

**Physiologische Charakterisierung des Formiat-Stoffwechsels
in *Escherichia coli***

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Lydia Beyer

geb. am 21.06.1984 in Lutherstadt Wittenberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.12.2014

Gutachter: Prof. Gary Sawers
Prof. Milton Stubbs
Prof. Johann Heider

Inhalt

1	Einleitung	8
1.1	Die Grundlagen der gemischten Säuregärung in <i>E. coli</i>	9
1.2	Der Formiat-Metabolismus in <i>E. coli</i>	10
1.2.1	Die verschiedenen Hydrogenasen in <i>E. coli</i>	14
1.3	Das Formiat-Transportprotein FocA	15
1.4	Die Anwesenheit eines weiteren Formiat-Transportsystems in <i>E. coli</i>	17
1.5	Glycyldradikalenzyme und ihre möglichen Schutzmechanismen im anaeroben Stoffwechsel	18
1.6	Zielstellung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Verwendete Organismen, Vektoren und Phagen	21
2.2	Verwendete Nährmedien	23
2.2.1	LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	23
2.2.2	M9-Minimalmedium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	24
2.2.3	TYEP-Medium	25
2.2.4	Medienzusätze	25
2.3	Stammhaltung und Zellwachstum	25
2.3.1	Stammhaltung	25
2.3.2	Aerobe Kultivierung	26
2.3.3	Anaerobe Kultivierung	26
2.3.4	Dokumentation des Bakterienwachstums	26
2.4	Molekularbiologische Methoden	26
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.4.2	Polymerase Kettenreaktion	27
2.4.3	Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA)	29
2.4.4	Amplifikation von RNA	29
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	30
2.5	Herstellung und Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	30
2.5.1	Herstellung ultra-chemokompetenter Zellen und Chemotransformation	30
2.5.2	Herstellung elektrokompeter Zellen und Elektroporation	31
2.5.3	Überprüfen der erhaltenen Transformanden	32
2.6	Die Generierung von Deletionen mittels P1-Phagentransduktion	33
2.6.1	Herstellung eines P1-Phagenlysates	33

Inhaltsverzeichnis

2.6.2	P1-Transduktion	33
2.6.3	Entfernen einer Antibiotikum-Resistenzkassette	34
2.7	Proteinbiochemische Methoden	34
2.7.1	Zellernte, -aufschluss und Fraktionierung	34
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.7.3	Expression und Reinigung mittels Affinitätschromatographie von Proteinen mit 6xHis-tag	36
2.7.4	Pufferaustausch von Proteinlösungen mittels Dialyse	36
2.7.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	37
2.7.6	Abspaltung des 6xHis-tags mittels TEV-Protease	37
2.7.7	Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	37
2.7.8	Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.7.9	Coomassie-Färbung von Proteinen	39
2.7.10	Western-Blot-Analyse	39
2.8	Enzymologische Methoden	41
2.8.1	Messung der β -Galaktosidase Aktivität	41
2.8.2	Bestimmung der Gasproduktion	42
2.9	Biophysikalische Methoden	43
2.9.1	Massenspektrometrie (MS)	43
2.9.2	Fern-UV-Circulardichroismus-Spektroskopie (Kelly <i>et al.</i> , 2005)	43
2.9.3	Kristallisation und Röntgenkristallstrukturanalyse	44
2.10	Geräte und Chemikalien	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Untersuchungen zum anaeroben Pyruvatstoffwechsel in <i>E. coli</i>	48
3.1.1	Der Einfluss von Mutationen auf den Formiat-Stoffwechsel	49
3.1.2	Quantifizierung der Wasserstoffproduktion einer <i>adhE</i> -Mutante während der gemischten Säuregärung	52
3.1.3	Bestimmung der Änderung der internen Formiat-Konzentration mit Hilfe eines <i>lacZ</i> -basierten Reportersystems	53
3.1.4	Der Formiat-Abbau in der Zelle korreliert mit der Formiat-Aufnahme im Medium	57
3.2	Charakterisierung weiterer möglicher Transportsysteme für Formiat	64
3.2.1	Der Nitrit-Transporter NirC transportiert <i>in vivo</i> kein Formiat	64
3.2.2	Untersuchungen zur Funktion des möglichen Formiat-Transporters FocB	66

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Untersuchungen von DauA hinsichtlich des Formiat-Transports	69
3.3	Untersuchungen zum Glycylradikalenzym GrcA	73
3.3.1	Reinigungsstrategie und immunologischer Nachweis des Glycylradikalenzyms GrcA	73
3.3.2	Die konzentrationsabhängige Dimerbildung von GrcA.....	74
3.3.3	GrcA zeigt überwiegend einen α -helikalen Anteil.....	77
3.3.4	Untersuchungen zur Struktur von GrcA mittels Röntgenstrukturanalyse.....	78
3.3.5	GrcA interagiert <i>in vivo</i> mit PflB	83
4	Diskussion	86
4.1	Zusammenhänge in der gemischten Säuregärung hinsichtlich des Formiat-Metabolismus	86
4.2	Mechanismen zur Regulation der internen Formiat-Konzentration	89
4.3	In <i>E. coli</i> existieren mehrere Transportsysteme für Formiat	90
4.4	Welche Rolle nimmt TdcE im Formiat-Metabolismus ein?	93
4.5	Strukturelle Analyse des Glycylradikalenzyms GrcA	94
4.6	Modell zum Formiat-Stoffwechsel	99
5	Zusammenfassung	102
6	Ausblick	103
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Anhang	115
9	Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Δ	Deletion
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton (Masseneinheit; $1 \text{ Da} = 1 \text{ g mol}^{-1}$)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTH	Natriumdithionit
e^-	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDH-H	Formiatdehydrogenase-H
FHL	Formiat-Hydrogen-Lyase
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen

Abkürzungsverzeichnis

mAU	Milli-Absorptionseinheit
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>ortho</i> -Nitrophenyl- β -galaktosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität, 1 U = Umsatz von 1 mol Substrat je min
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Anglizismen, die fester Bestandteil der biochemischen Terminologie sind, wurden kursiv geschrieben.

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle: Aminosäuren mit entsprechendem Drei- und Einbuchstabencode

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabenbencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* gehört zu den am besten untersuchten Organismen und dient in vielerlei Hinsicht als Modell. Der fakultative Anaerobier ist in der Lage sowohl aerobe als auch anaerobe Atmung sowie in Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren Gärung durchzuführen. Bei allen drei Lebensweisen wird zunächst die Glukose mit Hilfe des Phosphotransferase-Systems in die Zelle aufgenommen (Kundig *et al.*, 1964) und während der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt. Hierbei entstehen aus einem Molekül Glukose 2 Moleküle Pyruvat, 2 ATP und 2 NADH. Anschließend entscheidet die Anwesenheit des Elektronenakzeptors über den weiteren Abbau des Pyruvats. In Anwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat zu Kohlendioxid oxidiert. Dabei wird zunächst Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA metabolisiert, welches anschließend in den Citronensäurezyklus eingespeist wird. Diese Reaktion wird vom Enzymkomplex Pyruvatdehydrogenase (Pdh) katalysiert, welcher aus drei Untereinheiten besteht, 12 AceE Dimeren, einem 24 Untereinheiten umfassenden „Kern“ AceF und 6 LpdA Dimeren (Bates *et al.*, 1977; Angelides *et al.*, 1979; Yang *et al.*, 1985). Der Pdh-Enzymkomplex nimmt durch die Verbindung von Glykolyse und Citratzyklus eine zentrale Rolle in der aeroben Atmung ein. Sind dagegen Nitrat, Nitrit, Fumarat, Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als terminale Elektronenakzeptoren vorhanden, so führt das Bakterium eine anaerobe Atmung durch (Haddock und Jones, 1977, Strøm *et al.*, 1979; van der Plas *et al.*, 1983; Unden und Bongaerts, 1997). Sowohl bei der aeroben als auch bei der anaeroben Atmung erfolgt die Energiekonservierung durch die Weitergabe von Elektronen innerhalb einer Atmungskette auf den vorhandenen Akzeptor. Dies ist an den Transport von Protonen ins Periplasma gekoppelt. Die Protonen werden dabei entgegen des Membranpotenzials transportiert, welches innen negativ und außen positiv ist. Dadurch entsteht ein elektrochemischer Protonengradient (pmf, *proton motif force*), welcher wiederum eine H⁺-ATP-Synthase antreibt, welche die Protonen zurück ins Cytoplasma transportiert. Dabei wird Energie in Form von ATP konserviert. In Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren führt *E. coli* die gemischte Säuregärung durch, wobei die Energiekonservierung über Substratkettenphosphorylierung erfolgt.

1.1 Die Grundlagen der gemischten Säuregärung in *E. coli*

In Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren ist *E. coli* in der Lage zu fermentieren, wobei die Produkte Succinat, Acetat, Ethanol, Laktat, Wasserstoff, Kohlendioxid und zum Teil auch Formiat entstehen (Abbildung 1.1). Das während der Glykolyse entstandene Pyruvat wird durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (PflB) in Formiat und Acetyl-CoA gespalten. Während Formiat durch den Formiat-Hydrogen-Lyase Komplex (FHL-Komplex) weiter in Wasserstoff und Kohlendioxid disproportioniert wird, kann das entstandene Acetyl-CoA auf zwei unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. Zum Einen kann Acetyl-CoA durch die Phosphatacetyltransferase (Pta) reversibel in Acetylphosphat und anschließend durch die Acetatkinase (Ack) in Acetat umgewandelt werden (Wolfe, 2005, Campos-Bermudez *et al.*, 2010). Dabei spielt Acetylphosphat eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen, wie der Proteinmodifikation und kann sogar als globaler Signalregulator wirken (Mizrahi *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Mizrahi *et al.*, 2009).

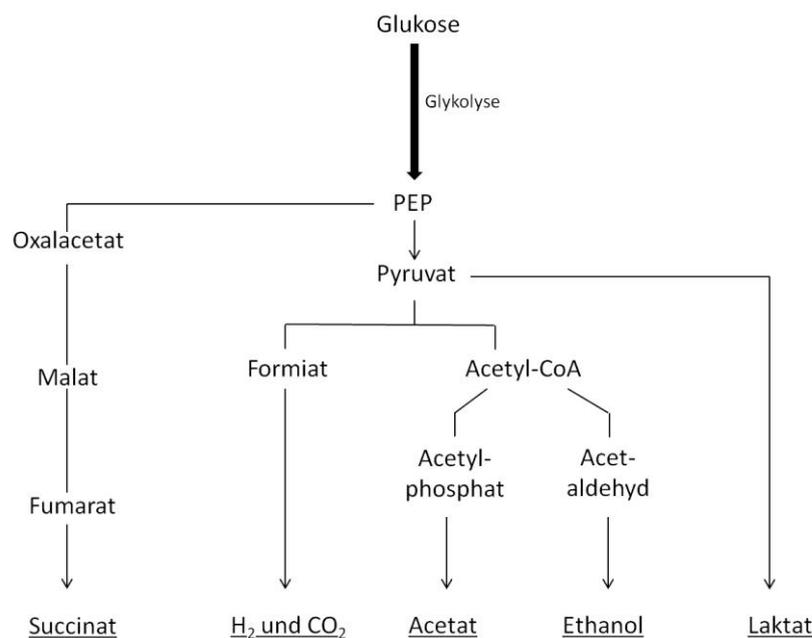


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der gemischten Säuregärung (PEP: Phosphoenolpyruvat)

Zum Anderen kann Acetyl-CoA über die Zwischenstufe des Acetaldehyds zu Ethanol abgebaut werden. Beide Reaktionen werden durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (AdhE) katalysiert. Dabei handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, welches durch das gleichnamige Gen *adhE* kodiert wird (Membrillo-Hernandez und Lin, 1999). Das 96 kDa große Protomer besitzt drei Fe^{2+} -abhängige katalytische Funktionen: Alkohol-Dehydrogenase, Acetaldehyd-Dehydrogenase und Pyruvat-Formiat-Lyase-Deaktivase (Kessler *et al.*, 1991).

Einleitung

Das AdhE-Protein ist aus vier Domänen aufgebaut, eine Acetaldehyd-Domäne, eine NAD-Bindestelle, einen Bereich mit bisher ungeklärter Funktion und schließlich eine Alkohol-Dehydrogenase-Domäne (Membrillo-Hernandez *et al.*, 2000). Weiterhin konnten Kessler *et al.*, 1992, mittels Elektronenmikroskopie zeigen, dass sich 20 bis 60 AdhE-Protomere in Form helikaler Filamente mit einer Länge von 45 bis 120 nm zusammen lagern. Trotz der enormen Relevanz dieses Enzyms für den anaeroben Stoffwechsel von *E. coli*, ist über dieses komplexe Enzym noch sehr viel unklar.

Das durch die Glykolyse anfallende Pyruvat kann jedoch auch durch die D-Laktat-Dehydrogenase (LdhA) zu Laktat metabolisiert werden (Tarmy und Kaplan, 1968a; Tarmy und Kaplan, 1968b; Mat-Jan *et al.*, 1989). Auch unter aeroben Bedingungen konnte LdhA nachgewiesen werden, jedoch steigt die Proteinmenge um etwa das 10fache unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit einer Vielzahl verschiedener Zucker und einem sauren Milieu (Mat-Jan *et al.*, 1989). Ein weiterer Abbauweg der gemischten Säuregärung zweigt sich bereits vom Phosphoenolpyruvat (PEP) ab, welches über die Zwischenstufen Oxalacetat und Malat zu Fumarat abgebaut wird. Fumarat wird schließlich mit Hilfe der Fumarat-Reduktase (Frd) zu Succinat reduziert. Das membranständige Enzym besteht aus vier Untereinheiten und zwei Domänen, wobei die katalytische Domäne im Cytoplasma lokalisiert ist (Cecchini *et al.*, 2002).

1.2 Der Formiat-Metabolismus in *E. coli*

Formiat entsteht als Stoffwechselintermediat während der gemischten Säuregärung unter anaeroben Bedingungen in Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren neben Acetyl-CoA aus Pyruvat. Formiat besitzt einen pK_a -Wert von 3,75 und ist damit die stärkste Monocarbonsäure. Da der pH-Wert in der Zelle etwa zwischen 7,2 und 7,9 ist (Hersh *et al.*, 1996), liegt intrazellulär gebildetes Formiat zu 99,99 % dissoziiert vor. Durch die negative Ladung der Cytoplasmamembran, ist Formiat nicht in der Lage diese zu passieren.

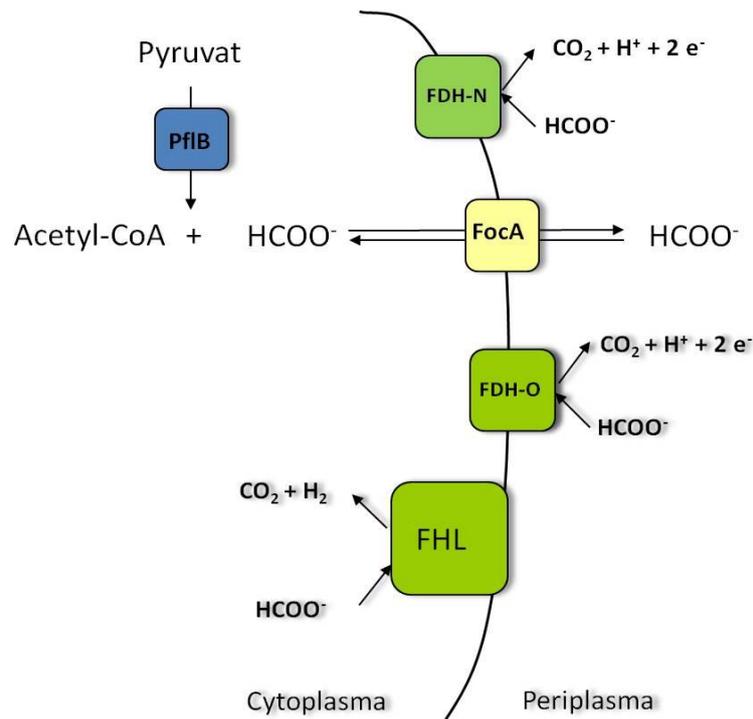


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Formiat-Stoffwechsels in *E. coli*

PflB - Pyruvat-Formiat-Lyase; FocA - Formiat-Transporter; FDH - Formiat-Dehydrogenase; FHL - Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex. Die Enzyme FDH und FHL liegen in der Zelle als Komplexe vor und sind hier in vereinfachter Form dargestellt.

PflB katalysiert die Umsetzung von Pyruvat in Formiat und Acetyl-CoA. Dieses Enzym ist ein Homodimer, wobei jedes Monomer eine Größe von etwa 85 kDa aufweist und durch das gleichnamige Gen kodiert wird. Es wurde von Knappe *et al.*, 1984, mittels EPR-Spektroskopie die Anwesenheit eines freien Radikals auf einem sp²-hybridisierten α -Kohlenstoffatom eines spezifischen Glycylrestes als Komponente der aktiven PflB identifiziert. Dieser Glycylrest ist verbunden mit dem Glycin an Position 734 und Teil einer hoch konservierten Region in der Nähe des C-Terminus (Wagner *et al.*, 1992). PflB kann somit in die Gruppe der Glycylradikalenzyme (GRE) eingeordnet werden. Die Aktivierung von PflB wird durch eine Fe²⁺-abhängige Aktivase, PflA, in Anwesenheit von Adenosylmethionin und Dihydroflavodoxin katalysiert (Knappe *et al.*, 1984, Conradt *et al.*, 1984). Dabei wird am Gly-734 mit Hilfe der beiden benachbarten Cysteine an den Positionen 418 und 419 durch den Transfer von Wasserstoff das Radikal gebildet (Knappe *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1999)(Abbildung 1.3 C). In Anwesenheit des Substrats Pyruvat wird durch den Elektronentransfer von Gly-734 auf Cys-418 dieses transient in das katalytisch aktive Thiyl-Radikal umgewandelt und vermittelt die reversible Spaltung der C-C-Bindung des am Cys-419 kovalent gebundenen Pyruvats (Parast *et al.*, 1995).

Einleitung

Das Gen *pflB* ist in einem Operon mit dem Gen *focA* lokalisiert (Abbildung 1.3 A), welches für einen Formiat-Transporter kodiert (Suppmann und Sawers, 1994). Stromabwärts von *pflB* liegt das Gen für die Aktivase, *pflA*, welches konstitutiv σ^{70} -abhängig exprimiert wird. Die Expression des *pflB*-Gens hingegen wird unter anaeroben Bedingungen in Abhängigkeit von Formiat und den globalen Regulatoren FNR und ArcA induziert (Sawers und Böck, 1988; Sawers und Böck, 1989; Sawers und Suppmann, 1992).

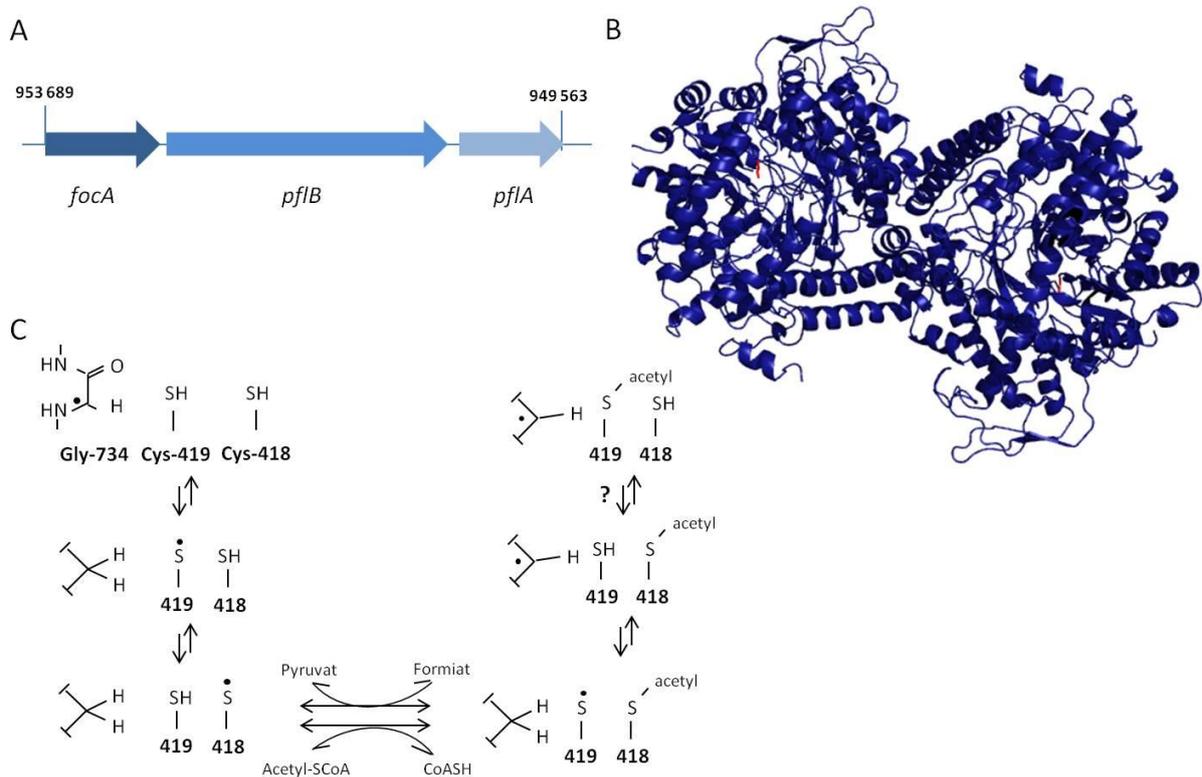


Abbildung 1.3: Pyruvat-Formiat-Lyase (PflB) in *E. coli* (A) schematische Darstellung der Lokalisation der Gene für den Formiat-Transporter (*focA*), die Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) und die Aktivase (*pflA*); (B) Kristallstruktur eines PflB-Homodimers nach Becker *et al.*, 1999, rot: Glycin an Position 734 (PDB: 2PFL; Auflösung: 2,70 Å) (C) Modell der Aktivierung von PflB (nach Becker *et al.*, 1999)

Das im Cytoplasma entstandene Formiat ist in hohen Konzentrationen toxisch für die Zelle. Es wird daher während der gemischten Säuregärung umgehend durch den FHL-Komplex in Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut. Der FHL-Komplex setzt sich aus den Enzymen Formiatdehydrogenase H (Fdh-H) und Hydrogenase 3 (Hyd 3) zusammen und wird nur unter anaeroben Bedingungen synthetisiert (Sawers, 1994). Dabei werden sowohl das *hyc*-Operon, welches für die Strukturgene der Hyd 3 kodiert, als auch das *fdhF*-Gen, dessen Genprodukt die Fdh-H ist, durch Formiat induziert (Pecher *et al.*, 1983). Dies geschieht über den Transkriptionsaktivator FhlA, welcher durch Formiat aktiviert wird und anschließend an die entsprechenden Bereiche der DNA bindet und so die Transkription der Gene initiiert (Schlensog und Böck, 1990; Schlensog *et al.*, 1994). Die Fdh-H ist ein sauerstoffsensitives

Einleitung

Enzym und beinhaltet Selen in Form eines Selenocysteins, welches kotranslational an Stelle eines UGA Stoppcodons im *open reading frame* der FdhF eingebaut wird (Zinoni *et al.*, 1986). Dieser Einbau wird durch die Produkte der Gene *selABCD* ermöglicht, wobei *selAB* in einem Operon liegen und die Gene *selC* und *selD* jeweils separat an einem anderen Ort im Genom von *E. coli* lokalisiert sind (Sawers *et al.*, 1991). Bei SelA handelt es sich um eine Selenocystein-Synthase, welche die Umsetzung von Serin zu Selenocystein katalysiert (Forchhammer *et al.*, 1991), wohingegen *selB* für einen Selenocysteinyl tRNAspezifischen Translations-Elongationsfaktor kodiert. Leinfelder *et al.*, 1989, konnten zeigen, dass eine Deletion von *selB* zu einer Anhäufung von Sec-tRNA^{Sec}_{UCA} führt und kein Einbau von Selenocystein in Selenoproteine mehr stattfindet. Das Gen *selC* kodiert für eine spezielle tRNA, die in der Lage ist, Selenocystein *in-frame* anstelle eines UGA Codons einzubauen (Leinfelder *et al.*, 1989; Baron *et al.*, 1990). Als Selenonor fungiert eine Kinase, SelD, welche eine Reaktion katalysiert, bei der Selenphosphat entsteht, welches für die Biosynthese von Selenocystein genutzt wird (Ehrenreich *et al.*, 1992). Gladyshev *et al.*, 1994, konnten mittels EPR-Spektroskopie außerdem die Anwesenheit eines Molybdän-Cofaktors zeigen, was durch Strukturaufklärungen bestätigt werden konnte (Boyington *et al.*, 1997). Außerdem konnten Boyington *et al.*, 1997, mit Hilfe der Kristallstruktur das Vorhandensein eines [4Fe-4S]-Clusters nachweisen.

E. coli besitzt neben der Fdh-H noch zwei weitere Formiat-Dehydrogenasen, Fdh-N und Fdh-O, bei denen es sich ebenfalls um Molybdän-Selenocystein-Enzyme handelt (Sawers, 1994). Sie können jedoch vorrangig vorhandenes Formiat während der anaeroben Atmung disproportionieren. Die Expression der Fdh-N wird unter anaeroben Bedingungen durch Nitrat induziert und durch FNR und NarL reguliert (Berg und Stewart, 1990; Wang und Gunsalus, 2003). Das aktive Zentrum der Fdh-N ist im Periplasma lokalisiert. Die bei der Oxidation von Formiat entstehenden Elektronen werden in einen Menachinonpool in der Cytoplasmamembran eingespeist und von dort auf eine Nitrat-Reduktase übertragen. Diese überträgt die Elektronen schließlich im Cytoplasma auf Nitrat und reduziert es so zu Nitrit (Jones *et al.*, 1980). Die dritte Formiat-Dehydrogenase in *E. coli* ist die Fdh-O. Die Expression von *fdoGHI* steigt unter aeroben Bedingungen sowie unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat an (Abaibou *et al.*, 1995). Der Fdh-O kommt die physiologische Rolle der Umsetzung von Formiat zu, wenn die äußeren Bedingungen sich von aerob auf anaerob, mit Nitrat als Elektronenakzeptor, verändern und die Fdh-N erst synthetisiert werden muss (Abaibou *et al.*, 1995).

1.2.1 Die verschiedenen Hydrogenasen in *E. coli*

Neben der Hydrogenase 3 besitzt *E. coli* noch weitere Hydrogenasen (Abbildung 1.4). Die Strukturgene der Hydrogenase 1 (Hyd 1) werden durch das *hya*-Operon kodiert. Sie wird unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Formiat und Fumarat induziert und in Anwesenheit von Nitrat unterdrückt. Hyd1 benötigt für eine optimale Expression einen sauren pH-Wert sowie die Transkriptionsregulatoren ArcA und AppY (Brondsted und Atlung, 1994; King und Przybyla, 1999; Richard *et al.*, 1999). Die Hyd 2, welche durch die Genprodukte des *hyb*-Operons kodiert wird, ist ebenfalls ein membrangebundenes Protein des anaeroben Stoffwechsels. Es katalysiert die Wasserstoff-abhängige Reduktion von Chinon (Ballantine und Boxer, 1986; Sawers, 1994; Sargent *et al.*, 1998). Weiterhin ist die Hyd 2 in der Lage Wasserstoff als Elektronendonator, während der anaeroben Atmung mit Fumarat als Elektronenakzeptor, bereitzustellen (Lee *et al.*, 1985; Menon *et al.*, 1994). Frühere Experimente konnten bereits zeigen, dass die Hyd 1 gegenüber Sauerstoff toleranter ist als die Hyd 2 (Laurinavichene *et al.*, 2002). Die Hyd 4 ist bisher nur wenig untersucht. Sie wird durch das *hyf*-Operon kodiert und in Abhängigkeit von σ^{54} durch FhlA und dem FhlA-ähnlichen Regulator HyfR reguliert (Andrews *et al.*, 1997; Skibinski *et al.*, 2002; Self *et al.*, 2004).

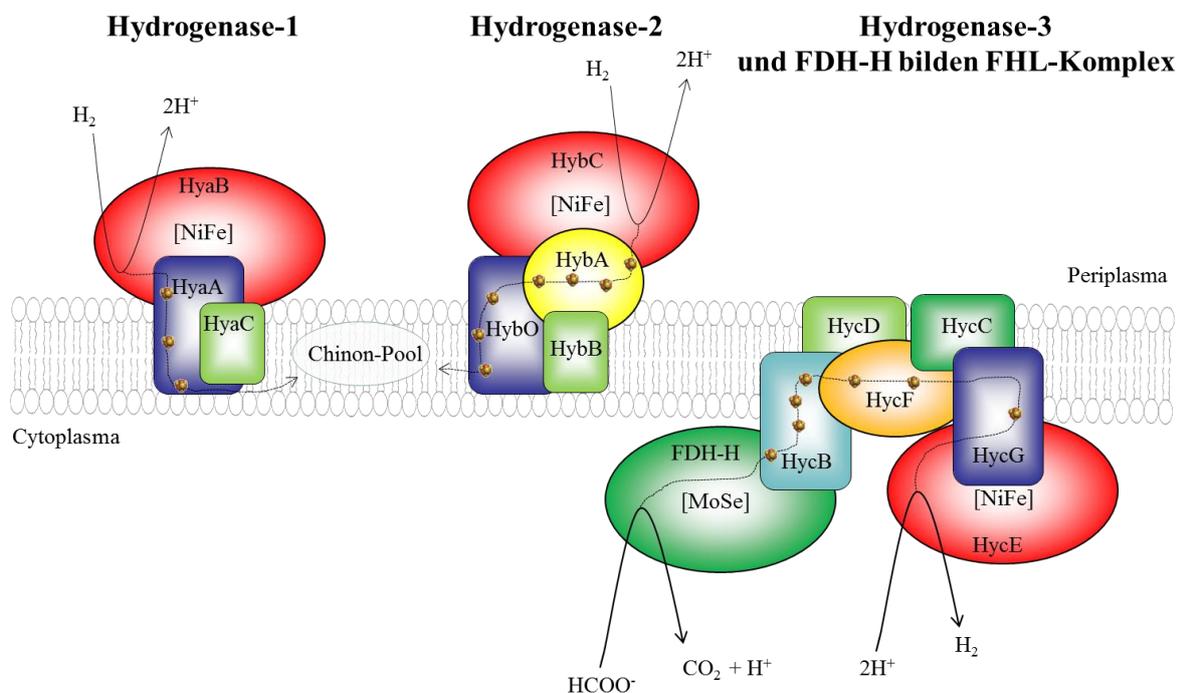


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht über Anordnung und Aufbau der drei in *E. coli* vorhandenen und bereits charakterisierten Hydrogenasen (C. Bielak (Masterarbeit, 2012; modifiziert nach Forzi und Sawers, 2007))

Einleitung

Die Hyd 3 galt bisher als einziges wasserstoffproduzierendes Enzym. Neueste Erkenntnisse konnten jedoch zeigen, dass auch sowohl die Hyd 1 als auch die Hyd 2 in *E. coli* in der Lage sind, Wasserstoff in geringen Mengen zu bilden (Lukey *et al.*, 2010, Murphy *et al.*, 2014). Wie bereits erwähnt, werden die Strukturgene der Hyd 3 durch das *hyc*-Operon kodiert, welches unter fermentativen Bedingungen durch Formiat induziert und in Anwesenheit von Sauerstoff oder Nitrat reprimiert wird (Pecher *et al.*, 1983). Die Genprodukte der Gene *hycBCDEFG* bilden jeweils die verschiedenen Untereinheiten des Enzyms, während es sich bei *HycA* um einen Regulator handelt, der in die Kontrolle verschiedener Gene des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes involviert ist. Dabei wird angenommen, dass *HycA* mit dem Transkriptionsaktivator *FhlA* interagiert und diesen daran hindert an die entsprechenden Aktivatorsequenzen zu binden (Sauter *et al.*, 1992; Leonhartsberger *et al.*, 2000). Die Expression von *hycA* wird ebenfalls durch Formiat induziert (Suppmann und Sawers, 1994). Die Hyd 3 enthält in ihrem aktiven Zentrum, genau wie auch die Hyd 1 und die Hyd 2, Nickel und ein Fe-S-Cluster und wird damit der Klasse der Nickel-Eisen-Hydrogenasen zugeordnet (Rossmann *et al.*, 1994). Da sich Formiat bei hohen Konzentrationen in der Zelle auf diese toxisch auswirkt, hat *E. coli* ein System entwickelt, welches es ermöglicht Formiat zunächst ins Periplasma zu transportieren und von dort zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufzunehmen um es abzubauen. Suppmann und Sawers, 1994, identifizierten ein Gen, *focA* (*formate channel A*), dessen Produkt in der Lage ist, Formiat über die Cytoplasmamembran zu transportieren.

1.3 Das Formiat-Transportprotein FocA

Durch ungerichtete Mutagenese und einem anschließenden Screening-System auf dem toxischen Formiat-Analogon Hypophosphit, wurden Mutanten erhalten, welche einen Wachstumsvorteil aufwiesen (Suppmann und Sawers, 1994). Hypophosphit ist in seiner Struktur Formiat sehr ähnlich, jedoch hemmt es *PflB* und ist damit toxisch für die Zelle (Knappe *et al.*, 1984). Bei der Sequenzierung der Insertionsstelle der erhaltenen Mutante, wurde ein Gen identifiziert, welches fortan als *focA* bezeichnet wurde. Das Gen *focA* ist in einem Operon mit dem Gen *pflB* lokalisiert und wird mit selbigem kotranskribiert (Abbildung 1.3 A). Dabei wird *focA* genau wie *pflB* unter anaeroben Bedingungen induziert und durch FNR und ArcA reguliert (Sawers und Böck, 1988; Sawers und Suppmann, 1992; Drapal und Sawers, 1995). Die Transkription des Operons wird von acht verschiedenen Promotoren kontrolliert, wobei das Gen durch den Promotor 6a schwach konstitutiv exprimiert wird (Sawers, 2006). Das Translationsinitiationscodon von *focA* ist nicht wie gewöhnlich ein AUG,

Einleitung

sondern ein GUG (Suppmann und Sawers, 1994). Das Genprodukt von *focA* ist ein etwa 31 kDa großes Protein, was in der Cytoplasmamembran als Homopentamer vorkommt (Suppmann und Sawers, 1994; Falke *et al.*, 2010). Dabei umfasst ein Monomer sechs transmembrane Helices. Der N- sowie der C-Terminus von FocA sind jeweils im Cytoplasma lokalisiert.

Die Kristallstruktur von FocA konnte bereits aus unterschiedlichen Organismen gelöst werden. So zeigt sowohl die Struktur eines Protomers aus *E. coli* (Wang *et al.*, 2009), als auch aus *Vibrio cholerae* (Waight *et al.*, 2010) und *Salmonella typhimurium* () einen Aquaporin-ähnlichen Kanal, von denen fünf sich zu einem Homopentamer zusammenlagern. Es ergibt sich dabei pro Monomer je eine kleine Pore und eine Zentralpore im Homopentamer. Alle drei erhaltenen Strukturen unterscheiden sich nur minimal voneinander, jedoch gelang es keine der Gruppen den N-Terminus des Proteins vollständig aufzulösen. Dies lässt vermuten, dass der N-Terminus eines FocA-Protomers sehr flexibel ist und damit entscheidend für den Transport von Formiat sein könnte.

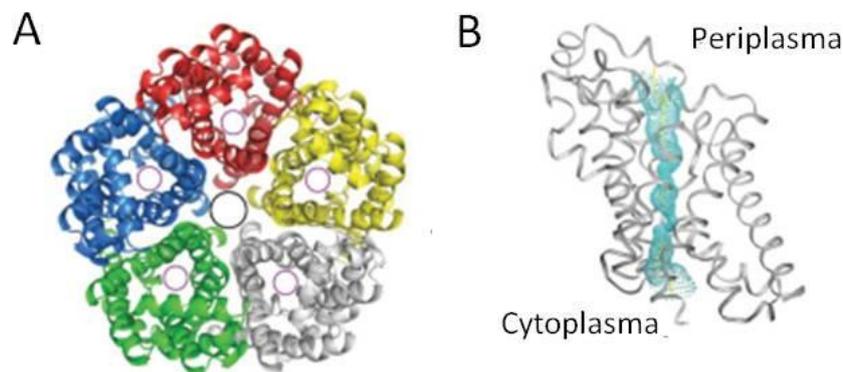


Abbildung 1.5: Kristallstruktur des FocA-Proteins aus *E. coli* nach Wang *et al.*, 2009; PDB 3KCV; 2,25 Å
(A) FocA als Homopentamer aus periplasmatischer Sicht; (B) FocA-Protomer in der Membranansicht.

Der genaue Mechanismus, wie Formiat transportiert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Bisher konnte gezeigt werden, dass es sich um einen bidirektionalen Transport handelt (Suppmann und Sawers, 1994). Formiat kann somit durch FocA ins Medium transloziert und schließlich auch wieder aufgenommen werden. Während von Lü *et al.*, 2011, ein pH-abhängiger Transport durch jedes Protomer postuliert wurde, gehen Wang *et al.*, 2009 und Waight *et al.*, 2010 von einem Transport durch die monomere Pore aus, indem sich Engstellen bilden. Dabei konnte eine Engstelle in der Pore durch eine Wasserstoffbrückenbindung

Einleitung

zwischen den Aminosäuren Thr-90 und His-208 ermittelt werden, wobei gezeigt werden konnte, dass Formiatmoleküle an Stelle des Threonins treten können und so den Kanal öffnen.

1.4 Die Anwesenheit eines weiteren Formiat-Transportsystems in *E. coli*

Das FocA-Protein gehört zur Familie der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT-Familie) und zeigt hohe Sequenzhomologien zum Nitrit-Transporter NirC aus *E. coli* (Jia und Cole, 2005) sowie zu FdhC aus *Methanobacterium formicium*, bei dem es sich ebenfalls um ein Protein zur Formiataufnahme handeln soll (White und Ferry, 1992; Nölling und Reeve, 1997). Bereits Suppmann und Sawers (1994) konnten zeigen, dass in einem FocA⁻-Stamm noch immer Formiat über die Cytoplasmamembran ins Medium transportiert und von dort aus auch wieder aufgenommen werden kann (Abbildung 1.6Abbildung 1.). Dies lässt auf die Anwesenheit mindestens eines weiteren Formiat-Transporters schließen.

