

**Die Demethylierung von Dimethylselenid ist eine adaptive
Antwort des Archaeons *Methanococcus voltae*
auf Selenmangel**

Dissertation

zur

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

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ulf Michael Niess
aus Göppingen

Marburg/Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2001 bis Februar 2004 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Klein durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. A. Klein

Zweitgutachter Prof. Dr. R. K. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung am

Während der Promotion erzielten Ergebnisse sind in folgendem Artikel veröffentlicht:

Niess, U.M. and Klein A. (2004)

Dimethylselenide Demethylation is an Adaptive Response to Selenium Deprivation in the Archaeon *Methanococcus voltae*. Journal of Bacteriology, accepted.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	3
3	EINLEITUNG	5
4	MATERIAL UND METHODEN	16
4.1	CHEMIKALIEN	16
4.2	GASE	16
4.3	RADIOISOTOPE	16
4.4	VERWENDETE STÄMME	16
4.5	OLIGONUKLEOTIDE	17
4.6	PHAGENBANK	19
4.7	PLASMIDE	19
4.7.1	<i>Konstruktion der Plasmide pNPAC-sdmA, -sdmB, -sdmC und -sdmBC</i>	20
4.8	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	23
4.8.1	<i>Kultivierung von Methanococcus voltae</i>	23
4.8.2	<i>Kultivierung von Escherichia coli</i>	23
4.9	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
4.9.1	<i>Fällung von DNA/RNA mit Isopropanol</i>	24
4.9.2	<i>Phenol/Chloroform-Extraktion</i>	24
4.9.3	<i>Auftrennung von DNA in Agarosegelen</i>	24
4.9.4	<i>Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren</i>	24
4.9.5	<i>Reinigung chromosomaler DNA aus M. voltae</i>	25
4.9.6	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	25
4.9.7	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	25
4.9.8	<i>Klonierung von PCR-Produkten, Restriktion und Ligation von DNA</i>	26
4.9.9	<i>Elution von DNA aus Agarosegelen</i>	26
4.9.10	<i>Sequenzierung von DNA</i>	26
4.9.11	<i>Primer Extension</i>	27
4.9.12	<i>RT-PCR</i>	28
4.9.13	<i>Herstellung elektrokompenter Zellen aus E. coli</i>	28

4.9.14	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	28
4.9.15	Transfektion von <i>M. voltae</i>	29
4.9.16	Qualitativer und quantitativer Glucuronidase-Reportergentest	29
4.9.17	Herstellung radioaktiver DNA Sonden	30
4.9.18	Southern-Blot-Analyse	30
4.9.19	Präparation von RNA aus <i>M. voltae</i>	31
4.9.20	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese	32
4.9.21	Northern-Blot-Analyse	32
4.9.22	Herstellen einer partiellen Genbank	33
4.9.23	Screening einer partiellen Genbank durch Koloniehybridisierung	34
4.9.24	Screening einer genomischen DNA Phagenbank aus <i>M. Voltae</i>	34
4.10	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	34
4.10.1	Gaschromatographischer Nachweis von CH_4	34
5	ERGEBNISSE	36
5.1	IDENTIFIZIERUNG DES GENS <i>SDMA</i>	36
5.2	IDENTIFIZIERUNG POSITIVER KLONE DURCH DAS SCREENING VERSCHIEDENER GENBANKEN MIT EINER SONDE DES GENS <i>SDMA</i>	38
5.3	IM 3'-BEREICH DES GENS <i>SDMA</i> LIEGEN DIE OFFENEN LESERASTER <i>SDMB</i> UND <i>SDMC</i>	40
5.4	DAS GEN <i>SDMA</i> CODIERT FÜR EIN MÖGLICHES CORRINOID-PROTEIN, <i>SDMB</i> UND <i>SDMC</i> FÜR MÖGLICHE METHYLTRANSFERASEN	41
5.5	DAS GEN <i>SDMA</i> WIRD NUR BEI SELENMANGEL TRANSKRIBIERT	45
5.6	BESTIMMUNG EINES MÖGLICHEN TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTS DES GENS <i>SDMA</i>	47
5.7	DIE GENE <i>SDMA</i> , <i>SDMB</i> UND <i>SDMC</i> LIEGEN AUF EINEM GEMEINSAMEN POLYCISTRONISCHEN MESSENGER	49
5.8	<i>M. VOLTAE</i> KANN METHYLIERTE AMINE, DIMETHYLSULFID ODER METHANOL NICHT FÜR DIE METHANOGENESE ERSCHLIEßEN	51
5.9	DIE KONSTRUKTION VON DELETIONSMUTANTEN DER GENE <i>SDMA</i> , <i>SDMB</i> UND <i>SDMC</i>	52
5.10	CHARAKTERISIERUNG DER ERHALTENEN <i>M. VOLTAE</i> -KLONE <i>V1ΔSDMA</i> , <i>V1ΔSDMB</i> , <i>V1ΔSDMC</i> UND <i>V1ΔSDMBC</i>	53
5.11	DIE PROTEINE <i>SDMA</i> UND <i>SDMC</i> SIND AN DER ERSCHLIEßUNG VON SELEN AUS DIMETHYLSELENID BETEILIGT	57
5.12	DIE STÄMME <i>V1ΔSDMA</i> , <i>V1ΔSDMC</i> UND <i>V1ΔSDMBC</i> ZEIGEN BEI ANWESENHEIT	

VON DIMETHYLSELENID EINE GERINGERE WACHSTUMSRATE ALS DIE STÄMME V1 UND V1 Δ SDMB	59
5.13 DAS GEN <i>SDMC</i> BESITZT FÜR SEINE TRANSKRIPTION EINEN ZUSÄTZLICHEN STARTPUNKT	62
6 DISKUSSION	65
7 LITERATURVERZEICHNIS	78

1 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMDSe	Dimethyldiselenid
DMS	Dimethylsulfid
DMSe	Dimethylselenid
DMSeS	Dimethylselenylsulfid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Frc	selenfreies Isoenzym zu Fru
Fru	F ₄₂₀ –reduzierende Hydrogenase
GSH	Glutathion
GSSeSG	Selenodiglutathion
GSSe ⁻	Glutathionyl-Selenid-Anion
MtaA	Methylcob(III)alamin:Coenzym M-Methyltransferase
MtaB	Methanol:Cob(I)alamin-Methyltransferase
MtaC	Methyltransferase-Corrinoid-Protein
MtbA	Isoenzym von MtaA
MtbB	Dimethylamin:Corrinoid-Methyltransferase
MtbC	Dimethylamin Corrinoid-Protein
MtmB	Monomethylamin:Corrinoid-Methyltransferase
MtmC	Monomethylamin Corrinoid-Protein
MttB	Trimethylamin:Corrinoid-Methyltransferase
MttC	Trimethylamin Corrinoid-Protein
MtsA	Methylthiol:Coenzym M-Methyltransferase
MtsB	Methylthiol:Coenzym M-Methyltransferase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNPGLuc	4-Nitrophenyl- β -1,4-Glucuronid
Psl	Promotor des S-layer-Gens
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
SECIS	Selenocysteine insertion sequence
TMA	Trimethylamin
Tmcr	Terminator der Methyl-Coenzym M-Reduktase-Gene
<i>uidA</i>	Gen der β -Glucuronidase aus <i>E. coli</i>
Vhc	selenfreies Isoenzym zu Vhu
Vhu	F ₄₂₀ -nicht-reduziernde Hydrogenase

2 Zusammenfassung

Im natürlichen Lebensraum von *Methanococcus voltae* kommt Selen in unterschiedlichen Verbindungen und Konzentration vor. So variiert der Selengehalt im Mündungswasser verschiedener Flüsse zwischen 0,1 und 63 nM. Aufgrund der guten Löslichkeit sind die Oxianionen des Selens biologisch am interessantesten. Sie sind daher aber auch in hohen Konzentrationen toxisch. Selen in geringen Mengen ist dagegen essentiell, da es als Selenomethionin oder -cystein in Proteinen vorkommen kann. Eine häufig anzutreffende organische Selenverbindungen ist das Dimethylselenid (DMSe). Diese flüchtige Substanz wird von einer Vielzahl Organismen zur Detoxifizierung gebildet.

Aus *M. voltae* sind insgesamt 4 Hydrogenasen bekannt, wovon zwei ein Selenocystein aufweisen und konstitutiv exprimiert werden. Die Induktion der Transkription der selenfreien Isoenzyme erfolgt dagegen bei Selenmangel. In Expressionsanalysen zeigte sich, dass 5 weitere Proteine ebenfalls nur unter Selenlimitierung synthetisiert werden. Von zweien wurde jeweils die N-terminale Peptidsequenz und von einem zusätzlich interne Peptidsequenzen bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Gen eines dieser Proteine identifiziert. In einer Datenbanksuche stellte sich dann heraus, dass es Sequenzidentitäten mit Corrinoid-Proteinen aus *Methanosarcina* aufwies. Es wurde als SdmA bezeichnet (für Dimethylselenid Demethylierung). Das Gen *sdmA* liegt zusammen mit *sdmB* und *sdmC* auf einem gemeinsamen polycistronischen Messenger, der nur bei Selenmangel nachweisbar war. SdmB und SdmC haben gemeinsame Sequenzmotive mit Methyltransferasen, die in einigen Methanoarchaen an der methylotrophen Methanogenese beteiligt sind. Dabei übertragen diese die Methylgruppe von Corrinoid-Proteinen auf den Akzeptor Coenzym M. Die Methylgruppe stammt dabei beispielsweise aus methylierten Aminen bzw. Thiolen oder aus Methanol.

Normalerweise werden von *M. voltae* für die Methanogenese nur Formiat oder H_2/CO_2 erschlossen, so bestätigte sich die Vermutung nicht, dass bei Selenmangel

SdmA, SdmB und SdmC die Erschließung der oben genannten methylierten Substrate erlauben könnten.

Versetzt man das Selenmangelmedium jedoch mit DMSe, dann führt dies zur Repression des Promotors der Gene einer selenfreien Hydrogenase, der normalerweise nur unter Selenlimitierung aktiv wäre. Eine Deletion von *sdmA* oder *sdmC* führte zur Aktivität des Promotors trotz der Anwesenheit von DMSe. Der Austausch von *sdmB* hatte dagegen keinen Effekt. Zudem waren die Wachstumsraten der Mutanten $\Delta sdmA$ und $\Delta sdmB$ im Vergleich zum Wildtyp trotz DMSe-Zugabe reduziert.

In *M. voltae* scheint es daher zwei verschiedene Anpassungsmechanismen an Selenmangel zu geben. Zum einen werden unter Selenlimitierung die selenfreien Isoenzyme der selenhaltigen Hydrogenasen exprimiert und zum anderen lässt sich unter diesen Bedingungen ein alternatives Selensubstrat, wie das DMSe, von *M. voltae* zur Biosynthese der Selenoproteine erschließen. Daran ist vermutlich das Corrinoid-Proteine SdmA und die Methyltransferase SdmC beteiligt.

3 Einleitung

Methanogene sind prokaryotische, strikt anaerobe Organismen, die Methan zur Energiegewinnung produzieren. Der Prozess der Methanbildung wird auch als Methanogenese bezeichnet. Methan wurde ursprünglich als eine Art „brennende“ Luft durch den italienischen Physiker Alessandro Volta (1745-1827) identifiziert, der Gas aus Sumpfsedimenten sammelte und dessen Entflammbarkeit zeigte. Die ursprünglich als Methanbakterien bezeichneten Organismen gehören tatsächlich zu der Domäne der Archaea, die man von den Bacteria und Eucarya unterscheidet (Woese & Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Das Reich der Archaea lässt sich wiederum in Crenarchaeota, Euryarchaeota und Korarchaeota unterteilen. Den Methanogenen, die den Euryarchaeota zugeordnet werden, gehören die fünf Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* und *Methanomicrobiales* an (Boone *et al.*, 1993). *Methanococcus voltae* wurde 1970 in West-Florida aus einer Flussmündung von Janice M. Ward isoliert (Ward, 1989). Es ist ein mesophiler moderat halophiler Organismus, den man zu den *Methanococcales* zählt. Zur Energiegewinnung durch die Methanogenese werden von *M. voltae* nur H_2/CO_2 oder Formiat verwendet (Whitman *et al.*, 1982). Andere Vertreter der Methanogenen hingegen, wie die *Methanosarcinales*, können auch Acetat, Methanol, Methylthiole oder Methylamine erschließen (Keltjens & Vogels, 1993; Ferry, 1999; Thauer, 1993; Thauer, 1998).

