanosarcina thermophila*.

J. Biol. Chem. 268 (1993): 23172-23178

Sudarsanam, P. und Winston, F.

The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control.

Trends Genet. 16 (2000): 345-351

Teixeira, M., Fauque, G., Moura, I., Lespinat, P.A., Berlier, Y., Prickril, B., Peck, H.D. Jr, Xavier, A.V. und Moura, J.J.G.

Nickel-(iron-sulfur)-selenium-containing hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743).

Eur. J. Biochem. 167 (1987): 47-58

Thomm, M.

Die Transkriptionsmaschinerie der Archaea.

Biospektrum 3/2000 (2000): 179-185

Tijan, R. und Maniatis, T.

Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces.

Cell 77 (1994): 5-8

Tung, W.L. und Chow K.

A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*.

Trends Genet. 11 (4) (1995): 128-129

Voorhorst, W.G.B., Guenguen, Y., Geerling, A.C.M., Schut, G., Dahlke, I., Thomm, M., van der Oost, J. und de Vos, W.M.

Transcriptional regulation in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: coordinated expression of divergently oriented genes in response to beta-linked glucose polymers.

J. Bacteriol 181 (1999): 3777-3783

Vorholt, J.A., Vaupel, M. und Thauer, R.K.

A selenium-dependent and selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*.

Mol. Microbiol. 23 (1997): 1033-1042

Woese, C. und Fox, G.E.

Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977): 5088-5090

Woese, C.R., Kandler, O. und Wheelis, M.L.

Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains archaea, bacteria and eucarya.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990): 4576-4579

Wösten, M.M.S.M.

Eubacterial sigma-factors.

FEMS Microbiol. Rev. 22 (1998): 127-150

Whitman, W.B., Ankwanda, E. und Wolfe, R.S.

Nutrition and carbon metabolism of *Methanococcus voltae*.

J. Bacteriol. 149 (1982): 852-863

Wilting, R., Schorling, S., Persson, B.C. und Böck, A.

Selenoprotein synthesis in Archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion.

J. Mol. Biol. 266 (1997): 637-641

Yamazaki, S.

A selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*.

Identification of the selenium moiety as a selenocysteine residue.

J. Biol. Chem. 257 (1982): 7926-7929

Zillig, W., Palm, P., Langer, D., Klenk, H.P., Lanzendörfer, M., Hüdepohl, U. und Hain, J.

RNA polymerases and transcription in archaebacteria.

Biochem. Soc. Symp. 58 (1992): 79-88

Zirngibl, C., van Dongen, W., Schwörer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein, A. und Thauer, R.K.

H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea.

Eur. J. Biochem. 208 (1992): 511-520

Zuidam, N.J. und Barenholz, Y.

Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery.

Biochim. Biophys. Acta 1368 (1997): 115-128

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei all den Leuten bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und mir mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

Prof. Dr. Albrecht Klein möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation bei Ihm anfertigen zu können und für die hervorragende Unterstützung meiner Arbeit.

Matthias Pfeiffer und Jörg Bender gebührt Dank für all die guten Tipps, wenn es mal wieder nicht funktionieren wollte.

Ruth Bingemann danke ich für die guten Ratschläge bei der Entwicklung der Reinigung und vor allem für die Überlassung von Zellmaterial.

Ein besonderer Dank gilt Helga Bestgen, der guten Seele des Labors.

Allen Mitgliedern der AG Klein möchte ich für die schöne Zeit, die ich mit Ihnen verbracht habe und für die wunderbare Arbeitsatmosphäre danken.

Mein Dank geht auch nach Kiel zu Dr. Winfried Hausner, der mir großzügig gereinigtes *Methanococcus* TBP und den Antikörper zur Verfügung gestellt hat.

Mein ganz spezieller Dank geht an Petra Hentschel, die in der ganzen Zeit immer Geduld mit mir hatte und immer an mich geglaubt hat.