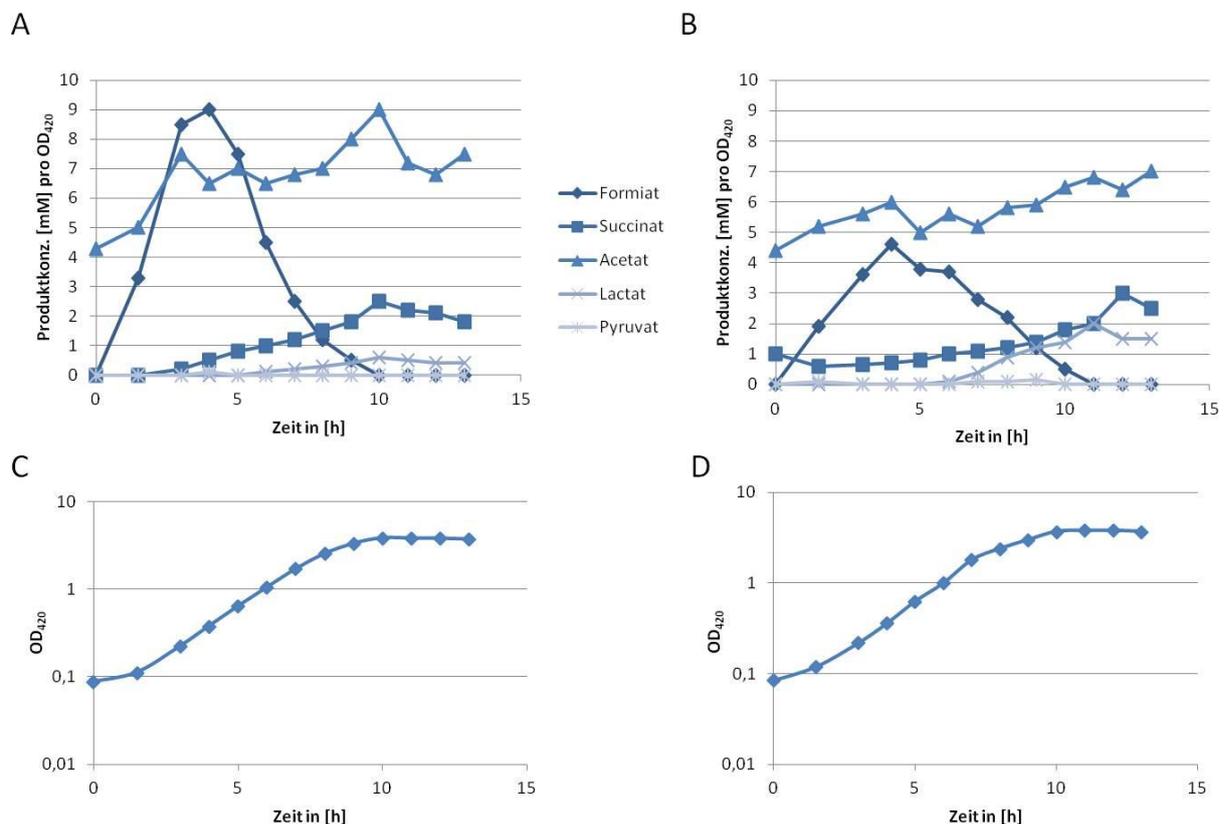


Abbildung 1.6: Säurespektren und Wachstumskurven verschiedener *E. coli* Stämme nach anaerober Kultivierung in Werkmann-Minimalmedium bei pH 6,8. (A) und (B) Säurespektren; (C) und (D) Wachstumskurven (A) und (C) Wildtypstamm MC4100; (B) und (D) FocA⁻-Stamm REK701. Die organischen Säuren wurden aus dem Kultivierungsmedium extrahiert und mittels HPLC analysiert. Abbildung aus Suppmann und Sawers, 1994.

Es besteht die Möglichkeit, dass NirC aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit neben Nitrit auch Formiat transportieren kann. Der Nitrit-Transporter NirC gehört, genau wie FocA, zur FNT-

Einleitung

Familie. Das Protein umfasst ebenfalls sechs Transmembranhelices und N- und C-Terminus sind dabei, wie bei FocA, im Cytoplasma lokalisiert (Clegg *et al.*, 2002). Bei *In-vitro*-Versuchen mit NirC aus *Salmonella typhimurium* konnte gezeigt werden, dass NirC in der Lage ist, Formiat zu transportieren (Lü *et al.*, 2012).

Von Andrews *et al.* (1997) wurde andererseits ein Gen beschrieben, welches aufgrund seiner Ähnlichkeit zu *focA* als *focB* bezeichnet und dessen Genprodukt als mögliche Funktion der Transport von Formiat zugeordnet wurde. Das Gen *focB* ist im *hyf*-Operon lokalisiert, welches die Strukturgene für eine mögliche Hyd 4 beinhaltet (Andrews *et al.*, 1997; Skibinski *et al.*, 2002). Computergestützte Analysen mit Hilfe des Programmes TMHMM 2.0 (NCBI) ergaben, dass der mögliche Formiat-Transporter FocB genau wie FocA und NirC sechs transmembrane Helices aufweist und der N- und C-Terminus ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert sind. Es gilt daher zu klären, ob FocB am Formiat-Transport beteiligt ist.

Formiat ist die einfachste Monocarbonsäure. Das Bakterium *E. coli* besitzt nun auch Transportsysteme, welche in der Lage sind, Dicarbonsäuren bzw. längere Carbonsäuren zu transportieren. Ein Beispiel ist der C4-Dicarbonsäure Transporter DctA (Lo, 1977). Ob Formiat durch diese Transporter ebenfalls unspezifisch transportiert werden kann, gilt es ebenfalls zu untersuchen

1.5 Glycylradikalenzyme und ihre möglichen Schutzmechanismen im anaeroben Stoffwechsel

Es gibt, wie oben beschrieben, auch Proteine im Formiat-Metabolismus, die in Anwesenheit von Sauerstoff zerfallen bzw. inaktiviert werden. Ein Beispiel ist die bereits oben ausführlich beschriebene Pyruvat-Formiat-Lyase PflB, welche zu den Glycylradikalenzymen (GRE) gehört. GREs sind Biokatalysatoren, welche anaerobe und fakultativ anaerobe Organismen befähigen chemisch schwierige Reaktionen zu katalysieren (Frey, 2001). Für ihre Aktivierung wird eine eisenhaltige Aktivase sowie Adenosylmethionin benötigt (Frey und Booker, 2001). Neben PflB handelt es sich auch bei der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase um ein Enzym, welches zur GRE-Familie gehört (Kolberg *et al.*, 2004). Im anaeroben Stoffwechsel von *E. coli* gibt es neben PflB noch die 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase TdcE, welche ebenfalls zu den GREs gehört und bei einer Deletion von *pflB* dessen Funktion partiell übernehmen kann (Sawers *et al.*, 1998). Die Expression des *tdcE*-Gens ist cAMP-abhängig und unterliegt der Katabolitrepression. TdcE wird ebenfalls von der Aktivase PflA aktiviert. Zwischen PflB und TdcE gibt es eine hohe Übereinstimmung in der AS-Sequenz (siehe A3) und der C-Terminus

Einleitung

2001, konnte bereits durch *In-vitro*-Versuche eine Aktivität von PflB nach Interaktion mit GrcA nachweisen. Die Struktur von GrcA sowie eine Interaktion mit PflB *in vivo*, und damit funktionelle Komplementation von PflB nach Sauerstoffstress, konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Ablauf der gemischten Säuregärung mit dem Schwerpunkt auf dem Formiat-Metabolismus untersucht werden. Die Bestimmung der Gasproduktion nach anaerobem Wachstum bei verschiedenen Stoffwechsel-Mutanten soll Hinweise auf mögliche Zusammenhänge der unterschiedlichen Abbauewege von Pyruvat während der gemischten Säuregärung geben. Mittels weiterer physiologischer Untersuchungen soll schließlich die Verknüpfung zwischen Formiat-Synthese durch PflB und Formiat-Transport durch FocA untersucht werden. Auch der Formiat-Abbau unter anaeroben Bedingungen durch den FHL-Komplex im Zusammenhang mit der internen Formiat-Konzentration ist ein zu betrachtender Aspekt der vorliegenden Arbeit. Dabei soll weiterhin die Möglichkeit, Formiat zur Detoxifizierung der Zelle zunächst ins Periplasma zu transportieren, untersucht werden. Anliegend gilt es Hinweise auf ein weiteres Formiat-Transport-System neben dem bisher bekannten Membranprotein FocA zu erhalten. Durch gezielte Deletion von Genen, deren Genprodukte Transportproteine darstellen, sollen mögliche weitere Formiat-Transporter identifiziert und schließlich näher charakterisiert werden.

Ein weiteres Teilgebiet dieser Arbeit stellt die nähere Charakterisierung des Glycylradikalenzym GrcA dar. Es sollen sowohl biochemische als auch biophysikalische Untersuchungen zu GrcA durchgeführt werden. Dabei sind Versuche zur Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse und CD-Spektroskopie sowie Experimente zur Interaktion von PflB und GrcA vorgesehen um Hinweise auf die Funktion von GrcA in *E. coli* zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen, Vektoren und Phagen

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme, Plasmide und Phagenlysate mit den entsprechenden Resistenzen und Genotypen aufgeführt.

Tabelle 2-1: Verwendete *E. coli*-Stämme mit entsprechendem Genotyp

Stamm	Resistenz	Genotyp	Referenz
MC4100		F- <i>araD 139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 ptsF25 deoC1 relA1 flbB530 rpsL 150</i> λ -	Casadaban und Cohen, 1979
XL1-Blue	Tet	<i>hsdR17 endA1 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac</i> [F ⁺ <i>proAB, lacIq</i> Δ M15, Tn10]	Stratagene, Amsterdam, NL
BL21(DE3)		F- <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ (DE3[<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Invitrogen, Carlsbad, USA
DH4100	Kan	MC4100 λ <i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	L. Beyer, Diplomarbeit 2009
DH701	Kan	MC4100 <i>focA</i> (Codone 114 und 115 zu UAG und UAA mutiert) λ <i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	Suppmann und Sawers, 1994; L. Beyer, Diplomarbeit 2009
DH234M1	Kan, Cm	MC4100 Δ <i>pflA</i> λ <i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1992; modifiziert: diese Arbeit
DH201	Kan, Cm	MC4100 Δ <i>pflB</i> -25 Ω (Δ <i>focA pflB</i>) λ <i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	Sawers und Böck, 1989; L. Beyer, Diplomarbeit 2009
DH220	Kan	MC4100 Δ <i>pflB pflA</i> λ <i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	Suppmann und Sawers, 1994; L. Beyer, Diplomarbeit 2009
DH223	Kan	DH220 Δ <i>tdcE</i>	Hesslinger <i>et al.</i> , 1998a; modifiziert: diese Arbeit
DH226	Kan, Cm	DH201 Δ <i>tdcE</i>	Hesslinger <i>et al.</i> , 1998a; modifiziert: diese Arbeit
IL746	Cm	MC4100 Δ <i>adhE</i>	Kessler <i>et al.</i> , 1991
Pta	Kan	MC4100 Δ <i>pta</i>	C. Pinske, unveröffentlicht
JW2477	Kan	BW25113 Δ <i>focB</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 2006

Material und Methoden

Stamm	Resistenz	Genotyp	Referenz
DH1003	Kan	MC4100 $\Delta focB \lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
JW3330	Kan	BW25113 $\Delta nirC$	Kitagawa <i>et al.</i> , 2006
DH1004	Kan	REK701 $\Delta focB \lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
FocA ⁻ $\Delta nirC$	Kan	DH701 $\Delta nirC$	diese Arbeit
$\Delta dauA$	Kan	MC4100 $\Delta dauA \lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
FocA ⁻ $\Delta dauA$	Kan	REK701 $\Delta dauA \lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
REK700		MC4100 <i>focA</i> (GUG → UUU)	Suppmann und Sawers, 1994
REK701		MC4100 FocA ⁻	Suppmann und Sawers, 1994
REK702		MC4100 <i>focA</i> (GUG → AUG)	Suppmann und Sawers, 1994
REK703		MC4100 <i>focA</i> (GUG → GUC)	Suppmann und Sawers, 1994
REK704		MC4100 <i>focA</i> (CVVC → SVVS)	Suppmann und Sawers, 1994
DH700	Kan	REK700 $\lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
DH702	Kan	REK702 $\lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
DH703	Kan	REK703 $\lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
DH704	Kan	REK704 $\lambda fdhF'-'lacZ$	diese Arbeit
DH4100 $\Delta selB$	Kan; Tet	DH4100 Tn10:: <i>selB</i>	diese Arbeit
DH700 $\Delta selB$	Kan; Tet	DH700 Tn10:: <i>selB</i>	diese Arbeit
DH701 $\Delta selB$	Kan; Tet	DH701 Tn10:: <i>selB</i>	diese Arbeit
DH702 $\Delta selB$	Kan; Tet	DH702 Tn10:: <i>selB</i>	diese Arbeit
DH703 $\Delta selB$	Kan; Tet	DH703 Tn10:: <i>selB</i>	diese Arbeit
DH704 $\Delta selB$	Kan; Tet	DH704 Tn10:: <i>selB</i>	diese Arbeit

Tabelle 2-2: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Referenz
p29/1	Cm	pACYC184 <i>pflB pflA</i>	Christiansen und Pedersen, 1981
pCP20	Amp, Cm	FLP ⁺ λ cI857 ⁺ λ p _R Rep ^{ts}	Cherepanov und Wackernagel, 1995
pET15b-TEV (<i>grcA</i>)	Amp	pET15b-TEV <i>grcA</i>	Dr. P. Kolenko (unveröffentlicht)

Tabelle 2-3: Übersicht über verwendete Phagenlysate

Phagenlysat	Resistenz	Genotyp	Referenz
P1-Starterlysat		P1 <i>kc</i>	Miller, 1972
λ <i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	Kan	<i>fdhF'</i> - <i>lacZ</i>	L. Beyer, 2009
P1:: Δ <i>selA</i> , Δ <i>selB</i> oder Δ <i>selC</i>	Tet	Zufällige Insertion eines Tn10-Mini-Transposons in Δ <i>selA</i> , Δ <i>selB</i> oder Δ <i>selC</i>	A. Krizsan, 2011

2.2 Verwendete Nährmedien

Für die Anzucht der Bakterien wurden folgende Medien verwendet. Sie wurden nach der Herstellung für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.2.1 LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	1 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

Material und Methoden

2.2.2 M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

5 x M9-Salz	20,0 % (w/v)
1 M MgSO ₄	0,2 % (w/v)
Glukose	0,4 % (w/v)
1 M CaCl ₂	0,01 % (w/v)
Spurenelementlösung	0,01 % (v/v)
Thiamindichlorid	0,01 % (w/v)

5 x M9-Salze

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	238 mM
KH ₂ PO ₄	110 mM
NaCl	42,2 mM
NH ₄ Cl	93 mM

Spurenelementlösung (nach Hormann und Andreesen, 1989, modifiziert)

HCl (25 %) (v/v)	10 ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g
ZnCl ₂	0,07 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g
H ₃ BO ₄	0,006 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002 g
NiCl ₂ x 2 H ₂ O	0,024 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,033 g
Na ₂ SeO ₃	0,171 g
Na ₂ VO ₃ x 2 H ₂ O	0,014 g
H ₂ O dest.	ad 1 l

Das Eisenchlorid wurde zunächst in der Salzsäure (25 %) (v/v) gelöst und dann mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Darin wurden die weiteren Spurenelemente gelöst. Anschließend wurde die Lösung 20 min autoklaviert.

Material und Methoden

2.2.3 TYEP-Medium

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Kaliumphosphatpuffer	100 mM

Erhielt das Medium den Zusatz von 0,4 % (w/v) Glukose, wurde es als TGYEP-Medium bezeichnet. Kaliumphosphatpuffer wurde in verschiedenen pH-Werten verwendet.

2.2.4 Medienzusätze

In der folgenden Tabelle sind Zusätze aufgeführt, welche nach dem Autoklavieren dem entsprechenden Kulturmedium zugeführt wurden.

Tabelle 2-4: Verwendete Medienzusätze, welche nach dem Autoklavieren zugegeben wurden

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O dest.	50 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 70%igem Ethanol	12,5 µg/ml
Ampicillin	125 mg/ml in H ₂ O dest.	125 µg/ml
IPTG	0,5 M in H ₂ O dest.	0,1 mM

Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bei –20 °C gelagert. Der entsprechende Anteil wurde dem autoklavierten Medium nach dem Abkühlen zugegeben.

2.3 Stammhaltung und Zellwachstum

2.3.1 Stammhaltung

Die Bakterienstämme wurden auf Nähragarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 4 °C für maximal fünf Wochen gelagert, bevor sie erneut entsprechend überimpft wurden. Desweiteren wurden von jedem Stamm Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden die Stämme in LB-Medium (2.2.1) über Nacht bei 37 °C kultiviert und 1 ml dieser Kultur mit Glycerin [Endkonzentration 12,5 % (v/v)] versetzt. Die Aufbewahrung dieser Glycerinkulturen erfolgte bei –80 °C.

Material und Methoden

2.3.2 Aerobe Kultivierung

Die in Tabelle 2.1 erwähnten Stämme wurden auf einer Nähragarplatte aus einer Glycerinkultur mit der Impföse ausgestrichen und anschließend bei 37 °C inkubiert. Die dabei erhaltenen Kolonien wurden vereinzelt und in einem Kulturröhrchen mit Kapsenbergkappe und 5 ml Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum auf einem Schüttler kultiviert. Erfolgte die aerobe Kultivierung in einem Erlenmeyer- bzw. Klettkolben, wurde dieser zu einem Viertel mit dem entsprechenden Nährmedium gefüllt und bei 37 °C in einem Rundschüttler bei 150-200 Upm inkubiert. Damit wurde eine optimale Sauerstoffversorgung gewährleistet.

2.3.3 Anaerobe Kultivierung

Die anaerobe Zellanzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in Hungate-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 15 ml. Diese wurden mit 14 ml TGYEP-Medium gefüllt, mit den jeweiligen Antibiotika versehen und anschließend mit einem sterilen Septum luftdicht abgeschlossen. Die noch anwesende Sauerstoffphase über dem Medium wird vom fakultativen Anaerobier *E. coli* nach dem Animpfen verbraucht, so dass anaerobes Wachstum gegeben war. Wurden größere Kulturvolumina benötigt, wurden für die anaerobe Anzucht der Bakterienstämme Serumflaschen nach dem gleichen Prinzip verwendet.

2.3.4 Dokumentation des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Zur Durchführung der Messung wurden bei aerober Kultivierung Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und 1 ml Fassungsvermögen verwendet. Als Leerwert diente das jeweilige Medium im unbeimpften Zustand. Bei der anaeroben Anzucht konnte die OD₆₀₀ in den Hungate-Röhrchen direkt gemessen werden. Eine Hauptkultur wurde immer 1%ig mit der Vorkultur angeimpft, so dass eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,03 bis 0,08 erreicht wurde. Die Bestimmung des Wachstums während einer Wachstumskurve wurde stündlich und mindestens dreimal durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen 20 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen, die aufgrund ihrer Zersetzungstemperatur nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,02 µm in ein steriles Gefäß filtriert. Die nicht hitzestabilen Geräte wurden mit 70%igem Ethanol behandelt oder abgeflammt.

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Plasmid-Präparations-Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Dazu wurden 5 ml Kultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Aus dieser wurde nach Anleitung des Herstellers mit den bereitgestellten Lösungen das Plasmid isoliert und in 30 µl H₂O eluiert. Die Plasmidkonzentration wurde anschließend am Nano-Drop 1000 (Peqlab, Erlangen) bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der DNA-Probe wurde aus dem Quotient 260/280 geschlussfolgert (ebenfalls am Nano-Drop bestimmt), der unter optimalen Bedingungen bei etwa 1,9 liegen sollte.

2.4.2 Polymerase Kettenreaktion

Zur Amplifikation eines gewünschten Abschnitts der chromosomalen DNA von *E. coli* bzw. rekombinanter Plasmid-DNA wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet (Mullis *et al.*, 1992). Hierbei werden einzelne Fragmente in hoher Kopienzahl erzeugt.

Wurde eine Kolonie-PCR zur Überprüfung einer Mutation durchgeführt, wurde das Koloniematerial von *E. coli* direkt im PCR-Ansatz resuspendiert. Zur Überprüfung eines Gens auf einem Plasmid wurden 50-200 ng *template*-DNA eingesetzt und das dafür verwendete Volumen vom Wasseranteil abgezogen. Die Tabelle 2-5 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

PCR-Ansatz mit	Einheit	<i>Taq</i> DNA Polymerase	Phusion-High-Fidelity-DNA-Polymerase
Primer 1 und 2 (10 pmol/µl)	µl	jeweils 0,5	jeweils 1
dNTP-Mix (je 0,2 mM)	µl	0,5	1
Reaktionspuffer 5 x	µl	-	10
Reaktionspuffer 10 x	µl	2	-
Polymerase (1 U)	µl	0,5	0,5
H ₂ O _{dest.}	µl	16	36,5

Material und Methoden

Nachfolgend sind die jeweiligen Amplifikationsprogramme aufgeführt.

<i>Taq</i> -DNA Polymerase:	Denaturierung	95 °C	2 min	
	Denaturierung	95 °C	15 s	} 32 x
	<i>Annealing</i>	55-65 °C	30 s	
	<i>Extension</i>	72 °C	30 s	
	Pause	4 °C		

Phusion-High-Fidelity DNA-Polymerase:	Denaturierung	98 °C	30 s	
	Denaturierung	98 °C	10 s	} 32 x
	<i>Annealing</i>	70 °C	30 s	
	<i>Extension</i>	72 °C	10 s	
	<i>Final Extension</i>	72 °C	5 min	
	Pause	4 °		

Die *Annealing*-Temperatur der Primer richtet sich nach deren Schmelztemperatur und lag 5 °C unter dieser. Die *Extension*-Zeit ist von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig. Hierbei wurde beachtet, dass die Syntheseleistung der *Taq*-Polymerase 1 kb/min beträgt und die der High-Phusion-Fidelity-Polymerase 1 kb pro 15-30 s (Herstellerangaben).

Die Tabelle A4 im Anhang fasst die verwendeten Primer, welche von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und von dieser erworben wurden, zusammen.

2.4.3 Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA)

Beim Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA) ist besondere Sorgfalt erforderlich, da RNasen allgegenwärtig sind. Aus diesem Grund werden alle Reaktionsgefäße sowie selbst hergestellte Lösungen zuvor zweifach bei 121 °C je 20 min autoklaviert. Der Arbeitsplatz sowie alle verwendeten Geräte und Materialien werden intensiv mit 70%igem Alkohol gereinigt. Während des Arbeitens sind stets Handschuhe zu tragen und Türen und Fenster geschlossen zu halten.

Für die Isolierung der RNA wurde der entsprechende *E. coli*-Stamm bis zur gewünschten optischen Dichte in LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Nach der Zellernte für 10 min bei 2990 x g wurde die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend erfolgte ein erneuter DNase Verdau für 1 h bei 37 °C. Dafür wurden etwa 15 µg der isolierten RNA mit 10 µl DNase Puffer und 10 µl DNase (Promega, Madison, USA) in einen Gesamtansatz von 100 µl gegeben. Der Verdau wurde im Anschluss mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.4.4 Amplifikation von RNA

Da RNA nicht direkt als *template* in einer PCR eingesetzt werden kann, muss die einzelsträngige RNA erst mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

Die Synthese von cDNA erfolgte mittels des *RevertedAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Scientific) nach Herstellerprotokoll. Dabei kamen, abhängig vom zu untersuchenden Gen, sowohl die im Kit enthaltenen *Random-hexamer*-Primer als auch genspezifische Primer zum Einsatz. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Die erhaltene cDNA konnte nun als *template* bei der PCR eingesetzt werden. Auf diese Weise sind Rückschlüsse möglich, ob ein bestimmtes Gen *in vivo* transkribiert wird. Die PCR wurde, wie unter 2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden jeweils genspezifische Primer verwendet, die ein Produkt von etwa 300 bis 600 bp ergaben. Als Negativkontrolle wurde 1 µl der in Punkt 2.4.3 erhaltenen RNA eingesetzt. Als Positivkontrolle diente genomische DNA.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung der DNA erfolgte gelelektrophoretisch bei 80-110 V. Dazu wurde je nach Fragmentgröße ein 0,8-1,5 % (w/v) Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde dabei in 1 x TAE (40 mM Tris/HCl; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0) gelöst. Die Proben wurden mit 0,2 Vol. Stopp-Lösung (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin) versetzt.

Die Auftrennung erfolgte in Gelelektrophoresekammern der Firma Peqlab (Erlangen), wobei 1 x TAE als Laufpuffer diente. Anschließend wurde das Gel ca. 30 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die Basen der DNA. Die Detektion der DNA-Moleküle als Banden erfolgte bei UV-Licht mit Hilfe des Gel-Imagers (Intas GDS, Göttingen). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde der λ-Pst-Marker verwendet. Dieser wurde selbst hergestellt, in dem die DNA des Phagen λ mit dem Restriktionsenzym PstI vollständig verdaut wurde. Dabei entstanden folgende Fragmentgrößen (in kb): 11,5; 5,08; 4,51; 2,94; 2,55; 2,44; 2,14; 1,99; 1,7; 1,16; 1,09; 0,81; 0,51; 0,47; 0,45; 0,34; 0,25

2.5 Herstellung und Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

2.5.1 Herstellung ultra-chemokompetenter Zellen und Chemotransformation

Zur Herstellung chemokompetenter Zellen wurde eine 5 ml Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Davon wurde 1%ig eine Tageskultur von 50 ml LB-Medium angeimpft und diese bei 37 °C kultiviert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreichte. Die Kultur wurde in ein steriles, eisgekühltes Greiner-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte bei 2990 x g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 16 ml eisgekühltem Transformationspuffer (238 mM MnCl₂ x 4 H₂O; 110 mM CaCl₂ x 4 H₂O; 42,7 mM KCl; 93 mM PIPES (pH 6,7)) resuspendiert. Dann wurden die Zellen erneut für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewaschene Zellpellet wurde in 2 ml Transformationspuffer aufgenommen, mit 0,3 ml sterilem DMSO versetzt und zu je 200 µl aliquotiert. Die Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Material und Methoden

Für die Chemotransformation wurde ein Aliquot der Zellen zum langsamen Auftauen etwa 30 min auf Eis inkubiert und 50-100 ng des gewünschten Plasmids zum Ansatz gegeben. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C, dem sich ein Abkühlungsschritt auf Eis anschloss. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zum Ansatz gegeben und dieser für 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Selektion fand durch Ausplattieren verschiedener Volumina auf Nähragarplatten mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C statt.

2.5.2 Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Davon wurde eine 200 ml Hauptkultur 1%ig angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 bei 37 °C kultiviert. Nach dem Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurden die Zellen auf Eis gestellt und anschließend auf vier sterile Greiner-Röhrchen verteilt. Es folgt ein zehn minütiger Zentrifugationsschritt bei 2990 x g und 4 °C. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 1 Vol. eiskaltem Wasser gewaschen (10 min, 2990 x g, 4 °C). Es erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 30 ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerin und anschließender Zentrifugation (10 min, 2990 x g, 4 °C). Das Pellet wurde schließlich in 0,6 ml 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert. Der Ansatz wurde zu je 40 µl Aliquots in gekühlte Reaktionsgefäße verteilt und diese anschließend bei –80 °C aufbewahrt.

Bei der Elektroporation wurden zum Zellaliquot 250-500 ng Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Da vorhandene Salze die Elektroporation stören, sollte die Plasmid-DNA vorher ggf. mittels Mikrodialyse gegen Wasser entsalzt werden (Marusyk und Sergeant, 1980). Dazu wurden Membranfilter mit einer Porengröße von 0,025 µm der Firma Millipore (Eschborn) verwendet. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) mit 0,2 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation wurde an einem Gene Pulser (Bio-Rad, München) bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω durchgeführt. Direkt im Anschluss an den Impuls wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben und der gesamte Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Schließlich erfolgte das Ausplattieren von verschiedenen Volumina des Transformationsansatzes auf selektivem Nähragar. Die Inkubation der Platten geschah ebenfalls über Nacht bei 37 °C.

2.5.3 Überprüfen der erhaltenen Transformanden

Die durch Chemotransformation oder Elektroporation erhaltenen Transformanden wurden nach erneutem Ausstrich auf selektivem Nähragar und dem damit einhergehenden Erhalt von Einzelkolonien auf ihre Korrektheit überprüft. Dafür wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden eingesetzt.

2.5.3.1 Quick-Check-Gel zur Überprüfung von Transformanden

Ein *Quick-Check*-Agarose-Gel dient dem schnellen Überprüfen von Transformanden. Hierfür wurden die nach dem Ausstrich erhaltenen Einzelkolonien in LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht schüttelnd bei 37 °C angezogen. Von der Zellsuspension wurden 100 µl abgenommen und mit 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) sowie 20 µl Stopp-Mix (2.4.5) versehen. Der Ansatz wurde für 30 s kräftig auf einem Vortexer gemischt und anschließend für 5 min bei 12000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5415C) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl abgenommen und auf ein 1,5%iges Agarose Gel geladen. Als Negativkontrolle wurde der entsprechende Leervektor des Plasmids mitgeführt. Die Agarose Gelelektrophorese erfolgte, wie unter Punkt 2.4.5 beschrieben.

Zum Prüfen der korrekten Insertion eines Gens in einen Vektor nach erfolgreicher Transformation wurde etwas Koloniematerial der erhaltenen Einzelkolonien abgenommen und in einem PCR-Ansatz resuspendiert. Die PCR wurde, wie unter 2.4.3 beschrieben, durchgeführt.

2.5.3.2 Sequenzierung und Auswertung der erhaltenen Sequenzen

Die Sequenzierung stellt eine weitere, sehr genaue Methode zur Überprüfung erhaltener Transformanden dar. Dazu wurden diese in LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen und anschließend das Plasmid, wie unter 2.4.1 beschrieben, isoliert. Für die Sequenzierung wurden dann 50-200 ng Plasmid-DNA und 20 pmol eines entsprechenden Primers in einen Gesamtansatz von 7 µl gegeben. Die Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab in Göttingen nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm *Chromas Lite* (Griffith University, Southport, Australien, www.technelysium.com/au) visualisiert und dem Programm *Serial Cloner* mit der erwarteten Sequenz bzw. mit Hilfe des Programmes BLAST (*basic local alignment search tool*) über das „National Center for Biotechnological Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit den gespeicherten DNA-Sequenzen der Datenbank EMBL verglichen.

2.6 Die Generierung von Deletionen mittels P1-Phagentransduktion

2.6.1 Herstellung eines P1-Phagenlysates

Um eine gewünschte Mutation in die chromosomale DNA von *E. coli* zu transduzieren, muss zunächst ein gemischtes Lysat des P1-Phagen hergestellt werden, welches in gewissen Teilen auch die gewünschte Mutation enthält.

Hierfür wurde eine 5 ml Übernachtskultur des Donorstammes angezogen. Davon wurden 0,5 ml abgenommen und mit 4,5 ml LB-Medium, welches 2,5 mM CaCl₂ enthielt, versetzt. Der P1-Phage benötigt das Calcium zur Adhäsion an das Bakterium. Diese Kultur wurde 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml dieser Kultur und 0,1 ml LB-Medium mit 2,5 mM CaCl₂ gemischt und 5 µl P1-Phagenlysate zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C ohne mechanischen Stress inkubiert. Als Negativkontrolle wurde hierbei immer ein Ansatz mitgeführt, der kein Phagenlysate enthält. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit 5 ml R-Top-Agar (1 % (w/v) Pepton; 0,1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,8 % (w/v) Bacto-Agar; 0,8 % (w/v) NaCl, 2 mM CaCl₂; 0,1 % (w/v) Glukose), temperiert auf 50 °C, versehen und auf je eine 2,5 mM CaCl₂-enthaltende Nähragarplatte verteilt. Die Platten wurden etwa 6 h bei 37 °C inkubiert. War ein lysierter Bakterienrasen auf der Platte erkennbar, wurden 4 ml eiskalter SM-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 0,002 % (w/v) Gelatine) zugegeben und der Top-Agar mit einem sterilen Glasspatel abgeschwemmt. Das Gemisch aus Puffer und Agar wurde in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, dem zur Abtötung der Bakterien anschließend 110 µl Chloroform zugegeben wurden. Nach kräftigem Mischen erfolgte die Inkubation des Ansatzes 30 min bei 37 °C und anschließend 90 min bei RT. Es folgte eine zehninminütige Zentrifugation bei 2990 x g. Der Überstand enthält das gewünschte heterogene P1-Lysate und wurde vorsichtig abgenommen und aliquotiert.

2.6.2 P1-Transduktion

An die Lysatherstellung schloss sich die Infizierung des Zielstammes an. Dazu wurde dieser in 5 ml LB-Medium mit 2,5 mM CaCl₂ über Nacht angezogen. Zu dieser Kultur wurden 5 ml MC-Puffer (10 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 5 mM CaCl₂) gegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 1,5 ml des Kultur-Puffer-Gemisches aliquotiert und diese 10 min bei 8 000 Upm zentrifugiert ((Eppendorf Zentrifuge 5415C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,1 ml LB-Medium mit 0,4 % (w/v) Glukose resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl P1-Phagenlysate und CaCl₂ mit einer Endkonzentration von 100 mM wurde

Material und Methoden

der Ansatz erneut 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 0,5 ml LB-Citrat-Medium (0,5 M Natriumcitrat) abgestoppt. Nach der Zentrifugation (5 min, 13 000 Upm, RT, Eppendorf Zentrifuge 5415C) und Verwerfen des erhaltenen Überstandes wurde das Pellet in 0,1 ml LB-Citrat-Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf selektivem LB-Citrat-Agar (20 mM Natriumcitrat)) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die korrekte Insertion der Mutation wurde anschließend mittels PCR (2.4.3) überprüft.

2.6.3 Entfernen einer Antibiotikum-Resistenzkassette

Um mehrere Mutationen bzw. Konstrukte mittels Phagentransduktion ins *E. coli*-Chromosom zu integrieren war es teilweise erforderlich, das Gen für eine vorhandene Kanamycin-Resistenzkassette zu entfernen. Dies geschah mit dem Plasmid pCP20, welches einen temperatursensitiven *origin of replication* besitzt. Stämme mit diesem Plasmid können daher nur bei 30 °C kultiviert werden. Nach erfolgreicher Elektroporation des Plasmids pCP20 in den Stamm mit der zu eliminierenden Resistenzkassette und anschließender Selektion auf Nähragar mit Ampicillin wie unter 2.5.2 beschrieben, erfolgte eine Vereinzelung der erhaltenen Klone auf Nähragarplatten ohne Antibiotikum. Durch homologe Rekombination der FRT-sites des Plasmids mit dem *kan*-Gen auf dem Chromosom erfolgte bereits das Entfernen des Resistenzgens. Um das Plasmid pCP20 aus den Zellen zu eliminieren, erfolgte eine Inkubation der Nähragarplatte über Nacht bei 42 °C. Um anschließend sicher zu stellen, dass sowohl die Kanamycinresistenz als auch das Plasmid pCP20 nicht mehr im Zielstamm vorhanden sind, wurden die nach dem Hitzeschock erhaltenen Kolonien auf LB, LB mit Kanamycin und LB mit Ampicillin vereinzelt. Positive Klone zeigten nur ein Wachstum auf LB-Agar-Platten. Das Ausschalten der Resistenzkassette sowie der noch vorhandenen ursprünglichen Mutation wurden anschließend mittels Kolonie-PCR (2.4.3) überprüft.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Zellernte, -aufschluss und Fraktionierung

Nachdem die Zellen bis zur gewünschten OD₆₀₀ gewachsen waren, erfolgte die Zellernte bei 4 °C und 2990 x g für 10 min (SORVALL Zentrifuge, Rotor F10S, Thermo Scientific). Nach einem Waschschrift des erhaltenen Zellpellets in 1/100 Vol. 100 mM Tris/HCl pH 7,4 und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 2990 x g (Hettich Zentrifuge, Rotor 1424A) wurde das Zellpellet zum besseren Zellaufschluss für einige Stunden bei -20 °C eingefroren.

Material und Methoden

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet nach dem Auftauen in 3 ml 100 mM Tris/HCl (pH 7,4) pro Gramm Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl 0,2 M PMSF (gelöst in Isopropanol) und 2 µl DNaseI (10 U/µl) pro 1 ml Zellsuspension und eine Inkubation des gesamten Ansatzes für 30 min bei 37 °C. Die Zellen wurden durch Ultraschall (Sonodentyp KE76, Sonoplus Ultraschall-Homogenisator Bandelin, Berlin) bei 20 Watt und einer Beschallung im 0,5 s Takt aufgeschlossen. Ein Zyklus dauerte 4 min und wurde dreimal durchgeführt. Nach jedem Beschallungszyklus erfolgte eine 4 minütige Pause auf Eis.

Für die Sedimentation von unaufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern wurde der Ansatz 45 min bei 4 °C und 19 000 Upm (SORVALL Zentrifuge, Rotor SS34) zentrifugiert. Der Überstand wird fortan als Rohextrakt bezeichnet. War eine weitere Fraktionierung des Rohextrakts in Membranfraktion und lösliche Fraktion notwendig, wurde ein Ultrazentrifugationsschritt bei 4 °C und 130.000 x g (Beckmann LM-60M Ultrazentrifuge, Krefeld) für 90 min durchgeführt. Der Überstand entspricht der löslichen Fraktion und das Zellpellet der Membranfraktion, welche durch resuspendieren in 100 mM Tris/HCl (pH 7,4) erhalten wurde. Wurden die erhaltenen Fraktionen nicht gleich für weitere Experimente eingesetzt, konnten sie bei – 20 °C gelagert werden.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung nach BRADFORD

Für eine Proteinbestimmung nach BRADFORD wurden die lösliche Fraktion 1:100 und die Membranfraktion 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 20 µl der zu untersuchenden Proteinprobe in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 ml BRADFORD-Reagenz (0,007 % (w/v) Serva Blau G-250; 5 % (v/v) Ethanol; 8,5 % Phosphorsäure) versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibriergerade ermittelt.

Proteinbestimmung mittels Nanodrop (Peqlab, Erlangen)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Nanodrop fand nur bei gereinigten Proteinen statt. Durch die Eingabe des spezifischen Molekulargewichts und Extinktionskoeffizienten bestimmt das Gerät die Proteinkonzentration. Dabei wird die Proteinaggregation durch Subtraktion des Werts bei 330 nm berücksichtigt.

2.7.3 Expression und Reinigung mittels Affinitätschromatographie von Proteinen mit 6xHis-tag

Der *E. coli* Überexpressionsstamm BL21(DE3) mit dem entsprechenden Vektor, der das Gen des zu reinigenden Proteins enthält, wurde, wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 angezogen. Die Induktion erfolgte mit 0,1 mM IPTG für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen, wie unter Punkt 2.7.1 erläutert, geerntet, aufgeschlossen und bis zum Rohextrakt fraktioniert. Die Reinigung der His-tag-Fusionsproteine erfolgte durch *immobilized metal ion affinity chromatography* (Krahulec *et al.*, 2008) an Nickel oder Kobalt Sepharose™. Die Säule wurde vor der Verwendung mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 300 mM NaCl) äquilibriert. Der erhaltene Rohextrakt wurde nun auf die Säule, die ein entsprechendes Volumen aufwies (meist 5 ml Säulenvolumen bei 45 ml Rohextrakt), geladen. Es folgte ein Waschschriff mit 10 Vol. Waschpuffer. Die Elution des an die Säule gebundenen Proteins erfolgte schrittweise durch einen Imidazol-Gradienten (5 mM, 10 mM, 30 mM, 300 mM) im Waschpuffer. Die Säule wurde anschließend mit 10 Vol. MES-Puffer (pH 5,0; 200 mM NaCl) und 10 Vol. H₂O_{dest.} gewaschen und anschließend mit 20%igem Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden zur Entfernung des Imidazols im Anschluss mittels PD10 Säule (2.7.4) entsalzt. Dafür wurde die PD10 Säule zuerst mit 25 ml desselben Puffers äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml der Proteinlösung aufgetragen und das Zielprotein mit 3,5 ml Puffer wieder eluiert. Nach dem Waschen der Säule mit 25 ml Puffer, wurde sie mit 20 % (v/v) Ethanol versehen und bei 4 °C gelagert.