Die Methanogenese und ihre Substrate

Die Umsetzung des CO_2 zu Methan erfolgt über an Coenzym gebundene C₁-Intermediate (Abb. 1). Die beteiligten Coenzyme sind das Methanofuran (MFR), das Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) und das Coenzym M (CoM). Zur Reduktion des CO_2 werden 8 Elektronen benötigt, die durch die Aktivierung des molekularen Wasserstoffs durch Hydrogenasen bereitgestellt werden. Die Elektronen werden mittels Elektronenüberträger, wie z.B. dem F₄₂₀, transferiert. Generell besitzen Methanogene, die CO_2 und H_2 als Substrat nutzen, zwei verschiedene Hydrogenasen, eine F₄₂₀-reduzierende und eine F₄₂₀-nicht-reduzierende. Eine weitere Hydrogenase wurde aus einem Vertreter der *Methanosarcinales* gereinigt. Es

ist die membrangebundene *Escherichia coli* ähnliche Hydrogenase Ech (Künkel *et al.*, 1998; Meuer *et al.*, 1999). Ihre biologische Bedeutung im Metabolismus von *M. barkeri* wurde durch Mutationsanalysen beschrieben (Meuer *et al.*, 2002).

Aus *M. voltae* sind insgesamt vier Hydrogenasen bekannt, wobei die F₄₂₀-reduzierende Fru und die F₄₂₀-nicht-reduzierende Vhu beides Selenoproteine sind. Die Hydrogenasen Vhc und Frc weisen anstelle des Selenocysteinyl- einen Cysteinyl-Rest auf (Halboth & Klein, 1992).

Methylotrrophe Vertreter der Methanogenen können, wie bereits erwähnt, für die Methanogenese methylierte Substrate erschließen (Abb. 1). Die Demethylierung der Substrate erfolgt durch ein spezifisches Methyltransferase-System. Dabei wird die Methylgruppe des Substrats auf das Coenzym M übertragen und durch die Methyl-Coenzym M-Reduktase zu Methan reduziert. Durch die Oxidation der Methylgruppe eines Substratmoleküls können insgesamt 6 Elektronen gewonnen und zur Reduktion der Methylgruppen von drei weiteren Substratmolekülen verwendet werden. Das Methyltransferase-System besteht im Allgemeinen aus zwei Komponenten (Ferry, 1999), das am Beispiel des Monomethylamine:Coenzym M-Methyltransferase-Systems aus *M. barkeri* beschrieben werden soll. Die eine Komponente ist dort die Monomethylamin-Methyltransferase, welche mit dem Monomethylamin-Corrinoid-Protein assoziiert ist (Burke & Krzycki, 1997). Diese substratspezifische Methyltransferase überträgt die Methylgruppe vom Monomethylamin (MMA) auf das Corrinoid-Protein (Burke & Krzycki, 1995). Die andere Komponente ist die Methylcobalamin:Coenzym M-Methyltransferase, die die Methylgruppe dann weiter auf das Coenzym M überträgt (Burke & Krzycki, 1995; Burke & Krzycki, 1997). Sie ist unter anderem auch in der Methanogenese, ausgehend vom Trimethylamin (TMA) oder Dimethylamin (DMA), beteiligt (Yeliseev *et al.*, 1993; Ferguson *et al.*, 1996). Die Aminosäuresequenz des Corrinoid-Proteins beinhaltet ein Corrinoid-Bindemotiv, wie es auch in der cobalaminabhängigen Methionin-Synthase MetH aus *E. coli* vorkommt (Banerjee *et al.*, 1989). Die Methylcobalamin:Coenzym M-Methyltransferase enthält ein Zinkbindemotiv (LeClerc & Grahame, 1996; Gencic *et al.*, 2001), das beispielsweise auch in der Methionin-Synthase MetE beschrieben wurde (Zhou *et al.*, 1999).

Eine Ausnahme des Systems mit zwei Komponenten ist bei der Demethylierung von Dimethylsulfid (DMS) gezeigt worden (Tallant & Krzycki, 1997; Tallant *et al.*, 2001).

Die Methylthiol:Coenzym M-Methyltransferase aus *M. barkeri* katalysiert beide Reaktionen, die Demethylierung des DMS und die Methylierung des Coenzym M.

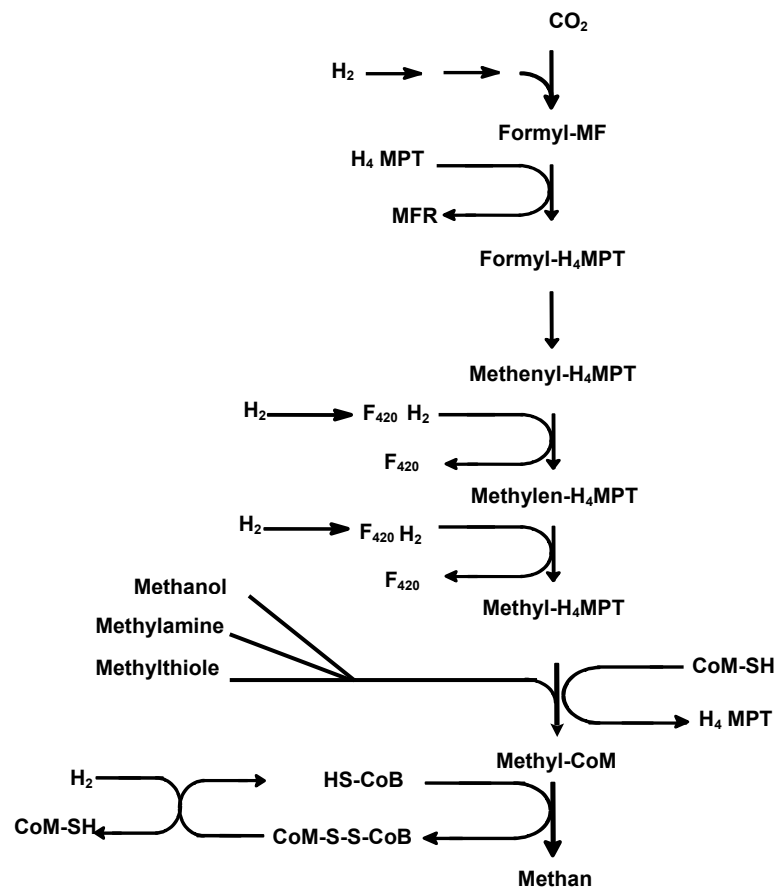


Abb. 1: Generelles Schema der Methanogenese bei Verwendung unterschiedlicher Substrate

Das CO_2 wird über C1-Intermediate zu Methan reduziert. Die Elektronen werden über die Aktivierung des molekularen Wasserstoffs durch Hydrogenasen bereitgestellt. Das Coenzym F_{420} ist dabei Elektronenüberträger. Die Methylgruppen des Methanols, der Methylamine und Methylthiole können über ein substratspezifisches Methyltransferase-System auf das Coenzym M (CoM) übertragen und zu Methan reduziert werden.

MFR: Methanofuran, H_4MPT : Tetrahydromethanopterin, CoM: Coenzym M, CoB: Coenzym B

Selen

Das Selen gehört der Hauptgruppe VIA des Periodensystems der Elemente an. Es kommt in vier verschiedenen Oxidationsstufen vor: als Selenid (-II), elementares Selen (0), Selenit (+IV) und als Selenat (+VI). Folgende Redoxprozesse des Selens sind möglich:



Elementares Selen und die Selenide lösen sich nur sehr schlecht in Wasser, die Oxianionen des Selens lösen sich dagegen sehr gut (Fishbein, 1991).

Generell sind daher geringen Konzentrationen des Selenats und Selenits essentiell und hohe toxisch. Das Selen kommt als Spurenelement in Selenoproteinen als Selenomethionin oder -cystein (Stadtman, 1990; Stadtman, 1996) und in einigen tRNAs als ein Bestandteil eines speziellen Nukleotids, dem 5-[(Methylamino)Methyl]-2-Selenouridin, vor (Wittwer *et al.*, 1984).

In der Umwelt können die verschiedenen Selenverbindungen in unterschiedlichen Mengen angetroffen werden (Conde & Sanz Alaejos, 1997). Beispielsweise lag die Gesamtselenkonzentration in einer Probe aus dem Atlantik bei ca. 0,35 und bei 40 nM in einer Probe aus dem Toten Meer. In Wasserproben aus Flussmündungen fand man Selen je nach Ursprung zu ca. 0,1 bis 63 nM vor. Z.B. wurden im Mündungswasser des Sacramento Rivers Selenkonzentrationen zwischen ca. 0,5 und 1,4 nM nachgewiesen.

In Proben aus aerobem Oberflächenwasser eines kanadischen Fjords waren die überwiegend detektierten Selenverbindungen das Selenit und das Selenat. Bei zunehmender Tiefe und unter zunehmend reduzierenden Bedingungen sank jedoch die Selenitkonzentration auf ca. 0,1 nM. Das Selenat konnte dann nicht mehr nachgewiesen werden, aber die Konzentration der organischen Selenide nahm zu (Cutter, 1982). Es ist daher möglich, dass verfügbares Selen unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen in sehr geringen Mengen vorkommt.

Generell ist in Meerwasser eine niedrigere Selenkonzentration anzutreffen, als in Süßwasser oder Böden (Fishbein, 1991).

Organische Selenverbindungen

Außer den anorganischen Selenverbindungen können in der Umwelt auch organische vorgefunden werden. Am häufigsten wurde das Dimethylselenid (DMSe), das Dimethylselenylsulfid (DMSeS) und das Dimethyldiselenid (DMDS₂) detektiert (Chasteen & Bentley, 2003). Beispielsweise ließen sich diese Verbindungen in verschiedenen Proben des Oberflächenwassers aus einer Region im Nordatlantik nachweisen. Dabei kamen dort das DMSe und DMSeS zu beinahe gleichen Konzentrationen (ca. 1 und 0,5 pM) und das DMDS₂ in nur sehr geringen Mengen vor (Amouroux *et al.*, 2001).

Die flüchtigen organischen Selenverbindungen entstehen durch die Biomethylierung des anorganischen Selens. Bei Zugabe von Selenit oder Selenat zu Sedimenten aus verschiedenen Seen Ontarios wurde die Bildung flüchtiger Selenverbindungen beobachtet. Die Bildung dieser Verbindungen war dabei mit mikrobiellem Wachstum assoziiert (Chau *et al.*, 1976). Reamer und Zoller (1980) detektierten DMSe und DMDS₂ in Abwasserschlamm nach Zugabe von Selenit und Inkubation der Proben bei 21°C. Wurden die Proben vor der Zugabe autoklaviert, konnten keine organischen Selenverbindungen nachgewiesen werden. Eine Methylierung des Selenits zu DMSe wurde im übrigen auch in Bodenproben festgestellt (Francis *et al.*, 1974).

Die Synthese flüchtiger Selenverbindungen wurde für verschiedene Organismen in Reinkultur nach Zugabe anorganischen Selens nachgewiesen.

Bei einer von Fan *et al.* (1997) aus einem Abwasserbecken isolierte *Chlorella*-Art führte die Zugabe des Selenits zur Bildung von DMSe und DMDS₂. Doran und Alexander (1977) isolierten ein *Corynebacterium*, das elementares Selen, Selenit oder Selenat in DMSe umwandelte. Bei *Enterobacter chloacae*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Desulfovibrio gigas*, *Disulfovibrio vulgaris*, *Chlostridium collagenovorans* und *M. barkeri*, einem Vertreter der Archaea, wurde ebenfalls nach Selenitzugabe die Bildung von DMSe beobachtet (Dungan & Frankenberger, 2000; Michalke *et al.*, 2000; Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000).

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass die Methylierung anorganischen Selens eigentlich eine Möglichkeit zur Detoxifizierung darstellt. Das anorganische

Selen kann bei sehr hohen Konzentrationen in flüchtige organische Selenverbindungen umgewandelt und in die Atmosphäre abgegeben werden. Die Selenkonzentration im Boden, Sediment oder Wasser nimmt dadurch ab.

Eine andere Möglichkeit zur Detoxifizierung ist die Reduktion der Oxianionen zu elementarem Selen. Wie bereits erwähnt, ist das elementare Selen in Wasser schwer löslich und steht daher nicht mehr zur Verfügung.

Kultiviert man beispielsweise *E. coli* in einem Medium, das mit Selenat oder Selenit angereichert wurde, werden diese beiden Verbindungen zu elementarem Selen reduziert. Dadurch färbt sich das Medium rot ein. In elektronen-mikroskopischen Aufnahmen von einzelnen Zellen erscheint akkumuliertes elementares Selen als elektronendichte Einlagerung (Gerrard *et al.*, 1974). Solche Partikel wurden auch in *Rhodospirillum rubrum* entdeckt, wenn das Kulturmedium 65 - 260 mg/l Selenit enthielt (Kessi *et al.*, 1999). Die selenreiche Kultivierung von *R. sphaeroides* führt ebenfalls zur Rotfärbung des Mediums (Moore & Kaplan, 1992).