2.7.4 Pufferaustausch von Proteinlösungen mittels Dialyse

Lag ein Protein nicht im gewünschten Puffer vor, so wurde mit Hilfe einer Dialyse ein Pufferwechsel vorgenommen. Dabei wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por *molecularporous membrane tubing*, Spectrum Laboratories, Californien), welcher vorher zweimal 10 min in dest. Wasser inkubierte, gegeben und die Enden des Schlauches jeweils mit einer speziellen Dialyseklammer versehen, welche sicherstellten, dass der Schlauch auf beiden Seiten fest verschlossen war. Nun wurde der verschlossene Dialyseschlauch in den vorgekühlten Zielpuffer gegeben und bei 4 °C unter langsamem Rühren inkubiert. Das Puffervolumen betrug dabei ungefähr das 50fache des Volumens der Proteinlösung. Des Weiteren wurde der Puffer mindestens einmal gewechselt. Es wurde stets über Nacht dialysiert.

2.7.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Um eine Proteinlösung zu konzentrieren wurden Vivaspin-Tubes (Vivaspin, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) verwendet. Durch Zentrifugation (2990 x g, 4 °C) werden die Pufferlösung und niedermolekulare Verbindungen durch eine Membran vom Zielprotein getrennt. Die Porengröße dieser Membran (MWCO = *molecular weight cut off*) wurde so gewählt, dass diese 10 kDa kleiner ist als das zu konzentrierende Protein. Die Zentrifugation erfolgte mehrmals hintereinander nur wenige Minuten, da die Lösung zwischenzeitlich resuspendiert werden musste, um eine Sedimentation der Proteinpartikel und ein Verstopfen der Membran zu vermeiden.

2.7.6 Abspaltung des 6xHis-tags mittels TEV-Protease

In einigen Experimenten erwies sich der N-terminal gelegene 6xHis-tag am Protein als störend und wurde daher mit Hilfe der TEV-Protease abgespalten. Die TEV-Protease ist eine Cysteinprotease aus dem *tobacco etch virus* (TEV) und in der Lage durch die Erkennung der spezifischen Aminosäuresequenz ENLYFQ\S zu spalten (Carrington und Dougherty, 1988). Die in dieser Arbeit verwendete TEV-Protease (van den Berg *et al.*, 2006) wurde gereinigt und zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Schöpfel (AG Stubbs, Institut für Biotechnologie, MLU, Halle-Wittenberg). Da die Protease nur unter reduzierenden Bedingungen aktiv ist, erfolgte die Zugabe von 5 mM DTT zum Ansatz, der in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 300 mM NaCl durchgeführt wurde. In der Regel wurden dabei 1 µl der Protease-Stammlösung (2,159 g/l; 64,3 µU) zu 100 µg Protein gegeben. Der TEV-Verdau von GrcA im Rahmen dieser Arbeit erfolgte 7 h bei RT. Anschließend wurde der Ansatz zur Abtrennung des unprozessierten Zielproteins und der TEV-Protease, welche ebenfalls einen 6xHis-tag enthält, über eine Nickel- oder Kobalt-Säule gegeben. Durch den fehlenden His-Tag kommt es nicht mehr zur Komplexierung des Zielproteins mit den Ni²⁺- oder Co²⁺-Ionen der Säule und es ist bereits im Durchfluss zu finden. Ungespaltene Protein sowie die Protease binden zunächst an der Säule und konnten später mit Hilfe der Zugabe von Imidazol wieder eluiert werden.

2.7.7 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Bei der Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*; SEC) wird eine Proteinprobe nach ihrem hydrodynamischen Radius fraktioniert. Durch quervernetztes Dextran oder Agarose werden die Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Diffusionsvolumina aufgetrennt. Kleine Moleküle treten dabei besser in die Gelmatrix ein, was in einer längeren Retentionszeit resultiert.

Material und Methoden

Für die SEC wurde die *HiLoad*TM 16/60 SuperdexTM 200 *prep grade* Säule an einem ÄKTA *purifier*-System (ÄKTA*purifier* 10, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 3 Vol. entgastem und filtriertem Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 200 mM NaCl; 5 mM TCEP) wurde die Proteinprobe (max. 3-4 ml) mittels *Loop* auf die Säule geladen und eine Flussrate von 0,7 ml min⁻¹ eingestellt. Die entstandenen Peaks wurden fraktioniert gesammelt.

Die Größenausschluss-Chromatographie des GrcA Proteins mittels *HiLoad*TM SuperdexTM 75 Säule (GE Healthcare, München), ebenfalls mit oben aufgeführtem Puffer, wurde von Dr. Michael Schöpfel (AG Stubbs; MLU, Halle-Wittenberg) durchgeführt. Dafür wurde auch ein ÄKTA*purifier*-System mit einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ verwendet.

2.7.8 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden dazu vorher mit 0,5 Vol. 2 x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 % (v/v) Glycerol; 5 % (v/v) Mercaptoethanol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (w/v) SDS) versehen und 10 min bei 95 °C denaturiert. Das anionische Detergenz SDS bindet dabei an denaturierte Proteine, neutralisiert deren Eigenladung und verleiht eine konstant negative Ladungsverteilung. Das im Probenpuffer vorhandene Mercaptoethanol reduziert eventuell vorhandene Disulfidbrücken. Wurden Membranproteine oder Membranfraktionen auf eine SDS-PAGE geladen, wurden diese zuvor mit 0,2 Vol. 5 x Membranprobenpuffer (160 mM Tris/HCl (pH 6,8); 25 % (v/v) Glycerol; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 25 mM DTT; 5 % (w/v) SDS) versehen und 1 h bei RT inkubiert. Für die SDS-PAGE wurden vertikale Minigel-Apparaturen (Biometra, Göttingen) verwendet. Die Zusammensetzung eines SDS-PA-Gels ist in der folgenden Tabelle 2-6 zu finden, wobei die Konzentration des Acrylamids abhängig von der Molekularmasse des zu analysierenden Proteins gewählt wurde.

Tabelle 2-6: Übersicht der Zusammensetzung von je einem Trenn- und Sammelgel

Bestandteil	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	5 %
Rotiphorese Gel 30	2 ml	2,5 ml	0,33 ml
1,5 M Tris/HCl; pH 8,0	1,2 ml	1,2 ml	-
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	-	-	0,4 ml
0,5 % SDS (w/v)	1,2 ml	1,2 ml	0,4 ml
H ₂ O _{dest.}	1,6 ml	1,1 ml	0,87 ml
TEMED	5 µl	5 µl	2 µl
10 % APS (w/v)	30 µl	30 µl	10 µl

Das SDS-PA-Gel wurde mit den Proteinproben entsprechend beladen. Als Elektrophoresepuffer diente dabei 2,5 mM Tris, 20 mM Glycin mit 0,1 % (w/v) SDS. Die Auftrennung des Sammelgels erfolgte bei einer Stromstärke von 12 mA pro Gel und die des Trenngels bei 25 mA pro Gel. Als Größenstandard wurde ein Molekularmassenmarker (*PageRuler Prestained* oder *PageRuler Unstained*, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt.

2.7.9 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten anschließend mittels Coomassie-Färbelösung (0,2 % Serva Blau R250 (w/v); 0,05 % (w/v) Serva Blau G250; 5 % (v/v) Methanol; 42,5 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) sichtbar gemacht werden. Nach Entfernen der Färbelösung und kurzem Schwenken in H₂O_{dest.} wurde das Gel bis zum gewünschten Färbegrad der Proteinbanden in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure; 45 % (v/v) Ethanol; 45 % H₂O_{dest.}) inkubiert.

2.7.10 Western-Blot-Analyse

Mittels Western-Blot-Analyse (Towbin *et al.*, 1979) werden Proteine auf eine Membran übertragen und können anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

2.7.10.1 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels *Semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Machery&Nagel, Düren) transferiert. Dafür wurden sechs Lagen *Whatman*-Papier sowie eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. *Whatman*-Papier, Membran und SDS-PA-Gel wurden für 10 min in

Material und Methoden

Towbin-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Anschließend wurde die Fastblot-Apparatur (Biometra, Göttingen) von der Anode aus folgendermaßen luftblasenfrei aufgebaut: drei Lagen *Whatman*-Papier – Nitrocellulose-Membran – SDS-PA-Gel – drei Lagen *Whatman*-Papier. Der Transfer der Proteine erfolgte für 90 min und 1,2 mA pro cm² Membran.

2.7.10.2 Proteindetektion mittels ECL-Reaktion (*enhanced chemiluminescence*)

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese für 1 h oder über Nacht in *Blocking*-Puffer inkubiert. Dazu wurde 1 x PBS Puffer (4 mM KH₂PO₄; 16 mM Na₂HPO₄; 115 mM NaCl) mit 7 % (w/v) Magermilchpulver versetzt. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation bei 4 °C über Nacht mit dem primären Antikörper, der ebenfalls in 1 x PBS mit 0,5 % (w/v) BSA vorlag. Die Membran wurde erneut 3 x 15 min gewaschen um nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen, bevor sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anschloss. Die folgende Tabelle 2-7 zeigt eine Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Tabelle 2-7: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Typ	Antigen	Referenz
Anti-His	1:5000	IgG (Mausserum)	Tetra-/Penta- Histidin	Quiagen, Hilden
Anti-PflB	1:3000	IgG (Kaninchenserum)	TdcE (<i>E. coli</i>)	Hesslinger <i>et al.</i> , 1998a
<i>goat</i> -anti- <i>mouse</i> -HRP Konjugat	1:5000	IgG (Ziegenserum)	IgG (Maus)	Merck, Darmstadt
<i>goat</i> -anti- <i>rabbit</i> -HRP Konjugat	1:5000	IgG (Ziegenserum)	IgG (Kaninchen)	Bio-Rad, München

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper schloss sich wieder ein Waschschrift für 3 x 15 min in 1 x PBS Puffer an. Da der sekundäre Antikörper, welcher spezifisch an den Primären bindet, mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, war ein Nachweis in Form eines lichtemittierenden Produkts mit Hilfe von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid möglich. Dafür wurden Lösung A (100 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2,5 mM Luminol; 0,4 mM ρ -Cumarsäure) und Lösung B (100 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,018 % (v/v) H₂O₂) zu gleichen Teilen miteinander im Dunkeln vermischt und die Membran etwa 1 min

Material und Methoden

darin geschwenkt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostik, Mannheim) wurde, abhängig vom erwarteten Signal, exponiert. Der Film wurde durch Schwenken in Entwicklerlösung (Calbe Fotochemie, Calbe), Spülen mit Wasser und Schwenken in Fixierlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) entwickelt.

2.7.10.3 Antikörper-Stripping der Nitrocellulose-Membran

Sollte eine erneute Detektion mit einem weiteren primären Antikörper auf der Membran erfolgen, musste diese zunächst kurz in 1 x PBS geschwenkt und anschließend 2 x 10 min in *Mild-stripping*-Puffer (1,5 % (w/v) Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) Tween20 (pH 2,2)) inkubiert werden um die bereits gebundenen primären und sekundären Antikörper zu entfernen. Um sicher zu stellen, ob die gesamten Antikörper eliminiert wurden, wurde eine „Blinddetektion“ durchgeführt. Wurde dabei kein Signal mehr detektiert, wurde die Membran erneut, wie unter 2.7.7.2 beschrieben, behandelt.

2.8 Enzymologische Methoden

2.8.1 Messung der β -Galaktosidase Aktivität

Mit Hilfe eines durch Formiat induzierbaren *fdhF*::*lacZ*-Konstruktes, welches mit Hilfe des λ -Phagen ins *E. coli* Chromosom integriert wurde, kann durch Messung der β -Galaktosidase Aktivität indirekt eine Aussage über die Formiat-Konzentration in der Zelle getroffen werden. Dafür wurden die Zellen, wie unter 2.3.3 beschrieben, in TGYEP Medium mit und ohne Zugabe von Formiat angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 wurden 100 μ l der Kultur für den Enzymassay entnommen und in eine 96well-Platte gegeben. Für den Zellaufschluss erfolgte die Zugabe von 20 μ l Puffer-Z (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β -Mercaptoethanol) und 40 μ l Chloroform. Es schloss sich eine Inkubationszeit für 10 min an. Zum Start der Enzymreaktion wurden 20 μ l ONPG-Lösung (4 mg/ml gelöst in Puffer-Z) zum Ansatz gegeben. Mit Hilfe des *Tecan Sunrise Plattenreaders* (Männedorf, Schweiz) wurde nun die Absorption bei 420 nm in jedem *well* gleichmäßig über einen definierten Zeitraum gemessen. Aus den erhaltenen Werten konnte schließlich der Anstieg (Zunahme der Absorption in Abhängigkeit der Zeit) berechnet werden. Mit folgender Formel konnte die β -Galaktosidase-Aktivität schließlich berechnet werden.

Gleichung 2:

$$\beta\text{-Galaktosidase Aktivität (Units)} = \frac{\text{Anstieg}}{v * \text{OD}_{600}}$$

v = eingesetztes Kulturvolumen
OD₆₀₀ = optische Dichte der Zellkultur unmittelbar vor der Ernte

2.8.2 Bestimmung der Gasproduktion

2.8.2.1 Untersuchung der Gasbildung mittels Durham-Röhrchen

Für die Untersuchung auf Gasbildung mittels Durham-Röhrchen wurden große Kulturröhrchen mit 10 ml LB- bzw. TYEP-Medium (mit unterschiedlichen pH-Werten) befüllt. Das Durham-Röhrchen wurde mit der Öffnung nach unten in das Kulturröhrchen gegeben und durch Schwenken luftblasenfrei gemacht. Nach dem Autoklavieren wurde jedem Röhrchen 0,4 % (w/v) Glukose sowie entsprechende Antibiotika zugegeben. Um die Formiataufnahme zu untersuchen wurde diversen Kulturröhrchen unterschiedliche Konzentration an Formiat zugesetzt. Jedes Röhrchen wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und für, wenn nicht anders angegeben, 48 h bei 37 °C inkubiert. Eventuell gebildetes Gas steigt nun nach oben, kann aber durch das Durham-Röhrchen nicht entweichen und sammelt sich so dort an. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgte in der Regel photographisch. Zusätzlich wurden die OD₆₀₀ und der pH-Wert nach 48 h bestimmt.

2.8.2.2 Quantitative Wasserstoffmessung am Gaschromatographen

Durch Messung am Gaschromatographen (Shimadzu Europe GmbH) kann die Konzentration an gebildetem Wasserstoff quantitativ bestimmt werden, da es möglich ist Probengemische aufzutrennen und den Gehalt jeder Komponente zu bestimmen. Dabei verdampft die injizierte Probe und wird mit Hilfe eines Trägergases (Stickstoff) über eine Trennsäule transportiert. Die Auftrennung der einzelnen Komponenten erfolgt dabei durch die unterschiedlichen Retentionszeiten. Mit Hilfe eines Detektors werden die Komponenten, welche die Säule verlassen, erkannt, als Signal weitergeleitet und mit der Chromatographie Software *GC solution* sichtbar gemacht.

Zunächst wurde eine Kalibriergerade erstellt, indem unterschiedliche Volumina und unterschiedliche Konzentrationen an Wasserstoff injiziert wurden. Um die gewünschten *E. coli*-Stämme auf ihre Wasserstoffproduktion hin zu untersuchen, wurden diese in 50 ml Greiner-Röhrchen anaerob kultiviert. Dazu waren die Greiner randvoll mit LB- oder TGYEP-Medium gefüllt. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 wurden die Kulturen durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 2990 x g geerntet. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) mit 20 % (v/v) Glycerin entsprechend der zuvor bestimmten OD₆₀₀ resuspendiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass für die Messung in jedem Ansatz dieselbe Zellzahl eingesetzt wurde.

Material und Methoden

VIVASPIN 20 Zentrifugationsröhrchen konzentriert. Die Messung wurde in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm bei 20 °C, einer Scangeschwindigkeit von 1 nm s⁻¹ und einer Glättung von 1 s fünfzigfach akkumuliert und pufferkorrigiert in einem Spektrophotometer (J-810, Jasco, Gross-Umstadt) durchgeführt. Die gemessene Elliptizität wurde anhand der Gleichung 4 in die molare Elliptizität umgerechnet.

$$\text{Gleichung 4: } [\Theta] = \frac{\Theta \times M}{c \times d \times 10}$$

- [Θ] molare Elliptizität in deg cm² dmol⁻¹
 Θ gemessene Elliptizität
M Molekularmasse in Dalton
c Proteinkonzentration in mg/ml
d Schichtdicke der Küvette in cm

2.9.3 Kristallisation und Röntgenkristallstrukturanalyse

Mittels Röntgenstrukturanalyse ist es möglich, den atomaren Aufbau von Proteinen und Proteinkomplexen durch Beugung von Röntgenstrahlung am Kristallgitter zu erhalten. Dabei wird die Proteinstruktur eines Kristalls mit Hilfe des erhaltenen Beugungsmusters und der daraus berechneten Elektronendichte wiedergegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Kooperation mit der AG Stubbs (Institut für Biotechnologie, MLU, Halle-Wittenberg) die Kristallstruktur von GrcA aufgeklärt werden. Das Gen *grcA* lag im Vektor pET15b-TEV (Eckhard *et al.*, 2008) vor, welcher von Dr. P. Kolenko (AG Stubbs, Institut für Biotechnologie, MLU, Halle-Wittenberg) konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Nach erfolgreicher Anreicherung von GrcA mittels Affinitätschromatographie (2.7.3) wurde zunächst der N-terminale 6xHis-tag durch einen TEV-Verdau (2.7.6) für 7 h bei RT abgespalten. Das Protein wurde anschließend mittels Zentrifugalkonzentrator konzentriert (2.7.5) und auf eine *HiLoad*TM SuperdexTM 75 Säule (GE Healthcare, München) geladen (2.7.7). Dabei separierten zwei Peaks (Abbildung 3.20), wobei mit dem zweiten Peak weitergearbeitet wurde. Nach einem zweifachen Dialyseschritt gegen den Kristallisationspuffer (20 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 5 mM TCEP) wurde die Probe erneut auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml und 30 mg/ml gebracht. Alle bisherigen Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Material und Methoden

Bei der angewendeten *Sitting-drop*-Methode wurden 200 nl Proteinlösung mit einem Pipettierroboter (Cartesian Microsys, Zinsser-Analytik, Frankfurt/Main) mit 200 nl Reservoirlösung verschiedener Kristallisations-Kits (siehe Anhang A1) gemischt und die Ansätze anschließend bei 16 °C inkubiert (*vapor diffusion*). Die Röntgenmessungen und Datensammlung der Proteinkristalle sowie die Lösung des Phasenproblems und der Struktur als auch deren manuelle Anpassung und Verfeinerung wurden von Dr. Michael Schöpfel, wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt. Die Analyse des Streuverhaltens der Proteinkristalle fand am hauseigenen Drehanoden-Röntgengenerator (MicroMax007, Rigaku/MSK, Tokio, Japan) mit einer maximalen Leistung von 0,8 kW (40 kV, 20 mA) statt, wobei eine monochromatische Cu-K_α-Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von 1,5418 Å erzeugt wurde. Die Detektion der Streuung erfolgte durch einen Saturn 944+ Detektor (CCD++, Rigaku/MSK, Tokio, Japan). Für hoch aufgelöste Datensätze wurden die Kristalle mit freundlicher Unterstützung von Dr. Mikio Tanabe (ZIK HALOmem, Halle) am *Swiss Light Source* (SLS, Paul Scherer Institut, Villingen, Schweiz) an der *beamline* X06DA bei einer Wellenlänge von 1 Å gemessen. Die Identifizierung und Integration der erhaltenen Intensitäten wurde mit *XDS* (Kabsch, 1993; Kabsch, 2010a; Kabsch, 2010b) durchgeführt. Die Skalierung erfolgte mit dem Programm *Scala* (Evans, 2006). Die Lösung des Phasenproblems geschah durch die *Iod-single-anomalous-diffraction* (SAD)-Methode (Dauter *et al.*, 2000). Dafür wurden 200 nl einer 1 M KI-Lösung zum Kristallisationstropfen pipettiert und für 45 s diffundieren lassen, bevor der Kristall bei 100 K eingefroren wurde. Die Analyse erfolgte erneut am hauseigenen Drehanoden-Röntgengenerator mit den bereits oben beschriebenen Angaben. Um die Bindestellen des Iods zu identifizieren, wurde das Programm *PHENIXautosol* (Adams *et al.*, 2010) verwendet. Die initiale Struktur wurde anschließend mit dem Programm *PHENIXautobuild* erstellt und eine Verfeinerung mit *PHENIXrefine* durchgeführt.

2.10 Geräte und Chemikalien

Im vorangegangenen Methodenteil wurden bereits Angaben zu Geräten und Chemikalien gemacht. Darüber hinaus wurden folgende Geräte verwendet:

PCR-Maschine	Thermocycler 300 (Biometra, Göttingen)
Gelkammer	Peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen)
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5415C (1,5/2 ml Reaktionsgefäße) (Eppendorf, Wessling-Berzdorf) Hettich Universal 30 RF Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen (50 ml Greiner-Röhrchen) Sorvall RC6 Plus (SS34-Röhrchen)
Laborwippe	Rocking-Plattform (Biometra Göttingen)
Magnetrührer	Magnetmix 2070 (Roth, Karlsruhe)
Waagen	ER-182A bzw. FX-200 Electronic Balance (Tokyo, Japan)
DNA-Messung	Nano-Drop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen)
Vortexer	IKA Labortechnik
Thermoblock	ThermoShaker (Biometra, Göttingen)

Chemikalien wurden von folgenden Firmen verwendet:

Amersham Bioscience Europe	(Freiburg)
Fluka	(Buchs, CH)
Invitrogen	(Karlsruhe)

Material und Methoden

Merck	(Darmstadt)
Riedel de Haen/Sigma-Aldrich	(Seelze)
Roche Diagnostics	(Mannheim)
Roth	(Karlsruhe)
SERVA	(Heidelberg)
Sigma-Aldrich	(Steinheim)

3 Ergebnisse

Das während der Glykolyse entstandene Pyruvat kann in Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren auf verschiedenen Wegen abgebaut werden. Einer dieser Wege, welcher die Umwandlung von Pyruvat zu Formiat und die Spaltung dessen zu Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid beinhaltet, stellt die zentrale Thematik der vorliegenden Arbeit dar. Dabei gliedern sich die im Folgenden dargestellten Ergebnisse in drei Teile. Zuerst werden mit Hilfe verschiedener enzymatischer Assays Betrachtungen zum intrazellulären Pyruvat- und Formiat-Stoffwechsel gemacht. Anschließend werden Überlegungen zur Anwesenheit von mindestens einem weiteren Formiat-Transportsystem und Untersuchungen dazu dargestellt. Im dritten Teil geht es um das Glycylradikal Coenzym A (GrcA), welches als möglicher „Rettungsanker“ für die Pyruvat-Formiat-Lyase (PflB) bei Sauerstoffstress dienen soll (Wagner *et al.*, 2001). Dabei stehen Versuche zur Strukturaufklärung von GrcA und die Interaktion mit PflB im Mittelpunkt.

3.1 Untersuchungen zum anaeroben Pyruvatstoffwechsel in *E. coli*

Als erstes sollte betrachtet werden, wie sich Mutationen bei Schlüsselenzymen der gemischten Säuregärung, wie PflB und AdhE, auf das Zellwachstum und die Bildung der Stoffwechselendprodukte Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid auswirken. Für diese Untersuchungen standen verschiedene Mutanten zur Verfügung. Zum Nachweis von PflB wurde eine Immunoblot-Detektion mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit Mutationen in Genen, welche für Enzyme des Formiat-Stoffwechsels kodieren, nach anaerober Kultivierung in LB-Medium, durchgeführt. Hier sollte erst einmal die An- bzw. Abwesenheit des Enzyms PflB in den unterschiedlichen Mutanten nachgewiesen werden um in weiteren Experimenten sicher zu stellen, dass die verschiedenen Stämme in der Lage sein könnten Formiat in Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren aus Pyruvat zu metabolisieren. Dieser Nachweis erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit dem PflB-Antikörper. Der FocA⁻-Stamm REK701 unterscheidet sich von den *focA*-Deletionsstämmen durch die Einführung zweier benachbarter Stopp-Codone an den Positionen 114 und 115, so dass kein funktionsfähiges FocA-Protein mehr synthetisiert werden kann. Die Stämme RM223 ($\Delta pflB \Delta pflA \Delta tdcE$) und RM226 ($\Delta focA \Delta pflB \Delta tdcE$) sind im Gegensatz zu den Stämmen RM220 ($\Delta pflB \Delta pflA$) und RM201 ($\Delta focA \Delta pflB$) zusätzlich im *tdcE*-Gen deletiert. Da die Expression des Gens *tdcE*, welches für die 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase kodiert und eine ähnliche Größe wie PflB hat, der Katabolitrepression unterliegt (Hesslinger *et al.*, 1998b), sollte TdcE bei den gegebenen Kultivierungsbedingungen nicht synthetisiert worden sein.

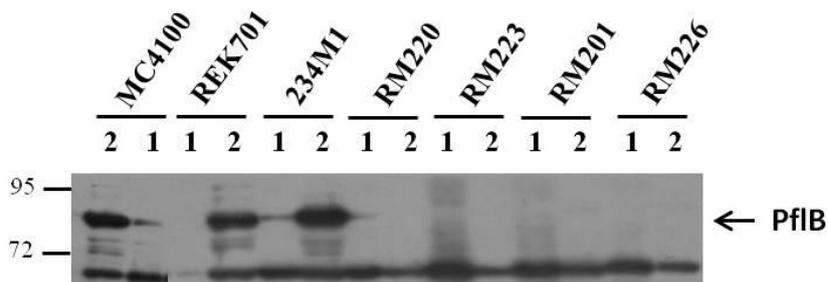


Abbildung 3.1: Nachweis von PflB in verschiedenen *E. coli*-Mutanten. Dargestellt ist eine Immunoblot-Detektion von PflB im Wildtyp und verschiedenen Mutanten. Der Nachweis erfolgte mittels PflB-Antikörper. Der Größenstandard ist links dargestellt. 1 - Membranfraktion; 2 - lösliche Fraktion der verschiedenen Stämme nach anaerober Kultivierung in LB-Medium. Es wurden 6,1 µg Protein aufgetragen (bei Stamm MC4100 nur 5 µg). MC4100 - Wildtyp; REK701 - *FocA*⁻; 234M1 - $\Delta pflA$; RM220 - $\Delta pflB \Delta pflA$; RM223 - $\Delta pflB \Delta pflA \Delta tdcE$; RM201 - $\Delta focA \Delta pflB$; RM226 - $\Delta focA \Delta pflB \Delta tdcE$

Im Wildtypstamm MC4100 sowie den Stämmen REK701 (*FocA*⁻) sowie 234M1 ($\Delta pflA$) war eine Bande in Höhe von ca. 85 kDa detektierbar, die dem Enzym PflB entspricht. Bei allen weiteren Stämmen, die alle eine Deletion im *pflB*-Gen bzw. eine zusätzliche Deletion im *tdcE*-Gen besitzen, konnte diese Bande, wie erwartet, nicht detektiert werden. Da TdcE jedoch unter fermentativen Bedingungen und in Abwesenheit von PflB dessen Funktion zum Teil übernehmen kann (Sawers *et al.*, 1998), hätte im Fall der Stämme DH220 und DH201 eine Bande in Höhe von 85 kDa detektiert werden können. Der PflB-Antikörper kreuzreagiert nämlich aufgrund der Sequenzähnlichkeit von PflB und TdcE und kann damit auch TdcE detektieren. Da dies jedoch nicht der Fall war, kann man nicht sicher sein, ob TdcE nicht synthetisiert worden ist oder die aufgetragene Proteinmenge für den Nachweis zu gering war.

3.1.1 Der Einfluss von Mutationen auf den Formiat-Stoffwechsel

Um nun Rückschlüsse auf die intrazelluläre Metabolisierung von Formiat ziehen zu können, sollte als nächstes die Gasproduktion verschiedener *E. coli*-Stämme in Vollmedium nach anaerobem Wachstum bei 37 °C für 48 h untersucht werden. Die bei der Spaltung von Formiat anfallenden Gase Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid können mit Hilfe von Durham-Röhrchen aufgefangen werden. Aufgrund der hohen Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid in Wasser sammelt sich hauptsächlich Wasserstoff in den Durham-Röhrchen an. Die angesammelte Gasmenge lässt Rückschlüsse auf die Aktivität des FHL-Komplexes zu, der unter den gegebenen Bedingungen als einziger Enzymkomplex in der Lage sein sollte, Formiat zu spalten. So ist es möglich eine indirekte Aussage über die Menge an Formiat in der Zelle zu treffen. Dieser Test kann dabei jedoch nur als Annäherung betrachtet werden, da

Ergebnisse

unterschiedliche Wachstumseigenschaften der einzelnen Mutanten in unterschiedlichen optischen Dichten nach 48 h Inkubation bei 37 °C resultierten, die gebildete Gasmenge jedoch abhängig von der Zellzahl ist.

A

Stamm	Wildtyp	FocA ⁻	$\Delta pflA \Delta pflB$	$\Delta focA \Delta pflB$
Gasproduktion				
ohne Formiat	+++	++	-	-
mit 20 mM Formiat	+++++	++++	+	++
Stamm	$\Delta pflA$	Δpta	$\Delta pflB$	$\Delta adhE$
Gasproduktion				
ohne Formiat	-	-	-	-
mit 20 mM Formiat	+	+	+	+

B

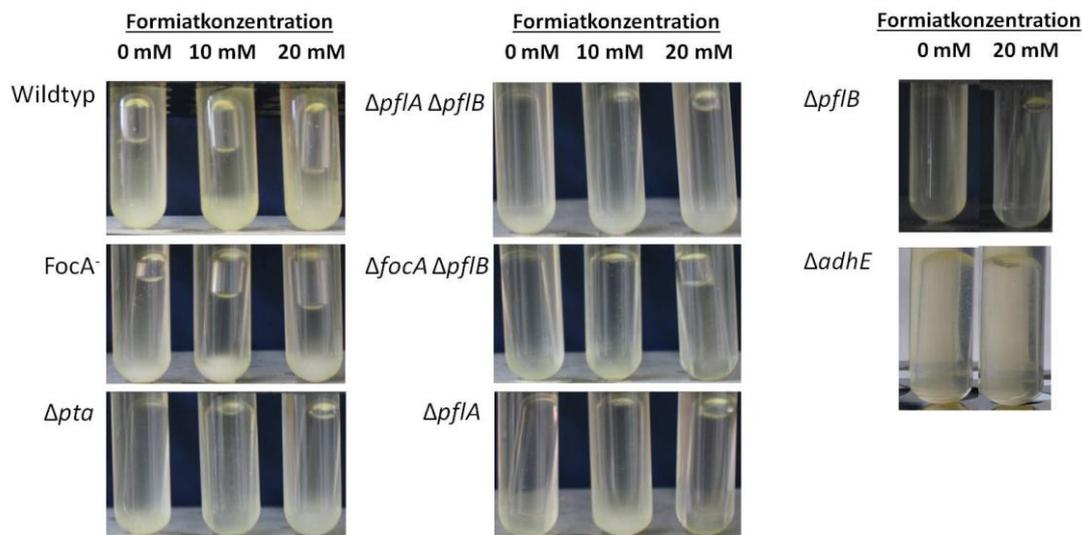


Abbildung 3.2: Untersuchung zur Gasproduktion verschiedener *E. coli* Stämme mit Mutationen im Stoffwechsel. Anzucht in 10 ml LB-Medium mit 0,8 % Glukose und verschiedenen Formiat-Konzentrationen. Alle Röhrchen wurden entsprechend mit einer Einzelkolonie beimpft und der Versuch als Dreifachbestimmung mehrere Male durchgeführt. (A) Die Tabelle zeigt durch die Anzahl der angegebenen + die Abstufung der gebildeten Gasmenge. Fehlende Gasbildung ist durch einen Strich gekennzeichnet. (B) Abbildung der Kulturröhrchen mit Durham-Röhrchen zur Visualisierung der Gasproduktion.

Bei allen in Abbildung 3.2 verwendeten Stämmen ließ sich eine Zunahme der Gasproduktion mit zunehmender Formiat-Konzentration im Medium erkennen. Dies deutet daraufhin, dass Formiat aus dem Medium in die Zelle gelangen musste. Ein Teil des Formiats ($pK_a=3,75$) gelangte wahrscheinlich durch Diffusion in die Zelle, da sich der pH-Wert des ungepufferten LB-Mediums aufgrund der Säurebildung während der Gärung auf etwa 4,8 absenkte. Damit

Ergebnisse

liegen fast 10 % des zuvor zugegebenen Formiat im Medium protoniert vor und kann in die Zelle diffundieren. Der weitaus größere Formiat-Anteil liegt im dissoziierten Zustand vor und kann so nur durch ein Transportsystem über die Cytoplasmamembran in die Zelle transportiert werden. Die zunehmende Gasproduktion bei ansteigender Formiat-Konzentration im Fall der FocA⁻ und der $\Delta focA \Delta pflB$ -Mutante zeigte, dass trotz des Fehlens von FocA noch Formiat in die Zelle gelangt sein musste. Dies konnte nicht allein auf den Effekt der Diffusion zurückgeführt werden und lässt auf die Anwesenheit eines weiteren Formiat-Transportsystems schließen. Es ist auch deutlich zu erkennen, dass Stämme ohne PflB bzw. ohne aktives PflB, aufgrund der *pflA*-Deletion, wie erwartet keine Gasbildung in Abwesenheit von Formiat aufwiesen. Interessant ist hierbei jedoch, dass der $\Delta pflA \Delta pflB$ -Stamm, trotz funktionsfähigem FocA, keine verstärkte Gasproduktion in Abwesenheit von zugegebenem Formiat zeigte im Gegensatz zum $\Delta focA \Delta pflB$ -Stamm, der bereits im *focA*-Gen deletiert ist. Auch eine *pflB*-Einzelmutante zeigte in Abwesenheit von 20 mM Formiat im Medium nur eine sehr geringe Gasproduktion, verglichen mit der Zunahme der Gasproduktion vom Wildtyp. Dies lässt schlussfolgern, dass FocA als Formiat-Transporter nur unter bestimmten Bedingungen aktiv zu sein scheint und diese vermutlich im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von PflB stehen.

In diesem Experiment wurden außerdem Stämme analysiert, die eine Mutation im Gen der Alkohol-Dehydrogenase (*AdhE*) sowie der Phosphat-Acetyltransferase (*Pta*) trugen. Beide Enzyme sind jeweils Teil eines Abbauweges des Acetyl-CoAs in der gemischten Säuregärung, welcher theoretisch nicht direkt an Bildung und Abbau von Formiat beteiligt zu sein scheint. Erstaunlicherweise zeigten jedoch sowohl die *pta*- als auch die *adhE*-Mutante keine Gasproduktion in Abwesenheit von Formiat im Medium, trotz theoretischer Anwesenheit einer aktiven Pyruvat-Formiat-Lyase. Auch die Zugabe von Formiat zum Medium resultierte trotz des Vorhandenseins von FocA in beiden Mutanten nur in einer minimalen Gasproduktion. Scheinbar beeinflussen die Deletionen von *pta* als auch *adhE* die Aktivität von PflB, was wiederum im Zusammenhang mit einem reduzierten Import von Formiat durch FocA stehen könnte.

3.1.2 Quantifizierung der Wasserstoffproduktion einer *adhE*-Mutante während der gemischten Säuregärung

Erstaunlicherweise zeigte die *adhE*-Mutante im vorangegangenen Experiment keine Gasbildung bzw. in Anwesenheit von Formiat nur minimale Gasbildung. Bereits Dr. Constanze Pinske konnte während ihrer Forschungsarbeiten in der AG Sawers (MLU, Halle-Wittenberg) beobachten, dass Formiat in einer *adhE*-Mutante in die Zelle gelangte. Jedoch konnte sie ebenfalls zeigen, dass die Hyd 3 in einer solchen Mutante in Anwesenheit von Formiat nicht synthetisiert wird und dieses somit nicht abgebaut werden kann. Wird dem Medium nun Fumarat als externer Elektronenakzeptor zugegeben, kommt es zur Synthese der Hyd 3 (persönliche Mitteilung Dr. Constanze Pinske und Prof. Gary Sawers). Daraus ergab sich erneut die Frage, in welchem Zusammenhang eine *adhE*-Mutation mit der Aktivität von PflB bzw. der Synthese des FHL-Komplexes steht. Um nun die genaue Menge an gebildetem Wasserstoff in einer *adhE*-Mutante zu ermitteln, wurde in einem nächsten Experiment die Gasphase über einem anaerob kultivierten Stamm quantitativ am Gaschromatographen untersucht. Dabei wurde, wenn nicht anders angegeben, wie unter 2.8.2.2 beschrieben, vorgegangen. Es stand für das Experiment eine *adhE*-Mutante zur Verfügung, Stamm IL746, bei der das *adhE*-Gen vollständig deletiert und durch eine Chloramphenicol-Kassette ersetzt wurde.

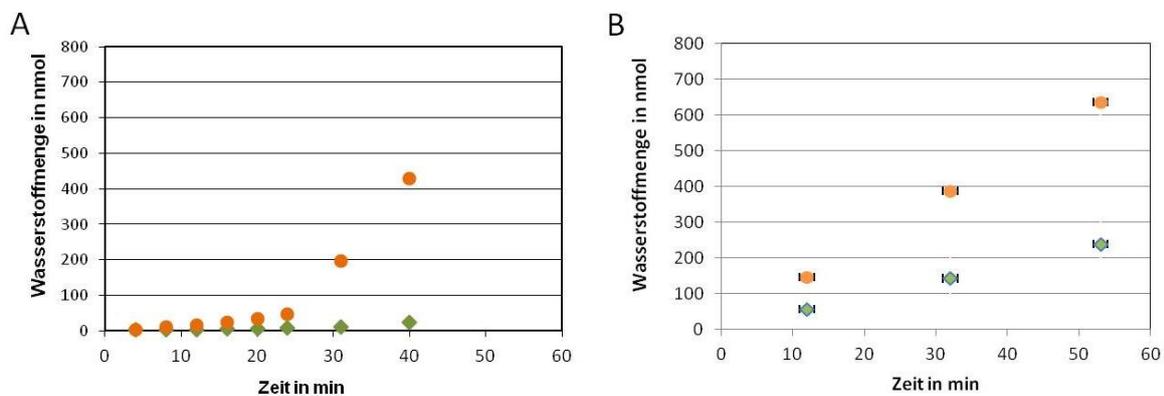


Abbildung 3.3: Quantitative Bestimmung der Wasserstoffkonzentration am Gaschromatographen. (A) *adhE*-Mutante Stamm IL746 nach anaerober Anzucht in LB Medium (B) Gebildete Wasserstoffmenge des Wildtyps DH4100 nach anaerober Kultivierung in TGYEP (pH 6,5; 0,4 % Glukose). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Wasserstoffkonzentration der *adhE*-Mutante und des Wildtyps, nach anaerober Anzucht ohne Formiat (◆) und mit 20 mM Formiat (●), am Gaschromatographen bestimmt. (Wasserstoffmessung am Gaschromatographen durchgeführt, wie in 2.8.2.2 beschrieben).

Ergebnisse

In der Abbildung 3.3 ist die Menge an gebildetem Wasserstoff einer *adhE*-Mutante und des Wildtyps nach Messung am Gaschromatographen bei unterschiedlichen Bedingungen dargestellt. Die Diagramme A und B zeigen dabei die Menge an gebildetem Wasserstoff in Abhängigkeit von der Zeit. Die *adhE*-Mutante IL746 wies nach anaerober Kultivierung ohne Formiat nach 20 min keine Gasproduktion auf und nach 40 min eine sehr geringe Menge an Wasserstoff. Wurde Formiat dem Kultivierungsmedium zugegeben, konnte nach etwa 20 min eine Wasserstoffkonzentration von etwa 30 nmol detektiert werden, die im weiteren Verlauf anstieg. Beim Wildtypstamm DH4100 konnte von Beginn an Wasserstoff nachgewiesen werden. Die gebildete Menge stieg mit der Zeit an und erreichte ohne Zugabe von Formiat nach 52 min eine Menge von etwa 240 nmol. Wurde dem Kultivierungsmedium Formiat zugegeben, konnten nach 52 min sogar etwa 630 nmol Wasserstoff detektiert werden. Dies zeigt, dass der Wildtyp Formiat aus dem Medium aufgenommen haben muss. Die *adhE*-Mutante IL746 zeigte trotz vorhandenem PflB keine Wasserstoffproduktion. Auch in Anwesenheit von Formiat konnte trotz des Vorhandenseins von FocA im Vergleich zum Wildtyp scheinbar nur eine geringe Menge an Formiat in die Zelle aufgenommen werden. Dies bedeutet, dass auch die Formiat-Aufnahme durch eine *adhE*-Deletion beeinflusst ist. Durch dieses Experiment konnte erneut gezeigt werden, dass eine *adhE*-Deletion Auswirkungen auf den Formiat-Stoffwechsel in *E. coli* hat.

3.1.3 Bestimmung der Änderung der internen Formiat-Konzentration mit Hilfe eines *lacZ*-basierten Reportersystems

Eine weitere Möglichkeit eine Aussage über die Änderung der internen Formiat-Konzentration in verschiedenen *E. coli*-Stämmen zu treffen, ist die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität eines durch Formiat induzierten *lacZ*-Konstruktes. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Konstrukt handelt es sich um eine Fusion des *fdhF*-Promotors mit dem *lacZ*-Gen, als *fdhF'*-*lacZ*-Konstrukt bezeichnet, was mit Hilfe des λ -Phagen ins Genom integriert wurde (Diplomarbeit Beyer, 2009). Alle Stämme, welche dieses *fdhF'*-*lacZ*-Konstrukt im Genom tragen, werden fortan vor ihren ursprünglichen Stammnamen mit DH bezeichnet. Der Promotor des *fdhF*-Gens, welches für die Formiatdehydrogenase H kodiert, wird durch das in der Zelle vorhandene Formiat induziert (Rossmann *et al.*, 1994). Dabei fungiert Formiat als Effektor und bindet an den Transkriptionsaktivator FhIA, welcher spezifisch *cis*-regulatorische Sequenzen des 5'-flankierenden Bereichs des *fdhF*-Gens bindet (Schlensog und Böck, 1990). Durch das im verwendeten Konstrukt sich anschließende *lacZ*-Gen kann nun mit Hilfe der Messung der β -Galaktosidase-Aktivität eine Aussage über die

Ergebnisse

Transkription des Gens und somit indirekt über die Formiat-Konzentration in der Zelle getroffen werden. Die bisher verwendeten Stämme wurden nun mit Hilfe dieses *lacZ*-basierten Reportersystems hinsichtlich der Änderung der intrazellulären Formiat-Konzentration untersucht, um Hinweise auf die Zusammenhänge von Formiat-Bildung und -Transport zu erhalten

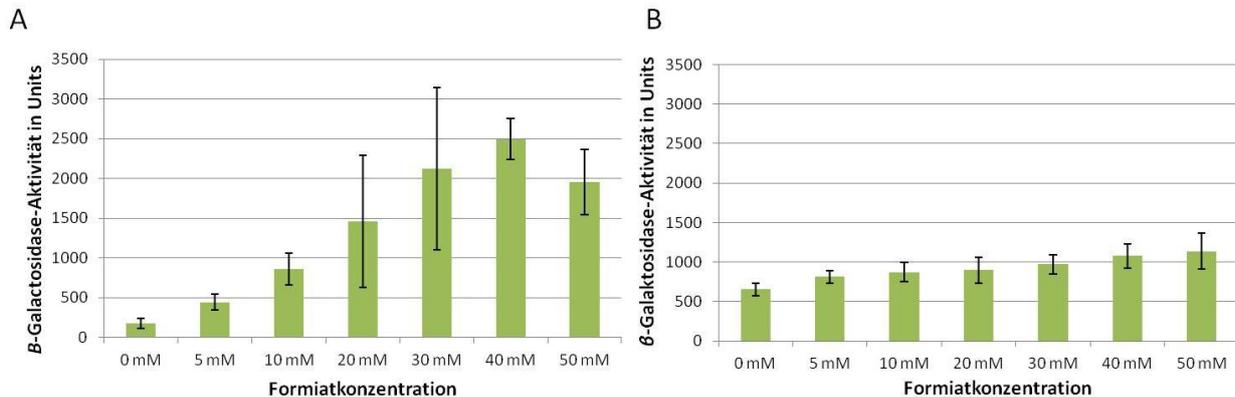


Abbildung 3.4: β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Anzucht. (A) Wildtyp DH4100 (B) $FocA^-$ -Stamm DH701. Die Anzucht erfolgte anaerob in TGYEP-Medium mit 0,8 % Glukose bei einem pH-Wert von 6,5. Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Betrachtet man vergleichend die β -Galaktosidase-Aktivität des Wildtypstammes DH4100 und eines $FocA^-$ -Stammes (DH701) nach anaerobem Wachstum in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,8 % Glukose) ohne Zugabe von Formiat (Abbildung 3.4), so wird deutlich, dass der Stamm ohne funktionstüchtiges $FocA$ eine sechsfach höhere Aktivität aufweist. Beide Stämme sind durch die Anwesenheit von PflB in der Lage Pyruvat zu Formiat umzusetzen. Beim Wildtyp kann selbiges durch $FocA$ aus der Zelle transportiert werden, wohingegen es bei einem $FocA^-$ -Stamm in der Zelle akkumuliert. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme der β -Galaktosidase Aktivität mit steigender Formiat-Konzentration im Medium. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Formiat aus dem Medium in die Zelle aufgenommen worden sein musste. Dabei konnte vom Wildtyp wesentlich mehr Formiat aufgenommen werden, was in einer höheren Aktivität resultierte. Vergleicht man die Aktivitäten der $FocA^-$ -Mutante ohne und mit 50 mM Formiat im Medium, so konnte fast eine Verdopplung der Aktivität erreicht werden. Da ein gepuffertes Medium mit einem pH Wert von 6,5 verwendet wurde, ist dieser Effekt nicht allein auf Diffusion zurück zu führen, sondern gibt Hinweise auf die Anwesenheit eines weiteren Formiat-Transportsystems in der Zelle.

Ergebnisse

Im vorhergehenden Experiment waren die *E. coli*-Stämme in der Lage unter anaeroben Bedingungen intrazellulär Formiat aus Pyruvat zu bilden. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, wie sich der interne Formiat Spiegel ändert, wenn Formiat nicht mehr selbst metabolisiert werden kann. Dafür standen Mutanten zur Verfügung, die entweder eine Deletion im *pflB*-Gen [DH201 ($\Delta focA \Delta pflB$) und DH220 ($\Delta pflA \Delta pflB$)] oder inaktives PflB durch die Deletion der Aktivase *pflA* synthetisierten (Stamm DH234M1). Die Stämme wurden wie im vorhergehenden Experiment kultiviert und dem Medium kein bzw. 15 mM und 50 mM Formiat zugegeben.

Vergleicht man nun die in Abbildung 3.5 untersuchten Stämme, fällt auf, dass die beiden Stämme DH220 und DH234M1 trotz Anwesenheit von FocA nur einen geringen Teil des Formiats aus dem Medium aufnahmen. Die Aktivität des Stammes DH201 hingegen stieg um das Dreifache in Anwesenheit von 15 mM Formiat gegenüber dem Wachstum ohne Formiat. Bei gleichen Bedingungen konnte in Abwesenheit von FocA eine höhere Aktivität erreicht werden als in Anwesenheit von FocA, was für eine gesteigerte Formiataufnahme des Stammes DH201 gegenüber den Stämmen DH220 und DH234M1 spricht. Daraus lässt sich erneut schlussfolgern, dass es neben FocA noch ein weiteres Transportsystem in *E. coli* geben muss, welches in der Lage ist, Formiat über die Cytoplasmamembran zu transportieren. Weiterhin ergibt sich die Fragestellung, unter welchen Bedingungen FocA aktiv ist und ob es einen Zusammenhang zwischen der Formiataufnahme und der Anwesenheit von PflB gibt.

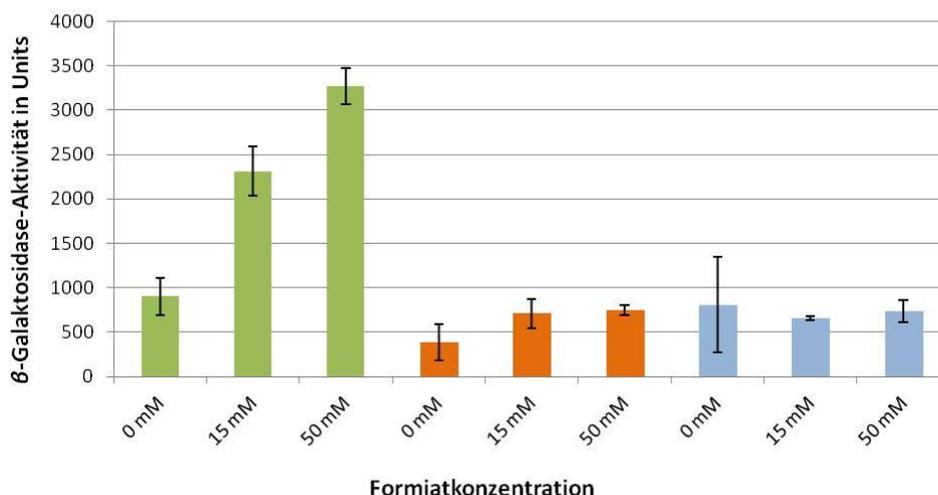


Abbildung 3.5: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme nach anaerober Anzucht. Grün = DH201 ($\Delta focA \Delta pflB$); Orange = DH220 ($\Delta pflB \Delta pflA$); Blau = DH234M1 ($\Delta pflA$) Die Anzucht erfolgte anaerob in TGYEP-Medium mit 0,8 % Glukose bei einem pH-Wert von 6,5. Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Ergebnisse

Betrachtet man in Abbildung 3.5 die einzelnen Stämme nach anaerober Kultivierung ohne Formiat im Medium, so zeigte sich trotz inaktivem PflB bzw. in den Deletionsmutanten eine β -Galaktosidase-Aktivität. Die stärkste Aktivität mit etwa 850 U konnte beim Stamm DH201 gemessen werden. Es war in allen Stämmen das Gen *tdcE*, welches für die 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase kodiert, vorhanden. Das Genprodukt von *tdcE* ist in der Lage im überproduzierten Zustand beim Fehlen von PflB dessen Funktion teilweise zu ersetzen (Sawers *et al.*, 1998) und wird ebenfalls von der Aktivase PflA aktiviert (Hesslinger *et al.*, 1998a). Die Stämme DH220 und DH234M1 sind beide im *pflA*-Gen deletiert. Lediglich der Stamm DH201 kann aktives TdcE besitzen, was in einer erhöhten β -Galaktosidase-Aktivität resultieren könnte. Aus diesem Grund wurden die Stämme DH220 und DH201 zusätzlich im Gen *tdcE* deletiert und die β -Galaktosidase-Aktivität erneut nach anaerobem Wachstum in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,8 % Glukose) mit verschiedenen Formiat-Konzentrationen bestimmt.

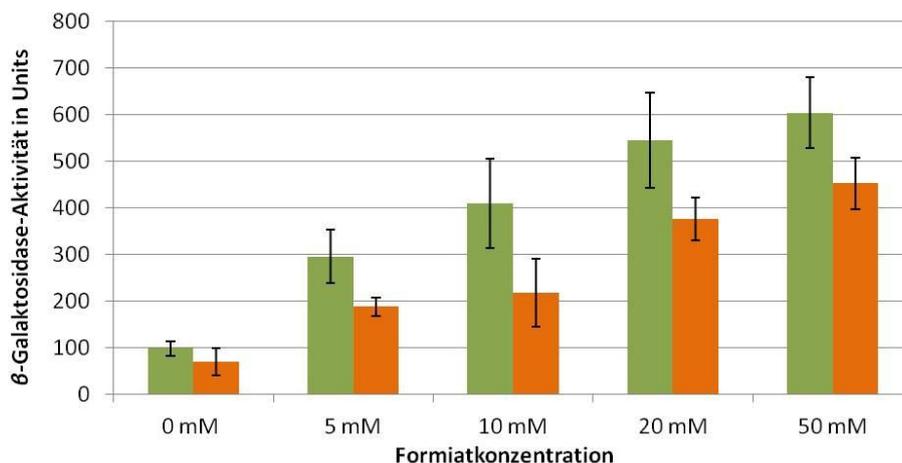


Abbildung 3.6: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme nach anaerober Anzucht Grün = DH223 ($\Delta pflB \Delta pflA \Delta tdcE$); Orange = DH226 ($\Delta focA \Delta pflB \Delta tdcE$); Die Anzucht erfolgte anaerob in TGYEP-Medium mit 0,8 % Glukose bei einem pH-Wert von 6,5. Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Durch eine zusätzliche Deletion im Gen *tdcE* (Abbildung 3.6) wurde eine wesentlich niedrigere β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Anzucht in TGYEP-Medium ohne Zugabe von Formiat zum Medium erreicht als bei den untersuchten Stämmen in Abbildung 3.5. Dies sollte aus einer geringen intrazellulären Formiat-Konzentration resultieren und bestätigt damit die Hypothese von Sawers *et al.*, 1998, dass TdcE in Abwesenheit von PflB dessen Funktion zum Teil übernehmen kann. Weiterhin zeigte der Stamm DH226 gegenüber dem Stamm DH201 (Abbildung 3.5) nur ein Fünftel der Aktivität in Anwesenheit von 50 mM

Ergebnisse

Formiat. Zwischen den Stämmen DH220 (Abbildung 3.5) und DH223 (Abbildung 3.6) ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich ihrer Aktivität. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass der Formiat-Transport durch FocA vorrangig durch PflB reguliert zu werden scheint. Aber auch TdcE scheint die Formiat-Aufnahme zu regulieren. Da der pH-Wert in beiden Experimenten gleich war, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass im Fall von DH201 die Anwesenheit von aktivem TdcE die Aufnahme durch ein weiteres Formiat-Transportsystem begünstigt wird. Dies wird jedoch verhindert, wenn TdcE und PflB im inaktiven Zustand vorliegen.

3.1.4 Der Formiat-Abbau in der Zelle korreliert mit der Formiat-Aufnahme im Medium

Die Identifizierung des *focA*-Gens durch Suppmann und Sawers (1994) erfolgte durch ein *screening* mit dem toxischen Formiat-Analogon Hypophosphit. Dieses kann, durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Formiat (Abbildung 3.7 A) ebenfalls durch FocA aufgenommen werden und inaktiviert dann im Cytoplasma PflB (Knappe *et al.*, 1984). Da bisher gezeigt werden konnte, dass es neben FocA noch ein weiteres Transportsystem für Formiat in *E. coli* geben muss und dass die Translokation von Formiat durch FocA vom Vorhandensein von aktivem PflB abzuhängen scheint, sollten diese Thesen im weiteren Verlauf näher untersucht werden. Dabei galt es außerdem zu klären, ob ein zweites Transportsystem auch Hypophosphit transportieren kann.

Für die Untersuchung der Thesen standen verschiedene FocA-Mutanten zur Verfügung, bei denen überall die Anwesenheit von PflB mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.7 B). Dabei wird ersichtlich, dass im Stamm REK702 aufgrund der Mutation des Startcodons von GUG zu AUG eine wesentlich größere Menge an PflB vorlag. Bereits Suppmann und Sawers, 1994 postulierten mittels *pflB-lacZ*-Fusion einen 50%igen Anstieg der *pflB*-Expression unter aeroben Bedingungen und einen 2,3fachen unter anaeroben Bedingungen und bewiesen damit einen polaren Effekt einer Mutation des *focA*-Startcodons auf die Expression von *pflB*. Darüber hinaus konnte von Beyer *et al.*, 2013 gezeigt werden, dass dieser Stamm eine 20fache Menge an FocA und eine etwa 3fache Menge an PflB aufweist. Die beiden Stämme REK700 und REK703 wurden ebenfalls hinsichtlich ihres Startcodons verändert. Jedoch wurde das ursprüngliche GUG im Fall von REK700 zu UUU und bei REK703 zu GUC mutiert, was jeweils in einer *nonsense*-Mutation resultiert. Die Mutante REK704 besitzt statt des CVVC-Motivs an Position 82-84 in FocA ein SVVS-Motiv. Durch die Mutation ergab sich kein polarer Effekt hinsichtlich der *pflB*-Expression oder

Ergebnisse

Menge an FocA in der Zelle (B. Suppmann, 1993). Ein CxxC-Motiv stellt häufig eine Bindestelle für metallische Cofaktoren, wie z.B. Eisen dar (Archer *et al.*, 1995). Dabei fixieren die beiden hochkonservierten Cysteine das Eisen-Atom. Hinsichtlich der Bedeutung dieses Motivs für FocA aus *E. coli* ist noch nichts bekannt.

Wie die unterschiedliche Menge an FocA und PflB das Wachstum in Anwesenheit von Hypophosphit beeinflussen, wurde in einem Resistenztest untersucht, bei dem eine Wachstumsendpunktbestimmung nach 24 h anaerober Kultivierung in M9-Minimalmedium mit 0,4 % Glukose durchgeführt wurde (Abbildung 3.7 C).

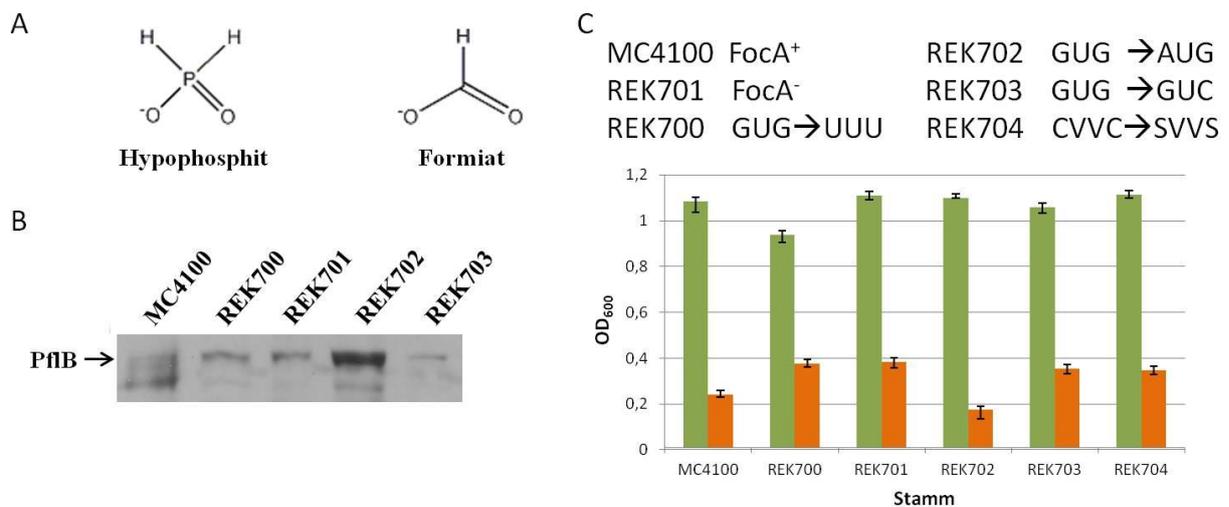


Abbildung 3.7: Einfluss der Aufnahme des toxischen Formiat-Analogons Hypophosphit bei verschiedenen FocA-Varianten. (A) Strukturformel von Hypophosphit und Formiat; (B) Immunoblot-Detektion mittels PflB-Antikörper. Aufgetragen wurden 40 µg des Rohextrakts der verschiedenen Stämme. Diese wurden zuvor anaerob in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C kultiviert, anschließend geerntet, aufgeschlossen und fraktioniert. (C) Hypophosphit Resistenztest in M9-Minimalmedium. Die angegebenen Stämme wurden anaerob in M9-Minimalmedium bei 37 °C für 24 h kultiviert. Grün = ohne Zugabe von Hypophosphit, Orange = mit 75 mM Hypophosphit

Der Stamm REK702, der aufgrund der Mutation des Startcodons von GUG zu AUG eine größere Menge an FocA in der Zelle aufweist, war auch sensitiver gegenüber Hypophosphit im Vergleich zum Wildtyp. Dies resultierte in einer geringeren End-OD₆₀₀. Die Stämme REK700 und REK703, die durch Mutationen im Startcodon kein funktionsfähiges FocA mehr enthalten (Beyer *et al.*, 2013), und der Stamm REK701, der Stoppcodone an den Positionen 114 und 115 trägt, zeigten nach 24 h Wachstum in Anwesenheit von 75 mM Hypophosphit einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp MC4100. In Abwesenheit von FocA gelangte offensichtlich weniger Hypophosphit in die Zelle, welches das anaerobe Wachstum blockieren konnte. Der Stamm REK704 verhielt sich ähnlich dem FocA⁻-Stamm REK701

Ergebnisse

und zeigte ebenfalls einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp in Anwesenheit von Hypophosphit. Da die erreichte optische Dichte mit Hypophosphit im Medium jedoch immer noch weiter unter der ohne liegt, musste das toxische Analogon trotzdem in die Zelle gelangt sein. Die nicht dissoziierte Form von Hypophosphit kann jedoch aufgrund des sehr niedrigen pKa-Wertes von etwa 1,1 so gut wie nicht über die Membran diffundieren, sondern muss transportiert werden. Aus diesem Grund muss es ein weiteres Transportsystem geben, welches auch in der Lage ist, Hypophosphit zu transportieren.

Nachdem Hinweise erhalten werden konnten, dass das weitere Transportsystem auch Hypophosphit transportieren kann und eine Veränderung des FocA-Startcodons sich auf die Menge an FocA und damit auf den Transport des toxischen Analogons auswirkt, sollte nun untersucht werden, wie sich die interne Formiat-Konzentration dieser FocA-Varianten ändert. Dazu wurde mittels λ -Phagentransduktion das *fdhF'*-*lacZ* Konstrukt ins Genom der einzelnen Stämme integriert. Die Stämme wurden nun statt REKxxx mit DHxxx bezeichnet. Nach anaerober Kultivierung in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,8 % Glukose) bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,6 wurde die β -Galaktosidase-Aktivität der einzelnen Varianten bestimmt (Abbildung 3.8).

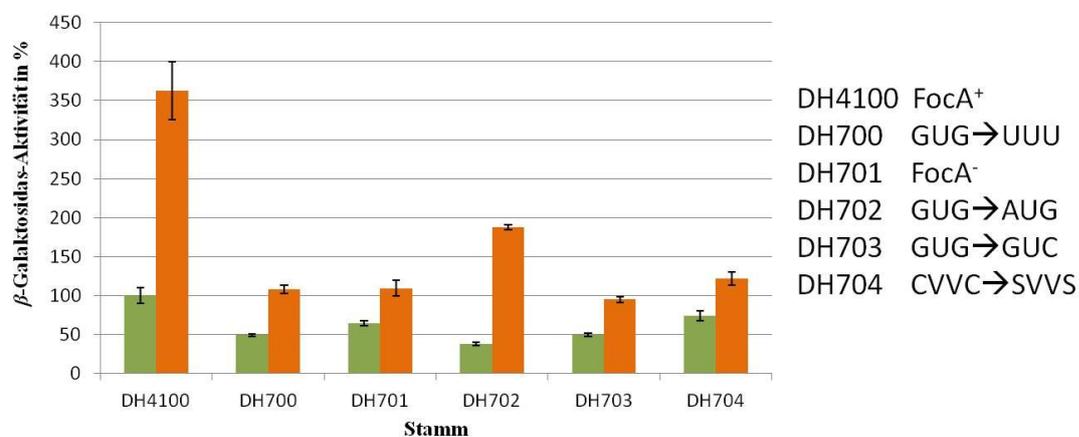


Abbildung 3.8: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen FocA-Varianten. Die Messung erfolgte nach anaerober Anzucht in TGYEP-Medium mit 0,8 % Glukose und einem pH-Wert von 6,5. Grün = ohne Zusatz von Formiat zum Medium; Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium. Der Wildtypstamm DH4100 wurde als Referenzstamm mitgeführt und die entsprechende Aktivität ohne Zugabe von Formiat zum Medium 100 % gesetzt (100 % entsprechen 694,84 U). Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Ergebnisse

Die Stämme DH700, DH701 und DH703 zeigten nur etwa 50-60 % der Aktivität des Wildtyps nach Kultivierung ohne Formiat. Noch weniger Aktivität zeigte der Stamm DH702 mit etwa 40 %. Der Stamm ist zudem in der Lage, durch den polaren Effekt der Mutation des Startcodons von GUG zu AUG auf die Expression von *pflB*, mehr Formiat zu produzieren. Durch das erhöhte Vorkommen von FocA wird das intrazellulär gebildete Formiat vermutlich stärker ins Periplasma transportiert, was in einer niedrigeren *fdhF*-*lacZ*-Aktivität resultierte. Somit scheint die Zelle auf die vermehrte Produktion von Formiat zu reagieren und damit einer Toxifizierung, die in einer Wachstumshemmung resultieren würde, entgegen zu wirken. Nach Wachstum mit Formiat im Medium verhielten sich die Stämme DH700, DH701 und DH703 ebenfalls gleich und zeigten etwa die Aktivität des Wildtyps nach Wachstum ohne Formiat. Alle drei Stämme besitzen kein funktionsfähiges FocA-Protein mehr. Da die Aktivität in Anwesenheit von Formiat im Medium trotzdem ansteigt, muss Formiat trotz des Fehlens von FocA in die Zelle gelangt sein. Möglicherweise geschah dies, durch die Verwendung von gepuffertem Medium, welches eine Diffusion weitgehend verhindern sollte, durch ein weiteres Transportsystem. Der Stamm DH702 zeigte etwa die Hälfte der Wildtypaktivität nachdem beide Stämme mit Formiat im Medium kultiviert wurden. Dies zeigt, dass mehr Formiat in die Zelle gelangte als bei den Stämmen ohne funktionsfähiges FocA, jedoch wurde nicht die Aktivität des Wildtyps erreicht. Hier zeigte sich erneut, dass die Zelle auf die vermehrte Anwesenheit von Formiat reagiert und versucht die intrazelluläre Konzentration von für sie toxischen Intermediaten bzw. Medienkomponenten zu regulieren. Der Stamm DH704, bei dem das CVVC-Motiv gegen ein SVVS-Motiv mutiert wurde, verhielt sich wie der FocA⁻-Stamm DH701. Auch hier wurde eine stark verminderte Formiat-Aufnahme aus dem Medium nachgewiesen. Dies gibt einen Hinweis, dass die beiden Cysteine für die Formiat-Aufnahme essentiell sein könnten.

Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, wie die Zelle den Formiat-Abbau durch den FHL-Komplex reguliert, wenn die Detoxifizierung der Zelle durch den Export von Formiat aufgrund des Fehlens von FocA nicht mehr möglich ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Aktivität des FHL-Komplexes in Abhängigkeit von der internen Formiat-Konzentration steht. Deshalb wurde die gebildete Menge an Wasserstoff am Gaschromatographen quantitativ bestimmt. Dies lässt Rückschlüsse auf die Aktivität des FHL-Komplexes zu und damit auf den Abbau von Formiat bei verschiedenen intrazellulären Konzentrationen. Dazu wurden die Zellen anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,4 % Glukose) im Hungate-Röhrchen kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 wurde eine Probe aus der Gasphase über dem Medium entnommen und mit Hilfe des Gaschromatographen

Ergebnisse

analysiert (Abbildung 3.9). Der Wildtypstamm DH4100 wurde als Referenz mitgeführt und dessen gebildete Wasserstoffkonzentration nach Kultivierung ohne Formiat entspricht 100 %.

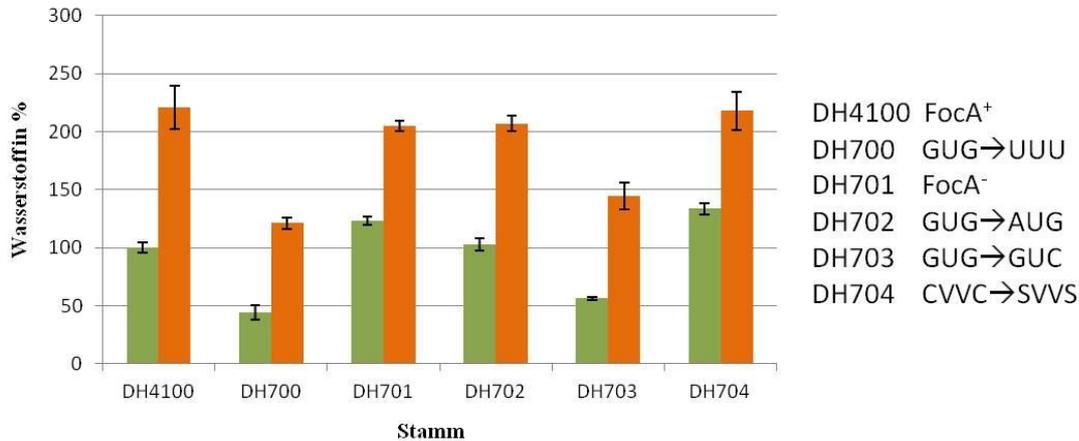


Abbildung 3.9: Wasserstoffproduktion verschiedener *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen FocA-Varianten. Die Stämme wurden im Hungate Röhrchen, gefüllt mit 10 ml TGYEP-Medium mit einem pH-Wert von 6,5 und einem Glukoseanteil von 0,8 %, bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 kultiviert. Anschließend erfolgte die Probenentnahme direkt aus der Gasphase des Kulturröhrchens. Grün = ohne Zugabe von Formiat bei der Kultivierung, Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium; Die Aktivität des Stammes DH4100 ohne Zugabe von Formiat zum Medium wurde 100 % gesetzt (entsprechen 38,2 nmol Wasserstoff). Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Nach Kultivierung mit Formiat im Medium erreichte der Wildtyp mit etwa 220 % (entspricht etwa 84 nmol Wasserstoff) die höchste Wasserstoffkonzentration. Die Stämme DH700 und DH703 verhalten sich in etwa gleich. Die Mutation des Startcodons dieser beiden Stämme führt zu einer Verringerung der *pflB*-Expression (Suppmann und Sawers, 1994). Damit kommt es wahrscheinlich zu einer niedrigeren Formiat-Konzentration in der Zelle, was die niedrigere Aktivität gegenüber dem Wildtypstamm in Abwesenheit von Formiat im Kultivierungsmedium erklären könnte. Im Stamm DH701 kommt es zu einer Anhäufung des Formiats, was sich in einer höheren Wasserstoffkonzentration nach Kultivierung ohne Formiat zeigte. Wuchs der Stamm in Anwesenheit von Formiat, gelangte selbiges in niedrigeren Konzentrationen in die Zelle, wie die Messung ergab. Interessanterweise verhielt sich der Stamm DH702 wie der Wildtyp. Trotz des Effekts, dass durch PflB gebildetes Formiat aufgrund des höheren Vorkommens von FocA zunächst aus der Zelle transportiert zu werden scheint (Abbildung 3.8), wird die Wasserstoffproduktion durch diesen Effekt nicht beeinträchtigt. Es scheint sich ein Gleichgewicht zwischen Formiat-Import und -Export sowie des Formiat-Abbaus einzustellen.

Ergebnisse

Um diese Schlussfolgerung weiter zu untermauern, sollte die Änderung der Formiat-Konzentration in der Zelle untersucht werden, wenn *E. coli* nicht mehr in der Lage ist Formiat abzubauen. Dazu wurde mit Hilfe eines P1-Lysats, welches ein Tn10-Transposon in einem der *sel*-Gene, wahrscheinlich im *selB*-Gen besaß, in die verschiedenen FocA-Varianten eine zusätzliche chromosomale Mutation eingeführt. Das Gen *selB* kodiert für einen Selenocystein-tRNA-spezifischen Translations-Elongationsfaktor, welcher für den Einbau des Selenocysteins in die Formiatdehydrogenasen und damit für deren Funktionalität essentiell ist (Forchhammer *et al.*, 1989; Leinfelder *et al.*, 1989; Böck *et al.*, 1991; Sawers *et al.*, 1991). Das Fehlen von SelB verhindert damit den Abbau von Formiat in der Zelle.

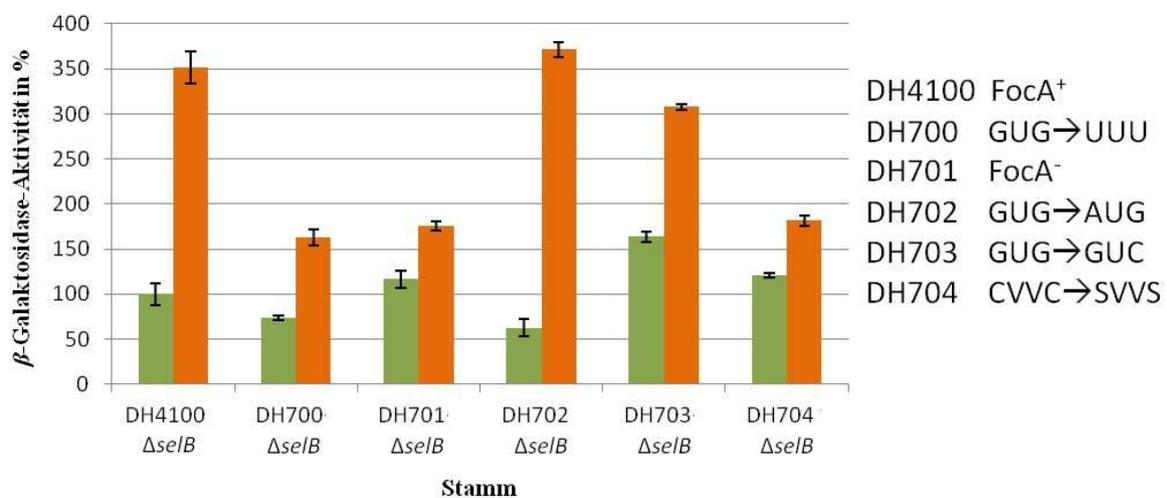


Abbildung 3.10: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen FocA Varianten und zusätzlicher Transposoninsertion im Gen *selB*. Die Kulturen wurden anaerob in TGYEP Medium mit 0,8 % Glukose und einem pH Wert von 6,5 kultiviert. Grün = ohne Zusatz von Formiat zum Medium; Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium. Die Aktivität des Stammes DH4100 + $\Delta selB$ ohne Zugabe von Formiat zum Medium wurde 100 % gesetzt (entsprechen 427,8 Units). Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Alle FocA-Varianten sowie der Wildtypstamm sollten nun nicht mehr in der Lage sein, SelB zu synthetisieren und so Formiat mit Hilfe einer Formiatdehydrogenase zu oxidieren. Es wurden erneut β -Galaktosidase-Aktivitäts-Assays durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich die Formiat-Konzentration in der Zelle ändert, wenn Formiat nicht mehr abgebaut werden kann. Dafür wurden die einzelnen Stämme wieder anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,8 % Glukose) bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,6 kultiviert und die Enzymaktivität anschließend bestimmt (Abbildung 3.10). Insgesamt konnte bei diesem Experiment ein verzögertes Wachstum aller Stämme beobachtet werden, welches auch in einer niedrigeren OD am Ende des Versuches resultierte (Daten nicht gezeigt). Da das intrazellulär gebildete

Ergebnisse

Formiat nicht mehr abgebaut werden konnte, häufte es sich in der Zelle an und führte wahrscheinlich zu einer Absenkung des pH-Wertes im Cytoplasma.

Es wurde sichtbar, dass der Stamm DH702 mit zusätzlicher *selB*-Mutation nach Anzucht ohne Formiat die geringste Aktivität zeigte. Mit Formiat im Medium wies er eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität auf. Durch die Mutation des Startcodons von GUG zu AUG liegt mehr FocA in der Zelle vor und das intrazellulär gebildete Formiat kann zur Detoxifizierung ins Periplasma transportiert werden. Wurde Formiat dem Kultivierungsmedium zugegeben, scheint sich, trotz der höheren Menge an FocA im Stamm DH702 $\Delta selB$ ein dem Wildtyp ähnliches Gleichgewicht der Formiat-Konzentration zwischen Cytoplasma und Medium einzustellen. In den Stämmen DH701 $\Delta selB$ und DH703 $\Delta selB$ häufte sich das intrazellulär gebildete Formiat nach anaerober Kultivierung ohne Zugabe von Formiat in der Zelle an, was in einer höheren β -Galaktosidase-Aktivität resultierte. Der Stamm DH701 $\Delta selB$ weicht hier, trotz der *nonsense*-Mutation des Startcodons von GUG zu UUU, etwas ab. Jedoch zeigte dieser Stamm in Anwesenheit von 20 mM Formiat im Kultivierungsmedium eine um die Hälfte verminderte β -Galaktosidase Aktivität verglichen mit dem Wildtyp DH4100 $\Delta selB$ und Stamm DH702 $\Delta selB$. Dies weist daraufhin, dass in Abwesenheit von FocA weniger Formiat aus dem Medium in die Zelle transportiert wurde. Dass die nachgewiesene Aktivität jedoch in Anwesenheit von Formiat höher war als ohne Formiat im Medium zeigt, dass Formiat trotzdem noch in die Zelle gelangt sein musste. Durch die Verwendung von gepuffertem Medium, welches sich während des anaeroben Wachstums nur auf einen pH-Wert von etwa 6,2 absenkte, muss ein großer Teil des Formiats in die Zelle transportiert worden sein. Dies zeigte erneut, dass es neben FocA noch ein weiteres Transportsystem für Formiat in *E. coli* geben muss. Der Stamm DH704 $\Delta selB$ verhielt sich auch bei diesem Experiment wie ein FocA⁻-Stamm. Dies bestätigt erneut, dass die beiden Cysteine an den Positionen 82 und 84 in FocA für den Formiat-Transport essentiell zu sein scheinen.