Die Aufnahme von Selen

Die Aufnahme des Selenats ist an die Sulfataufnahme gekoppelt. Es gelangt daher über das Sulfat-Transportsystem in die Zelle (Brown & Shrift, 1980; Lindblow-Kull *et al.*, 1985). Mutationen in den Genen dieses Transportsystems können deshalb zur Resistenz gegenüber Selenat führen (Smith *et al.*, 1995). Die Aufnahme des Selenats und des Sulfats lässt sich durch Cystein inhibieren, die des Selenits dagegen nicht (Brown & Shrift, 1982). Anhand dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass es für das Selenit ein zusätzliches unabhängiges Transportsystem gibt. Ein weiterer Hinweis darauf liefert *Selenomonas ruminantium*. Dieser Organismus ist nicht in der Lage, Sulfat oder Selenat zu assimilieren, Selenit wird jedoch als Selenquelle genutzt (Hudman & Glenn, 1984). In *Salmonella typhimurium* führten Mutationen in den Genen einer Sulfat-Permease zu reduziertem Transport von Selenat. Die Aufnahme von Selenit war dadurch nicht betroffen (Brown & Shrift, 1980).

In der Zelle sollte das Selenat zunächst zu Selenit reduziert werden. Avazeri *et al.* (1997) zeigte, dass beispielsweise in *E. coli* membranassoziierte Nitrat-Reduktasen *in vitro* in der Lage sind, diese Reaktion zu katalysieren. Das Selen wird entweder als Selenomethionin oder -cystein in Selenoproteine inkorporiert. Dazu müssen die

aufgenommenen, oxidierten Selenverbindungen zu Selenid reduziert werden. Ursprünglich dachte man, dass dies auf dem Weg der Reduktion des Sulfats erfolgt. Allerdings liegen in der Umwelt im Allgemeinen Schwefelkonzentrationen vor, die um den Faktor 1000 höher liegen, als die vorgefundenen Konzentrationen des Selens (Turner *et al.*, 1998). Die Reduktion des Selenats bzw. Selenits könnte daher auf einem separaten Weg erfolgen, wodurch sichergestellt werden würde, dass die für die Synthese der Selenoproteine notwendigen Selenverbindungen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Der genaue Mechanismus der Reduktion ist nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass das Glutathion (GSH) an der Reduktion des Selenits beteiligt ist (Abb. 2). Dabei führt die Reaktion des Selenits mit dem Glutathion zur Bildung des Selenodiglutathions (GSSeSG), das weiter zum Glutathionyl-Selenid-Anion (GSSe⁻) und zum Selenol-Anion (HSe⁻) reduziert wird (Ganther, 1968; Sandholm & Sipponen, 1973; Turner *et al.*, 1998). Für den Einbau von Selenocystein in Proteine wird das Monoselenophosphat benötigt. Das Produkt des Gens *selD* aus *E. coli*, die Selenophosphat-Synthetase, katalysiert die Synthese des Monoselenophosphats aus ATP und Selenid (Veres *et al.*, 1994). Die für die Bildung des Monoselenophosphats benötigte Selenkonzentration war dabei so hoch, dass sie eigentlich ein optimales Wachstum der Zellen nicht erlauben würde. Daher ist es fraglich, ob es das natürliche Substrat für die Selenophosphat-Synthetase ist. So bindet das Enzym Rhodanese, eine Sulfurtransferase, in Anwesenheit von GSH Selen, wenn es als Selenit zugesetzt wurde. Bei Selenophosphat-Synthetase-Tests wurde dann *in vitro* die Synthese des Monoselenophosphats aus der Rhodanese in Anwesenheit von ATP gezeigt, wenn diese Selen gebunden hatte. Interessanterweise führte bereits eine geringere Rhodanese-Konzentration zur Bildung des Monoselenophosphats, als die normalerweise dafür benötigte Selenidkonzentration (Ogasawara *et al.*, 2001).

Die Selenocystein-Lyasen können das Selenocystein zu Alanin und elementares Selen abbauen. Ersetzt man in Selenophosphat-Synthetase-Tests das Selenid durch das Selenocystein und einer Selenocystein-Lyase, dann wird ebenfalls Monoselenophosphat gebildet. Es kann daher angenommen werden, dass die Selenocystein-Lyasen den zellulären Selenspiegel regulieren (Esaki *et al.*, 1982; Lacourciere & Stadtman, 1998; Lacourciere *et al.*, 2000).

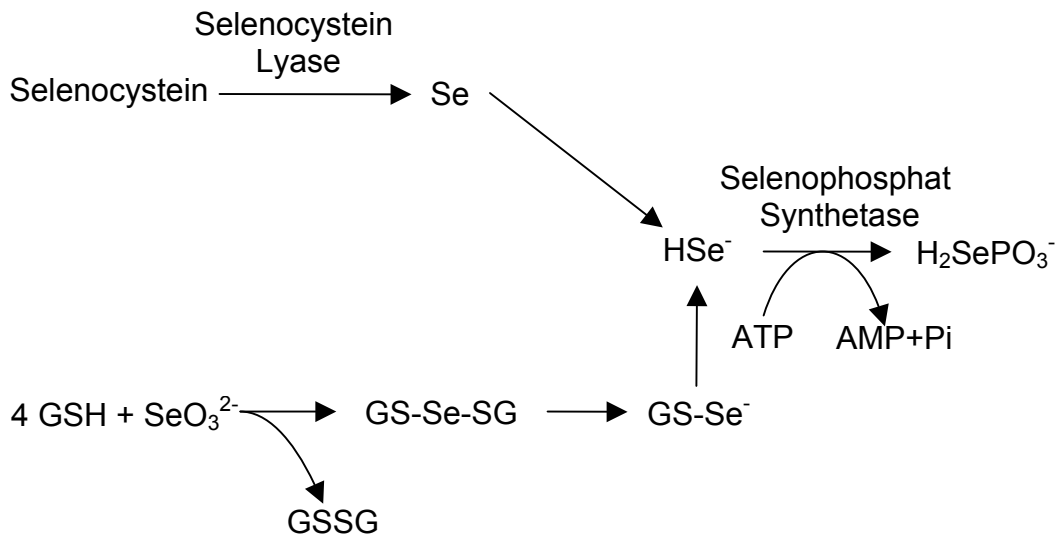


Abb. 2: Synthese von Monoselenophosphat aus Selenit und Selenocystein

Für die Synthese des Monoselenophosphats ($\text{H}_2\text{SePO}_3^-$) reagiert das Selenit (SeO_3^{2-}) mit dem Glutathion (GSH) zum Selenodiglutathion (GS-Se-SG), das zum Glutathionyl-Selenid-Anion (GS-Se^-) und zum Selenol-Anion (HSe^-) reduziert wird. Die Selenophosphat-Synthetase katalysiert die Synthese des Monoselenophosphats aus ATP und Selenid. Die Selenocystein-Lyase reguliert vermutlich den zellulären Selenspiegel durch den Abbau des Selenocysteins zu elementarem Selen (Se) und Alanin.

Die Biosynthese von Selenoproteinen

Für den korrekten Einbau des Selenocysteins in Selenoproteine wird eine bestimmte tRNA, die tRNA^{Sec} , benötigt (Leinfelder *et al.*, 1988). Diese wird zunächst durch eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen. Die Synthese der Selenocysteinyl-tRNA^{Sec} erfolgt durch die Selenocystein-Synthase aus der Seryl-tRNA^{Sec}. Dabei wird die Hydroxylgruppe des Serins durch ein Selenol ersetzt (Sunde & Evenson, 1987; Forchhammer & Bock, 1991; Forchhammer *et al.*, 1991). Der Donor der Selenogruppe ist dabei das Selenophosphat (Ehrenreich *et al.*, 1992; Glass *et al.*, 1993).

Die Inkorporation des Selenocysteins in die wachsende Polypeptidkette erfolgt am Codon UGA, das normalerweise für einen Stop der Translation sorgt. Das Anticodon der Cysteinyl-tRNA^{Sec} ist aber komplementär zu diesem Triplet. Für den Einbau des Selenocysteins in das Selenoprotein sind noch weitere Faktoren nötig, um das eigentliche Stop-Codon als Sinn-Triplet zu erkennen. In der mRNA der Selenoproteine befindet sich eine Sekundärstruktur, das SECIS-Element

(Selenocysteine insertion sequence) (Zinoni *et al.*, 1990). Es kommt in der 3'-nicht-kodierenden Region der mRNA in Eucarya und in Bacteria im 3'-Bereich des offenen Leserasters ausgehend vom Codon UGA vor (Böck, 2000). In Archaea befindet sich das SECIS-Element in 6 von 7 untersuchten Selenoproteinen im 3'- und in einem im 5'-Bereich der nicht kodierenden Region (Wilting *et al.*, 1997). Zudem wird für den Einbau des Selenocysteins der Translationsfaktor SelB benötigt. Er wurde sowohl aus Archaea als auch aus Bacteria gereinigt und charakterisiert (Forchhammer *et al.*, 1989; Forchhammer *et al.*, 1990; Rother *et al.*, 2000). SelB interagiert vermutlich mit dem SECIS-Element und der Selenocysteinyl-tRNA^{Sec} und erlaubt den Einbau des Selenocysteins in die wachsende Polypeptidkette. Eine Interaktion von SelB mit der Seryl-tRNA^{Sec} wurde ausgeschlossen.

Selenoproteine in Archaea und die Anpassung an Selenmangel

Das erste in Archaea identifizierte Selenoprotein war die Formiat-Dehydrogenase aus *Methanococcus vannielii* (Jones *et al.*, 1979), neben der dort auch ein selenfreies Isoenzym vorkommt (Jones & Stadtman, 1981). Später wurde aus demselben Organismus eine Hydrogenase gereinigt, in der eine Untereinheit Selen enthielt (Yamazaki, 1982). Aus *M. voltae* sind die zwei selenhaltigen Hydrogenasen, Vhu und Fru, bekannt. Neben diesen gibt es die selenfreien Isoenzyme, Vhc und Frc, die anstelle des Selenocysteinyl- einen Cysteinyl-Rest aufweisen (Halboth & Klein, 1992). Eine selenhaltige und eine selenfreie Formylmethanofuran-Dehydrogenase findet man in *Methanopyrus kandleri* vor (Vorholt *et al.*, 1997). In *Methanococcus jannaschii* wurden neben den Hydrogenasen eine selenhaltige Formiat-Dehydrogenase, eine Heterodisulfid-Reduktase und eine Formylmethanofuran-Dehydrogenase identifiziert. Sogar die Selenophosphat-Synthetase ist dort ein selenhaltiges Enzym (Wilting *et al.*, 1997).

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass die oben genannten Selenoproteine, bis auf die Selenophosphat-Synthetase, an der Methanogenese beteiligt sind. In *M. jannaschii* gibt es keine selenocystein-freien Isoenzyme (Rother *et al.*, 2001) und vermutlich aus diesem Grunde wächst dieser Organismus nicht auf selenarmen Medium (Burggraf *et al.*, 1990; Mukhopadhyay *et al.*, 1999). Die Wachstumsrate von *M. voltae* ist dagegen bei Selenentzug lediglich reduziert (Berghöfer & Klein, 1995; Whitman *et al.*, 1982), eine Anpassung an Selenmangel von *M. voltae* kann daher

angenommen werden. So werden die selenfreien Hydrogenasen Fru und Vhu, wie die selenfreie Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *M. kandleri*, nur bei Selenlimitierung, die entsprechenden Selenoenzyme aber konstitutiv exprimiert (Berghöfer *et al.*, 1994; Vorholt *et al.*, 1997).

Die Regulation der Transkription selenfreier Isoenzyme ist an den beiden Gengruppen der Hydrogenasen aus *M. voltae* am Besten untersucht. Sie teilen sich eine gemeinsame intergene Region, in der die jeweiligen Promotoren lokalisiert sind. In dieser Sequenz wurden Elemente identifiziert, die sowohl für die negative, als auch für die positive Regulation der Transkription verantwortlich sind (Noll *et al.*, 1999). Für ein mögliches Aktivatorprotein wurde eine Erkennungssequenz erkannt, die jeweils in Transkriptionsrichtung vor den beiden Promotoren der selenfreien Hydrogenasen liegt. Ein möglicher Aktivator wurde durch eine Affinitätschromatographie gereinigt, konnte aber bislang nicht genauer charakterisiert werden (Müller & Klein, 2001). Ein negativer Regulator wurde auf die selbe Weise isoliert. Er gehört zur LysR-Familie prokaryotischer Regulatorproteine. Eine Zerstörung seines Gens führte zur Transkription der Hydrogenasen-Gene in Gegenwart von Selen (Sun, 2003).

Neben den beiden Hydrogenasen wurden in *M. voltae* über die 2D-Elektrophorese 5 weitere Proteine identifiziert, die nur bei Selenmangel exprimiert werden (Niess, 2001). Zwei der 5 Proteine wurden aus den Gelen ausgeschnitten und deren N-terminale Peptidsequenz bestimmt. Von einem der beiden Proteine wurde, nach der Behandlung mit Trypsin, zudem die Sequenz der erhaltenen Teilpeptide ermittelt. Verwandte Proteine konnten anhand der Peptidsequenzen nur zu einem dieser Proteine in einer Datenbanksuche gefunden werden. Es zeigte eine Übereinstimmung von 79% der N-terminalen Sequenz zu einem Protein mit unbekannter Funktion aus *M. jannaschii*. Aufgrund der geringen Längen der erhaltenen Aminosäuresequenzen des anderen Proteins, konnten keine verwandten Proteine gefunden werden (Niess, 2001).