3.2 Charakterisierung weiterer möglicher Transportsysteme für Formiat

Alle bisher erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in *E. coli* neben FocA noch mindestens ein weiteres Transportsystem geben muss, welches in der Lage ist, Formiat über die Cytoplasmamembran zu transportieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen, die zur Annäherung der Identifizierung dieses Transportsystems gemacht wurden, sind im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Der Nitrit-Transporter NirC transportiert *in vivo* kein Formiat

Aufgrund der bereits in der Einleitung beschriebenen Ähnlichkeit des Nitrit-Transporters NirC zu FocA liegt die Vermutung nahe, dass NirC auch in der Lage ist Formiat zu transportieren. Lü *et al.* (2012) konnten bereits bei *In-vitro*-Experimenten in *black lipid membranes* zeigen, dass NirC aus *Salmonella typhimurium* neben Nitrit auch Formiat transportieren kann. Um nun die Möglichkeit des Formiat-Transports durch NirC *in vivo* in *E. coli* zu untersuchen, wurde eine $\Delta focA \Delta nirC$ -Doppelmutante konstruiert. Als Donorstamm für die *nirC*-Deletion diente der Stamm JW3330 aus der Keio-Kollektion (Baba *et al.*, 2006), während der bereits in dieser Arbeit verwendete FocA⁻-Stamm REK701 als Akzeptorstamm fungierte. Nach der Herstellung eines heterogenen P1-Phagenlysats vom Donorstamm, wurde der Akzeptorstamm mit dem Lysat infiziert und die *nirC*-Deletion durch homologe Rekombination ins Genom integriert. Die damit vermittelte Kanamycin-Resistenzkassette wurde anschließend mit Hilfe des Plasmids pCP20 entfernt (Datsenko und Wanner, 2000). Nachdem die erhaltene Doppelmutante in sensitiver Form vorlag, wurde mittels λ -Phagentransduktion das *fdhF'*-*lacZ*-Konstrukt ebenfalls gerichtet ins Chromosom integriert. Alle eingeführten Mutationen und Konstrukte wurden anschließend auf ihre Korrektheit mittels Kolonie-PCR überprüft.

Der FocA⁻-Stamm sowie die Doppelmutante (FocA⁻ *nirC*) wurden nun in TGYEP-Medium mit und ohne Zugabe von Formiat bei zwei verschiedenen pH-Werten unter anaeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die β -Galaktosidase-Aktivitäten der einzelnen Stämme ermittelt. Dabei wurde der Wildtypstamm DH4100 als Referenz mitgeführt und dessen Aktivität nach Kultivierung ohne Formiat im Medium 100 % gesetzt. Dabei entsprechen 100 % bei einem pH-Wert von 6,5 130 U (Abbildung 3.11 A) und bei einem pH-Wert von 7,5 420 U (Abbildung 3.11 B). Vergleicht man die Aktivitäten des FocA⁻-Stammes mit denen der Doppelmutante, sowohl nach Wachstum bei pH 6,5 als auch nach Wachstum bei pH 7,5, so verhält sich die Doppelmutante wie der FocA⁻-Stamm. Würde NirC am Formiat-Transport beteiligt sein, wäre eine

Ergebnisse

Anhäufung des intrazellulär gebildeten Formiat zu erwarten gewesen, was wiederum in einer gesteigerten β -Galaktosidase-Aktivität resultieren sollte. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen somit frühere Untersuchungen, die bereits zeigten, dass NirC nicht am Formiat-Transport beteiligt zu sein scheint (Suppmann, 1993).

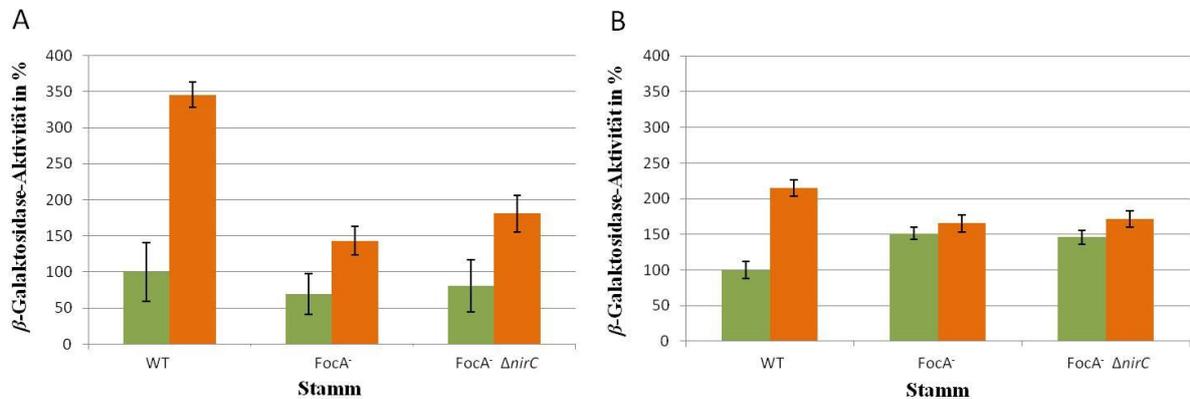


Abbildung 3.11: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme nach anaerobem Wachstum zur Untersuchung des Einflusses von NirC hinsichtlich des Formiat-Transports. Die Zellen wurden anaerob in TGYEP-Medium bei pH 6,5 (A) und pH 7,5 (B) und 0,4 % Glukose angezogen. Grün = ohne Zusatz von Formiat zum Medium; Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium. Der Wildtypstamm DH4100 wurde als Referenzstamm mitgeführt und die entsprechende Aktivität ohne Zugabe von Formiat zum Medium 100 % gleich gesetzt. Dabei entsprechen 100 % in Abb. (A) etwa 130 U und in Abb. (B) etwa 420 U. Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Vergleicht man die Abbildung 3.11 (A) und (B) miteinander, so wird deutlich, dass die Aktivität des Wildtyps nach anaerober Anzucht mit Formiat im Medium bei pH 6,5 eine um 250 % gesteigerte Aktivität im Gegensatz zur Kultivierung ohne Zugabe von Formiat zum Medium entsprach. Dies zeigt, dass im sauren Milieu mehr Formiat über die Cytoplasmamembran aus dem Medium in die Zelle gelangte. Aufgrund des niedrigen $pK_{a,s}$ von Formiat ist es denkbar, dass bei einem pH-Wert von 6,5 auch mehr Formiat in die Zelle diffundiert sein könnte als bei einem pH-Wert von 7,5.

Im weiteren Verlauf sollte nun die gebildete Wasserstoffkonzentration einer *FocA*⁻ Δ *nirC*-Mutante im Vergleich zu einem *FocA*⁻-Stamm untersucht werden, um weitere Hinweise zu bekommen, ob NirC tatsächlich nicht am Formiat-Transport beteiligt ist. Dazu wurden die verwendeten Stämme anaerob in TGYEP-Medium kultiviert und die Wasserstoffkonzentration anschließend, wie unter 2.8.2.2 beschrieben, bestimmt.

Ergebnisse

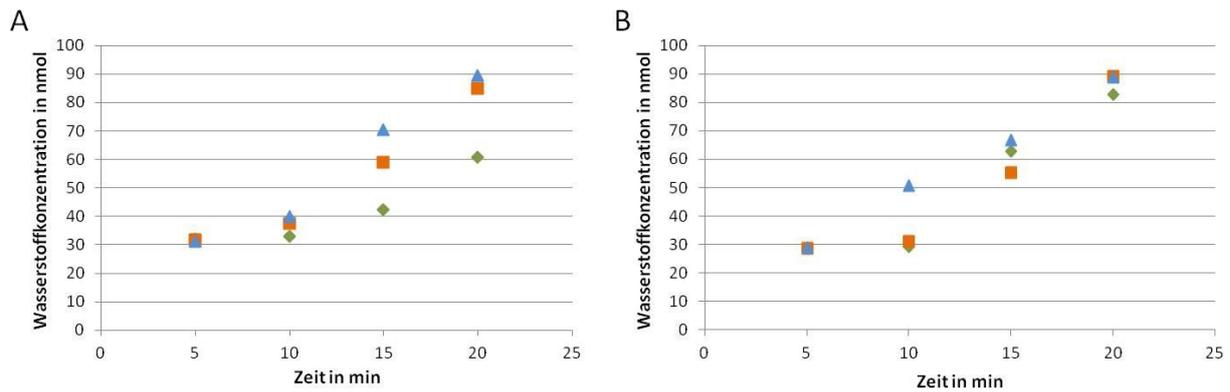


Abbildung 3.12: Gebildete Menge an Wasserstoff in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen *E. coli*-Stämmen. (A) nach anaerober Kultivierung in TGYEP-Medium (pH 6,5; 0,8 % Glukose) ohne Formiat; (B) nach anaerober Kultivierung in TGYEP-Medium (pH 6,5; 0,8 % Glukose) in Anwesenheit von 20 mM Formiat. Grüne Raute = Wildtypstamm MC4100; orangenes Quadrat = FocA⁻-Stamm; blaues Dreieck = FocA⁻ ΔnirC Mutante

Die Abbildung 3.12 zeigt die gebildete Menge an Wasserstoff in Abhängigkeit von der Zeit ohne (A) und mit Zugabe von 20 mM Formiat (B). Auch hier zeigte sich, dass sich eine FocA⁻ ΔnirC-Doppelmutante wie ein FocA⁻-Stamm verhält. Lediglich beim Wildtyp wurde eine Steigerung der Wasserstoffkonzentration in Anwesenheit von Formiat im Medium ersichtlich. Damit konnte auch mit einer weiteren Methode gezeigt werden, dass NirC nicht am Formiat-Transport beteiligt ist.

3.2.2 Untersuchungen zur Funktion des möglichen Formiat-Transporters FocB

Nachdem NirC als Mitglied der FNT-Familie für den Transport von Formiat *in vivo* ausgeschlossen werden konnte, sollte nun im weiteren Verlauf die Rolle von FocB hinsichtlich des Formiat-Transports untersucht werden. Da das Gen *focB* von Andrews *et al.*, 1997, bei bioinformatischen Analysen durch seine hohe Sequenzähnlichkeit zu *focA* als solches bezeichnet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei FocB um ein weiteres Formiat-Transportsystem handelt.

Um dies zu untersuchen wurden eine Δ*focB*-Einzel- und eine FocA⁻ Δ*focB*-Doppelmutante mittels P1-Phagentransduktion konstruiert. Als Donorstamm wurde der Stamm JW2477 aus der Keio-Kollektion (Baba *et al.*, 2006) verwendet. Als Akzeptorstamm diente für die Einfachmutante der Wildtypstamm MC4100 und für die Doppelmutante der FocA⁻-Stamm REK701. Die Konstruktion der Mutanten sowie die Insertion des *fdhF'*-*lacZ*-Konstruktes erfolgte ebenfalls wie bei 3.2.1 beschrieben. Die erhaltenen Mutanten wurden mittels Kolonie-PCR auf ihre Korrektheit überprüft.

Ergebnisse

Zunächst sollte nun mit Hilfe des *fdhF'*-*lacZ* Konstruktes eine Aussage über die Änderung der Formiat-Konzentration in der Zelle getroffen werden. Dafür wurden alle Stämme in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,8 % Glukose) anaerob bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 kultiviert und im Anschluss die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Eine Δ *focB*-Mutante zeigt dabei eine um etwa 40 % verminderte Aktivität gegenüber dem Wildtyp nach der Kultivierung ohne Formiat im Medium. Wurde dem Kultivierungsmedium Formiat zugegeben, verhielt sich die Δ *focB*-Mutante wie der FocA⁻-Stamm. Bei der Doppelmutante zeigte sich nach anaerober Kultivierung ohne Zugabe von Formiat eine etwa 90 % gesteigerte Aktivität gegenüber dem Wildtyp bei gleichen Bedingungen. Dies lässt auf eine erhöhte interne Formiat-Konzentration schließen. Diese ergibt sich, da das intern gebildete Formiat durch die Abwesenheit von FocA und FocB nicht mehr aus der Zelle transportiert werden konnte und sich somit anhäufte. Betrachtet man die Aktivität der Doppelmutante nach Anzucht mit Formiat im Medium, so ist festzustellen, dass diese nur eine etwa 30 % verringerte Aktivität gegenüber dem Wildtyp bei gleichen Bedingungen, jedoch eine um etwa 50 % gesteigerte Aktivität gegenüber der Anzucht ohne Formiat im Medium zeigt. Diese Aktivität ergibt sich aus der Anhäufung des intrazellulär gebildeten Formiats zuzüglich des aufgenommenen, welches durch Diffusion oder aber noch ein weiteres Formiat-Transportsystem in die Zelle gelangt sein könnte.

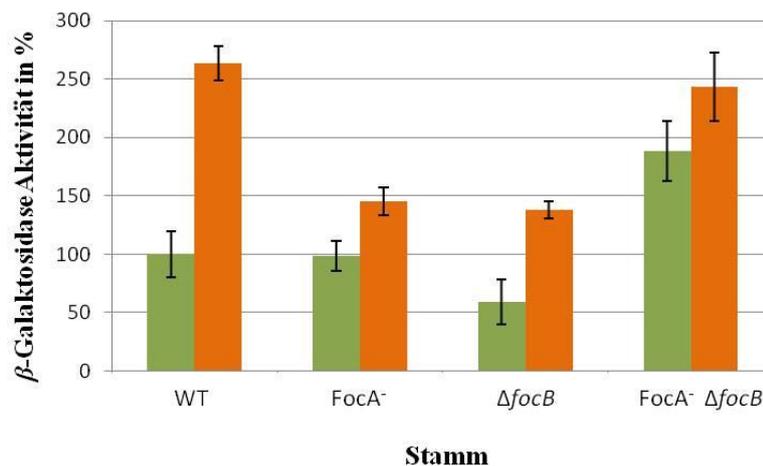


Abbildung 3.13: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme nach anaerober Anzucht in TGYEP-Medium (pH 6,5) zur Untersuchung der Rolle von FocB hinsichtlich des Formiat-Transports. Grün = ohne Zusatz von Formiat zum Medium; Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium. Der Wildtypstamm DH4100 wurde als Referenzstamm mitgeführt und die entsprechende Aktivität ohne Zugabe von Formiat zum Medium 100 % gesetzt (100 % entsprechen 809 U). Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Ergebnisse

Mit dem vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass FocB am Formiat-Transport beteiligt ist. Dies wurde vor allem durch die Anhäufung des Formiats in der Zelle, die aus einem gestörten Export resultierte, deutlich. Um nun im weiteren Verlauf zu schauen, ob die gesteigerte Menge an Formiat in der Zelle vom FHL-Komplex auch abgebaut werden kann, wurde die gebildete Wasserstoffkonzentration bei allen Stämmen am Gaschromatographen quantitativ bestimmt. Dafür wurden die Stämme, wie im vorangegangenen Experiment in mit TGYEP-Medium gefüllten Hungate-Röhrchen anaerob kultiviert und beim Erreichen einer optischen Dichte von etwa 0,6 wurde eine Probe aus der Gasphase über dem Medium mit einer Gasspritze entnommen.

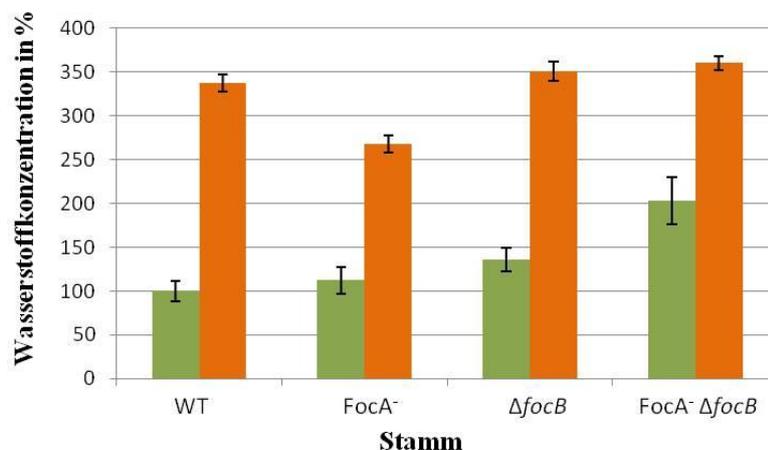


Abbildung 3.14: Analyse der Wasserstoffproduktion verschiedener *E. coli*-Stämme nach anaerobem Wachstum zur Untersuchung der Rolle von FocB hinsichtlich des Formiat-Transports. Die Stämme wurden im Hungate-Röhrchen, gefüllt mit 10 ml TGYEP-Medium mit einem pH-Wert von 6,5 und einem Glukoseanteil von 0,4 %, bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 kultiviert. Anschließend erfolgte die Probenentnahme direkt aus der Gasphase des Kulturröhrchens. Die gebildete Wasserstoffmenge des Wildtypstammes DH4100 wurde 100 % gesetzt (100 % entsprechen 21,7 nmol). Grün = ohne Zugabe von Formiat bei der Kultivierung, Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium

Die Abbildung 3.14 zeigt die Wasserstoffproduktion der einzelnen Stämme. Dabei wird deutlich, dass alle Mutanten ohne Zugabe von Formiat zum Kultivierungsmedium eine leicht gesteigerte Wasserstoffproduktion gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Im Wildtyp kann Formiat, welches von der Zelle nicht gleich abgebaut werden kann, zur Detoxifizierung der Zelle ins Periplasma transportiert werden und von dort dann später wieder aufgenommen werden (Beyer *et al.*, 2013). Sind nun FocA oder FocB nicht vorhanden, muss die Zelle das gebildete Formiat schnell abbauen um eine zu starke Ansäuerung des Cytoplasmas zu vermeiden. Dies resultierte in einer gesteigerten Wasserstoffbildung. Besonders deutlich wurde dies bei der Doppelmutante, sie erreichte eine annähernd 100 % gesteigerte Wasserstoffkonzentration des Wildtyps bei gleichen Bedingungen. Interessant ist das

Ergebnisse

Ergebnis der Wasserstoffproduktion, wenn alle Stämme Formiat im Medium enthielten. Sie war zwar höher als beim Wachstum ohne Formiat, jedoch unterschied sie sich nicht so stark zwischen den einzelnen Mutanten und dem Wildtyp. Lediglich der FocA⁻-Stamm zeigte eine verminderte Wasserstoffkonzentration gegenüber allen anderen Stämmen. Dieses Experiment lässt vermuten, dass der FHL-Komplex in der Zelle limitiert ist und daher unabhängig von der Formiat-Konzentration in der Zelle nur eine bestimmte Konzentration an Formiat umsetzen kann.

3.2.3 Untersuchungen von DauA hinsichtlich des Formiat-Transports

Das Transportprotein DauA (früher als YchM bezeichnet) gehört zur Familie SLC26 der Anionentransporter, welche in der Lage sind Bicarbonat aufzunehmen (Babu *et al.*, 2010). Karinou *et al.*, 2013 konnten zeigen, dass DauA der einzige aerob aktive Succinat-Transporter bei saurem pH in *E. coli* ist, was ihm schließlich den Namen gab, *dicarboxylic acid uptake system A*. Weiterhin wurde durch diese Arbeitsgruppe gezeigt, dass DauA nicht substratspezifisch ist und auch weitere C4-Dicarboxysäuren transportieren kann. Dabei kam die Frage auf, ob auch Formiat als Monocarbonsäure ein mögliches Substrat ist. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob DauA am Formiat-Transport unter anaeroben Bedingungen beteiligt ist.

Dafür wurden zuerst wieder die entsprechenden Einfach- und Doppelmutanten mittels P1-Phagentransduktion konstruiert. Als Donorstamm für die *dauA*-Deletion diente der Stamm JW5189. Als Akzeptorstamm für die Einfachmutante fungierte der Wildtypstamm MC4100, bei der Doppelmutante der FocA⁻-Stamm REK701. Die Stämme wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben, konstruiert und ihre Korrektheit anschließend mittels Kolonie-PCR überprüft. Um nun eine Aussage über die Änderung der Formiat-Konzentration in der Zelle hinsichtlich der eingefügten Mutationen machen zu können, wurde mit Hilfe des *fdhF'*-*lacZ*-Konstruktes die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Dazu wurden alle Stämme anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5 und 0,8 % Glukose) bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 kultiviert. Anschließend wurde, wie unter 2.8.1 beschrieben, die Enzymaktivität bestimmt.

Eine *dauA*-Deletionsmutante zeigte nach anaerobem Wachstum ohne Zugabe von Formiat nur gut 40 % der Aktivität des Wildtyps bei gleichen Bedingungen. Mit Zugabe von Formiat zum Kultivierungsmedium erreichte der Wildtyp etwa 270 %, der FocA⁻-Stamm etwa 100 % und die *dauA*-Deletionsmutante ca. 155 %. Offensichtlich gelangte beim Fehlen von DauA

Ergebnisse

weniger Formiat in die Zelle als beim Wildtyp, aber mehr als in einem Stamm ohne funktionsfähiges FocA. Betrachtet man nun die Doppelmutante, so zeigte diese, nach Anzucht ohne Formiat im Medium ähnliche Aktivitäten wie der FocA⁻-Stamm und nicht, wie erwartet, durch intrazelluläre Anhäufung von Formiat eine gesteigerte Aktivität gegenüber dem Wildtyp. Dieses Ergebnis zeigte, dass DauA durchaus am Formiat-Transport beteiligt zu sein scheint. Jedoch stellte sich die Frage, wann und unter welchen Bedingungen welches Transportsystem für die Aufnahme bzw. den Export von Formiat über die Cytoplasmamembran verantwortlich ist. Von FocA ist bekannt, dass es sich um einen bidirektionalen Transporter handelt (Suppmann und Sawers, 1994), was vor allem die Frage aufwirft, welche Aufgabe DauA in diesem Zusammenhang zukommt.

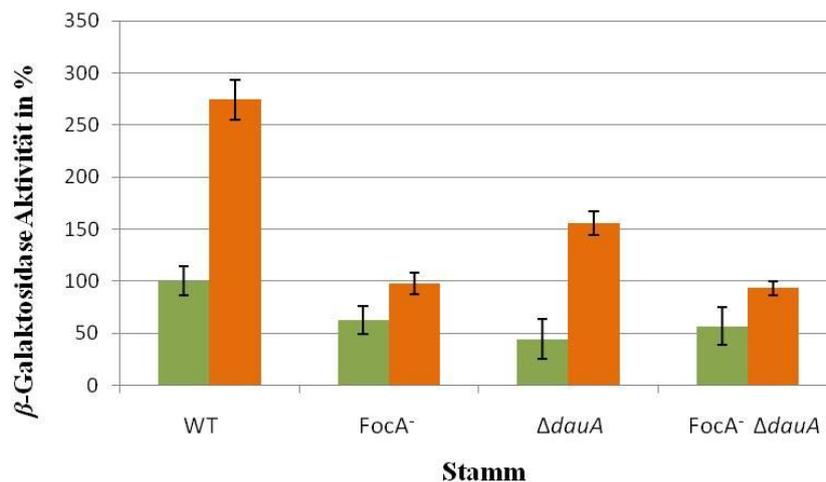


Abbildung 3.15: β -Galaktosidase-Aktivität verschiedener *E. coli*-Stämme nach anaerober Anzucht in TGYEP (pH 6,5) zur Untersuchung der Rolle von DauA hinsichtlich des Formiat-Transports. Grün = ohne Zusatz von Formiat zum Medium; Orange = Zugabe von 20 mM Formiat zum Medium. Der Wildtypstamm DH4100 wurde als Referenzstamm mitgeführt und die entsprechende Aktivität ohne Zugabe von Formiat zum Medium 100 % gesetzt (100 % entsprechen 1535 U). Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und das Experiment unabhängig voneinander mehrere Male wiederholt. Dabei differierten die absoluten Werte der einzelnen Aktivitäten, jedoch zeigte sich immer dieselbe Tendenz.

Karinou *et al.*, 2013 postulierten weiterhin, dass DauA vor allem bei saurem pH-Wert aktiv ist und Succinat unter diesen Bedingungen als Mono-Carboxylat vorliegt. Aus diesem Grund sollte in einem nächsten Experiment der Einfluss von DauA hinsichtlich des Formiat-Transports bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden. Als Methode wurde der Gastest mittels Durham-Röhrchen gewählt, wofür Kulturröhrchen mit TGYEP-Medium mit den pH-Werten 6,0; 6,6 und 7,7 und 0,8 % Glukose befüllt wurden. Zusätzlich wurde dem Medium Formiat in den Konzentrationen von 10 mM und 20 mM zugegeben.

Ergebnisse

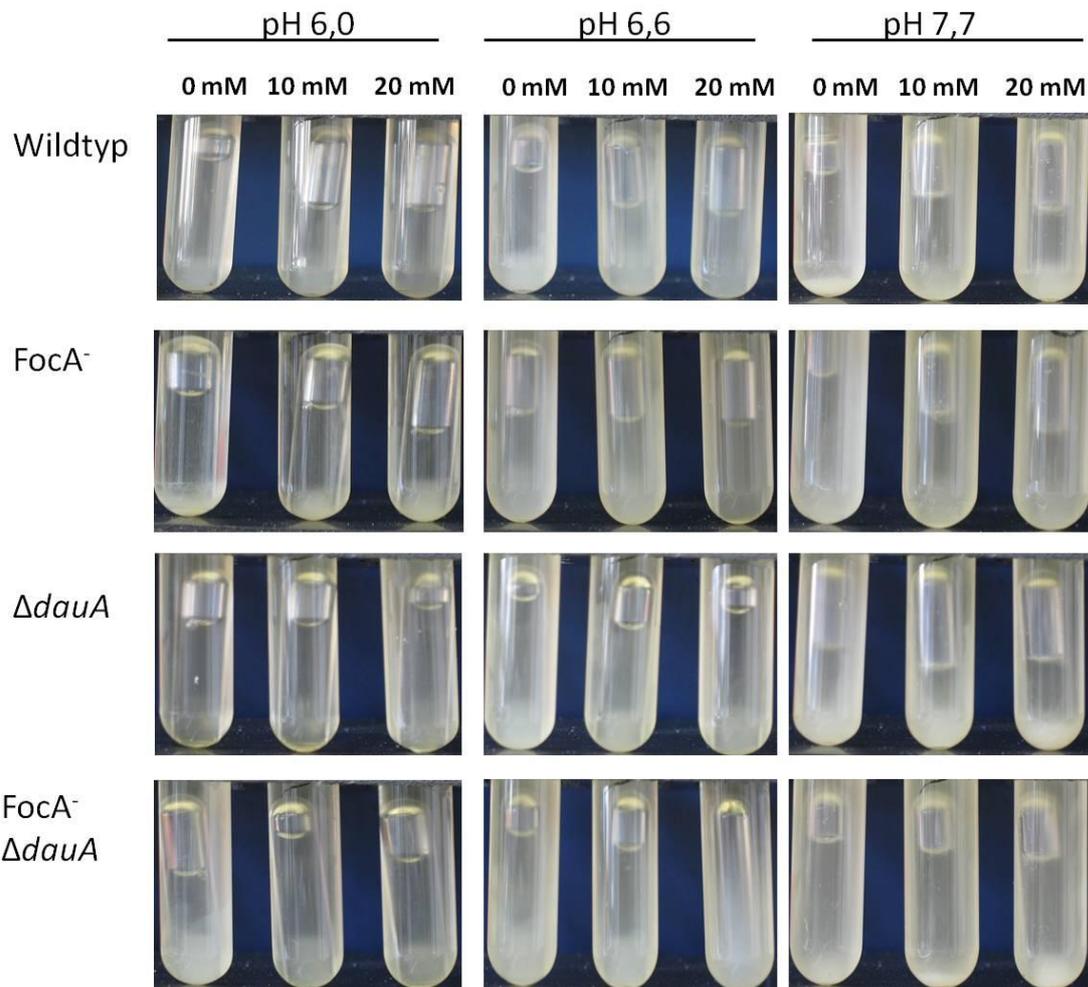


Abbildung 3.16: Gastest zur Untersuchung des Einflusses von DauA auf den Formiat-Transport in Abhängigkeit vom pH-Wert. Kultivierung der Stämme in TGYEP-Medium mit verschiedenen pH-Werten und 0,8 % Glukose für 48 h bei 37 °C. Zusätzlich wurde Formiat zum Medium gegeben. Jedes Kulturröhrchen wurde entsprechend mit einer Einzelkolonie beimpft.

Vergleicht man in Abbildung 3.16 erst einmal generell das Wachstum der Stämme bei den angegebenen pH-Werten, so zeigte sich bei einem pH von 6,0 die geringste Trübung und damit das schlechteste Wachstum. Mit zunehmendem pH wuchsen auch die Stämme besser, was an einer stärkeren Trübung erkennbar wurde. Weiterhin war, außer bei der *dauA*-Einfachmutante, eine Zunahme der Gasproduktion mit steigender Formiat-Konzentration feststellbar. Ebenfalls deutlich erkennbar wird, wie erwartet, dass ein FocA⁻-Stamm ohne Zugabe von Formiat eine stärkere Gasproduktion zeigte als der Wildtyp. Interessanterweise zeigte der *dauA*-Deletionsstamm bei einem pH von 7,7 die stärkste Gasbildung. Dabei war der Unterschied zwischen dem Wachstum in An- bzw. Abwesenheit von Formiat nur minimal. Da mit Hilfe dieser Methode nur ein erster Eindruck hinsichtlich der Gasproduktion bei den

Ergebnisse

unterschiedlichen Stämmen erhalten werden konnte, sollte die genaue Produktion von Wasserstoff im Folgenden mittels Gaschromatographie quantifiziert werden. Dazu wurden die verschiedenen Mutanten sowie der Wildtypstamm in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,6 anaerob kultiviert und die Messung am Gaschromatographen, wie unter 2.8.2.2 beschrieben, durchgeführt. Da die Untersuchung auf Gasproduktion zuvor in gepuffertem Medium erfolgte, wurde im folgenden Versuch zum Vergleich ebenfalls ein Gastest mit Durham-Röhrchen unter Verwendung von LB-Medium mitgeführt (Abbildung 3.17 A).

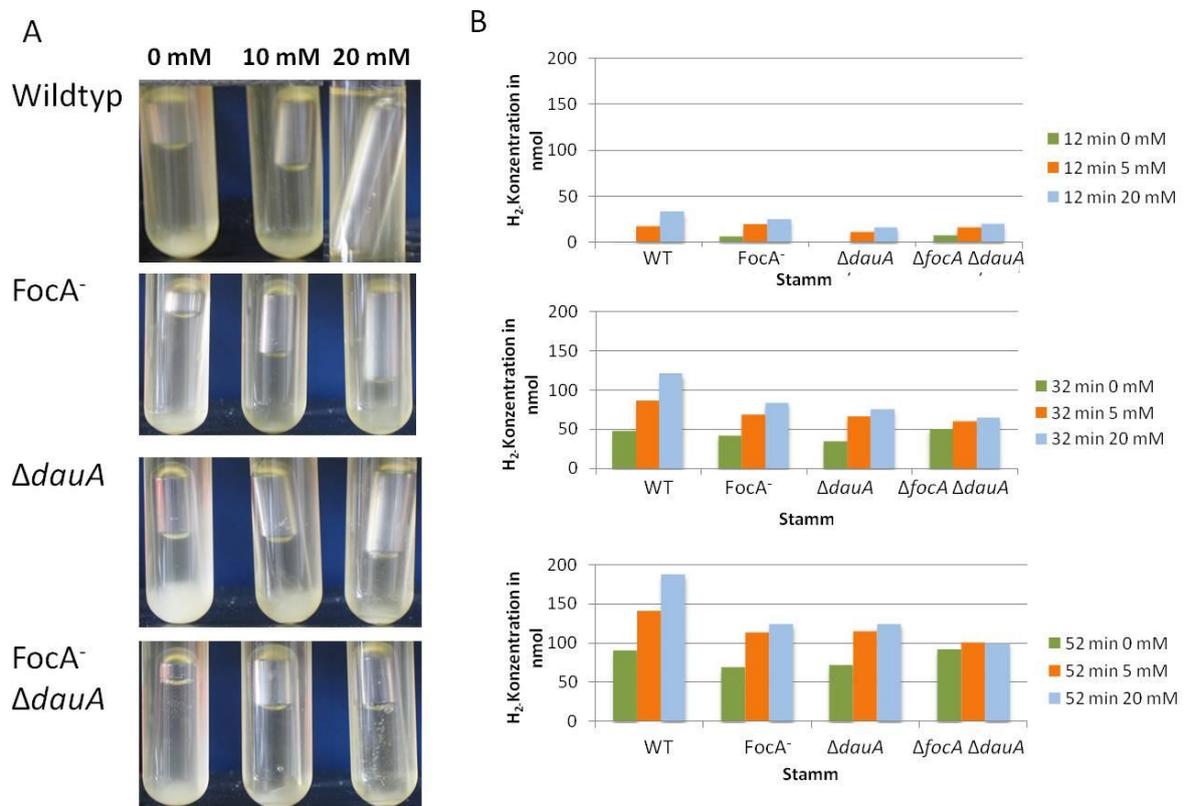


Abbildung 3.17: Untersuchungen zur Gasproduktion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (A) Untersuchung der Gasproduktion mittels Durhamröhrchen in LB-Medium bei verschiedenen Formiat-Konzentrationen. (B) Quantitative Wasserstoffbestimmung am Gaschromatographen nach anaerober Kultivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bei verschiedenen Formiat-Konzentrationen.

Bei dem in Abbildung 3.17 dargestellten Ergebnissen der Untersuchung der Gasproduktion, durchgeführt nach Wachstum in LB-Medium, zeigte sich, nicht wie erwartet, dass die Gasproduktion eines FocA⁻-Stammes nach Kultivierung in Abwesenheit von Formiat im Medium größer ist, als die des Wildtyps. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass die Wasserstoffbildung bei allen verwendeten Stämmen mit der Zeit zu nimmt (Abbildung 3.17 B). Des Weiteren zeigte sich, dass bei einem FocA⁻ ΔdauA-Stamm die

Ergebnisse

Wasserstoffkonzentration unabhängig von der Anwesenheit von Formiat immer annähernd gleich war und sich etwa auf dem Wildtyplevel nach Kultivierung ohne Formiat befand. Dies konnte auch bei der Untersuchung mittels Durham-Röhrchen beobachtet werden (Abbildung 3.17 A). Da dieser Effekt bei den jeweiligen Einzelmutanten nicht zu erkennen war, lässt sich schlussfolgern, dass DauA am Import von Formiat beteiligt sein könnte.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse in diesem Abschnitt vermuten, dass DauA in der Lage zu sein scheint, Formiat aufzunehmen. Bezieht man die erhaltenen Ergebnisse aus 3.2.2 mit ein, so hat sich gezeigt, dass es in *E. coli* neben dem bekannten Formiat-Transporter FocA nicht nur ein weiteres Transportsystem für Formiat gibt, sondern mindestens zwei weitere Membranproteine in der Lage zu sein scheinen Formiat zu transportieren. Dabei ist anzunehmen, dass es sich bei DauA um einen Formiatimporter handelt, während FocB möglicherweise Formiat sowohl aufnehmen als auch exportieren kann. Ob es neben diesen drei Proteinen noch weitere Formiat-Transporter gibt, kann anhand dieser Ergebnisse nicht gesagt werden. Die Konstruktion und phänotypische Untersuchung einer Dreifachmutante, die in allen drei Transportproteinen deletiert ist, wäre daher eine Möglichkeit diese Fragestellung zu untersuchen.

3.3 Untersuchungen zum Glycylradikalenzym GrcA

Das Glycylradikalenzym PflB ist sauerstoffempfindlich. Schon durch geringste Mengen an Sauerstoff zerfällt das Glycylradikal und PflB ist inaktiv (Knappe *et al.*, 1984). Es wird postuliert, dass es in *E. coli* ein Protein gibt, GrcA, bei dem es sich ebenfalls um ein Glycylradikalenzym handelt und welches in der Lage sein soll, die durch Sauerstoff zerfallene Untereinheit von PflB zu ersetzen (Wagner *et al.*, 2001). Mit der biochemischen Charakterisierung und den Untersuchungen hinsichtlich Struktur und Funktion beschäftigt sich das letzte Kapitel dieser Arbeit.

3.3.1 Reinigungsstrategie und immunologischer Nachweis des Glycylradikalenzym GrcA

Das *grcA*-Gen lag im Vektor pET15b-TEV (Eckhard *et al.*, 2008) vor, der freundlicherweise von Dr. P. Kolenko (AG Stubbs, Institut für Biophysik, Halle) zur Verfügung gestellt wurde. Um das Protein GrcA näher zu charakterisieren, musste zunächst eine Überexpressions- und Reinigungsstrategie entwickelt werden. Nach erfolgreicher Transformation des Vektors in den Stamm BL21(DE3) erfolgte die Überexpression von *grcA* in LB-Medium. Die Überexpression von *grcA* erfolgte für 4 h bei 37 °C.

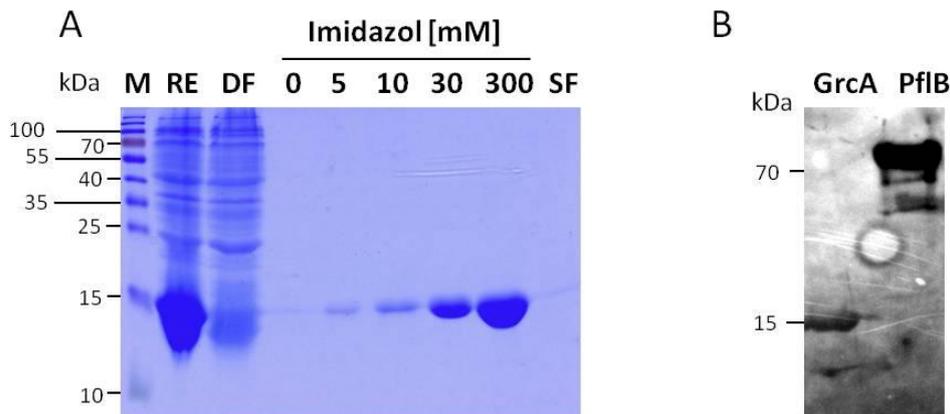


Abbildung 3.18: Reinigung und immunologischer Nachweis des Glycylradikalenzym GrcA (A) 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel nach Reinigung über Nickel NTA Säule M – Marker; RE – Rohextrakt; DF – Durchfluss; SF – Strippingfraktion (B) Immunoblot-Detektion der, via Nickel NTA, gereinigten Proteine GrcA und PflB mittels PflB-Antikörper. Aufgetragen wurden 5,8 µg Protein.

Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen, fraktioniert (2.7.1) und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (2.7.3). Dabei eluierte das GrcA Protein mit dem 6xHis-tag hauptsächlich bei einer Imidazolkonzentration von 300 mM (Abbildung 3.18 A). Anschließend sollte GrcA mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Zunächst wurde dafür der His-Antikörper verwendet, wobei sich damit kein Signal nachweisen ließ. Da GrcA eine sehr hohe Identität zum C-Terminus von PflB aufweist (1.5, Anhang A3), wurde als nächstes getestet, ob sich der PflB-Antikörper auch zum Nachweis von GrcA eignet. In der Abbildung 3.18 B war in der ersten Spur in der Höhe von 15 kDa ein Signal detektierbar, welches dem gereinigten GrcA entsprach. Das Protein GrcA konnte also annähernd bis zur Homogenität angereichert und mittels PflB-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen werden.

3.3.2 Die konzentrationsabhängige Dimerbildung von GrcA

Nach der erfolgreichen Anreicherung von GrcA (3.3.1) wurde das Protein mittels Zentrifugationsröhrchen konzentriert. Wurde das konzentrierte Protein anschließend erneut auf eine SDS-PAGE geladen, so war oberhalb der 35 kDa Markerbande eine weitere Bande sichtbar, welche die Vermutung aufkommen ließ, dass es sich dabei um die dimere Form von GrcA handelt. Massenspektrometrische Analysen, die von Herrn Michael Zorn (Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg) durchgeführt wurden, ergaben, dass es sich bei dieser Bande tatsächlich um das Dimer von GrcA handelt (Daten nicht gezeigt). Da GrcA an Position 31 ein Cystein besitzt, lag die Vermutung nahe, dass es zum Dimer durch

Ergebnisse

Ausbildung einer Disulfidbrücke gekommen war und der SDS-Probenpuffer die Proteinlösung nicht vollständig reduzierte. Daher wurde ein Teil der Proteinprobe zusätzlich mit dem Reduktionsmittel Tris-Carboxyethylphosphin (TCEP) (5 mM) versetzt. Des Weiteren wurde die Probe einmal mit SDS-Probenpuffer behandelt und 10 min bei 95 °C inkubiert und einmal lediglich mit Nativ-Probenpuffer (10xProbenpuffer: 5 % Coomassie Brilliant Blue G250; 150 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0; 500 mM 6-Aminocapronsäure; 30 % Saccharose) versehen (Abbildung 19). Das im SDS-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol sowie die Hitzeeinwirkung sollten ebenfalls die Dimerbildung verhindern bzw. reversibel machen. Alle Proben wurden zum Vergleich auf eine 15%ige SDS-PAGE geladen. Zusätzlich wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt, wobei die Membran zunächst mit dem PflB-Antikörper behandelt wurde. Nach erfolgreichem Antikörper-*Stripping* (2.7.10.3) wurde dieselbe Membran noch einmal mit dem His-Antikörper inkubiert.

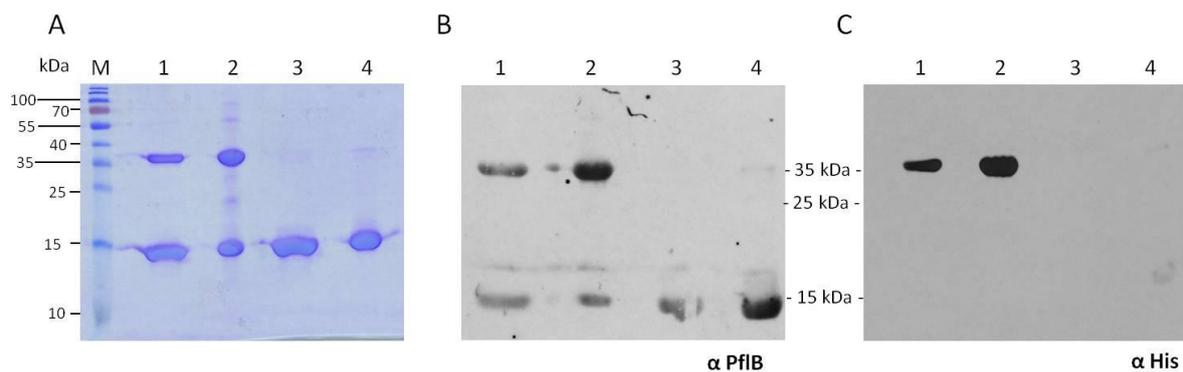


Abbildung 3.19: Dimerbildung des Glycylradikalenzyms GrcA. (A) 15%iges Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel; (B) Immunoblot-Detektion mittels Anti-PflB-Ak; (C) Immunoblot-Detektion mittels Anti-His-AK; aufgetragen wurden jeweils 10 µg via Nickel-NTA gereinigtes GrcA Protein. 1 - inkubiert in SDS-Probenpuffer und anschließend erhitzt für 10 min bei 95 °C; 2 – inkubiert in Nativ-Probenpuffer 3 – mit TCEP behandelt, inkubiert in SDS-Probenpuffer und anschließend aufgeköcht für 10 min bei 95 °C; 4 – mit TCEP behandelt, inkubiert in Nativ-Probenpuffer

In der Abbildung 3.19 A wird ersichtlich, dass nach Behandlung von GrcA mit dem Reduktionsmittel TCEP (Spuren 3 und 4) kaum eine Dimerbande mehr vorhanden war. Dies bestätigte die Annahme, dass die Dimerisierung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen zweier Proteinen zustande kommt. Selbst das im SDS-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol und das Aufkochen der Probe reichten nicht aus die Dimerbildung zu unterbinden. Bei der Immunoblotdetektion mittels PflB-Antikörper (Abbildung 3.19 B) konnten sowohl die monomere als auch die dimere Form von GrcA nachgewiesen werden. Der Nachweis des Proteins nach der Affinitätschromatographie mittels

Ergebnisse

His-tag spezifischen Antikörper war nicht erfolgreich (Abbildung 3.18 B). Jedoch konnte nach der Ankonzentrierung der Probe die dimere Form von GrcA mit Hilfe des His-tag spezifische Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 3.19 B). Dies lässt vermuten, dass der His-tag in der monomeren Form nicht zugänglich ist, es bei der Dimerisierung aber zu einer Konformationsänderung kommt, bei der der His-tag wieder frei zugänglich zu werden scheint.

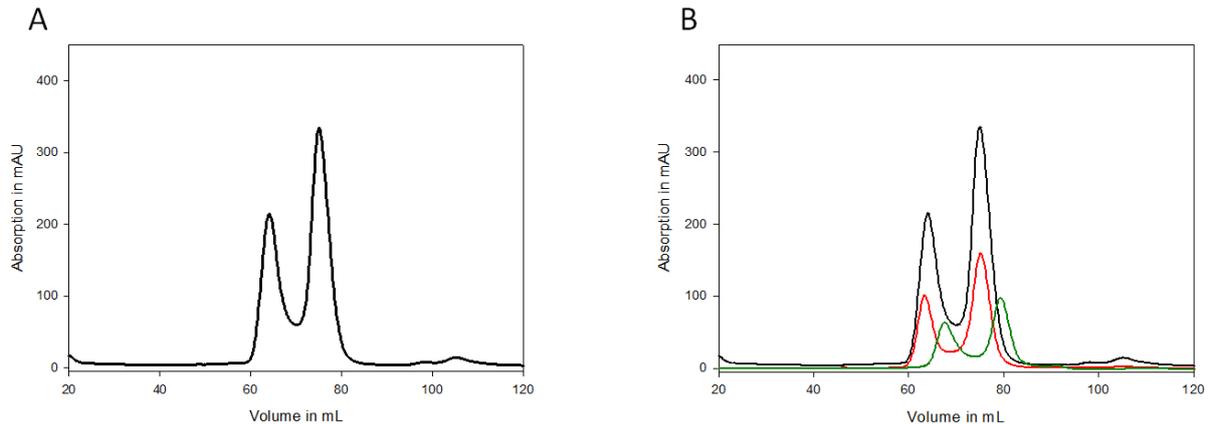


Abbildung 3.20: Rechromatographie des GrcA Proteins mittels SEC (A) SEC mit Superdex 75 (16/60), aufgetragene Proteinkonzentration 8 mg/ml (B) Rechromatographie des SEC aus (A) mit Superdex 75 (16/60) ; schwarz = erste SEC von GrcA, rot = Rechromatographie des ersten Peaks, grün = Rechromatographie des zweiten Peaks. (Abb. bereitgestellt von Dr. Michael Schöpfel)

Für die Kristallisationsversuche wurde GrcA nach der Affinitätschromatographie über die *HiLoad*TM SuperdexTM 75 Säule (GE Healthcare, München) gegeben, um mögliche Aggregationen und niedermolekulare Moleküle wie Nukleotide zu entfernen (2.7.7). Dafür wurde die Probe im Vorfeld auf ein Volumen kleiner als 5 ml konzentriert. Das dazugehörige Chromatogramm wies zwei Peaks auf, die aufgrund ihres Retentionsvolumens dem Dimer bzw. Monomer von GrcA entsprechen könnten (Abbildung 3.20 A). Offensichtlich scheint es sich hier um eine konzentrationsabhängige Dimerbildung zu handeln. Weiterhin lässt sich bei der Betrachtung von Abbildung 3.19 A vermuten, dass Monomer und Dimer ein Gleichgewicht auszubilden scheinen. Um diese Thesen weiter zu bestätigen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Schöpfel eine Rechromatographie der erhaltenen Peaks aus Abbildung 3.20 A durchgeführt. Dazu wurden die erhaltenen Fraktionen der einzelnen Peaks jeweils vereinigt, anschließend auf eine Proteinkonzentration von etwa 8 mg/ml konzentriert und für 16 h bei 4 °C inkubiert. Beide Peaks wurden erneut getrennt voneinander über die *HiLoad*TM SuperdexTM 75 Säule (GE Healthcare, München) gegeben.

Ergebnisse

Die Rechromatographierung ergab schließlich, dass beide Peaks wieder in je zwei Peaks separierten (Abbildung 3.20 B). Dabei war das Retentionsvolumen der Proteine aus der ersten Fraktion, welche dem Dimer entspricht, identisch mit dem ersten Chromatogramm. Die Elution der Proteinfraction, die dem Monomer-Peak entspricht, erfolgte hingegen leicht versetzt, was auf eine Konformationsänderung des Monomers hindeuten könnte. In jedem Fall konnte bestätigt werden, dass die Dimerbildung von GrcA konzentrationsabhängig ist und sich dabei ein Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer einzustellen scheint.

3.3.3 GrcA zeigt überwiegend einen α -helikalen Anteil

Nachdem GrcA annähernd bis zur Homogenität mittels Affinitätschromatographie angereichert wurde, konnten Experimente durchgeführt werden, die zur Aufklärung der Struktur des Proteins beitragen sollten. Zunächst sollten mittels CD-Spektroskopie Hinweise zur Sekundärstruktur erhalten werden. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 0,25 mg/ml und das Protein lag in einem zuvor für die Messung optimierten CD-Puffer (1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0, 50 mM NaCl) vor. Mittels Analytischer Ultrazentrifugation konnte ermittelt werden, dass es sich bei dieser Proteinkonzentration um ein Monomer handelt (persönliche Information PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biotechnologie, MLU, Halle-Wittenberg). Die Werte wurden, wie in 2.9.2 beschriebenen, berechnet und graphisch dargestellt und mit Hilfe der Datenbank K2D2 (<http://k2d2.ogic.ca/>) berechnet. Dabei wurde ein α -helikaler Anteil von 84,27 % und ein β -Faltblattanteil von 1,24 % vorausgesagt.

Auch der erhaltene Kurvenverlauf weist auf einen hohen α -helikalen Anteil hin (Abbildung 3.20). Dies zeigt sich an den beiden Minima bei 210 nm und 220 nm, welche charakteristisch für ein Protein mit überwiegend α -Helices sind (Kelly *et al.*, 2005).

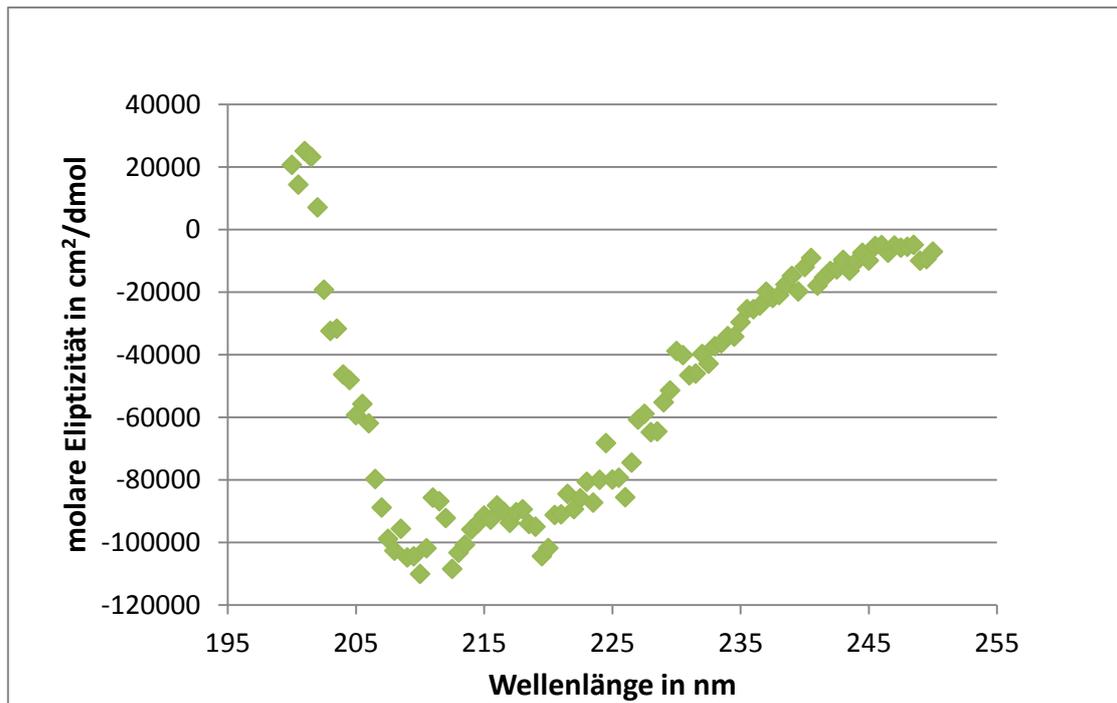


Abbildung 3.21: CD-Spektrum von GrcA aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml in einem Wellenlängenbereich von 195 bis 250 nm, in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm.

3.3.4 Untersuchungen zur Struktur von GrcA mittels Röntgenstrukturanalyse

Um die atomare Struktur von GrcA aufzulösen, wurden in Kooperation mit der Physikalsichen Biochemie (Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU, Halle-Wittenberg) Kristallisationsversuche durchgeführt. Bei der Kristallisation von GrcA mit der *Vapor-diffusion*-Methode im *96-well*-Format wurden eine Vielzahl von Bedingungen sowie Konzentrationen getestet (verwendete *Screening Kits* siehe Anhang A1). Nach einer Woche Inkubation bei 16 °C zeigten sich in verschiedenen Ansätzen Kristalle in unterschiedlichen Formen (Abbildung 3.22). Dabei erwiesen sich PEG 1500, PEG 3350, PEG 6000 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als geeignete Präzipitanten für die Kristallisation von GrcA.

Ergebnisse

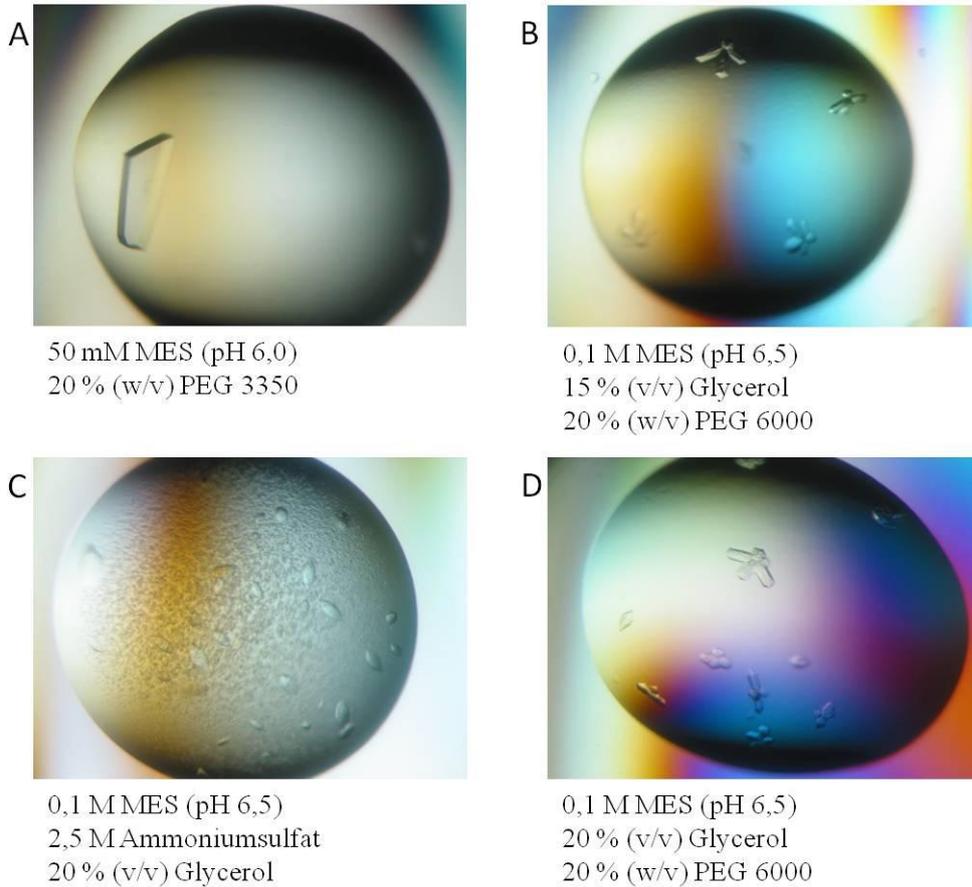


Abbildung 3.22: Kristalle von GrcA im 96-well-Format dargestellt mit den jeweiligen Bedingungen.

Der native Datensatz streut bis zu einer Auflösung von 1,7 Å (siehe Tabelle A5). Das Programm PHENIX*autosol* konnte die Positionen von vier Iodionen in der asymmetrischen Einheit identifizieren und die initiale Dichte für diese Iodionen berechnen. Mit Hilfe dieser initialen Dichte konnte ein initiales Modell von GrcA gebaut werden. Dieses wurde wiederum in den nativen Datensatz eingesetzt und PHENIX*autobuild* baute das initiale Strukturmodell aus dem nativen Datensatz. Dabei fehlen die Aminosäuren GGQHLNV ab Position 69 bis 75 sowie die letzten 18 Aminosäuren am C-Terminus, was für eine hohe Flexibilität dieser Regionen spricht.

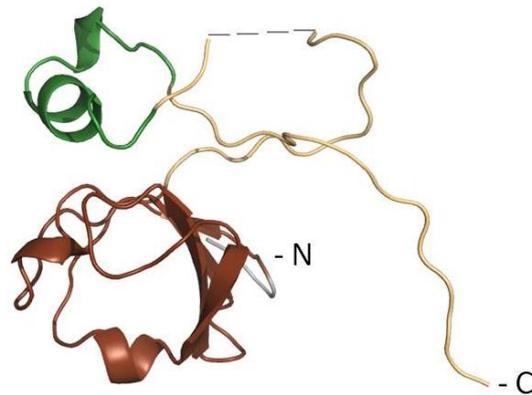


Abbildung 3.23: Darstellung der monomeren Struktur von GrcA. Gekennzeichnet sind der N- sowie der C-Terminus. Die gestrichelte Linie stellt eine nicht aufgelöste *Loop*-Region von Aminosäure 69 bis 75 dar. Die farbliche Gestaltung zeigt die Einteilung in die verschiedenen Domänen. Braun = Domäne 1; Grün = Domäne 2; Beige = *Loop*-Regionen, Grau = Überhang am N-Terminus nach TEV-Spaltung

Die erhaltene Struktur kann in zwei Domänen unterteilt werden, welche durch eine *Loop*-Region verbunden sind. Die erste Faltungseinheit, in Abbildung 3.23 braun dargestellt, geht vom Start-Methionin bis zum Glu-56. Sie umfasst ein β -Faltblatt und zwei kurze α -Helices. Es folgt eine *Loop*-Region. Ab dem Arg-79 bis zum Gln-95 erstreckt sich die zweite Domäne, welche in der Abbildung 3.23 grün dargestellt ist. Sie schließt eine α -Helix sowie den Ansatz einer weiteren α -Helix ein. Anschließend kommt erneut eine *Loop*-Region, welche bis zur Position Ser-109 aufgelöst werden konnte und damit das Glycin, in welches durch PflA das Radikal eingebaut wird, beinhaltet. Interessanterweise scheint also der für die Aktivierung des Proteins notwendige Teil strukturell flexibel zu sein.

Strukturvergleiche mit Hilfe der Datenbank *DALI* haben ergeben, dass die N-terminale Domäne von GrcA strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Hfq-Protein aus *E. coli* zeigt (persönliche Information Prof. M. Stubbs). Hfq stimuliert RNA-RNA-Bindung und ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Hfq besitzt Ähnlichkeit zu den sm-ähnlichen Proteinen aus Säugern (Moller *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2002).

Die Aminosäuresequenz des C-Terminus ab Position 696 von PflB hat eine sehr hohe Ähnlichkeit zu der von GrcA (Abbildung 1.7). Jedoch zeigte ein Vergleich der Struktur beider Proteine (Abbildung 3.24), dass diese in diesem Bereich sehr unterschiedlich sind. Dafür wurde der Bereich Glu-696 bis Met-760 von PflB mit dem Bereich Pro-58 bis Ser-106 von GrcA mit dem Programm *pymol* analysiert. Hierbei handelt es sich um ein strukturbasiertes *Alignment*, was unabhängig von der Sequenz durchgeführt wurde. Der RMSD-Wert (*Root Mean Square Deviation*) des Alignments lag bei 1,958 Å.

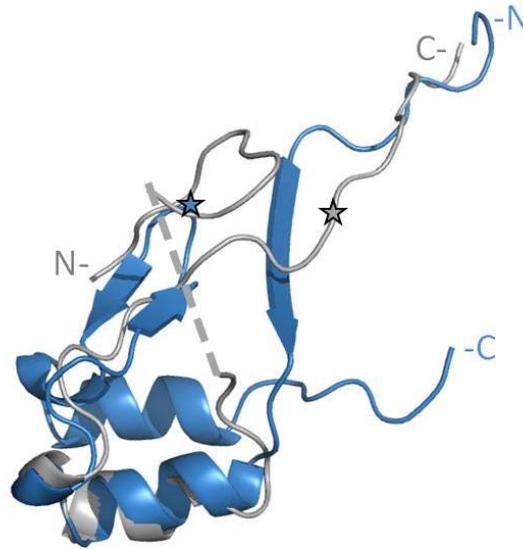


Abbildung 3.24: Strukturelles Alignment der sequenzhomologen Bereiche von GrcA mit PflB. Verglichen wurde der Bereich Glu-696 bis Met-760 von PflB (blau) (pdb: 2PFL; Becker *et al.*, 1999) mit dem Bereich Pro-58 bis Ser-106 von GrcA (grau) (RMSD = 1,958 Å). Gekennzeichnet sind die jeweiligen N- und C-Termini. Grau gestrichelte Linie = nicht aufgelöste *Loop*-Region von GrcA; Sterne kennzeichnen jeweils die Position des Glycyradikals.

Es fällt auf, dass große Teile der Kristallstruktur von GrcA unstrukturiert vorliegen. Betrachtet man nun innerhalb der erhaltenen Kristallstruktur das symmetrieverwandte Molekül (Abbildung 3.25), so wird ersichtlich, dass der C-Terminus eines Moleküls die Struktur in der nicht vollständig aufgelösten *Loop*-Region des benachbarten Moleküls durchspannen könnte. Möglicherweise kommt es auf diese Art zur Bildung eines Dimers. Dabei scheinen sich die Glycine beider Monomere, welche nach der Aktivierung durch die Aktivase PflA das Radikal tragen, unmittelbar gegenüber zu liegen. Anders als durch vorhergehende Experimente vermutet, wurden hierbei nun Hinweise erhalten, dass eine mögliche Dimerbildung nicht durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen zustande kommt. Das Cystein eines Moleküls liegt zum Cystein des symmetrieverwandten Moleküls räumlich weit entfernt. Dies erschwert somit eine Bindung einzugehen und bestätigt somit das Ergebnis der Rechromatographie (Abbildung 3.20). Möglicherweise kommt es jedoch auch zur Ausbildung zweier unterschiedlicher Dimere.

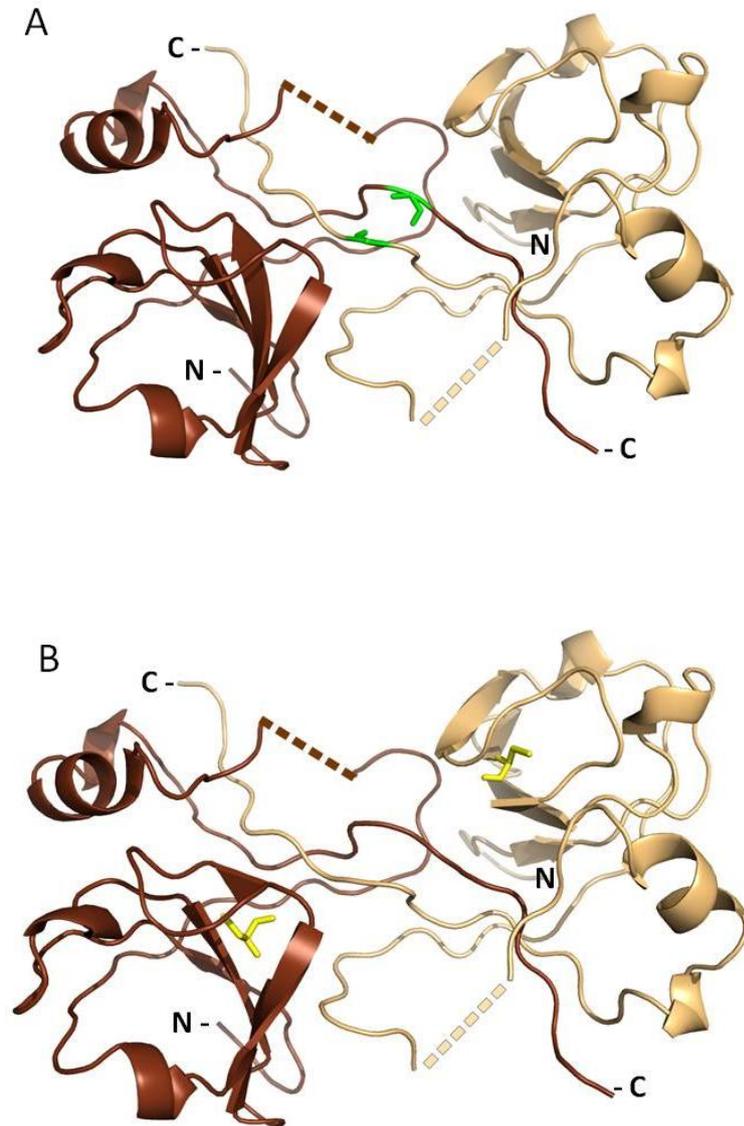


Abbildung 3.25: Darstellung des Dimers von GrcA Braun dargestellt ist ein GrcA-Molekül, welches an der unvollständigen *Loop*-Region vom C-Terminus der symmetrieverwandten Moleküls (beige) durchspannt wird. (A) Dabei sind die Glycine (grün) beider GrcA-Monomere, die das Glycylradikal bei der Aktivierung beinhalten, gegenüber lokalisiert. (B) Die Cysteine (gelb) beider GrcA-Monomere liegen zu weit entfernt voneinander, so dass die Ausbildung einer Disulfidbrücke nicht möglich scheint.

Das in Punkt 3.3.3 erhaltene CD-Spektrum für die Sekundärstruktur von GrcA zeigte hauptsächlich einen α -helikalen Anteil. Die erhaltene Kristallstruktur umfasst ein β -Faltblatt mit vier Strängen, eine α -Helix sowie mehrere Ansätze für α -Helices. Vorrangig zeigte sich jedoch ein großer *Loop*-Anteil in der erhaltenen Struktur. Das CD-Spektrum wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml aufgenommen, während die Kristallisation bei einer Konzentration von 15 mg/ml bzw. 30 mg/ml erfolgte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass GrcA ein von der Proteinkonzentration abhängiges Dimer zu bilden

scheint. Möglicherweise kommt es bei der Dimerbildung zu Konformationsänderung bei GrcA, welche die unterschiedlichen Ergebnisse erklären würden.

3.3.5 GrcA interagiert *in vivo* mit PflB

Bei GrcA handelt es sich um ein Glycyradikalenzym, welches eine hohe Sequenzähnlichkeit zum C-Terminus von PflB aufweist und ebenfalls durch PflA aktiviert wird (Wagner *et al.*, 2001; Wyborn *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte von Wagner *et al.*, 2001 erstmals *in vitro* gezeigt werden, dass GrcA den in Anwesenheit von Sauerstoff abgespaltenen C-Terminus von PflB funktionell komplementieren kann. Bisher gibt es jedoch noch keinen direkten Nachweis für die Interaktion beider Proteine. Ziel war es daher die funktionelle Komplementation von PflB durch GrcA *in vivo* nachzuweisen und *in vitro* mittels *Pull-down*-Assay zu zeigen, dass beide Proteine miteinander interagieren.

Dafür wurden GrcA und PflB, die beide jeweils einen 6xHis-tag besitzen, mittels Affinitätschromatographie gereinigt (2.7.3). Anschließend wurden verschiedene *Pull-down*-Analysen durchgeführt, bei denen jedoch keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Beide Proteine liegen nach der Synthese und Reinigung vorrangig im inaktiven Zustand vor. Nach der Hypothese von Wagner *et al.*, 2001 interagiert jedoch durch Sauerstoff zerfallenes, zuvor aktives PflB mit GrcA. Aus diesem Grund wurde aerob Rohextrakt vom Wildtypstamm MC4100 nach anaerobem Wachstum in LB-Medium gewonnen (2.3.2; 2.7.1) und das *Pull-down*-Experiment erneut mit diesem Rohextrakt und gereinigtem GrcA durchgeführt. Jedoch konnte auch auf diesem Wege keine Interaktion nachgewiesen werden. Auch durch eine Far-Western-Blot-Analyse (durchgeführt nach Wu *et al.*, 2007), bei dem der Rohextrakt von MC4100 auf ein 12,5%iges SDS-PA-Gel aufgetragen wurde und die Membran nach dem Immunoblot mit gereinigtem GrcA inkubiert wurde, konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Offensichtlich sind für die Interaktion beider Proteine Bedingungen notwendig, welche bei den *In-vitro*-Versuchen nicht gegeben waren. Um Hinweise auf diese Bedingungen zu erhalten, wurde im weiteren Verlauf versucht, *in vivo* Anhaltspunkte zur Aufklärung der Interaktion zu bekommen.

Betrachtet man ein SDS-PA-Gel nach der Anreicherung von GrcA mittels Affinitätschromatographie genauer, so wird im Bereich oberhalb der 70 kDa Markerbande eine Doppelbande sichtbar, die ihrer Größe nach PflB entsprechen könnte (Abbildung 3.26). Um diese Annahme zu bestätigen, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, bei der der PflB-Antikörper als primärer Antikörper eingesetzt wurde. Tatsächlich konnte damit eine

Ergebnisse

Bande detektiert werden, die auf gleicher Höhe wie das gereinigte PflB migrierte. Dass es sich bei dieser Bande wirklich um das vermutete PflB Protein handelt, konnte zusätzlich noch einmal durch massenspektrometrische Analysen, durchgeführt von Michael Zorn (AG Sinz, Institut für Pharmazie, MLU, Halle-Wittenberg) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Coelution von PflB bei der Reinigung von GrcA verfestigt die Annahme, dass PflB und GrcA *in vivo* miteinander interagieren.

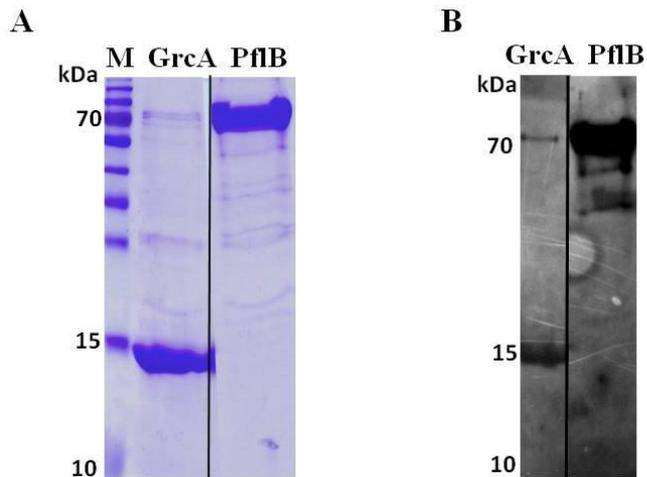


Abbildung 3.26: Coelution von PflB bei der Reinigung von GrcA (A) 15%ige SDS-PAGE Coomassie gefärbt nach Reinigung von GrcA mittels Affinitätschromatographie, gereinigtes PflB wurde zum Vergleich mit aufgetragen; (B) Immunoblot-Detektion nach Western Blot Analyse mit PflB-Antikörper nach 15%iger SDS-PAGE. Die Immunoblot-Detektion von PflB wurde aus Abbildung 3.18 zum besseren Verständnis hier nochmal gezeigt. Aufgetragen wurden bei (A) und (B) jeweils 5,8 µg angereichertes Protein.

Die Coelution von PflB bei der Reinigung von GrcA sollte nun in einem weiteren Experiment gezielt erreicht werden, um damit eine Interaktion beider Proteine *in vivo* zu bestätigen. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3), welcher bereits zur Reinigung von GrcA den pET15b-TEV(*grcA*) Vektor enthält, mit dem Plasmid p29/1 transformiert, welches zusätzlich die Gene *pflB* - *pflA* enthält. Durch die zusätzliche Anwesenheit der Aktivase PflA sollte nun neben aktivem PflB auch vermehrt aktives GrcA in der Zelle vorliegen. Da der Einbau des Glycylradikals und die damit verbundene Aktivierung der Proteine nur unter anaeroben Bedingungen statt findet, wurde der Stamm BL21(DE3)/pET15b-TEV(*grcA*)/p29/1 in zwei parallelen Ansätzen in LB-Medium anaerob bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,8 kultiviert (2.3.3). Anschließend wurde ein Ansatz aerob geerntet und der andere unter strikt anaeroben Bedingungen. Der Zellaufschluss, die Fraktionierung sowie die Reinigung von GrcA mittels Ni²⁺-NTA-Säule geschah für beide Ansätze wieder unter strikt anaeroben Bedingungen.

Ergebnisse

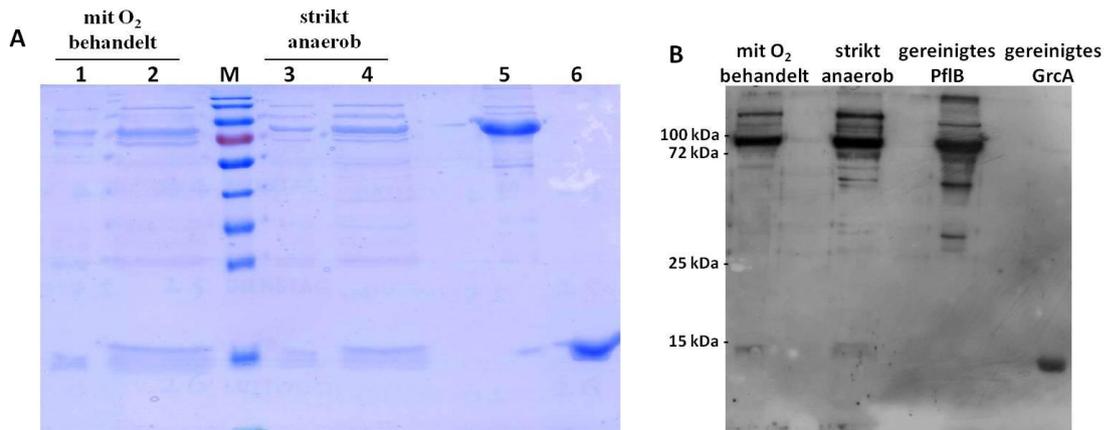


Abbildung 3.27: Coelution von PflB bei der anaeroben Reinigung von GrcA (A) 12,5%ige SDS-PAGE, Coomassie gefärbt; 1 - 1 µg Elutionsfraktion; 2 - 5 µg Elutionsfraktion; Proben in den Spuren 1 und 2 wurden aerob geerntet; M - Prestained Marker Fermentas; 3 - 1 µg Elutionsfraktion; 4 - 5 µg Elutionsfraktion; Proben in den Spuren 3 und 4 wurden anaerob geerntet; 5 - gereinigtes PflB (mit 6xHis-tag); 6 - gereinigtes GrcA (mit 6xHis-tag) **(B)** Immunodetektion nach Western-Blot-Analyse mittels PflB-Antikörper. In Spur 1 und 2 sind jeweils 5 µg der entsprechenden Elutionsfraktion aufgetragen.

Die anaerobe Reinigung von GrcA mit N-terminalem 6xHis-tag, die in Anwesenheit einer größeren Menge an PflB und PflA in der Zelle im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt wurde, zeigte deutliche Coelutionsbanden oberhalb der 70 kDa Markerbande, die auf der Höhe des gereinigten PflBs migrierten (Abbildung 3.27 A). Dass es sich dabei um PflB handelt, konnte mit Hilfe des PflB-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.27 B) gezeigt werden. Interessanterweise zeigte sich bei dem Ansatz, welcher strikt anaerob geerntet wurde, knapp oberhalb der 100 kDa Markerbande eine Proteinbande, welche im aerob geernteten Ansatz nicht nachzuweisen war. Es bestand die Annahme, dass es sich hierbei um die Alkoholdehydrogenase (AdhE) handelt, welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der gemischten Säuregärung spielt. Der Versuch dies mittels AdhE-Antikörper nachzuweisen, fiel jedoch negativ aus.

Auch wenn durch *Pull-down*-Experimente eine direkte Interaktion von GrcA mit PflB *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte, so war es durch die Coelution von PflB bei der Reinigung von GrcA zumindest möglich zu zeigen, dass beide Proteine *in vivo* miteinander interagieren.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente hinsichtlich des Formiatstoffwechsels durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Abbau von Formiat in der Zelle sowie dessen Transport über die Cytoplasmamembran gelegt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse und Datensätze konnten neue Erkenntnisse zur gemischten Säuregärung vermitteln und sollen nun im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Zusammenhänge in der gemischten Säuregärung hinsichtlich des Formiat-Metabolismus

Das Stoffwechselmetabolit Formiat entsteht während der gemischten Säuregärung in *E. coli*. Die Änderung der Konzentration an Formiat in der Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit indirekt über zwei verschiedene Methoden bestimmt. Einmal wurde die Aktivität der β -Galaktosidase durch ein formiatinduziertes *fdhF*⁻-*lacZ*-Konstrukt bestimmt. Zum Anderen wurde die gebildete Menge an Gas als Abbauprodukt von Formiat ermittelt (Gastest mittels Durham-Röhrchen) bzw. die Menge an gebildetem Wasserstoff quantitativ am Gaschromatographen bestimmt. Durch diese Methode wurde die Aktivität des FHL-Komplexes untersucht, was Rückschlüsse auf die interne Formiatkonzentration zuließ.

Bereits Kessler *et al.* postulierten 1991 für das AdhE-Protein neben der Acetaldehyd- und Alkoholdehydrogenase-Funktion eine weitere Pyruvat-Formiat-Lyase-Deaktivase-Funktion. Für die Umsetzung von Acetyl-CoA benötigt AdhE Eisen und NADH+H⁺. Das NADH+H⁺ stammt hierfür aus der Glykolyse. In dieser Arbeit zeigte eine *adhE*-Mutante bei Untersuchungen zur Gasproduktion im Vollmedium unter anaeroben Bedingungen keine Gasproduktion (Abbildung 3.2 und 3.3). Trotz der theoretischen Anwesenheit von aktivem PflB und des FHL-Komplexes, scheint Formiat entweder gar nicht erst aus Pyruvat metabolisiert worden zu sein oder das eventuell entstandene Formiat kann vom FHL-Komplex nicht abgebaut werden. Bisher wurde aktives PflB in einer *adhE*-Mutante jedoch noch nicht nachgewiesen und es stellt sich die Frage, ob PflB bei einer Deletion von *adhE* überhaupt aktiv vorliegt. Bei der Spaltung von Pyruvat entstehen Formiat und Acetyl-CoA. Während Formiat über den FHL-Komplex abgebaut werden kann, könnte Acetyl-CoA im Fall einer *adhE*-Deletion nur noch durch die Phosphat-Acetyltransferase, Pta, und die Acetatkinase, AckA, über Acetylphosphat zu Acetat abgebaut werden (Abbildung 4.1). Dabei kann ein energiereiches ATP generiert werden. Jedoch können auf diesem Weg nicht die beiden NADH+H⁺ aus der Glykolyse reoxidiert werden, was jedoch für den Metabolismus notwendig ist. Auch die *pta*-Mutante zeigte nach anaerober Kultivierung im Vollmedium

Diskussion

keine Gasproduktion. Durch die Deletion des *pta*-Gens wäre ein Abbau von Acetyl-CoA nur noch durch AdhE über Acetaldehyd zu Ethanol möglich. Dabei würden zwar die zwei $\text{NADH}+\text{H}^+$ aus der Glykolyse reoxidiert werden, jedoch würde bei der Energiekonservierung ein ATP fehlen. Da sowohl bei einer *pta*- als auch einer *adhE*-Mutante das Acetyl-CoA nicht mehr vollständig abgebaut werden kann, häuft es sich in der Zelle an. Da es bei beiden Mutanten zu keiner Gasbildung kam, kann vermutet werden, dass das sich anhäufende Acetyl-CoA in der Zelle die PflB negativ beeinflusst.