Ähnliche Untersuchungen zeigten bei Selenmangel in *Methanococcus maripaludis* eine erhöhte Expressionsrate des Gens einer Untereinheit der selenocysteinfreien Hydrogenase Vhc, also dem Isoenzym der selenhaltigen Hydrogenase Vhu, der Formylmethanofuran: Tetrahydromethanopterin-*N*-Formyltransferase und der H₂-bildenden Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Rother *et al.*, 2003). Die Tetrahydromethanopterin-*N*-Formyltransferase und die Methylen-

tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase sind ebenfalls an der Methanogenese beteiligt (Thauer, 1993).

Ziel der Arbeit

Wie oben schon erwähnt, wurden in *M. voltae* anhand der 2D-Elektrophorese Proteine identifiziert, die nur bei Selenmangel synthetisiert werden. Von zwei Proteinen wurde jeweils die N-terminale Sequenz, von einem zusätzlich die internen Peptidsequenzen nach Behandlung mit Trypsin bestimmt. Ein ähnliches Protein mit unbekannter Funktion aus *M. jannaschii* konnte in einer Datenbankrecherche einem der ausgeschnittenen Proteine zugeordnet werden (Niess, 2001). Es wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da *M. jannaschii* offensichtlich nicht über einen zu *M. voltae* vergleichbaren Anpassungsmechanismus an Selenmangel verfügt. So wächst *M. jannaschii* auf selenarmen Medium nicht (Burggraf *et al.*, 1990; Mukhopadhyay *et al.*, 1999). Zunächst sollte daher das Gen des anderen Proteins identifiziert werden. Die Auswirkungen von Deletionen könnten dann Hinweise auf eine mögliche Funktion geben. Ferner sollte die Funktion des Proteins in den Kontext der Anpassung an Selenmangel gestellt und die Frage beantwortet werden, ob das hier beschriebene selenabhängig regulierte Gen demselben Regulon angehört wie die erwähnten Gene der selenfreien Hydrogenasen.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Die während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert angegeben, bei den Firmen Biomol, Hamburg; Bio-Rad, München; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg und Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen.

4.2 Gase

Folgende Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim aus Siegen bezogen: Gasgemisch 5 % H₂, 20% CO₂, 75 % N₂ (Reinheit 3.0, 4.5, 5.6); Gasgemisch 80% H₂, 20% CO₂ (Reinheit 3.0, 4.5); Formiergas 5% H₂, 95% N₂; Stickstoff (Reinheit 4.6).

4.3 Radioisotope

Das Isotop α [³²P]-dATP (3×10^{-6} Ci/mmol) wurde von der Firma Hartman Analytic aus Braunschweig bezogen.

4.4 Verwendete Stämme

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 1 genannten Stämme verwendet.

Tab. 1: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

<i>E. coli</i> XL1 Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ <i>ϕ80lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara\text{-}leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (St ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF [']	$\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrBC\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)173$ <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F ['] <i>proAB</i> <i>lac</i> ^ϕ Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>E. coli</i> SOLR TM	e14 ⁻ (McrA ⁻) $\Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)171$ <i>sbC</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>uvrC</i> <i>umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>lac</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>thi-1</i> <i>endA1</i> λ^R [F ['] <i>proAB</i> <i>lac</i> ^ϕ Z Δ M15] su ⁻	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>M. voltae</i> V1	<i>uidA</i> ⁺ <i>his</i> ⁺ Pur ^s	(Pfeiffer <i>et al.</i> , 1998)
<i>M. voltae</i> V1 Δ <i>sdmA</i>	<i>uidA</i> ⁺ <i>his</i> ⁺ Pur ^r Δ <i>sdmA</i>	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> V1 Δ <i>sdmB</i>	<i>uidA</i> ⁺ <i>his</i> ⁺ Pur ^r Δ <i>sdmA</i>	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> V1 Δ <i>sdmC</i>	<i>uidA</i> ⁺ <i>his</i> ⁺ Pur ^r Δ <i>sdmA</i>	diese Arbeit
<i>M. voltae</i> V1 Δ <i>sdmBC</i>	<i>uidA</i> ⁺ <i>his</i> ⁺ Pur ^r Δ <i>sdmA</i>	diese Arbeit

4.5 Oligonukleotide

Die in der vorliegender Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Thermo Electron, Ulm, und MWG Biotech, Ebersberg, bezogen. Sie sind in Tab. 2 angegeben.

Tab. 2: Oligonukleotide zu den Untersuchungen der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC*

Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck
pep2ufw (sdm)	GGWTAYAAAYGCWTTYGA ^a	Identifikation von <i>sdmA</i>
pep1urv (sdm)	GCGTAWCCGTCWGC ^a	Identifikation von

		<i>sdmA</i>
p2sonde3'	GGAATGAACAGAGCAGGTGTTATG	Sonde I
p2sonde5'	AGATAGGACCGCCACCAACC	Sonde I
m13fwPrimer	IRD800 ^b -GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung
m13rvPrimer	IRD800 ^b -CAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung
ird800corri25	IRD800 ^b -GTCAGAAGCTATGGGCGC	Sequenzierung
ird800P2-walker5B	IRD800 ^b -CTGCCAATCCTTTTGAAATTCC	Sequenzierung
corrimet16RV	IRD800 ^b -CTGCTTCAGTTGTAGGTCC	Sequenzierung
corrimet16FW	IRD800 ^b -CCACAGGTAAACTACATCC	Sequenzierung
corsevorfw	ACTAGTCTTGACTATTTCACTGACAATTAAG	Knockout von <i>sdmA</i>
corsevorrv	TCGCGAGTTTTAGATTATAGCACCCCATAC	Knockout von <i>sdmA</i>
corsenachfw	GGTACCGCTTCAAATCTGCAAGAATTGC	Knockout von <i>sdmA</i> , Sonde IV
corsenachrv	GCTAGCCCTTAAATGTATGGGTATTCTACC	Knockout von <i>sdmA</i>
metIvorfw	ACTAGTGGTGTTATGTACGAAGAAGAAG	Knockout von <i>sdmB</i>
metIvorrv	TCGCGAGTATCGCTAATCATCTATATCAC	Knockout von <i>sdmB</i> , Sonde IV
metInachfw	GGTACCGGCTATTACAAAATACGAG	Knockout von <i>sdmB</i>
metInachrv	GCTAGCCAAATCTTCTGTAGGTTGC	Knockout von <i>sdmB</i>
metIIvorfw	ACTAGTGGTAACGTTGACCCTTCCG	Knockout von <i>sdmC</i>
metIIvorrv	TCGCGACTTTCATAGTTTGCCTCATGCTAG	Knockout von <i>sdmC</i>
metIInachfw	GGTACCCACAAATTATGTGAAATATCCCTAG	Knockout von <i>sdmC</i> , Sonde VI
metIInachrv	GCTAGCCATCAGTTACTGGCCATCC	Knockout von <i>sdmC</i> , Sonde VI
excorI	IRD800 ^b -TTGAAATTCCTTCGAATGC	Primer-Extension
metI2Hfw	GGATCCAGATGATTAGCGATACAATGAC	Sonde II
metI2Hrv	GTCGACATACTCGTATTTTGTAATAGCC	Sonde II
RTmetIIfw	GCAACCTACAGAAGATTTGGTG	Sonde III, RT-PCR
metII2Hrv	GTCGACCATCAGTTACTGGCCATCC	Sonde III
metIIIfw	ATAGGTACCGGTATGATGAATATGATAGTCAA AG	Sonde III down
metIIIrv	TATGCTAGCGGTTCCATTAATGATGAAGCCAC	Sonde III down
RTmetIIB	GATTGAAACACCATTGAG	RT-PCR
RTmetIIrv	CAATGCTTATACCCACACCAG	RT-PCR
RTmetIrvB	CACCAAATCTTCTGTAGGTTGC	RT-PCR

RTpac	GTGTATGACAAGAAAACCTGGTG	RT-PCR
pacsondefw	GTTTGTAAGTGGTAGAACAATTTTCG	Sonde V
pacsonderv	CCAGGTTTTCTTGTCATACACC	Sonde V

^a W = A+T, Y = C+T, R = A+G, K = G+T

^b IRD800: Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende des Oligonukleotids (MWG Biotech, Ebersberg)

4.6 Phagenbank

Es stand eine Genombank von *M. voltae* in Form einer Phagenbank zur Verfügung (Noll, I., dieses Labor). Der Hauptanteil der Fragmente lag in der Größe von 5 kb vor. Die Phagenbank wurde mit dem Lambda ZAP II Express[®] Predigested Vector Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) hergestellt.

4.7 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
Topo pCR 2.1	Zielvektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Amp ^r , Kan ^r)	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM [®] -T	Zielvektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Amp ^r)	Promega, Mannheim
pNPAC	Integrationsvektor für <i>M. voltae</i> basierend auf pSL1180 (Pur ^r , Amp ^r), Ausgangsvektor für die pNPAC Derivate	Sun J., dieses Labor
pNPAC-sdmA	Integrationsvektor für <i>M. voltae</i> mit <i>sdmA</i> flankierenden Sequenzen	Diese Arbeit
pNPAC-sdmB	Integrationsvektor für <i>M. voltae</i> mit <i>sdmB</i> flankierenden Sequenzen	Diese Arbeit

pNPAC-sdmC	Integrationsvektor für <i>M. voltae</i> mit <i>sdmC</i> flankierenden Sequenzen	Diese Arbeit
pNPAC-sdmBC	Integrationsvektor für <i>M. voltae</i> mit <i>sdmB</i> und <i>sdmC</i> flankierenden Sequenzen	Diese Arbeit

4.7.1 Konstruktion der Plasmide pNPAC-sdmA, -sdmB, -sdmC und -sdmBC

Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten Plasmide sind Derivate des Vektors pNPAC. Dieser trägt zur Selektion das Gen *pacN* (Zugangsnummer AY438700), welches der „codon usage“ von *M. voltae* angepasst ist und für die Puromycin-N-Acetyltransferase kodiert. Zur Herstellung des Vektors pNPAC-sdmA wurde mit den Oligonukleotiden corsevorfw und corsevorr das Fragment *sdmA*_{up} (up bezeichnet die 5'-Region vor dem Gen) und mit den Oligonukleotiden corsenachfw und corsenachrv das Fragment *sdmA*_{down} (down bezeichnet die 3'-Region hinter dem Gen) mittels einer PCR amplifiziert. Nach der Auftrennung in einem Agarosegel wurden die Fragmente zunächst in den Vektor Topo pCR 2.1 eingesetzt. Das Fragment *sdmA*_{up} trug am Ende die Restriktionsschnittstelle *Spe* I bzw. *Nru* I und *sdmA*_{down} die Schnittstelle *Kpn* I bzw. *Nhe* I. Diese waren so gewählt, dass sich die beiden Fragmente nach dem Einsetzen in den zu konstruierenden Vektor in der gewünschten Orientierung befanden. Der Vektor pNPAC-sdmA wurde durch das Einfügen der beiden Fragmente aus dem Zwischenprodukt in pNPAC über die oben benannten Schnittstellen erhalten (Abb. 3).

Die Vektoren pNPAC-sdmB, -sdmC und -sdmBC wurden über die gleichen Schnittstellen wie pNPAC-sdmA hergestellt. Jedoch wurde das Fragment *sdmB*_{up} über die Oligonukleotide metlvorfw und metlvorr, *sdmB*_{down} über die Oligonukleotide metlnachfw und metlnachrv, *sdmC*_{up} über die Oligonukleotide metllvorfw und metllvorr und *sdmC*_{down} über die Oligonukleotide metllnachfw und metllnachrv amplifiziert (Abb. 3 und Abb. 4).