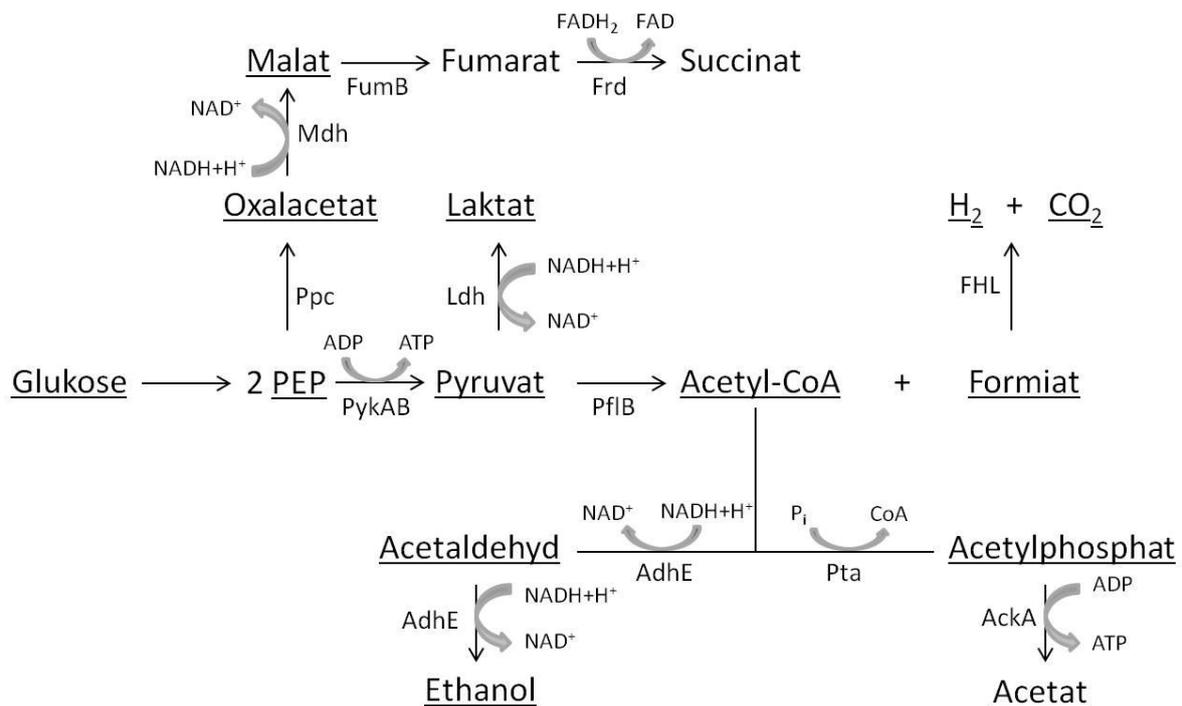


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der gemischten Säuregärung in *E. coli*. Ack: Acetat-Kinase; AdhE: Alkohol-Dehydrogenase; FHL: Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex; Frd: Fumarat-Reduktase; FumB: FumaraseB; Ldh: Laktat-Dehydrogenase; Mdh: Malat-Dehydrogenase; PflB: Pyruvat-Formiat-Lyase; Ppc: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; Pta: Phosphotrans-Acetylase; PykAB: Pyruvat-Kinase.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine *pta*-Mutante bei einem Wachstum mit Glukose unter mikroaerophilen Bedingungen große Mengen an Laktat erzeugt, was durch den Nachweis von inaktivem PflB und einer vermehrten Synthese der Laktat-Dehydrogenase, Ldh, unterstützt wird (Zhu und Shimizu, 2005). Bei der Katalyse von Pyruvat zu Laktat wird auch ein Molekül $\text{NADH}+\text{H}^+$ reoxidiert. Das zweite anfallende Molekül $\text{NADH}+\text{H}^+$ kann bei der Metabolisierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) über Malat und Fumarat zu Succinat reduziert werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass sowohl eine *pta*- als auch eine *adhE*-Mutante das Pyruvat aus der Glykolyse hauptsächlich zu Laktat verstoffwechselt. Weiterhin wird ein Teil des PEPs zu Succinat umgesetzt. Somit könnte die Zelle ihre Redoxbilanz

Diskussion

ausgleichen. Da es dabei gar nicht zur Umsetzung des Pyruvats zu Formiat kommt, kann in einer *adhE*- und *pta*-Mutante auch keine Gasproduktion nachgewiesen werden. Durch eine Analyse des Mediums mittels HPLC nach anaerober Kultivierung der verschiedenen Mutanten könnte man nähere Hinweise erhalten, welches Endprodukt wann und in welchen Konzentrationen vorliegt. Mit diesen Ergebnissen könnten dann Rückschlüsse auf die Aktivitäten der einzelnen Enzyme gezogen werden.

Jedoch scheint nicht nur die Umsetzung von Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA durch PflB in *E. coli* innerhalb der gemischten Säuregärung reguliert zu sein. Auch die Aufnahme von Formiat aus dem Medium durch FocA scheint durch PflB reguliert zu werden, wie man aus den erhaltenen Daten schließen kann. In einem *pflA*-Deletionsstamm kam es trotz Anwesenheit von FocA zu einem reduzierten Formiat-Import gegenüber dem Wildtyp und es konnte eine ähnliche Aktivität wie bei einer $\Delta pflB \Delta pflA$ -Doppelmutante erreicht werden (Abbildung 3.5). Dies lässt vermuten, dass aktives PflB für die Aufnahme von Formiat durch FocA notwendig ist. Bisher ist der genaue Mechanismus der Translokation von Formiat über die Cytoplasmamembran noch unbekannt. Von Lü *et al.*, 2011 wurde eine pH abhängige Konformationsänderung von FocA postuliert, wobei die zentrale Pore geöffnet und wieder geschlossen werden kann. Wang *et al.*, 2009, und Waight *et al.*, 2010, gehen hingegen von einem Transport durch eine Pore des FocA-Protomers aus, der durch eine Protonierung von Formiat durch His-209 angetrieben wird. Alle bisher veröffentlichten Studien zur Klärung des Mechanismus wurden *in vitro* durchgeführt, wo der Transport von Formiat durch gereinigtes FocA in *black-lipid-membranes* in Abwesenheit von PflB untersucht wurde (Wang *et al.*, 2009, Waight *et al.*, 2010, Lü *et al.*, 2011). Es konnte jedoch bereits ein Zusammenhang zwischen der Synthese von FocA und PflB festgestellt und gezeigt werden, dass die Koordination beider Proteine die Spezifität für den Transport von Formiat durch FocA gegenüber anderen Produkten der gemischten Säuregärung preferiert (Beyer *et al.*, 2013). Eine Interaktion der gereinigten Proteine FocA und PflB konnte bereits Dörte Falke in ihrer Diplomarbeit (2010) sowie Dr. Claudia Doberenz in ihrer Dissertation (2013) durch verschiedene Experimente, wie *Pull-down*-Analysen und Untersuchungen mit einem *Bacterial-two-hybrid*-System, nachweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von FocA und die zentrale Domäne von PflB für die Interaktion von Bedeutung sind. Durch *Chemical-cross-linking*-Daten konnten schließlich die Interaktionsstellen zwischen beiden Proteinen identifiziert werden, welche bestätigen, dass der N-Terminus von FocA mit der zentralen Domäne von PflB interagiert (Doberenz *et al.*, 2014). Weiterhin konnten Aminosäuren identifiziert werden, welche an der Translokation von Formiat beteiligt

sind. Den Aminosäuren Leu-79, Phe-202 und Glu-208 kommt dabei eine Bedeutung beim Export von Formiat zu, während die Aminosäuren Thr-91, His-209 und Asn-213 den Import von Formiat zu beeinflussen scheinen (Hunger *et al.*, 2014).

4.2 Mechanismen zur Regulation der internen Formiat-Konzentration

Verschiedene in dieser Arbeit durchgeführte Experimente deuten darauf hin, dass die *E. coli*-Zelle eine zu hohe intrazelluläre Formiat-Konzentration durch verschiedene Mechanismen reguliert um eine Toxifizierung zu vermeiden. Es konnte bereits anhand von Säurespektren gezeigt werden, dass Formiat erst aus der Zelle transportiert wird und schließlich aus dem Medium wieder aufgenommen werden kann (Suppmann und Sawers, 1994). Dafür wurden mittels HPLC-Analysen die Kultivierungsmedien nach anaerobem Wachstum verschiedener *E. coli*-Stämme untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine indirekte Aussage über den internen Formiat Spiegel verschiedener FocA-Varianten durch die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität getroffen werden. Der Abbau von Formiat wurde durch die Messung der gebildeten Wasserstoffmenge am Gaschromatographen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die interne Formiatkonzentrationen in den Stämmen mit Mutation im Startcodon von *focA* DH700 (*focA* GUG \rightarrow UUU), DH703 (*focA* GUG \rightarrow GUC) und dem FocA⁻-Stamm DH701 in ähnlichen Molaritäten vorlag (Abbildung 3.8). Der Stamm DH701 (FocA⁻) war jedoch in der Lage mehr Wasserstoff zu bilden (Abbildung 3.9). Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Fall von DH700 und DH703 eine stark verminderte Synthese von PflB stattfindet, während diese bei DH701 die dem Wildtyp entspricht (Suppmann und Sawers, 1994). Es sollte also im Stamm DH701 mehr PflB vorliegen als in den Stämmen DH700 und DH703 und damit mehr Pyruvat zu Formiat umgesetzt werden können. Im Vergleich zu den Stämmen DH700 und DH703 könnte die geringere β -Galaktosidase-Aktivität und die erhöhte Wasserstoffproduktion, welche beim Stamm DH701 gemessen wurde, damit erklärt werden, dass es sich bei der Wasserstoffproduktion um die gesamte Menge des bisher umgesetzten Formiats handelt und diese aufgrund der Menge an PflB im Stamm DH701 (Suppmann und Sawers, 1994) höher ausfällt. Der Stamm DH704, bei dem das CVVC-Motiv an Position 82 zu einem SVVS-Motiv mutiert wurde, verhielt sich sowohl bei der Wasserstoffproduktion als auch bei der Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe einer *fdhF*[']-*lacZ*-Konstruktes, wie der FocA⁻-Stamm DH701. Es scheint also durch die Mutation der Cysteine zu Serinen kein Formiat-Transport durch FocA mehr statt zu finden. Dies impliziert, dass die beiden Cysteine an den Positionen 82 und 85 für den Transport von Formiat als auch dessen toxischen Analogons Hypophosphit essentiell zu sein scheinen.

Nun wurde zusätzlich eine Transposon-Insertion im *selB*-Gen vorgenommen, was in einer inaktiven Fdh-H resultierte. Die Stämme waren nun unter anaeroben Wachstumsbedingungen nicht mehr in der Lage Formiat abzubauen. Es sollte sich daher in der Zelle anhäufen bzw. ins Periplasma zur Detoxifizierung der Zelle transportiert werden. Alle Stämme zeigten daraufhin eine Wachstumsverzögerung. War ein funktionsfähiges FocA-Protein vorhanden (beim Stamm DH4100 $\Delta selB$ sowie Stamm DH702 $\Delta selB$), wurde im Medium enthaltenes Formiat verstärkt aufgenommen, was in einer drastischen Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität resultiert. Interessant wäre nun die Betrachtung, in welchen Mengen Formiat unter diesen Bedingungen aus der Zelle ins Medium abgegeben wird, da es intrazellulär nicht mehr abgebaut werden kann. Dafür wäre die Analyse des Kultivierungsmediums nach dem anaeroben Wachstum mittels HPLC eine geeignete Methode um Hinweise auf den Export von Formiat zu erhalten.

4.3 In *E. coli* existieren mehrere Transportsysteme für Formiat

Bereits Suppmann und Sawers (1994) konnten bei der Identifizierung des Gens *focA* feststellen, dass, wenn dieses deletiert wurde, noch Formiat-Transport über der Cytoplasmamembran stattfindet. Auch L. Beyer (Diplomarbeit, 2009) und T. Nowak (Bachelorarbeit, 2010) hatten in ihren Abschlussarbeiten, beide angefertigt am Institut für Mikrobiologie in der AG Sawers der MLU, Halle-Wittenberg, die Zielstellung, durch ungerichtete Mutagenese mit Hilfe eines *Tn10*-Transposons und des etablierten *Screening*-Systems mit dem toxischen Formiat-Analogon Hypophosphit, weitere Formiat-Transporter zu identifizieren. Diese, doch sehr aufwendige, Methode führte jedoch nicht zur Identifizierung eines weiteren Transportsystems. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit gezielt Membranproteine ausgewählt, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu FocA oder ihrer bisher bekannten Funktion als mögliche Formiat-Transporter in Frage kommen könnten, und dahingehend untersucht. Das Protein NirC wurde in *E. coli*, als Nitrit-Transporter beschrieben und besitzt eine 44,7%ige Ähnlichkeit zu FocA (Jia und Cole, 2005). Als Mitglied der FNT-Familie lag die Vermutung nahe, dass NirC auch in der Lage sein könnte Formiat zu transportieren. Diese Annahme wurde verstärkt durch die Aussagen von Lü *et al.*, 2012, die durch *In-vitro*-Versuche nachweisen konnten, dass NirC aus *Salmonella typhimurium* neben Nitrit auch Formiat transportieren kann. Die in dieser Arbeit durch *In-vivo*-Versuche in *E. coli* erhaltenen Daten zeigten jedoch, dass NirC nicht am Formiat-Transport beteiligt zu sein scheint. Dies bestätigt noch einmal vorangegangene Arbeiten (Suppmann, 1993). Unabhängig davon konnte durch die durchgeführten *In-vivo*-Versuche die Erkenntnis erlangt werden, dass

Diskussion

die Aktivität des bereits bekannten Formiat-Transportproteins FocA von der Anwesenheit von aktivem PflB abhängt. Offensichtlich hat die Zelle Mechanismen entwickelt, welche die Formiat-Aufnahme und den -Export regulieren. Oftmals liegen die Interaktionspartner der Membranproteine jedoch bei *In-vitro*-Versuchen nicht vor bzw. können die intrazellulären Bedingungen bei *In-vitro*-Versuchen nicht vollständig gegenwärtig sein. Dies könnte erklären, weshalb Lü *et al.*, 2012 einen Formiat-Transport durch NirC in *Salmonella typhimurium* zeigen konnten, der sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch bei *In-vivo*-Versuchen in *E. coli* nicht bestätigen ließ. Da es sich dabei um zwei nah verwandte Organismen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* handelt, sollte die Substratspezifität gleich sein, da sowohl NirC als auch FocA aus beiden Organismen eine sehr hohe Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Möglicherweise wird jedoch die Spezifität von FocA für Formiat *in vivo* eben gerade durch die Anwesenheit des Interaktionspartners PflB erreicht.

Der von Andrews *et al.*, 1997 aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu FocA postulierte mögliche Formiat-Transporter FocB wurde ebenfalls im Zuge dieser Arbeit hinsichtlich seiner Rolle im Formiat-Transport untersucht. Bisher gelang es noch nicht FocB unter geeigneten Bedingungen zu reinigen und für *In-vitro*-Versuche einzusetzen. Mittels RNA-Isolierung und anschließender cDNA-Synthese konnte Transkript von *focB* im Wildtyp und FocA⁻-Stamm nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). M. Heisters konnte in seiner Diplomarbeit (2012) Expressionsbedingungen etablieren, und FocB in großen Mengen in der Membranfraktion nachweisen. Jedoch erwies sich die Solubilisierung und anschließende Reinigung von FocB als schwierig und so konnte das Protein nur in geringen Konzentrationen angereichert werden. Der Einfluss einer *focB*-Deletion hinsichtlich des Formiat-Imports und -Exports konnte in dieser Arbeit gezeigt werden und wurde unabhängig davon auch von M. Heisters (Diplomarbeit, 2012) nachgewiesen. Dies zeigte sich nicht nur in einer Anhäufung des intrazellulär gebildeten Formiats in einer FocA⁻ Δ *focB*-Doppelmutante. Auch eine Δ *focB*-Einzelmutante zeigte, ähnlich eines FocA⁻-Stammes, einen reduzierten Import von Formiat. Es stellt sich die Frage, unter welchen intra- sowie extrazellulären Bedingungen es zur Expression von *focB* kommt. Das Gen *focB* ist im *hyf*-Operon lokalisiert, welches für die Strukturgene der Hydrogenase 4 kodiert (Andrews *et al.*, 1997). Die Transkription des Operons ist abhängig vom Sigmafaktor 54 und wird reguliert durch FNR, FhlA, HyfR und dem cAMP Rezeptorprotein Crp (Skibinski *et al.*, 2002, Self *et al.*, 2004). Die Untersuchungen von Rossmann *et al.*, 1991 zeigten bereits einen cAMP abhängigen Formiat-Transport in *E. coli*, der von L. Beyer in ihrer Diplomarbeit (Beyer, 2009) bestätigt werden konnte. Der cAMP-Spiegel in der Zelle steigt in Abwesenheit von Glukose und ein Komplex

Diskussion

aus cAMP und dessen Rezeptorprotein CRP wirkt schließlich als Transkriptionsaktivator für Gene, die für Proteine zur Aufnahme und Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen kodieren (Wanner *et al.*, 1978, Postma *et al.*, 1993). Daher könnte vermutet werden, dass FocB seiner Rolle als Formiat-Transporter vor allem bei Stresssituationen in der Zelle, wie Stickstoff- oder Glukosemangel oder aber, wie in dieser Arbeit gezeigt, in Abwesenheit des primären Formiat-Transportsystems FocA, einnimmt.

Auch der Succinat-Transporter DauA scheint in der Lage zu sein, unter anaeroben Bedingungen Formiat aus dem Medium in das Cytoplasma zu transportieren (Abbildung 3.15). Karinou *et al.*, 2013, postulierten, dass DauA auch in der Lage ist neben Succinat noch weitere C4-Carbonsäuren zu transportieren und eine geringere Substratspezifität besitzt als der gut charakterisierte Succinat-Transporter DctA. Weiterhin konnte für DauA auch eine Transportaktivität von Succinat unter aeroben Bedingungen nachgewiesen werden (Karinou *et al.*, 2013). Ich konnte bereits in meiner Diplomarbeit (2009) mit Hilfe des formiatinduzierten Reportersystems *fdhF^c-lacZ* zeigen, dass unter aeroben Bedingungen Formiat aus dem Medium in die Zelle aufgenommen wird und schlussfolgerte, dass es einen Formiat-Transporter geben muss, der auch unter aeroben Bedingungen aktiv ist. Um zu bestätigen, ob es sich bei diesem Transportsystem um DauA handelt, müssten die in dieser Arbeit durchgeführten β -Galaktosidase-Assays auch unter aeroben Bedingungen durchgeführt werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob neben FocA, FocB und DauA noch weitere Membranproteine in der Lage sind Formiat über die Cytoplasmamembran zu transportieren. Im Organismus *Clostridium difficile* wurde durch genetische und biochemische Untersuchungen ein Hydrosulfid-Ionen-Kanal (HSC) identifiziert, welcher *in vitro* auch permeabel für Formiat und Nitrit ist (Czyzewski und Wang, 2012). Die Kristallstruktur von HSC ergab ein Pentamer und es wurde wie für FocA ein Aquaporin-ähnlicher Kanal beschrieben. Auch bei HSC bildet sich eine Engstelle in einer Pore des Protomers, wobei das Thr-90 von *E. coli* und *V. cholera* in *C. difficile* an Position 84 ist. Daher wurde HSC aus *C. difficile* von Czyzewski und Wang, 2012, als konservierter Ionenselektivitätsfilter beschrieben, der eine Polyspezifität für verschiedene Substrate aufweist. In *E. coli* ist ein solcher Kanal für Hydrosulfid-Ionen nicht bekannt. Jedoch wäre eine Polyspezifität in *E. coli*, wie sie bereits für DauA gezeigt werden konnte, auch für weitere Ionenkanäle denkbar.

Es scheint also, dass es verschiedene Transporter bzw. Kanäle in den fakultativ anaeroben Organismen gibt, die Formiat über die Cytoplasmamembran translozieren können. Die bisher

veröffentlichten Arbeiten konnten dabei häufig einen unspezifischen Transport von Formiat durch ein weiteres Protein der FNT-Familie mittels *In-vitro*-Versuche zeigen (Lü *et al.*, 2012; Czyzewski und Wang, 2012). Jedoch konnte auch im Rahmen dieser Arbeit der Formiat-Transport durch FocA abhängig von der Anwesenheit von PflB bestätigt werden. Möglicherweise reagiert PflB dabei als Regulator des Formiat-Im- und Exports und ermöglicht somit einen spezifischen Transport von Formiat, der bei *In-vitro*-Versuchen nicht gegeben ist. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass Formiat in der Lage zu sein scheint, unspezifisch durch verschiedene Kanäle ex- und wieder reimportiert zu werden. Ist jedoch PflB, das Enzym, welches Formiat aus Pyruvat metabolisieren kann, vorhanden, scheint der Export und Reimport durch PflB reguliert zu werden. Dass die Zelle mehrere Mechanismen entwickelt hat um Formiat ins Periplasma zu transportieren, ist für das Überleben der Zelle unter anaeroben Bedingungen mit Sicherheit von Vorteil. Durch die Anhäufung von Formiat im Cytoplasma senkt sich der pH-Wert soweit ab, dass eine Vielzahl von stoffwechselrelevanten Enzymen nicht mehr aktiv sind. Die Zelle würde so absterben. Von daher ist es fraglich, ob *E. coli* ohne funktionierendes Transportsystem für Formiat unter anaeroben Bedingungen überhaupt lebensfähig wäre.

4.4 Welche Rolle nimmt TdcE im Formiat-Metabolismus ein?

Bei der 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase TdcE handelt es sich um ein Glycylradikalenzym, welches ebenfalls durch die Aktivase PflA aktiviert wird (Hesslinger *et al.*, 1998a). Neben der Umsetzung von 2-Ketobutyrat zu Propionyl-CoA und Formiat während des Abbaus von Threonin kann TdcE auch in Abwesenheit von PflB dessen Funktion zum Teil übernehmen (Sawers *et al.*, 1998). Für TdcE gelten dabei Pyruvat und 2-Ketobutyrat gleichermaßen als Substrat, wohingegen für PflB Pyruvat das bevorzugte Substrat darstellt (Hesslinger *et al.*, 1998a). TdcE ist daher nicht in der Lage, eine *pflB*-Mutante vollständig zu komplementieren (Sawers *et al.*, 1998). Unklar ist bisher jedoch, ob dies daran liegt, dass TdcE aufgrund seiner Regulation nicht in ausreichender Menge synthetisiert wird um PflB vollständig zu komplementieren. In dieser Arbeit wurde eine indirekte Aussage über die interne Formiat-Konzentration durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität mit dem *fdhF'*-*lacZ*-Konstrukt getroffen, welches nur durch Formiat induziert wird. Dabei zeigte ein Stamm, welcher neben den Deletionen von *focA* und *pflB* auch im Gen *tdcE* deletiert war, eine geringere Aktivität nach anaerober Kultivierung im Vollmedium als ein Stamm, der lediglich einen Δ *focA* Δ *pflB*-Genotyp aufweist. Durch die Anwesenheit von PflA in beiden Stämmen, lag TdcE im Δ *focA* Δ *pflB*-Stamm aktiv vor und konnte das aus der Glykolyse stammende Pyruvat zu Formiat

Diskussion

umsetzen. Dies belegt die Aussage von Sawers *et al.*, 1998, dass TdcE in Abwesenheit von PflB dessen Funktion zum Teil übernehmen kann.

Wurde die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Kultivierung im Vollmedium mit 50 mM Formiat durchgeführt, zeigte ein $\Delta focA \Delta pflB \Delta tdcE$ -Stamm nur etwa ein Fünftel der Aktivität verglichen mit einem $\Delta focA \Delta pflB$ -Stamm, welcher zudem noch ein aktives TdcE-Protein besitzt (Abbildung 3.6). Damit konnte gezeigt werden, dass auch aktives TdcE an der Regulation der Formiat-Aufnahme beteiligt zu sein scheint. Es steht also in *E. coli* das Enzym, welches vorrangig Formiat metabolisiert (PflB), in direkter Verknüpfung mit dem primären Formiat-Transporter (FocA). Möglich wäre nun, dass ein weiteres Transportsystem auch durch ein Pyruvat-metabolisierendes Enzym reguliert wird. Aufgrund der erhaltenen Daten könnte in Betracht gezogen werden, dass es sich dabei um die alternative Pyruvat-Formiat-Lyase TdcE handelt.

4.5 Strukturelle Analyse des Glycylradikalenzym GrcA

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es das Glycylradikalenzym GrcA zu reinigen. Dabei wurden Hinweise auf eine mögliche Dimerbildung des Proteins erhalten. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte anschließend die Kristallstruktur des Proteins gelöst werden. Diese wies ebenfalls auf eine konzentrationsabhängige Dimerbildung hin. Es gelang schließlich einen möglichen Interaktionspartner von GrcA, die Pyruvat-Formiat-Lyase PflB, durch Coelution des Proteins nachzuweisen. Dies ist ein Hinweis auf eine Interaktion beider Proteine miteinander.

Die Kristallstruktur von GrcA zeigte in dem Bereich, welcher eine hohe Sequenzähnlichkeit zum C-Terminus von PflB aufweist, hauptsächlich eine *Loop*-Region, die teilweise nicht vollständig aufgelöst werden konnte. Auch das Glycin, welches nach der Aktivierung durch PflA das Radikal trägt, befindet sich in einem *Loop*-Bereich. Eine *Loop*-Region in einer Kristallstruktur spricht häufig für einen strukturell flexiblen Bereich. Eine flexible Struktur wiederum kann die Interaktion mit einem weiteren Protein erleichtern. Ein Alignment zwischen dem C-Terminus von PflB und GrcA hat kaum strukturelle Übereinstimmungen ergeben. Jedoch könnte GrcA im Stoffwechsel noch weitere Aufgaben haben und die strukturell flexiblen Bereiche ermöglichen eine Interaktion mit verschiedenen Proteinen. So konnte mittels Strukturalignment mit dem Programm *DALI* eine Ähnlichkeit der Domäne 1 von GrcA mit dem RNA-Bindeprotein Hfq aus *E. coli* festgestellt werden (persönliche Mitteilung Prof. Milton Stubbs). Da die zweite Domäne aus der erhaltenen Kristallstruktur zur Aminosäuresequenz von PflB ab dem Glutamat an Position 696 homolog ist, wäre es

Diskussion

außerdem denkbar, dass die Domäne 1 für die Interaktion von PflB und GrcA von Bedeutung ist.

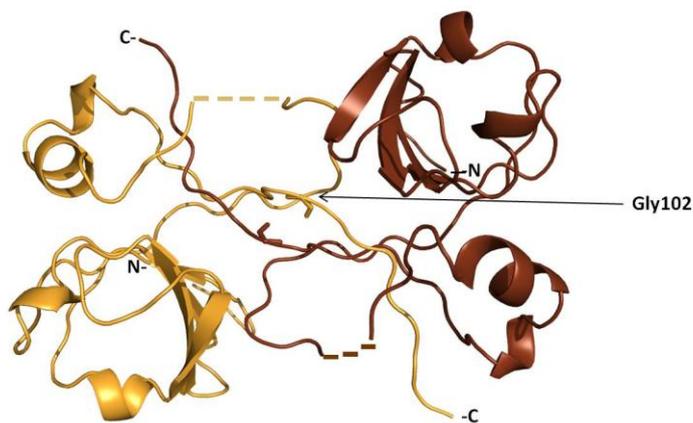
Die Betrachtung des symmetrieverwandten GrcA-Moleküls innerhalb des erhaltenen Kristalls zeigte ein Dimer, wobei der C-Terminus eines Moleküls die C-terminale *Loop*-Struktur des benachbarten Moleküls zu stabilisieren scheint. Dabei zeigt die erhaltene Struktur, dass sich die beiden zur Aktivierung notwendigen Glycine gegenüberliegen. Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit außerdem gezeigt werden, dass es sich um eine konzentrationsabhängige Dimerbildung zu handeln scheint. Da die konzentrationsabhängige Dimerbildung jedoch unter der Verwendung von TCEP als Reduktionsmittel nicht stattfand, kann dieses Dimer nicht durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen je einem Cystein von GrcA entstanden sein. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch außerdem gezeigt werden, dass der Einsatz eines Reduktionsmittels durchaus die Dimerbildung verhindert, was für eine Bindung zwischen den Cysteinen spricht. Daher ist es denkbar, dass es sich um zwei verschiedene dimere Formen handelt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob es auch in der Zelle zu einer Dimerbildung von GrcA kommt. Da bisher noch keine weitere Funktion von GrcA neben der funktionellen Komplementation von PflB ermittelt werden konnte (Wagner *et al.*, 2001), ist auch noch unklar, ob GrcA überhaupt als Dimer für die Zelle notwendig ist. Für eine Dimerbildung, wie sie anhand der Kristallstruktur beobachtet wurde, spricht der Schutz des Glycins, welches für die Aktivierung notwendig ist (Wyborn *et al.*, 2002). Geht man jedoch von einer Bindung von GrcA mit PflB aus, um dieses funktionell bei Sauerstoffstress zu komplementieren, wäre ein GrcA-Dimer nicht nötig. Bei der Aktivierung des Homodimers PflB wird nur ein Monomer durch PflA aktiviert (Knappe *et al.*, 1984). Demzufolge müsste auch nur ein GrcA-Molekül mit einem Monomer des Homodimers für die funktionelle Komplementation interagieren. Um darüber mehr Hinweise zu erhalten, müssten zukünftig Interaktionsstudien mit den unterschiedlichen Varianten von PflB (inaktiv, aktiv, deaktiviert durch O₂) durchgeführt werden. Anschließend müsste mittels Massenspektrometrie analysiert werden, welche Proteinkomplexe wie interagieren.

Möglich wäre auch, dass es bei der durch die Kristallstruktur erhaltenen Dimerform zu einem *domain-swapping* kommt. Als solches bezeichnet man die evolutionäre Entwicklung von Monomeren zu Dimeren bzw. Oligomeren. Die Bildung von Proteinoligomeren kann für die Zelle verschiedene Vorteile haben. Es kommt zu einer Konzentration der aktiven Zentren in der Zelle bzw. bildet sich durch das *domain-swapping* das aktive Zentrum durch die Zusammenlagerung diverser Untereinheiten manchmal erst aus (Liu und Eisenberg, 2002).

Diskussion

Weiterhin besteht die Möglichkeit der allosterischen Kontrolle auf diese Art und Weise. Letztendlich stellt das *domain-swapping* eine ökologische Variante für die Zelle dar, große Proteine zu produzieren (Liu und Eisenberg, 2002). Es werden drei verschiedene Arten des *domain-swapping* unterschieden. Zum Einen kann es zum Austausch einer gesamten Domäne kommen, wie es bei dem Protein Crystallin aus dem Auge bekannt ist (Bax *et al.*, 1990). Eine weitere Möglichkeit ist der Austausch von Supersekundärstrukturen, wie bei Hsp33, einem Chaperon, sowie der Austausch einzelner Sekundärstrukturelemente. Dies ist zum Beispiel von der RNase 1 bekannt (Liu *et al.*, 1998). Im Fall von GrcA wäre ein Austausch der gesamten zweiten Domäne denkbar.

A



B

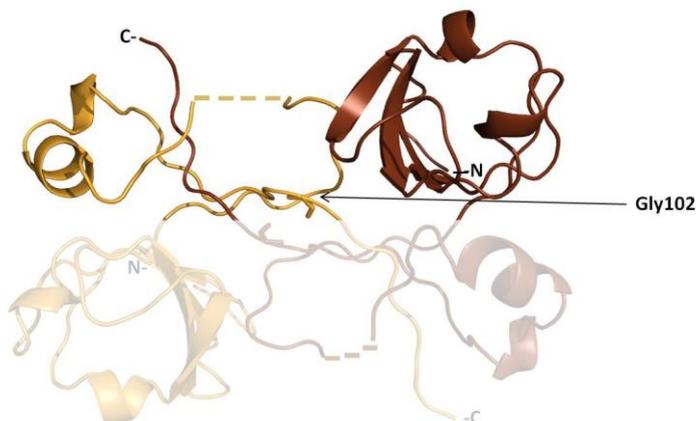


Abbildung 4.2: Das Protein GrcA als mögliches *swapped dimer*. Die ursprünglichen Monomere sind jeweils braun und orange dargestellt. Gekennzeichnet sind sowohl der N- als auch der C-Terminus beider Proteine sowie das Glycin an Position 102 für die Aktivierung von GrcA. Abbildung (A) zeigt die Kristallstruktur des Dimers von GrcA. In Abbildung (B) ist das *swapped dimer* dargestellt. Die Domäne 1 des braun angefärbten Monomers stellt mit der Domäne 2 des orange angefärbten Monomers ein Protein dar.

Diskussion

Das *grcA*-Gen kommt nicht nur in *E. coli* vor, sondern auch in weiteren *Enterobacteriaceae* wie *Salmonella* und *Citrobacter*. Dabei handelt es sich immer um fakultative Anaerobier, die wie *E. coli* eine Pyruvat-Formiat-Lyase haben. Die Aminosäuresequenz ist dabei in allen Organismen nahezu identisch. Sie weicht lediglich bei *Serratia* und *Yersinia* etwas ab (Abbildung 4.3 (A)). Die Region um das Glycin an Position 102 ist jedoch in allen *Enterobacteriaceae* hoch konserviert. Damit ist wahrscheinlich, dass GrcA auch dort die Funktion des „Rettungsankers“ bei Sauerstoffstress für die Pyruvat-Formiat-Lyase vermittelt. Möglicherweise haben Bakterien, welche sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen leben können, einen Mechanismus entwickelt, der es ihnen ermöglicht bei Sauerstoffstress in anaeroben Habitaten den anaeroben Stoffwechsel aufrecht zu erhalten.

4.6 Modell zum Formiat-Stoffwechsel

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen sich wie folgt in einem Modell zusammenfassen (Abbildung 4.4; Abbildung 4.5). Das nach der Glykolyse anfallende Pyruvat kann durch PflB in Formiat und Acetyl-CoA disproportioniert werden. Das Glycylradikalenzym PflB wurde zuvor von der Aktivase PflA aktiviert. Weiterhin interagiert PflB mit dem Formiat-Transportprotein FocA. Somit kann das entstandene Formiat sich nicht in der Zelle anhäufen und wird zur Detoxifizierung durch FocA gleich ins Periplasma transportiert.

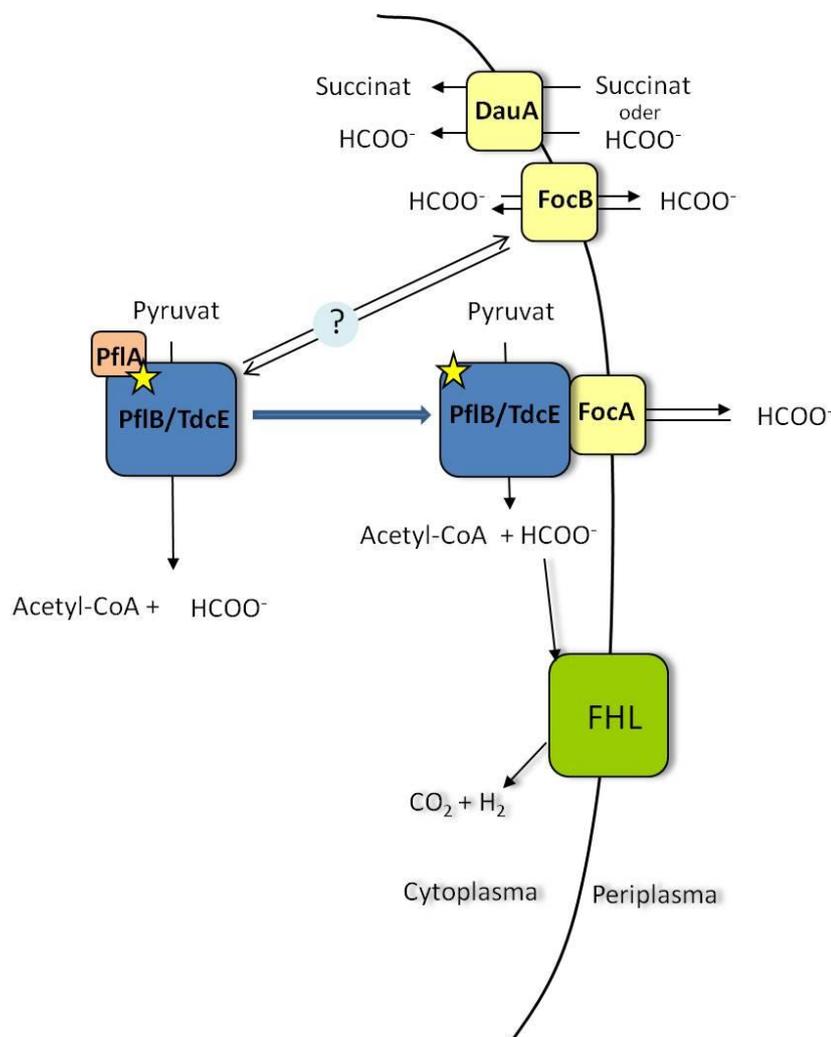


Abbildung 4.4: Modell zum Formiat-Stoffwechsel in *E. coli*. Formiat entsteht neben Acetyl-CoA aus Pyruvat durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (PflB), welche zuvor durch eine Aktivase (PflA) aktiviert wurde. Das Formiat im Cytoplasma kann durch die Formiat-Transporter FocA und FocB ins Periplasma transportiert werden. Der Reimport von Formiat aus dem dem Periplasma kann durch FocA und FocB sowie durch den Succinat-Transporter DauA erfolgen. Intrazelluläres Formiat kann durch den Formiat-Hydrogen-Lyase Komplex (FHL) in Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut werden. Die 2-Ketobutyrat-Lyase TdcE kann bei Abwesenheit von PflB deren Funktion zum Teil ersetzen. Aktives TdcE ist ebenfalls an der Regulation des Formiat-Transports beteiligt, wobei noch unklar ist, ob es mit FocB möglicherweise interagiert.

Diskussion

Die 2-Ketobutyrat-Lyase TdcE kann die Funktion von PflB teilweise ersetzen, wenn diese nicht vorhanden ist (Sawers *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass aktives TdcE genau wie aktiviertes PflB an der Regulation des Formiat-Transports beteiligt ist. Eine Interaktion von TdcE mit FocB konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Neben FocA konnte die Funktion des Formiat-Transports über die Cytoplasmamembran noch weiteren Membranproteinen zugeordnet werden. So wurde für FocB sowohl Formiat-Export als auch -Import nachgewiesen. Für den Succinat-Transporter DauA konnte Formiat-Aufnahme gezeigt werden.