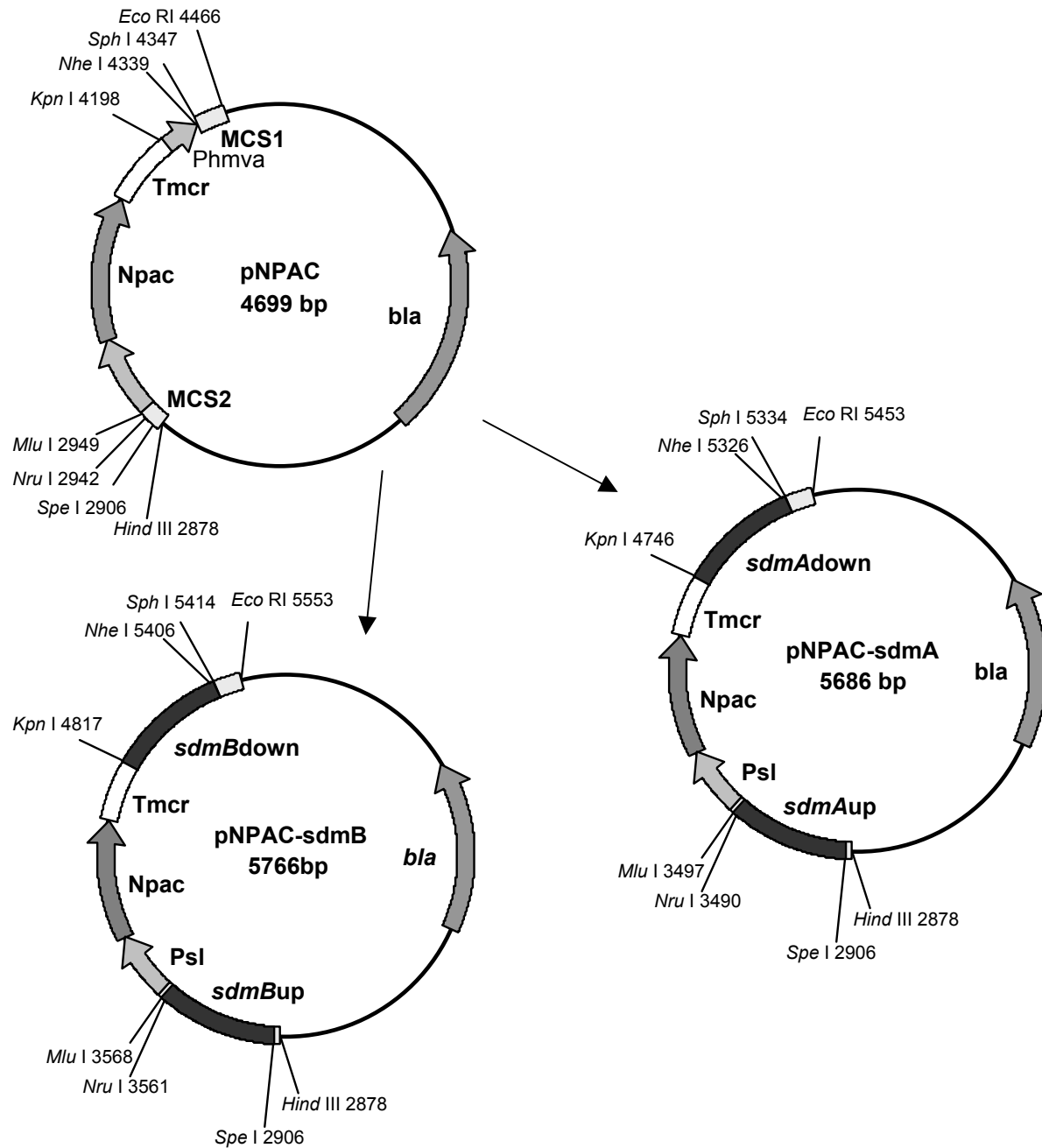


Abb. 3: Konstruktion der Vektoren pNPAC-sdmA und -sdmB aus dem Vektor pNPAC.

Psi: Promotor des S-layer-Gens (Kansy *et al.*, 1994; Konisky *et al.*, 1994); Npac: Gen der Puromycin-N-Acetyltransferase zur Selektion; Tmcr: Terminator der Gene der Methyl-Coenzym M-Reduktase (Müller *et al.*, 1985); Phmva: Promotor des Gens *hmvA* (Agha-Amiri & Klein, 1993); *bla*: Gen der Beta-Lactamase zur Selektion in *E. coli*; *sdmAup*: 5'-Bereich vor dem Gen *sdmA*; *sdmAdown*: 3'-Bereich hinter dem Gen *sdmA*; *sdmBup*: 5'-Bereich vor dem Gen *sdmB*; *sdmBdown*: 3'-Bereich hinter dem Gen *sdmB*.

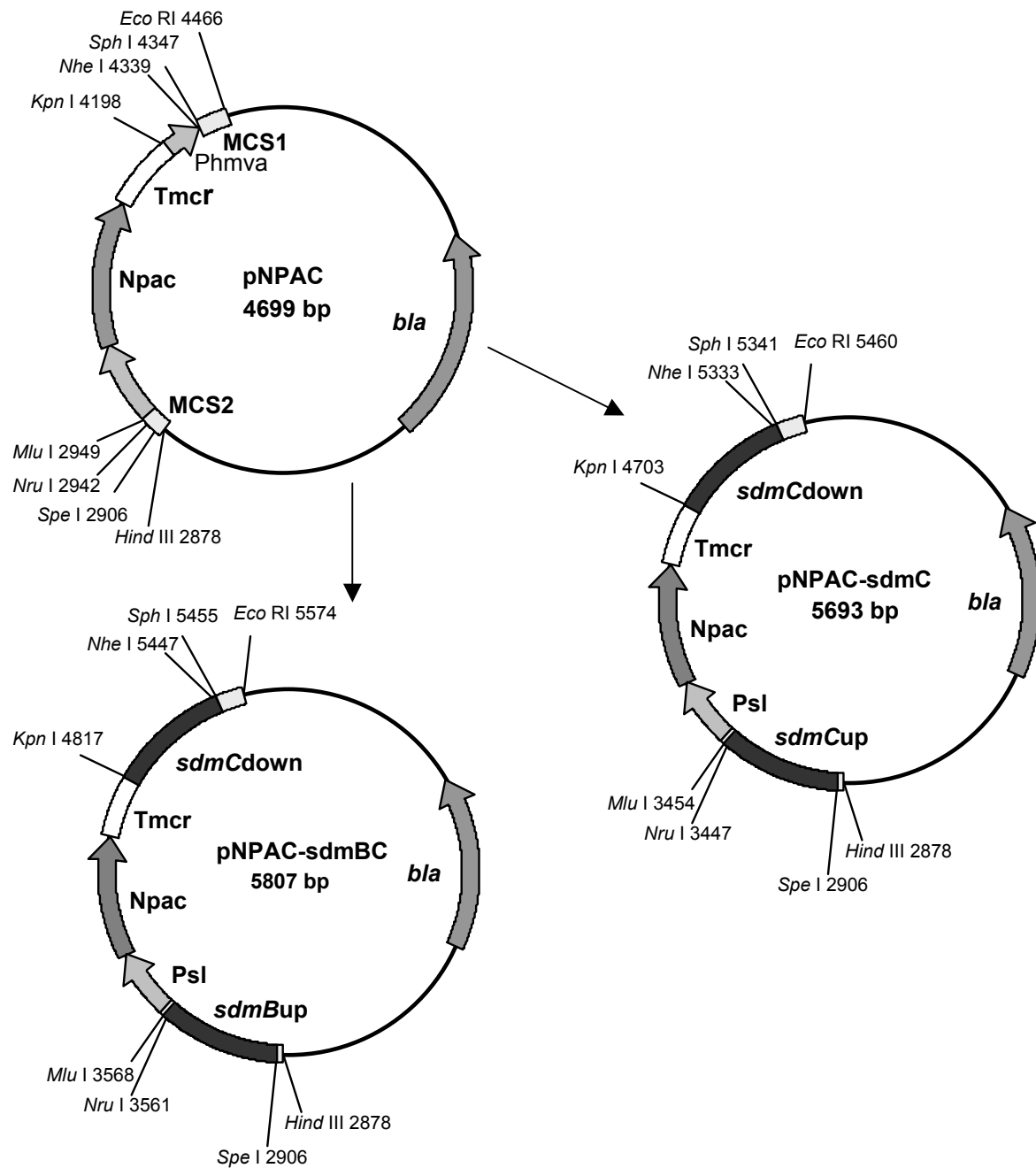


Abb. 4: Konstruktion der Vektoren pNPAC-sdmC und -sdmBC aus dem Vektor pNPAC.

Psi: Promotor des S-layer-Gens (Kansy *et al.*, 1994; Konisky *et al.*, 1994); Npac: Gen der Puromycin-N-Acetyltransferase zur Selektion; Tmcr: Terminator der Gene der Methyl-Coenzym M-Reduktase (Müller *et al.*, 1985); Phmva: Promotor des Gens *hmvA* (Agha-Amiri & Klein, 1993); *bla*: Gen der Beta-Lactamase zur Selektion in *E. coli*; *sdmCup*: 5'-Bereich vor dem Gen *sdmC*; *sdmCdown*: 3'-Bereich hinter dem Gen *sdmC*, *sdmBup*: 5'-Bereich vor dem Gen *sdmB*.

4.8 Mikrobiologische Methoden

4.8.1 Kultivierung von *Methanococcus voltae*

M. voltae wurde unter strikt anaeroben Bedingungen in einer H₂/CO₂ Atmosphäre (80/20) in definiertem Medium (Whitman *et al.*, 1982) kultiviert. Dafür wurde Natriumhydrogencarbonat dem Medium zu einer Konzentration von 36 mM und Cystein zu 6,3 mM zugesetzt. Die Eisensulfatkonzentration wurde auf 14 µM erhöht. Das Medium enthielt L-Aminosäuren zu folgenden Endkonzentrationen: 0,8 mM Aspartat, 0,7 mM Asparagin, 0,7 mM Glutamin, 0,5 mM Glutamat, 0,7 mM Methionin, 0,8 mM Isoleucin, 0,8 mM, 0,9 mM Valin, 1,1 mM Alanin, 1,3 mM Glycin, 0,5 mM Arginin, 0,6 mM Lysin, 1,0 mM Serin, 0,9 mM Threonin, 0,9 mM Prolin, 0,6 mM Phenylalanin, 0,6 mM Tyrosin und 1,2 mM Tryptophan. Ferner wurden dem Medium Vitamine zu nachfolgenden Konzentrationen zugefügt: 82 nM Biotin, 45 nM Folsäure, 486 nM Pyridoxin/HCl, 148 nM Thiamin/HCl, 133 nM Riboflavin, 406 nM Nicotinsäure, 242 nM Liponsäure, 21 µM Na-D-Panthenat und 4 nM Vitamin B12. Anstelle von Selenat wurde dem Medium Selenit, wenn nicht anders angegeben, zu einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben. Bei Bedarf enthielt das Medium DMSe (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), verdünnt in anaerobisiertem Methanol, zu einer Konzentration von 10 µM. Puromycin wurde zu einer Endkonzentration 10 µg/ml zugesetzt. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde *M. voltae* in 60 ml Medium in 1 l Serumflaschen kultiviert. Für gaschromatographische Messungen wurde auf NaHCO₃ im Medium verzichtet. Statt dessen wurde es mit 5 mM Imidazol gepuffert und auf pH 7 eingestellt. Festmedien wurden durch Zugabe von 1,3 % (w/v) Agar (BD Difco™ Bacto™ Agar, BD Bioscience, Heidelberg) hergestellt.

4.8.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde auf Standard I-Medium (Merck, Darmstadt) nach Ausubel *et al.* (1996) kultiviert. Bei Bedarf wurde dem Medium X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid) zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml und Ampicilin zu 100 µg/ml zugesetzt. Durch Zugabe von 1,5 % Agar wurden Festmedien hergestellt.

4.9 Molekularbiologische Methoden

4.9.1 Fällung von DNA/RNA mit Isopropanol

Fällung von DNA bzw. RNA mit Isopropanol erfolgte nach Ausubel et al. (1996).

4.9.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform aus Lösungen erfolgte nach Ausubel et al. (1996).

4.9.3 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA erfolgte in Agarosegelen in 40 mM Tris/Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA nach Sambrook und Russell (2001). Als Größenstandard wurde der GenRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde mit einer 0,2 % (w/v) Ethidiumbromidlösung gefärbt und nach kurzem Wässern unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

4.9.4 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ausubel *et al.*, 1996) oder anhand der Mengenabschätzung in Agarosegelen. Hierzu wurde die zu bestimmende Probe neben einer bekannten DNA-Menge eines Größenstandards aufgetrennt und die Probenmenge im Vergleich zum Standard abgeschätzt. Als Standard diente mit *Pst* I behandelte DNA des Bakteriophagen λ .

4.9.5 Reinigung chromosomaler DNA aus *M. voltae*

Die Reinigung von chromosomaler DNA erfolgte nach Sitzmann und Klein (1991) mit folgenden Veränderungen: Es wurden 10 ml Kultur bei 4 000 x g für 15 min abzentrifugiert und der Zelleniederschlag in 500 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA resuspendiert. Dem Ansatz wurde Ribonuklease A zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben. Nach 45 min bei 37°C wurde das Gemisch zu 0,4 mg/ml mit Proteinase K versetzt und dann für 3 h bei 55°C inkubiert. Proteine wurden durch dreimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform entfernt. Die DNA wurde danach gefällt und anschließend in 200 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 , 1 mM EDTA aufgenommen.

4.9.6 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmide wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (Ausubel *et al.*, 1996) präpariert. Eine Extraktion mit Phenol/Chloroform folgte bei Bedarf, um eine höhere Reinheit zu erhalten. Alternativ wurden Plasmidpräparationen über Anionentauscher nach Angaben der Hersteller (Fastplasmid mini, Eppendorf, Hamburg bzw. Nucleobond AX, Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

4.9.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion mit einer Taq-Polymerase durchgeführt. Dazu wurden 1 pg – 1µg Matrize und je 50 pmol Primer in einem Reaktionspuffer (PCR Mastermix, Eppendorf, Hamburg) zu einem Endvolumen von 25 µl vermischt. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Sambrook und Russell (2001) gewählt. Die PCR-Produkte wurden mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, bei Bedarf eluiert und in Zielvektoren kloniert.