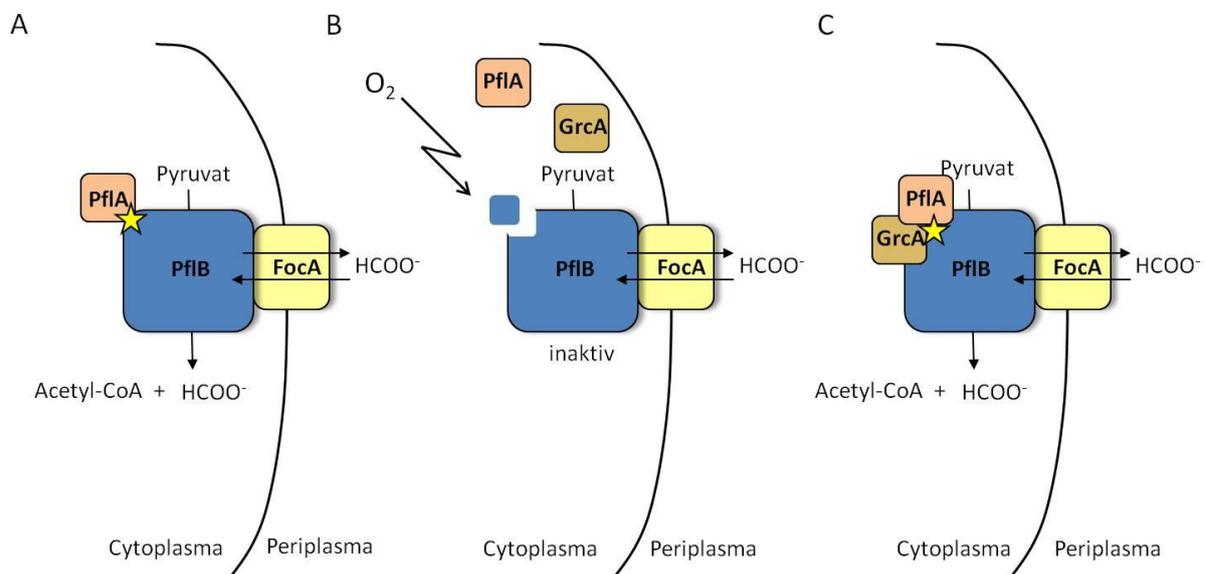


Abbildung 4.5: Modell zur Interaktion von GrcA und PflB (A) Synthese von Formiat und Acetyl-CoA aus Pyruvat durch aktives PflB unter anaeroben Bedingungen. (B) Durch die Anwesenheit von Sauerstoff zerfällt PflB und wird inaktiv. Somit entstehen kein Formiat und Acetyl-CoA mehr. (C) GrcA bindet an PflB und wird durch die Aktivase PflA aktiviert. Somit ist PflB funktionell komplementiert und aus Pyruvat entstehen wieder Formiat und Acetyl-CoA. PflB: Pyruvat-Formiat-Lyase; PflA: Pyruvat-Formiat-Lyase Aktivase; FocA: Formiat-Transportprotein; GrcA: Glycylradikal-Coenzym A; gelber Stern = aktiviert

Bezugnehmend auf die erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Glycylradikal-Cofaktors A (GrcA) wurde das in Abbildung 4.5 dargestellte Modell entwickelt. In Anwesenheit von Sauerstoff zerfällt PflB. Dabei wird der C-Terminus mit dem Glycylradikal abgespalten und PflB liegt inaktiv vor (Knappe und Sawers, 1990). Pyruvat kann nun nicht mehr zu Formiat und Acetyl-CoA abgebaut werden (Abbildung 4.5 B). Das Protein GrcA interagiert mit der 81 kDa großen, inaktiven Variante von PflB. Es wird ebenfalls durch die Aktivase PflA aktiviert. Unklar ist dabei jedoch noch, ob erst eine Bindung und dann die Aktivierung stattfinden oder das bereits aktivierte Protein an PflB bindet. Es ist jedoch wahrscheinlicher,

Diskussion

dass GrcA zunächst an PflB bindet und im Anschluss erst aktiviert wird, da für den Einbau des Glycylradikals zwei Cysteine notwendig sind, GrcA jedoch nur eins besitzt. GrcA komplementiert damit funktionell PflB und Formiat und Acetyl-CoA können wieder aus Pyruvat synthetisiert werden (Abbildung 4.5 C). Da auch für GrcA nachgewiesen werden konnte, dass es in Anwesenheit von Sauerstoff aufgrund des Glycylradikals zerfällt (Wagner *et al.*, 2001), findet der in Abbildung 4.5 dargestellte Mechanismus statt, wenn während des anaeroben Wachstums Sauerstoff in geringen Mengen auftritt.

5 Zusammenfassung

- (1) Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels *In-vivo*-Versuchen gezeigt werden, dass der Formiat-Transport durch FocA in Abhängigkeit von der Anwesenheit von aktivem PflB statt findet.
- (2) Durch die Untersuchung auf Gasproduktion verschiedener *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen Deletionen in Genen, die für Enzyme der gemischten Säuregärung kodieren, wurden Hinweise erhalten, dass sich diese Deletionen auf die unterschiedlichen Wege der gemischten Säuregärung auswirken. Sich anhäufendes Acetyl-CoA scheint dabei die Aktivität von PflB zu beeinflussen.
- (3) Es konnte weiterhin bestätigt werden, dass es in *E. coli* neben FocA noch weitere Transportsysteme für Formiat gibt. Dabei wurde ausgeschlossen, dass der Nitrit-Transporter NirC am Formiat-Transport beteiligt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *focB*-Gens, welches für einen möglichen Formiat-Transporter kodiert, einen Einfluss auf den Import und Export von Formiat in der Zelle besitzt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der Succinat-Transporter DauA in der Lage ist, Formiat in die Zelle zu importieren.
- (4) Die Kristallstruktur des Glycylradikalenzym Cofaktors A (GrcA) konnte bis 1,7 Å aufgelöst werden. Das Protein kann demnach in zwei Domänen unterteilt werden. Dabei wurde ein großer Anteil an *Loop*-Regionen festgestellt. Weiterhin besteht keine strukturelle Ähnlichkeit zu PflB. Bei der Betrachtung des symmetrieverwandten Moleküls konnte eine Dimerbildung festgestellt werden.
- (5) Bei der Anreicherung von GrcA wurde ermittelt, dass es sich um eine konzentrationsabhängige Dimerbildung handelt.
- (6) Durch Affinitätschromatographie von GrcA mittels Ni²⁺-NTA-Sepharose konnte die durch Sauerstoff gespaltene Form von PflB aus Zellextrakt coeluiert werden, was einen weiteren Hinweis auf die Interaktion beider Proteine liefert.

6 Ausblick

- (1) Die Regulation des Formiat-Transports durch TdcE sollte mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten (Kombinationen aus den Deletionen der Gene *tdcE*, *focA*, *focB*, *pflB*) und dem durch Formiat induzierten *fdhF'*-*lacZ*-Konstrukt untersucht werden. Mittels Interaktionsstudien wie *pull-down* oder *far western* sollte eine mögliche Interaktion von TdcE mit FocB erforscht werden.
- (2) Um die Einflüsse einer *adhE*-Deletion auf die Produkte der gemischten Säuregärung zu untersuchen, sollte das Kultivierungsmedium einer *adhE*-Mutante nach anaerobem Wachstum mittels HPLC untersucht und ein Säurespektrum aufgenommen werden.
- (3) Durch die Konstruktion einer Δ *focA* Δ *focB* Δ *dauA*-Mutante könnte mit Hilfe des *fdhF'*-*lacZ* -Konstruktes untersucht werden, ob Formiat noch durch ein weiteres Transportsystem in die Zelle aufgenommen werden kann. Durch HPLC-Analysen des Kultivierungsmediums nach anaerobem Wachstum dieser Mutante wäre eine Aussage über einen noch denkbaren Formiat-Export möglich.
- (4) Um die eventuell außerdem am Formiat-Transport beteiligten Membran-Proteine zu ermitteln, sollte eine Δ *pflB* Δ *focA* Δ *tdcE* Δ *focB* Δ *dauA*-Mutante konstruiert werden. Ist diese Mutante unter anaeroben Bedingungen noch lebensfähig, sollte im Anschluss mittels des *fdhF'*-*lacZ* -Konstruktes untersucht werden, ob noch Formiat-Transport über die Cytoplasma stattfindet und dann ggf. gezielt Transport-Proteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit Formiat zu transportieren untersucht werden.
- (5) Um die Interaktion zwischen GrcA und PflB zu untersuchen, sollten die unterschiedlichen Formen von PflB gereinigt werden und damit unter verschiedenen Bedingungen (z.B. anaerob und/oder in Anwesenheit von PflA) Interaktionsstudien durchgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abaibou, H., Pommier, J., Benoit, S., Giordano, G. und Mandrand-Berthelot, M. A.** (1995) Expression and characterization of the *Escherichia coli* *fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. *J Bacteriol* **177**: 7141-9.
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. und Zwart, P. H.** (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 213-21
- Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. und Guest, J. R.** (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143**: 3633-47
- Angelides, K. J., Akiyama, S. K. und Hammes, G. G.** (1979) Subunit stoichiometry and molecular weight of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 3279-83
- Archer, M., Huber, R., Tavares, P., Moura, I., Moura, J. J., Carrondo, M. A., Sieker, L. C., LeGall, J. und Romao, M. J.** (1995) Crystal structure of desulforedoxin from *Desulfovibrio gigas* determined at 1.8 Å resolution: a novel non-heme iron protein structure. *J Mol Biol* **251**: 690-702
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. und Mori, H.** (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0008
- Babu, M., Greenblatt, J. F., Emili, A., Strynadka, N. C., Reithmeier, R. A. und Moraes, T. F.** (2010) Structure of a SLC26 anion transporter STAS domain in complex with acyl carrier protein: implications for *E. coli* YchM in fatty acid metabolism. *Structure* **18**: 1450-62
- Ballantine, S. P. und Boxer, D. H.** (1986) Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **156**: 277-84
- Baron, C., Heider, J. und Böck, A.** (1990) Mutagenesis of *selC*, the gene for the selenocysteine-inserting tRNA-species in *E. coli*: effects on in vivo function. *Nucleic Acids Res* **18**: 6761-6
- Bates, D. L., Danson, M. J., Hale, G., Hooper, E. A. und Perham, R. N.** (1977) Self assembly and catalytic activity of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *Nature* **288**: 313-6

- Bax, B., Lapatto, R., Nalini, V., Driessen, H., Lindley, P. F., Mahadevan, D., Blundell, T. L. und Slingsby, C.** (1990) X-ray analysis of beta B2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins. *Nature* **347**: 776-80
- Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S. und Volker Wagner, A. F.** (1999) Structure and mechanism of the glycy radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat Struct Biol* **6**: 969-75
- Berg, B. L. und Stewart, V.** (1990) Structural genes for nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **125**: 691-702
- Beyer, L.** (2009) Untersuchungen zum Formiat-Stoffwechsel in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle-Wittenberg
- Beyer, L., Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B. und Sawers, R. G.** (2013) Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol* **195**: 1428-35
- Bielak, C.**(2012) Rolle des HybG Proteins im Reifungsprozess der Hydrogenase 2. Masterarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle-Wittenberg
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. und Zinoni, F.** (1991) Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* **5**: 515-20
- Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C. und Sun, P. D.** (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. *Science* **275**: 1305-8
- Brøndsted, L. und Atlung, T.** (1994) Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 5423-8
- Campos-Bermudez, V. A., Bologna, F. P., Andreo, C. S. und Drincovich, M. F.** (2010) Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. *FEBS J* **277**: 1957-66
- Carrington, J. C. und Dougherty, W. G.** (1988) A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3391-5
- Casadaban, M. J. und Cohen, S. N.** (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4530-3
- Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R. P. und Maklashina, E.** (2002) Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 140-57
- Cherepanov, P. P. und Wackernagel, W.** (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14

- Christiansen, L. und Pedersen, S.** (1981) Cloning, restriction endonuclease mapping and post transcriptional regulation of *rpsA*, the structural gene for ribosomal protein S1. *Mol Gen Genet* **181**: 548-51
- Clegg, S., Yu, F., Griffiths, L. und Cole, J. A.** (2002) The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol Microbiol* **44**: 143-55
- Conradt, H., Hohmann-Berger, M., Hohmann, H. P., Blaschkowski, H. P. und Knappe, J.** (1984) Pyruvate formate-lyase (inactive form) and pyruvate formate-lyase activating enzyme of *Escherichia coli*: isolation and structural properties. *Arch Biochem Biophys* **228**: 133-42
- Czyzewski, B. K. und Wang, D. N.** (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**: 494-7
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-5
- Dauter, Z., Dauter, M. und Rajashankar, K. R.** (2000) Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 232-7
- Doberenz, C., Zorn, M., Falke, D., Nannemann, D., Hunger, D., Beyer, L., Ihling, C. H., Meiler, J., Sinz, A. und Sawers, R. G.** (2014) Pyruvate Formate-Lyase Interacts Directly with the Formate Channel FocA to Regulate Formate Translocation. *J Mol Biol* [Epub ahead of print]
- Drapal, N. und Sawers, R. G.** (1995) Promoter 7 of the *Escherichia coli* *pfl* operon is a major determinant in the anaerobic regulation of expression by ArcA. *J Bacteriol* **177**: 5338-41
- Eckhard, U., Nuss, D., Ducka, P., Schonauer, E. und Brandstetter, H.** (2008) Crystallization and preliminary X-ray characterization of the catalytic domain of collagenase G from *Clostridium histolyticum*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**: 419-21
- Ehrenreich, A., Forchhammer, K., Tormay, P., Veprek, B. und Böck, A.** (1992) Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur J Biochem* **206**: 767-73
- Evans, P.** (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **62**: 72-82
- Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B. und Sawers, R. G.** (2009) Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli* : a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **30**: 69-75

- Falke, D.** (2010) Untersuchungen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle-Wittenberg
- Forchhammer, K., Leinfelder, W. und Böck, A.** (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* **342**: 453-6
- Forchhammer, K., Leinfelder, W., Boesmiller, K., Veprek, B. und Böck, A.** (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (*selA*) and purification of the protein. *J Biol Chem* **266**: 6318-23
- Forzi, L. und Sawers, R. G.** (2007) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals* **20**: 565-78
- Frey, P. A.** (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis. *Annu Rev Biochem* **70**: 121-48
- Frey, P. A. und Booker, S. J.** (2001) Radical mechanisms of S-adenosylmethionine-dependent enzymes. *Adv Protein Chem* **58**: 1-45
- Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Axley, M. J. und Stadtman, T. C.** (1994) Coordination of selenium to molybdenum in formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7708-11
- Haddock, B. A. und Jones, C. W.** (1977) Bacterial respiration. *Bacteriol Rev* **41**: 47-99
- Heisters, M.** (2013) Charakterisierung zweier Mitglieder der FNT-Proteinfamilie. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle-Wittenberg
- Hersh, B. M., Farooq, F. T., Barstad, D. N., Blankenhorn, D. L. und Slonczewski, J. L.** (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 3978-81
- Hesslinger, C., Fairhurst, S. A. und Sawers, R. G.** (1998) The *tdcE* gene in *Escherichia coli* strain W3110 is separated from the rest of the *tdc* operon by insertion of IS5 elements. *DNA Seq* **9**: 183-8
- Hesslinger, C., Fairhurst, S. A. und Sawers, R. G.** (1998) Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol Microbiol* **27**: 477-92
- Hormann, K. und Andreesen, J. R.** (1989) Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Arch Microbiol* **153**: 50-59
- Hunger, D., Doberenz, C. und Sawers, R. G.** (2014) Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biol Chem [Epub ahead of print]*

- Jia, W. und Cole, J. A.** (2005) Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **33**: 159-61
- Jones, R. W., Lamont, A. und Garland, P. B.** (1980) The mechanism of proton translocation driven by the respiratory nitrate reductase complex of *Escherichia coli*. *Biochem J* **190**: 79-94
- Kabsch, W.** (1993) Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 795-800
- Kabsch, W.** (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 133-44
- Kabsch, W.** (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125-32
- Karinou, E., Compton, E. L., Morel, M. und Javelle, A.** (2012) The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. *Mol Microbiol* **87**: 623-40
- Karplus, P. A. und Diederichs, K.** (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* **366**: 1030-3
- Kelly, S. M., Jess, T. J. und Price, N. C.** (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**: 119-39
- Kessler, D., Herth, W. und Knappe, J.** (1992) Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 18073-9
- Kessler, D., Leibrecht, I. und Knappe, J.** (1991) Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS Lett* **281**: 59-63
- King, P. W. und Przybyla, A. E.** (1999) Response of *hya* expression to external pH in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5250-6
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H. und Mori, H.** (2006) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**: 291-9
- Klein, A. H., Shulla, A., Reimann, S. A., Keating, D. H. und Wolfe, A. J.** (2007) The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J Bacteriol* **189**: 5574-81
- Knappe, J., Elbert, S., Frey, M. und Wagner, A. F.** (1993) Pyruvate formate-lyase mechanism involving the protein-based glycy radical. *Biochem Soc Trans* **21 (Pt 3)**: 731-4

- Knappe, J., Neugebauer, F. A., Blaschkowski, H. P. und Ganzler, M.** (1984) Post translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1332-5
- Knappe, J. und Sawers, R. G.** (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 383-98
- Kolberg, M., Strand, K. R., Graff, P. und Andersson, K. K.** (2004) Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1966**: 1-34
- Krahulec, S., Armao, G. C., Weber, H., Klimacek, M. und Nidetzky, B.** (2008) Characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase and its application for the stereoselective synthesis of protio and deuterio forms of D-mannitol 1-phosphate. *Carbohydr Res* **343**: 1414-23
- Krizsan, A.** (2011) Der *hydN-hypF*-Locus von *Escherichia coli* - Einfluss auf die [NiFe] Hydrogenasen und die Formiat-Dehydrogenase H. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle-Wittenberg
- Kundig, W., Ghosh, S. und Roseman, S.** (1964) Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**: 1067-74
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Laurinavichene, T. V., Zorin, N. A. und Tsygankov, A. A.** (2002) Effect of redox potential on activity of hydrogenase 1 and hydrogenase 2 in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **178**: 437-42
- Lee, J. H., Patel, P., Sankar, P. und Shanmugam, K. T.** (1985) Isolation and characterization of mutant strains of *Escherichia coli* altered in H₂ metabolism. *J Bacteriol* **162**: 344-52
- Leinfelder, W., Stadtman, T. C. und Böck, A.** (1989) Occurrence in vivo of selenocysteyl tRNA_{Leinfelder et al.}, in *Escherichia coli*. Effect of *sel* mutations. *J Biol Chem* **264**: 9720-3
- Leonhartsberger, S., Ehrenreich, A. und Böck, A.** (2000) Analysis of the domain structure and the DNA binding site of the transcriptional activator FhlA. *Eur J Biochem* **267**: 3672-84
- Liu, Y. und Eisenberg, D.** (2002) 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci* **11**: 1285-99
- Liu, Y., Hart, P. J., Schlunegger, M. P. und Eisenberg, D.** (1998) The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of RNase A at a 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3437-42

- Lo, T. C.** (1977) The molecular mechanism of dicarboxylic acid transport in *Escherichia coli* K 12. *J Supramol Struct* **7**: 463-80
- Lü, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. und Einsle, O.** (2011) pH dependent gating in a FocA formate channel. *Science* **332**: 352-4
- Lü, W., Schwarzer, N. J., Du, J., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. und Einsle, O.** (2012) Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18395-400
- Lukey, M. J., Parkin, A., Roessler, M. M., Murphy, B. J., Harmer, J., Palmer, T., Sargent, F. und Armstrong, F. A.** (2010) How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J Biol Chem* **285**: 3928-38
- Marusyk, R. und Sergeant, A.** (1980) A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal Biochem* **105**: 403-4
- Mat-Jan, F., Alam, K. Y. und Clark, D. P.** (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol* **171**: 342-8
- Membrillo-Hernandez, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J. und Lin, E. C.** (2000) Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J Biol Chem* **275**: 33869-75
- Membrillo-Hernandez, J. und Lin, E. C.** (1999) Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: transcription from a downstream promoter and regulation by *fnr* and *RpoS*. *J Bacteriol* **181**: 7571-9
- Menon, N. K., Chatelus, C. Y., Dervartanian, M., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T., Peck, H. D., Jr. und Przybyla, A. E.** (1994) Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *J Bacteriol* **176**: 4416-23
- Miller, A.** (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*
- Mizrahi, I., Biran, D. und Ron, E. Z.** (2006) Requirement for the acetyl phosphate pathway in *Escherichia coli* ATP-dependent proteolysis. *Mol Microbiol* **62**: 201-11
- Mizrahi, I., Biran, D. und Ron, E. Z.** (2009) Involvement of the Pta-AckA pathway in protein folding and aggregation. *Res Microbiol* **160**: 80-4
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D. R., Bachinger, H. P., Brennan, R. G. und Valentin-Hansen, P.** (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**: 23-30
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1992) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**: 17-27

- Murphy, B. J., Sargent, D. F. und Armstrong, F. A.** (2014) Transforming an oxygen tolerant NiFe uptake hydrogenase into a proficient hydrogen producer. *Energy Environ Sci* **7**: 1426
- Nölling, J. und Reeve, J. N.** (1997) Growth- and substrate-dependent transcription of the formate dehydrogenase (*fdhCAB*) operon in *Methanobacterium thermoformicum* Z-245. *J Bacteriol* **179**: 899-908
- Parast, C. V., Wong, K. K., Lewisch, S. A., Kozarich, J. W., Peisach, J. und Magliozzo, R. S.** (1995) Hydrogen exchange of the glycyl radical of pyruvate formate-lyase is catalyzed by cysteine 419. *Biochemistry* **34**: 2393-9
- Pecher, A., Zinoni, F., Jatisatienr, C., Wirth, R., Hennecke, H. und Böck, A.** (1983) On the redox control of synthesis of anaerobically induced enzymes in enterobacteriaceae. *Arch Microbiol* **136**: 131-6
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. und Jacobson, G. R.** (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-94
- Richard, D. J., Sawers, R. G., Sargent, F., McWalter, L. und Boxer, D. H.** (1999) Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiology* **145** (Pt 10): 2903-12
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. und Böck, A.** (1994) Maturation of the large subunit (HYCE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur J Biochem* **220**: 377-84
- Rossmann, R., Sawers, R. G. und Böck, A.** (1991) Mechanism of regulation of the formate hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol* **5**: 2807-14
- Sambrook, J., Fritsche, E. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, 2nd edition
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7
- Sargent, F., Ballantine, S. P., Rugman, P. A., Palmer, T. und Boxer, D. H.** (1998) Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit-- identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hypB* mutant. *Eur J Biochem* **255**: 746-54
- Sauter, M., Böhm, R. und Böck, A.** (1992) Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 1523-32
- Sawers, R. G.** (1994) The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 57-88
- Sawers, R. G. und Böck, A.** (1988) Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**: 5330-6

- Sawers, R. G. und Böck, A.** (1989) Novel transcriptional control of the pyruvate formate lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *J Bacteriol* **171**: 2485-98
- Sawers, R. G., Heider, J., Zehelein, E. und Böck, A.** (1991) Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J Bacteriol* **173**: 4983-93
- Sawers, R. G., Hesslinger, C., Müller, N. und Kaiser, M.** (1998) The glycyl radical enzyme TdcE can replace pyruvate formate-lyase in glucose fermentation. *J Bacteriol* **180**: 3509-16
- Sawers, R. G. und Suppmann, B.** (1992) Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. *J Bacteriol* **174**: 3474-8
- Sawers, R. G.** (2006) Differential turnover of the multiple processed transcripts of the *Escherichia coli* *focA-pflB* operon. *Microbiology* **152**: 2197-205
- Schlenso, V. und Böck, A.** (1990) Identification and sequence analysis of the gene encoding the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**: 1319-27
- Schlenso, V., Lutz, S. und Böck, A.** (1994) Purification and DNA-binding properties of FHLA, the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 19590-6
- Self, W. T., Hasona, A. und Shanmugam, K. T.** (2004) Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 580-7
- Skibinski, D. A., Golby, P., Chang, Y. S., Sargent, F., Hoffman, R., Harper, R., Guest, J. R., Attwood, M. M., Berks, B. C. und Andrews, S. C.** (2002) Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *J Bacteriol* **184**: 6642-53
- Strøm, A. R., Olafsen, J. A. und Larsen, H.** (1979) Trimethylamine oxide: a terminal electron acceptor in anaerobic respiration of bacteria. *J Gen Microbiol* **112**: 315-20
- Suppmann, B.** (1993) Genetische Untersuchungen zum Formiat-Transport in *Escherichia coli*. Dissertation, Fakultät für Biologie, LMU München
- Suppmann, B. und Sawers, R. G.** (1994) Isolation and characterization of hypophosphite resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter. *Mol Microbiol* **11**: 965-82
- Tarmy, E. M. und Kaplan, N. O.** (1968) Kinetics of *Escherichia coli* B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. *J Biol Chem* **243**: 2587-96
- Tarmy, E. M. und Kaplan, N. O.** (1968) Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* **243**: 2579-86

- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4
- Uden, G. und Bongaerts, J.** (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 217-34
- van den Berg, S., Lofdahl, P. A., Hard, T. und Berglund, H.** (2006) Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J Biotechnol* **121**: 291-8
- van der Plas, J., Hellingwerf, K. J., Seijen, H. G., Guest, J. R., Weiner, J. H. und Konings, W. N.** (1983) Identification and localization of enzymes of the fumarate reductase and nitrate respiration systems of *Escherichia coli* by crossed immunoelectrophoresis. *J Bacteriol* **153**: 1027-37
- Wagner, A. F., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schäfer, W. und Knappe, J.** (1992) The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 996-1000
- Wagner, A. F., Schultz, S., Bomke, J., Pils, T., Lehmann, W. D. und Knappe, J.** (2001) YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of bacteriophage T4 as autonomous glyceryl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 456-62
- Waight, A. B., Love, J. und Wang, D. N.** (2010) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 31-7
- Wang, H. und Gunsalus, R. P.** (2003) Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP. *J Bacteriol* **185**: 5076-85
- Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y. N., Wang, P., Yan, N. und Shi, Y.** (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**: 467-72
- Wanner, B. L., Kodaira, R. und Neidhardt, F. C.** (1978) Regulation of lac operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J Bacteriol* **136**: 947-54
- White, W. B. und Ferry, J. G.** (1992) Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicicum*. *J Bacteriol* **174**: 4997-5004
- Wolfe, A. J.** (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 12-50
- Wu, Y., Li, Q. und Chen, X. Z.** (2007) Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc* **2**: 3278-84

- Wyborn, N. R., Messenger, S. L., Henderson, R. A., Sawers, G., Roberts, R. E., Attwood, M. M. und Green, J.** (2002) Expression of the *Escherichia coli* *yfiD* gene responds to intracellular pH and reduces the accumulation of acidic metabolic end products. *Microbiology* **148**: 1015-26
- Yang, H. C., Hainfeld, J. F., Wall, J. S. und Frey, P. A.** (1985) Quaternary structure of pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**: 16049-51
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C. und Storz, G.** (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**: 11-22
- Zhu, J. und Shimizu, K.** (2005) Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. *Metab Eng* **7**: 104-15
- Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C. und Böck, A.** (1983) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4650-4

8 Anhang

A1: *Screening Kits*, welche für die verschiedenen Kristallisationsansätze verwendet wurden

Firma	Screening-Kit
Hampton Research	<i>Crystal Screen™ HR2-110,</i> <i>Crystal Screen 2™ HR2-112</i>
Molecular Dimension	<i>Morpheus™ MD 1 - 46 / MD 1 - 47</i>
Sigma-Aldrich	<i>Basic Kit, Cryo Kit, Extension Kit, Low Ionic</i> <i>Strength Kit</i>
Jena Bioscience	<i>JBScreen Classic 1 - 10,</i> <i>JBScreen JCSG++ 1 - 4</i>

Anhang

A2: Alignment verschiedener Transportproteine aus *E. coli*

```
FocA -----MKADNPFDLLPAAMAKVAEEAGVYKATKH---PLK 33
FocB -----MRNKLSFDLQLSARKAAIAERIAAHKIARS---KVS 33
NirC -----MFTDTINKCAANAARIARLSANN---PLG 26
DauA MNKIFSSHVMPFRALIDACWKEKYTAARFTRDLIAGITVGIIAIPLAMALAIGSGVAPQY 60
      :
FocA TFYLAITAGVFISIA-----FVFYITATTGTGTMFPGMAKLVGGICFSLG- 78
FocB VFLMAMSAGVFMAIG-----FTFYLSVIADASSQ--ALTHLVGGLCFTLG- 76
NirC FVWSSAMAGAYVGLG-----IILIFTLGNLLDPS--VRPLVMGATFGIA- 68
DauA GLYTAAVAGIVIALTGGSRFVSVGPTAAFVVILYPVSVQQFGLAGLLVATLLSGIFLILMG 120
      : ** :.: . : . . : *: * : :
FocA -----LILCVVCGADLFT-STVLIVVAK 100
FocB -----FILLAVCGTSLFT-SSVMTVMMAK 98
NirC -----LTLVI IAGSELFTGHTMFLTFGV 91
DauA LARFGRGLIEYIPVSVTLGFTSGIGITIGTMQIKDFLGLQMAHVPEHYLQKVGALFMALPT 180
      : : : * . :.: .
FocA ASG-----RITWGQLAKNWLNVYFGNLVGLLEFVLLMWLSGEYMTANGQWGLN 148
FocB SRG-----VISWRTWLINALLVACGNLAGIACFSLLIWFSGLVMSENAMWGVA 146
NirC KAG-----SISHQMMAILPQTWLGNLVGSVVFVAMLYSWGGSLLPVDT--I 137
DauA INVGDAAGIVTLGILVFWPRLGIRLPGHLPALLAGCAVMGIVNLLGGHVATIGSQFHYV 240
      : . *. * . :.: .*
FocA VLQTADH-----KVHHTFIEAVCLGILANLMVCLAVW 180
FocB VLHCAEG-----KMHHTFTESVSLGIMCNLMVCLALW 178
NirC VHSVALA-----KTTAPAMVLFKGCALCNWLVC LAIW 169
DauA LADGSQNGNGIPQLLPQLVLPWDLPNSEFTLTWDSIRTLPPAAFSMAMLGAIESLLCAVVL 300
      : : : . . . :.: * .:
FocA MSYSGRSLMDKAFIMVLPVAMFVASGFEHSIANMFMI PMGIVIRDFASPEFWTAVGSAPE 240
FocB MSYCGRSLCDKIVAMILPITL FVASGFEHCIANLFVIPFAIAIRHFAPPPFWQLAHSSAD 238
NirC MALR-TEGAAKFIAIWWCLLAFIASGYEHSIANMTL FALS-----WFGNHSEAY 217
DauA DGMTGTPKHKANSELVGGQLGNI IAPFFGGITATAA IARSAANVRAGATSPISAVIHSILV 360
      . . : : : :.:* . : * . : . *
FocA NFSHLTVMNFITDNLIPVTIGNI IGGGLLVGLTYWVIYLRENDHH----- 285
FocB NFPALTVSHFITANLLPVMLGNI IGGAVLVSMCYRAIYLRQEP----- 281
NirC TLAG-----IGHNLLWVTLGNTLSGAVFMGLGYWYATPKANRPVADKFNQETAAG--- 268
DauA ILALLVLAPLLSWLPLSAMAALLMVAWN MSEAHKVVDDLRRHAPKDDIIVMLLCMSLTVL 420
      :. : : . . : . :.: :
FocA -----
FocB -----
NirC -----
DauA FDMVIAISVGI VLASLLFMRR IARMTRLAPVVVDV PDDV LVLRVIGPLFFAAA EGLFTDL 480
FocA -----
FocB -----
NirC -----
DauA ESRLEGKRIVILKWD AVPVLDAGGLDAFQRFVKRLPEGCELRCV NVEFQPLRTMARAGIQ 540
FocA -----
FocB -----
NirC -----
DauA PIPGR LAFFPNRRAAMADL 559
```

* = identische Aminosäure; : = stark konservierte Aminosäuren mit gleicher Ladung; . = schwach konservierte Aminosäuren; - = keine Übereinstimmung

A4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bemerkung
pET upstream	AGA TCT CGA TCC CGC GAA AT	
focB_controle_forward	GCT TTT GCA GGA GTA TGC	Kontrolle der Deletion des <i>focB</i> -Gens
focB_controle_reverse	TTT CGC CGG GCT GCT GAT TTT	
NirC_forw	ATG ACA TCC TGC CTG AAA CC	Kontrolle der Deletion des <i>nirC</i> -Gens
NirC_revers	TGC GGT GAA CTG TGG AAT AA	
yehM_forw_control	GGG ATG CGC TCA CGG ATG AAA	Kontrolle der Deletion des <i>dauA</i> -Gens
yehM_rev_control	GGG TTG CGC TGA CTG GTC AAT	
pflA_forward	GTG GTG ACC TAT CGC CAC TT	Kontrolle der Deletion des <i>pflA</i> -Gens
pflA_reverse	ATT GCC ACC CAT TTG TGT TT	
pflB_forward	GCT GGC TAC ATC AAC AAG CA	Kontrolle der Deletion des <i>pflB</i> -Gens
pflB_reverse	GAT AGA TTC GGT TGC CCA GA	
focB_forw_qRT	GGG CTG GCA GGT ATT GCC TGT TT	zum Nachweis des Transkripts von <i>focB</i> bei RT-PCR
focB_rev_qRT	GGG GGA GCA GAT TGG CGG TAA TA	
lacZ_control	CGT TGG TGT AGA TGG GCG CA	Kontrolle der Insertion des lacZ-Konstruktes

Anhang

A5: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung für die Kristallstruktur von GrcA

Datensammlung	Nativ GrcA	KI inkubiert GrcA
Messstation	SLS X06SA	SLS X06SA
Wellenlänge (Å)	1,0	1,542
Auflösung (Å)	67,19 – 1,72	43 – 2,79
Höchste Auflösungsschale (Å)	1,81 – 1,72	2,94 – 2,79
Raumgruppe	P6 ₄ 22	P6 ₄ 22
Zelldimensionen		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	77,58; 77,78; 111,98	77,58; 77,78; 111,71
α , β , γ (°)	90; 90; 120	90; 90; 120
<i>R</i> _{merge} (%)	7,7 (143,4)	22,9 (124,4)
CC _(1/2) (%)	100 (79,3)	99,6 (72,3)
<i>I</i> / σI	25,1 (2,0)	16,8 (3,7)
Vollständigkeit (%)	100 (100)	99,6 (97,8)
Redundanz	18,9 (19,5)	19,7 (18,8)
Verfeinerung		
Nr. Reflexe (work/test)	21810 / 1115	
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	19,21 / 22,18	
Nr. Atome		
Protein	863	
Wasser	102	
<i>B</i> -Faktoren(Å ²)		
Protein	41,5	
Wasser	46,1	
Ramachandran Plot (%)		
bevorzugte / erlaubte	98,1 / 1,9	

Die Integration erfolgte hinsichtlich der Korrelation des CC(1/2)-Wertes nach Karplus und Diederichs (2012), Science 336, 1030-33. Karplus und Diederichs, 2012

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner praktischen Zeit sowie der Zeit des Zusammenschreibens unterstützt und mir geholfen haben.

Ich bedanke mich besonders bei Prof. Gary Sawers für die Überlassung des interessanten Themas, seinem Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die Unterstützung bei praktischen Arbeiten und allen Belangen darüber hinaus sowie das entgegen gebrachte Vertrauen.

Ich danke Prof. Milton Stubbs für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gute Kooperation sowie für die Möglichkeit einige Experimente in den Laboren des Instituts für Biotechnologie durchführen zu können.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Michael Schöpfel für die gute Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Kristallstruktur von GrcA, seine Hilfe und Geduld bei schwierigen proteinbiochemischen Fragestellungen sowie für die vielen weiterführenden Gespräche und Diskussionen

Ich bedanke mich weiterhin bei Michael Zorn (AG Sinz, Institut für Pharmazie) für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen sowie für seine Diskussionsbereitschaft und Vorschläge hinsichtlich dem Fortgang der Arbeit.

Ein Dankeschön geht ebenfalls an die Mitarbeiter der AG Schwarz (Institut für Biotechnologie) für die Hilfe und Unterstützung bei der CD-Messung.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen und momentanen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für eine tolle Zeit, eine gute Zusammenarbeit und für die ein oder andere Abwechslung im Arbeitsalltag. Besonderen Dank für die Unterstützung in fachlichen und laborbezogenen Fragen geht dabei an Dr. Constanze Pinske, Dr. Barbara Thiemer, Claudia Hammerschmidt, Dr. Basem Soboh, Doreen Hunger, Dr. Claudia Doberenz und Mario Braussemann. Ich danke außerdem Linda Nietzschmann, Marcus Heisters und Theresa Nowak, deren Abschlussarbeiten ich betreuen durfte, für ihr Vertrauen und die vielen Dinge, die ich durch diese Zusammenarbeit gelernt und erfahren habe.

Ich danke Dr. Annett Weidner für die Hilfe bei der Anfertigung meiner schriftlichen Arbeit und für das Korrekturlesen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Johannes Taubert für seine Hilfe und Unterstützung während der gesamten Doktorandenzeit, für die vielen fachlichen Gespräche und Diskussionen, die mir so oft weitergeholfen haben sowie für das immer offene Ohr und die Ermutigungen, wenn sie notwendig waren.

Nicht zuletzt danke ich meiner gesamten Familie sowie meinen Freunden (besonders Lydia, Maria, Dörte, Nicole, Claudi T. früher B., Marlén sowie Andi und Steffi) von ganzem Herzen für die tolle Unterstützung, das aufgebrachte Verständnis, die vielen Momente, die mir Kraft gegeben haben, und dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 21.06.1984
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg, Deutschland
Familienstand: ledig

Qualifikationen

04/2014 Qualitätsmanagement-Fachkraft (TÜV SÜD Akademie,
Leipzig)
05/2014 Qualitätsmanagement-Beauftragte (TÜV SÜD Akademie,
Leipzig)

Bisherige Tätigkeiten

01/2010 -
12/2013: Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) an der MLU
Halle/Wittenberg im Bereich Mikrobiologie (AG Prof. Sawers)

Studium

10/2004 -
11/2009: Studium der Biologie an der Martin- Luther Universität Halle
Abschluss: Diplom-Biologin
Vertiefungsrichtung: Mikrobiologie

Schulbildung

1995-2004: Goethe-Gymnasium in Roßlau
06/ 2004 Abitur

Publikationen

- Beyer, L.**, Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B. und Sawers, R. G. (2013) Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol* **195**: 1428-35
- Doberenz, C., Zorn, M., Falke, D., Nannemann, D., Hunger, D., **Beyer, L.**, Ihling, C. H., Meiler, J., Sinz, A. und Sawers, R. G. (2014) Pyruvate Formate-Lyase Interacts Directly with the Formate Channel FocA to Regulate Formate Translocation. *J Mol Biol* [Epub ahead of print]
- Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., **Beyer, L.**, Lilie, H., Thiemer, B. und Sawers, R. G. (2009) Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli* : a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **30**: 69-75

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Aus anderen Publikationen und Quellen wörtliche oder inhaltlich entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde weder in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades oder eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Halle (Saale), Juni 2014