4.9.8 Klonierung von PCR-Produkten, Restriktion und Ligation von DNA

Die Klonierungen von PCR-Fragmenten erfolgte nach Herstellerangaben (TOPO TA Cloning, Invitrogen, Karlsruhe bzw. pGM[®]-T Vector System I, Promega, Mannheim). DNA wurde ebenfalls nach Herstellerangaben mit Restriktionsendonukleasen (New England BioLabs, Frankfurt am Main) behandelt und DNA-Fragmente nach Sambrook und Russell (2001) mittels einer T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) ligiert.

4.9.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

Größere DNA-Mengen wurden durch Elektroelution (Ausubel *et al.*, 1996) aus Agarosegelen extrahiert. Die zu eluierende DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in einen Dialyseschlauch (Dialysis-Membrane Typ 8, cut-off:12-16 kD, pore size 25A, Biomol, Hamburg) überführt und mit wenig Wasser überschichtet. Der Schlauch wurde dann in eine Elektrophoresekammer mit 40 mM Tris/Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA, gegeben und die DNA für 30 min bei 100 V eluiert. Nach kurzem Umpolen der Spannung erfolgte die Fällung der DNA und der Niederschlag wurde anschließend in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA aufgenommen. Die Isolation kleinere DNA-Mengen aus Agarosegelen über Anionentauscher wurde nach Angaben der Hersteller (Perfectprep[®] Gel Cleanup Kit, Eppendorf, Hamburg und QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) durchgeführt.

4.9.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Die dafür verwendeten Oligonukleotide (MWG Biotech AG, Ebersberg) waren mit dem Infrarotfarbstoff IRD-800 markiert. Die Sequenzreaktion wurde mit dem Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Für eine Reaktion wurden 1 pmol DNA und 2 pmol des markierten Primers mit Wasser auf ein Volumen von 13 µl

gebracht. Davon wurden jeweils 3 µl in vier verschiedene Reaktionsgefäße aliquotiert, zu denen je 1 µl der Sequenzierreagenz des entsprechenden Dideoxy-Nukleotids gegeben wurde. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 20 µl Mineralöl überschichtet und die Amplifikation in beschriebener Weise einer PCR durchgeführt. Danach erfolgte das Stoppen der Reaktion mit 3 µl des im Kit enthaltenen formamidhaltigen Auftragspuffers. Die Abbruchprodukte der Reaktion wurden mittels eines Sequenzierers (Li-COR II 4000S, MWG Biotech AG Ebersberg) in einem denaturierenden 6 % Acrylamidgel (SequaGel XR, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) aufgetrennt. Die während des Laufs anfallenden Daten wurden gesammelt und anschließend ausgewertet.

4.9.11 Primer Extension

Der Transkriptionsstartpunkt von Genen wurde nach Ausubel et al. (1996) mit folgenden Modifikationen bestimmt: Es wurden 20 µg Gesamt-RNA aus *M. voltae* in exponentieller Wachstumsphase, 3 pmol eines mit IRD-800 markierten Oligonukleotids, (MWG Biotech AG Ebersberg), 2 µl 10 mM dNTPs (je 2,5 mM) in 12 µl H₂O für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf 42°C langsam abgekühlt. Dem Ansatz wurden 10 mM DTT, 200 U SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers zugegeben. RNaseOut™ (Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe) wurde durch 40 U RNase Block Ribonuclease Inhibitor (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) ersetzt. Das Gemisch wurde in einem Endvolumen von 20 µl Reaktionspuffer für 30 min bei 42°C inkubiert und nach Zugabe von 180 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml mit Glycogen und von 0,3 M mit Na-Acetat, pH 5,6 versetzt. Nach dem Mischen des Ansatzes wurden 0,8 V Isopropanol hinzugefügt und die gefällten Nukleinsäuren für 30 min bei 13 000 x g und 4°C sedimentiert. Der Niederschlag wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 3 µl H₂O und 2 µl formamidhaltigem Auftragspuffer (DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgenommen. Vor der Analyse wurde die Probe für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend neben einer Sequenzreaktion, die mit dem gleichen Oligonukleotid durchgeführt worden war, in einem denaturierenden 6 % Acrylamidgel

(SequaGel XR, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) mittels eines automatischen Sequenzierers (LI-COR II 4000S MWG Biotech AG Ebersberg) aufgetrennt und analysiert.

4.9.12 RT-PCR

Die RT-PCR wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt (SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase, Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe). Zur cDNA komplementäre RNA wurde mit RNase H ebenfalls nach den Angaben des Protokolls entfernt.

4.9.13 Herstellung elektrokompenter Zellen aus *E. coli*

Die Herstellung elektrokompenter Zellen erfolgte mit dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue nach Angaben von Sambrook und Russell (2001).

4.9.14 Elektrotransformation von *E. coli*

Die Elektrotransformation von *E. coli* wurde nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Dafür wurden elektrokompente Zellen langsam auf Eis aufgetaut, 50 µl der Zellsuspension mit 10 ng - 25 ng der zu transfizierenden DNA-Lösung durchmischt und in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt. DNA-Lösungen aus Ligationsansätzen wurden vorher auf einer Dialysemembran (MF-Millipore™ Membrane Filters, Porengröße 0,025 µm, Millipore, Eschborn) gegen Wasser dialysiert. Die Zellen wurden dann mit einem Puls unter einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach erfolgtem Spannungsstoß wurden sie in 1 ml Standard-Medium (Merck, Darmstadt) für 30 min inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigem Festmedium ausplattiert.

4.9.15 Transfektion von *M. voltae*

Die Transfektion von *M. voltae* erfolgte in anaerober Atmosphäre (5% H₂, 20% CO₂, 75% N₂) nach Metcalf *et al.* (1997). Dazu wurde linearisierte DNA (ca. 5 pmol) gefällt und anschließend in 225 µl 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,0 aufgenommen. Nach der Zugabe von 25 µl EscortTM Transfection Reagent (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde 1 ml einer *M. voltae*-Kultur mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,3 - 0,6 durch Zentrifugation bei 13 000 x g für 5 min sedimentiert und die Zellen in 0,5 ml 0,68 M Saccharose-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit der DNA-Lösung vermischt, nach 2 h in 10 ml Medium überführt und ohne Selektion bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von Puromycin zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml erfolgte nach 3 h. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von einer OD₆₀₀ von 1 kultiviert und dann zur Selektion auf puromycinhaltigem Festmedium ausplattiert.

4.9.16 Qualitativer und quantitativer Glucuronidase-Reportergentest

Der Glucuronidasetest erfolgte qualitativ modifiziert nach Beneke *et al.* (1995). Zur Aktivitätsbestimmung wurde 1 ml *M. voltae*-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 13 000 x g für 5 min sedimentiert und der Überstand abgenommen. Bei Bedarf wurde der Niederschlag bei -80 °C bis zur Messung gelagert. Die Zellen wurden in 1 ml 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,0 100 mM β-Mercaptoethanol lysiert und für 5 min schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13 000 x g und 4°C für 5 min wurden 0,5 ml des Überstandes zu einer Endkonzentration von 1 mM mit PNPGLuc (4-Nitrophenyl-β-1,4-Glucuronid) vermischt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur quantitativen Aktivitätsbestimmung wurden die Zellrümpfer nach dem Schütteln durch Zentrifugation bei 13 000 x g für 5 min und 4°C sedimentiert. 30 µl des Überstandes wurden mit 300 µl 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,0 100 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PNPGLuc vermischt und die Reaktion dadurch gestartet. Die Extinktion der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und in 60 minütlichen Intervallen bei 28°C verfolgt. Mit Hilfe einer Eichgeraden mit p-Nitrophenol wurde die Aktivität der Glucuronidase bestimmt und in mU (nmol Nitrophenol/min)/mg Gesamtprotein angegeben.

4.9.17 Herstellung radioaktiver DNA Sonden

DNA-Fragmente wurden durch Zufallsmarkierung nach Herstellerangaben (Hexanucleotide Mix, Roche Diagnostics, Mannheim) radioaktiv markiert. Dazu wurde die zu markierende DNA mittels entsprechender Oligonukleotide amplifiziert und in den Vektor Topo pCR 2.1 eingefügt. Eine Sequenzierung stellte sicher, ob tatsächlich das richtige Fragment eingesetzt wurde. Anschließend wurde es mittels Restriktionsenzymen wieder ausgeschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt, eluiert und dann zur Markierung eingesetzt. Der Ansatz enthielt 30 ng zu markierende DNA, 2 µl α [³²P]-dATP zu 3000Ci/mol und die übrigen Nukleotide, dCTP, dGTP, dTTP, zu einer Endkonzentration von je 0,07 mM. Das Gemisch wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und die markierte DNA danach über Gelfiltrationssäulchen (MobiSpin S-200, Mo Bi Tec, Göttingen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

4.9.18 Southern-Blot-Analyse

4.9.18.1 Southern-Blot

Der Transfer der DNA aus Agarosegelen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus, Carl Roth, Karlsruhe) erfolgte durch abwärtsgerichteten alkalischen Transfer nach Sambrook und Russell (2001). Nach Beendigung des Transfers wurde die DNA durch UV-Strahlung (245 nm, 12 kJ/min, 2 min, UV Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) fixiert.

4.9.18.2 Southern-Hybridisierung

Die Hybridisierung von DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde erfolgte nach Sambrook und Russell (2001) in 0,5 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 7 % SDS, 1 mM EDTA. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 10 min mit 0,5 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 5 % SDS und zweimal für 10 min mit 0,5 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 1 % SDS gewaschen. Bei Bedarf wurde die radioaktive Sonde wieder von der Membran entfernt. Dazu wurde sie für 2 h in einem

Hybridisierungssofen bei 90°C in 1 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 7 %SDS inkubiert und anschließend einmal für 30 min bei 90°C mit 0,5 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2, 1% SDS gewaschen.

4.9.18.3 Dot-Blot

Dot-Blots wurden nach Ausubel et al. (1996) angefertigt. Dazu wurden 2 µl DNA-Lösung aus einer Plasmidpräparation auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetropft und die Membran für 5 min zur Denaturierung der DNA auf 1,5 M NaCl, 0,5 NaOH gelegt. Anschließend wurde die Nylonmembran mit 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0 gewaschen und die DNA durch UV-Strahlung (245 nm, 12 kJ/min, 2 min, UV Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) fixiert. Anschließend konnte sie für eine Southern-Hybridisierung verwendet werden.

4.9.19 Präparation von RNA aus *M. voltae*

Die Präparation von RNA aus *M. voltae* erfolgte nach Chomczynski und Sacchi bzw. nach Sambrook und Russell (1987 bzw. 2001) und nach Herstellerangaben (TRIzol[®] Reagents, Invitrogen, Karlsruhe). Dazu wurden 10 ml einer exponentiellen *M. voltae* Kultur im Ethanol-Trockeneisbad schnell abgekühlt und anschließend bei 4000 x g und 4°C für 20 min sedimentiert. Der Zelleniederschlag wurde mit 1,6 ml Trizol lysiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 320 µl Chloroform wurde der Ansatz bei 13 000 x g und 4°C für 14 min zentrifugiert und die wässrige Phase mit 800 µl Phenol, gepuffert mit 0,2 M Na-Acetat, pH 4,0, durchmischt. Nach 5 min wurden 320 µl Chloroform zugegeben und der Ansatz für 15 min bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die RNA dann in beschriebener Weise gefällt und in 20 µl mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes H₂O aufgenommen.

4.9.20 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

RNA wurde in unterschiedlichen Mengen durch denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese nach Ausubel et al. (1996) in 40 mM MOPS, pH 7,0, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA getrennt. Der Ladepuffer bzw. Größenstandard wurde nach Angaben des Herstellers verwendet (2 x Loading Dye Solution for RNA electrophoresis bzw. RNA Ladder High Range, ready to use, MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

4.9.21 Northern-Blot-Analyse

4.9.21.1 Northern-Blot

Die Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf eine Membran erfolgte durch abwärtsgerichteten Transfer (Chomczynski, 1992). Hierzu wurde das Agarosegel 15 min schüttelnd in DEPC behandeltes H₂O inkubiert und anschließend die RNA mit 3 M NaCl, 8 mM NaOH auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus, Carl Roth, Karlsruhe) übertragen. Die RNA wurde danach durch UV-Strahlung (245 nm, 12 kJ/min, 2 min, UV Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) fixiert und die Membran mit 0,02% (w/v) Methylenblau in 0,3 M Na-Acetat, pH 5,5 gefärbt. Mit destilliertem H₂O wurde diese dann bis zur gewünschten Kenntlichkeit der RNA entfärbt.

4.9.21.2 Northern-Hybridisierung

Die Hybridisierung von RNA mit einer radioaktiv markierten Sonden erfolgte unter den Bedingungen einer Southern-Hybridisierung.

4.9.22 Herstellen einer partiellen Genbank

Die Erstellung einer partiellen Genbank wurde nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA mit einem Restriktionsenzym behandelt und in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Für die Restriktion wurde ein Enzym gewählt, das glatte Enden generieren, da die erhaltenen Fragmente nach Anhängen eines Adenyl-Restes in einen Vektor mit Thymidyl-Überhang eingesetzt werden sollten. Nach dem Auftrennen der DNA wurde die Größe des zu untersuchenden Fragments mittels einer Southern-Blot-Analyse bestimmt. Dabei wurde in der Hybridisierung eine Sonde eingesetzt, die komplementär zu einem Teilabschnitt des Fragments war. Insgesamt 10 µg der behandelten genomischen DNA wurden erneut in einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus dem Bereich ausgeschnitten, dessen Größe zuvor mit der Sonde ermittelten worden war. Anschließend wurden die Fragmente eluiert, nach Herstellerangaben mit Shrimp-Alkalischer-Phosphatase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt und danach gefällt. Der Niederschlag wurde in destilliertem H₂O gelöst und zu 50 µM mit dATP in 50 µl Reaktionspuffer (Taq-Reaction-Buffer, Eppendorf, Hamburg) vermischt. Nach Zugabe von 1U Taq-Polymerase (Taq DNA Polymerase, Eppendorf, Hamburg) erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 72°C. Die DNA wurde erneut gefällt, in 10 µl destilliertem H₂O aufgenommen und nach Angaben des Herstellers in den Zielvektor (TOPO TA Cloning, Invitrogen, Karlsruhe) eingefügt. Dafür wurden 3 µl der DNA-Fragmente (ca. 100 fmol) und 1 µl des Vektors (ca. 4 fmol) verwendet. Die anschließende Transformation erfolgte mit dem gesamten Ligationsansatz und chemisch kompetenter *E. coli* Top10-Zellen. Diese wurden zunächst nicht zur Selektion auf Festmedium ausplattiert, sondern die Zellen wurden direkt mit Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl der Kultur mit einer Helber-Zählkammer bestimmt, ca. 1000 Zellen auf antibiotikahaltigem Festmedium ausplattiert und eine positiv geladene Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus, Carl Roth, Karlsruhe) direkt auf die Oberfläche der Platten gelegt. Nach 12 h bei 37°C wurde die Membran abgenommen und zur Koloniehybridisierung verwendet.

4.9.23 Screening einer partiellen Genbank durch Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierung wurde nach Sambrook und Russell (2001) mit einer radioaktiv markierten Sonde durchgeführt. Die Plasmide wurden anschließend aus positiven Klonen präpariert und deren Richtigkeit über einen Dot-Blot verifiziert. Danach wurde die Sequenz der eingefügten Fragmente bestimmt.

4.9.24 Screening einer genomischen DNA Phagenbank aus *M. voltae*

Eine Genombank von *M. voltae* in Form einer Phagenbank lag für die vorliegende Arbeit zur Verfügung (Noll, I., dieses Labor). Die durchschnittliche Fragmentlänge lag bei ca. 5 kb. Aufgrund der Genomgröße von *M. voltae* von 1900 kb ergab sich daraus eine theoretische Anzahl von 380 zu untersuchenden Phagen, um das Genom vollständig abzudecken.

Für das erste Screening wurde eine Anzahl von 500 Plaques pro Platte gewählt. Das Screening erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Lambda ZAP II Express[®] Predigested Vector Kit (Stratagene, Heidelberg). Die Phagen wurden jedoch nicht auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, sondern auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roti[®]-Nylon plus, Carl Roth, Karlsruhe). Die Hybridisierung der Filter erfolgte dagegen wie beschrieben. Die Plasmide wurden aus positiven Klonen präpariert und deren Richtigkeit über einen Dot-Blot verifiziert. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung der in den Plasmiden enthaltenen Fragmente.

4.10 Chromatographische Methoden

4.10.1 Gaschromatographischer Nachweis von CH₄

Für den gaschromatographischen Nachweis von Methan wurde 1 ml einer *M. voltae*-Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,8 geerntet und für 5 min und bei 13 000 x g und Raumtemperatur sedimentiert. Der Zelniederschlag wurde dreimal mit 0.4 M NaCl, 15 mM NaAcetate, 14 mM MgSO₄, 14 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 5 mM NH₄Cl, 1 mM K₂HPO₄, 1 mM CaCl₂ gewaschen und in 1 ml desselben Puffers aufgenommen. Die

Zellsuspension wurde in 10 ml Serumflaschen überführt und gasdicht verschlossen. Die Zentrifugation und das Waschen der Zellen erfolgte dabei in anaerober N_2/H_2 (95%/5%) Atmosphäre. Für die Messungen wurden die Suspensionen entweder mit H_2 oder mit H_2/CO_2 (80%/20%) überschichtet. TMA, DMA, MMA, DMS oder Methanol wurden zu einer Endkonzentration von je 10 mM zu den Zellsuspensionen zugegeben. Methan wurde anschließend gaschromatographisch mit einem Flammenionisationsdetektor (CE Instruments, GC 8000 series, Mailand, Italien) bestimmt. Die Messbedingungen sind in Tab. 4 angegeben. Für die Erstellung von Eichgeraden wurden Methanstandards bekannter Konzentration (0,25% und 0,5% CH_4 in Luft) verwendet, wobei die gemessenen Peakhöhen den Gaskonzentrationen proportional waren. Anhand der Peakhöhen der Eichwerte konnten die unbekanntes CH_4 -Konzentrationen quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurden 0,2 ml Gas in Zeitabständen aus der Gasphase der Zellsuspensionsansätze entnommen und direkt in den Gaschromatographen mittels einer gasdichten Spritze injiziert.

Tab. 4 Bedingungen für die gaschromatographische Messung von CH_4

Einstellungen am GC		
Detektor		Flammenionisationsdetektor
Säule		Edelstahlsäule (130 × 0,2 cm)
Material		Molekularsieb 0,5 nm
Temperatur	(Injektor)	80 °C
	(Säule)	150 °C
	(Detektor)	150 °C
Trägergas		Stickstoff
Eingangsdruck		5 bar
Trägergasfluss		30 ml/min
Brenngas		Wasserstoff/Luft
Eingangsdruck	(H_2)	5 bar
	(Luft)	5 bar
Brenngasfluss	(H_2)	10 ml/min
	(Luft)	250 ml/min

5 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden die Gene der Hydrogenasen Vhc und Frc nur bei Selenmangel transkribiert (Berghöfer *et al.*, 1994). In Expressionsanalysen mittels der 2D-Elektrophorese wurden weitere Proteine identifiziert, die ebenfalls nur unter Selenlimitierung synthetisiert werden (Niess, 2001). Die Bestimmung der N-terminalen Peptidsequenzen erfolgte von zwei, aus den Gelen ausgeschnittenen Proteinen. Von einem wurde zudem auch interne Peptidsequenzen nach Behandlung mit Trypsin ermittelt. Verwandte Proteine konnten aus den Teilsequenzen zu diesem Protein durch eine Datenbankrecherche nicht gefunden werden.

Für das andere jedoch wurde ein verwandtes Protein mit unbekannter Funktion und einer Übereinstimmung der N-terminalen Peptidsequenz von 79% in *M. jannaschii* gefunden. Es wird in dieser Arbeit nicht untersucht, da es bei *M. jannaschii* vermutlich keine zu *M. voltae* vergleichbare Anpassung an Selenmangel gibt. Beispielsweise wächst *M. jannaschii* im Gegensatz zu *M. voltae* nicht auf einem selenarmen Medium (Burggraf *et al.*, 1990; Mukhopadhyay *et al.*, 1999).

5.1 Identifizierung des Gens *sdmA*

Für weitere Untersuchungen war es notwendig zunächst das Gen des Proteins zu identifizieren, dessen Funktion in der vorliegenden Arbeit geklärt werden soll. Anhand der oben erwähnten internen Peptide wurden die heterologen Primer pep2ufw(sdm) und pep1urv(sdm) zur Ermittlung des Gens abgeleitet. Als Matrize wurde genomische DNA aus *M. voltae* eingesetzt. Mit den beiden Primern entstand ein ca. 500 bp großes PCR-Produkt, das nach dem Einsetzen in den Vektor Topo pCR 2.1 sequenziert wurde. Die Sequenz ist in Abb. 5 dargestellt. Allerdings konnte der 5'- und 3'-Bereich des Gens über die PCR nicht bestimmt werden. Diese Sequenzen wurden durch ein Screening einer chromosomaler Phagenbank von *M. voltae* und partieller chromosomaler Plasmid-Genbanken über eine Koloniehybridisierung ermittelt. Eine Übereinstimmung der identifizierten DNA-Sequenz mit dem ausgeschnittenen Protein wurde durch ein internes Peptid

(GLADGMNR) gezeigt, das ebenfalls aus der erwähnten Proteinsequenzierung erhalten wurde. Dieses liegt innerhalb der Aminosäuresequenz, die aus der DNA-Sequenz abgeleitet wurde. In einer Datenbankrecherche (Blastp, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurden Sequenzidentitäten des zu untersuchenden Proteins mit Corrinoid-Proteinen aus *Methanosarcina* festgestellt, die dort mit Methyltransferasen Komplexe bilden (Burke & Krzycki, 1995; Burke & Krzycki, 1997). Sie sind in der Methanogenese an der Übertragung von Methylgruppen aus methylierten Substraten beteiligt (Hippe *et al.*, 1979; Walther *et al.*, 1981). Im Folgenden wird dieses Protein als SdmA (für Dimethylselenid Demethylierung) bezeichnet.

Genbanken durch Koloniehybridisierung identifiziert. Für beide Verfahren wurde die Sonde I verwendet, die an das Gen *sdmA* bindet. Das Fragment für die Markierung wurde mit den Oligonukleotiden p2sonde3' und p2sonde5' amplifiziert. Bei der späteren Hybridisierung mit der Sonde betrug die Temperatur 55°C. Zunächst wurde aber die Mindestzahl der zu untersuchenden Phagen berechnet. Aufgrund der Größe des *M. voltae*-Genoms von 1900 kb (Sitzmann & Klein, 1991) ergab sich daraus eine theoretische Anzahl von 1750 zu untersuchenden Phagen, wenn ein Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % gefunden werden sollte (Clarke & Carbon, 1976). Mit den Phagen aus positiven Plaques der Southern-Hybridisierung wurden erneut XL1-Blue MRF'-Zellen infiziert. Die Exzision der Plasmide erfolgte durch Koinfektion der Zellen mit Hilfe eines Helferphagens, der den Replikationsstartpunkt f1 auf dem Lambda ZAP II Vektor erkennt. Das ausgeschnittene Produkt ergibt ein pBluescript SK (+/-) Phagemid, verpackt in die Phagenköpfe des Helferphagens. Diese wurden nach Infektion des *E. coli*-Stammes SOLRTM durch eine Plasmidpräparation erhalten. Zur Kontrolle wurden sie über einen Dot-Blot verifiziert, wobei wieder die Sonde I verwendet wurde. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pBluescript ohne Insert, das auf dem Dot-Blot kein Signal zeigte. Eine Wechselwirkung der Sonde mit der Vektorsequenz war damit ausgeschlossen.

Für die Identifizierung des 5'- und 3'-Bereichs des Gens *sdmA* mittels der Herstellung einer partiellen Plasmid-Genbank, wurde die genomische DNA mit *Eco* RV behandelt. Eine Schnittstelle dieses Restriktionsenzymys befindet sich auch in dem Gen *sdmA* (Abb. 5). Nach der Behandlung der chromosomalen DNA würde man zwei Fragmente erwarten, die jeweils einen Teil des Gens *sdmA* tragen sollten. Ihre Größen wurden durch eine Southern-Blot-Analyse mit der Sonde I ermittelt (Abb. 6). Die Hybridisierungstemperatur betrug dabei 55°C. Das eine Fragment hatte eine Größe von ca. 2 000 und das andere von ca. 1 200 bp. Die mit *Eco* RV behandelte DNA wurde dann über ein 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente aus den Bereichen um 2 000 bzw. um 1 200 bp ausgeschnitten, eluiert und zur Erstellung von zwei, den beiden Bereichen entsprechenden, partiellen Genbanken verwendet. Nach der Koloniehybridisierung mit der Sonde I wurden positive Klone aus beiden Genbanken isoliert und die Ergebnisse über einen Dot-Blot verifiziert. Als Negativkontrolle diente der Vektor Topo pCR 2.1 mit einem bekannten Insert, das mit Sonde I kein Hybrid bilden sollte. Die Negativkontrolle zeigte kein

Signal, wodurch eine Wechselwirkung der Sonde mit der Vektorsequenz auszuschließen war.

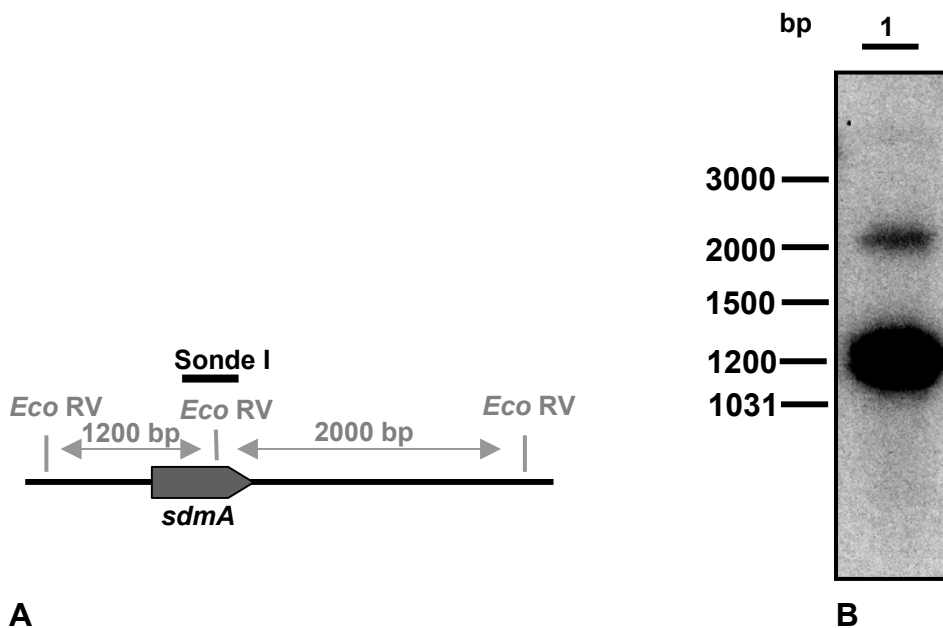


Abb. 6: Southern-Blot-Analyse des Gens *sdmA*

A: Schematische Darstellung der Schnittstellen von *Eco* RV in der chromosomalen DNA von *M. voltae* aus dem Bereich um das Gen *sdmA*.

B: 5 µg chromosomale DNA von *M. voltae* wurden mit *Eco* RV behandelt und in einer Southern-Blot-Analyse untersucht. Für die Hybridisierung wurde die Sonde I verwendet. Die Bindestelle der Sonde ist in der schematischen Darstellung angedeutet. bp: Längenstandard in Basenpaaren.

5.3 Im 3'-Bereich des Gens *sdmA* liegen die offenen Leseraster *sdmB* und *sdmC*

An den aus den verschiedenen Screeningverfahren erhaltenen Klone wurde die Sequenz des 5'- und 3'-Bereichs des Gens *sdmA* mit den Standard-Sequenzierprimern M13fw und M13rv teilweise ermittelt. Die Bindestellen dieser Oligonukleotide findet man in den gängigen Vektoren und sie ermöglichen die Sequenzierung eines eingefügten Fragments, wenn es von diesen Stellen flankiert ist. Bei sehr großen Inserts ist die Sequenzierung allein mit den Standardprimern nicht mehr möglich. Die Sequenz von *sdmA* und des umgebenden Bereichs, die durch M13fw und M13rv nicht ermittelt werden konnte, wurde mit den Primern ird800corri25, ird800P2walker5B, corrimet16RV und corrimet16FW bestimmt. Dabei

wurden noch zwei weitere offene Leseraster, *sdmB* und *sdmC*, identifiziert. Die komplette Sequenz findet sich in der Genbank unter der Zugangsnummer AJ575802.

5.4 Das Gen *sdmA* codiert für ein mögliches Corrinoïd-Protein, *sdmB* und *sdmC* für mögliche Methyltransferasen

Die relative chromosomale Anordnung der Gengruppe *sdmABC* ist schematisch in Abb. 7 dargestellt. Durch einen Sequenzvergleich auf Aminosäureebene (Blastp, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurden verwandte Proteine zu SdmA, SdmB und SdmC gefunden. Das Protein SdmA zeigt, wie bereits erwähnt, Sequenzidentitäten zu verschiedenen Corrinoïd-Proteinen. Diese sind unter anderem an der Demethylierung von Methylaminen in *Methanosarcina* beteiligt (Hippe *et al.*, 1979; Walther *et al.*, 1981). Dort bilden sie mit Methyltransferasen Komplexe, die die Methylgruppen der Substrate auf die Corrinoïd-Proteine übertragen. Der Transfer der Methylgruppe von den Corrinoïd-Proteinen auf den Akzeptor Coenzym M wird dann von einer anderen Methyltransferase katalysiert. (Burke & Krzycki, 1995; Burke & Krzycki, 1997). In Abb. 8 ist ein Sequenzvergleich funktionell bekannter Corrinoïd-Proteine aus *Methanosarcina barkeri* und eines nicht näher charakterisierten aus *Methanosarcina acetivorans* mit SdmA dargestellt. Das Protein MtbC aus *M. barkeri* bzw. aus *M. acetivorans* hat eine Sequenzübereinstimmung von 45 %, die Proteine MttC und MtmC von 38 % bzw. 35 % zu SdmA.

Außerdem weist die Aminosäuresequenz von SdmA ein Motiv mit der Sequenz Asp₁₀₄-X-His₁₀₆-X-X-G₁₀₉-X_n-Ser₁₅₁-X-Leu₁₅₃-X_n-Gy₁₈₂-Gly₁₈₃ auf, das als Cobalamin-Bindemotiv vorgeschlagen wurde (Marsh & Holloway, 1992). Das Motiv Asp-X-His-X-X-Gly-X₄₁₋₄₂-Thr/Ser-X-Leu-X₂₄₋₂₈-Gly-Gly kommt in einer Reihe anderer Corrinoïd-abhängiger Enzyme, wie z.B. bei der Cobalamin-abhängigen Methionin-Synthase MetH aus *E. coli* (Banerjee *et al.*, 1989), der Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii* (Marsh *et al.*, 1989), der Glutamat-Mutase aus *Clostridium cochlearium* (Zelder *et al.*, 1994) und bei MtaC aus *M. barkeri* (Sauer & Thauer, 1998) vor.

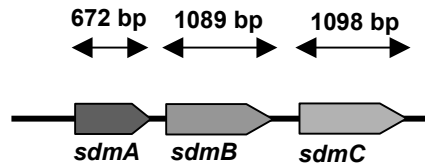


Abb. 7: Relative, chromosomale Anordnung der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC*

Die jeweiligen Größen der Gene sind in Basenpaaren, bp, angegeben. Das Gen *sdmA* codiert für ein Corrinoïd-Protein, *sdmB* und *sdmC* für Methyltransferasen.

	10	20	30	40	50	60
MtbC <i>M. acetivorans</i>	MRMASKEELLQELSDAIVSCKKDRVIAAVEKAKEV-MEPAEIIEKGLAAGMNQVGT LFER					
MtbC <i>M. barkeri</i>	---MSKEELLQELADAIISCKKDTVLAVVEKAKGE-LEPSEIIEKGLAAGMNEVGVRFER					
MttC <i>M. barkeri</i>	--MANKEEIIAKAKEAITDFDELAEEVANEALAAGIDPVELIEKFTAGMEEVGEKFGQ					
SdmA <i>M. voltae</i>	-MTESQENMIKQLSDAVLDMDEDLTEELSDTYIKNGYNAFEGISKGLADGMNRAGVMYEE					
MtmC <i>M. barkeri</i>	---MANQEIFDKLRDAIVNQNNAVGTPELCKEALAAGVPALDIITKGLSVGMKIVGDKFEA					
	70	80	90	100	110	120
MtbC <i>M. acetivorans</i>	GKLF LPHV MMAAD SMTAGV NILEAEMPAG-TETK KLGVI VNGTVEGDVHDIGKSIVSTML					
MtbC <i>M. barkeri</i>	GKLF LPHV MMAAD AMTAGVA ALKDLMP EG-ASGSKLGVIVNGTVEGDVHDIGKAI VSTML					
MttC <i>M. barkeri</i>	GELFLPHVLA AAEAMNSG IKVITPEMEKRKSQTKSLGTVAIGTIEGDIHSIGKDIVASML					
SdmA <i>M. voltae</i>	E EYFIPELLVCS DAMYKGLD IILKPHLQYS--ENDEKMKAVVGVVEGDTHDIGKNLFKIML					
MtmC <i>M. barkeri</i>	AEIFLPQIMMSGKAMSNAMEVLTPELEKNKKEGEEAGLAITFVAEGDIHDIGHRLVTTML					
	130	140	150	160	170	180
MtbC <i>M. acetivorans</i>	QSAGFEVHDIGRDVPIKNFVEKAKEVNAD--MIGLSALMTTMMQQRDVI ELLKEEGMRE					
MtbC <i>M. barkeri</i>	QSAGFEVHDIGRDVPIRNFIEKAKEVNAD--MIGISALMTTTLQGQKSVI ELLKEEGLRD					
MttC <i>M. barkeri</i>	NIAGFKVVDLGRDVPINTFVEKVKELKPQ--VVASSALMTTMMVNQIQIEEQLKEAGVRD					
SdmA <i>M. voltae</i>	ETQGF EVDLGRDVPPIEFVEKAKEVNAD--VIGLSTLMTTMDNMKVVIDILKEQNMKD					
MtmC <i>M. barkeri</i>	GANGFQIVDLGVDV L NENVVEEA AKHKG EKVLVGSALMTTSM LGQKDLMDRLNEEKL RD					
	190	200	210	220		
MtbC <i>M. acetivorans</i>	RVKVMVGGAPATQAWADKIGADCYAENASEAVAKAKELL L GK-----					
MtbC <i>M. barkeri</i>	KVKVMVGGAPATQAWADKIGADCYAENATEAVAKAKELLA-----					
MttC <i>M. barkeri</i>	QVKTMVGGAPVTQDWADKIGADIYGESANDAVAKVKAALNV-----					
SdmA <i>M. voltae</i>	NTIVMVG GGPISQSFADKIGADGYAPEASKSARIAKELVSKLKD SKLN					
MtmC <i>M. barkeri</i>	SVKCMFGGAPVSDKWIEEIGADATAENAAEA AKVALEVMK-----					

Abb. 8: Sequenzvergleich verschiedener Corrinoïd-Proteine aus *M. barkeri* und *M. acetivorans* mit dem Protein SdmA aus *M. voltae*.

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustlW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Die Aminosäuren der Konsensussequenz sind dunkelgrau, Aminosäuren mit chemisch ähnlichen Eigenschaften zum Konsensus sind hellgrau hinterlegt. MtbC aus *M. acetivorans* (Zugangsnummer NP_615887) und MtbC aus *M. barkeri* (Zugangsnummer AAD14629) zeigen eine Sequenzidentität zu 45 % mit SdmA. Die Proteine MttC (Zugangsnummer AAD14631) und MtmC (Zugangsnummer O30641) aus *M. barkeri* zeigen eine Sequenzidentität zu 38 % bzw. 35 % mit SdmA.

Die Aminosäuresequenzen der Proteine SdmB und SdmC weisen Übereinstimmungen zu Methyltransferasen auf, die, wie oben erwähnt, in der methylotrophen Methanogenese die Methylgruppe von Corrinoid-Proteinen auf den Akzeptor Coenzym M übertragen.

In Abb. 9 ist ein Vergleich funktionell bekannter Methyltransferasen aus *M. barkeri* und einer nicht näher charakterisierten aus *M. acetivorans* mit SdmB und SdmC dargestellt. Die beiden Methyltransferasen aus *M. voltae* haben untereinander eine Sequenzidentität von 66 %. MtsA zeigt eine Übereinstimmung von 22 % zu SdmB und von 24 % zu SdmC, MtbA von 23 % zu SdmB und von 24 % zu SdmC und MtaA von 24 % zu SdmB und von 25 % zu SdmC. Das Protein MtaA aus *M. acetivorans* ist zu 23 % identisch mit SdmB und zu 24 % mit SdmC. Zudem weisen die Aminosäuresequenzen von SdmB und SdmC auf ein mögliches Zinkbindemotiv, His₂₃₉-X-Cys₂₄₁-X_N-Cys₃₂₂ bzw. His₂₄₁-X-Cys₂₄₃-X_N-Cys₃₂₄, hin. Von dem Motiv His-X-Cys-X_N-Cys wurde gezeigt, dass in der Cobalamin-unabhängigen Methionin-Synthese MetE und der Methyltransferase MtbA der Imidazolring des Histidins und die beiden Thiolgruppen der Cysteine Zink koordinieren (Zhou *et al.*, 1999; Gencic *et al.*, 2001).

	10	20	30	40	50	60
MtaA <i>M. barkeri</i>	-----MSEFTL	KTRLLAALE	GKPV	DKVPVCS	VTQTG	IVELMDKVGAAWPEAHTNP
MtaA <i>M. acetivorans</i>	--MTDMSEFTL	KTRLLAAV	KGEPV	DKVPVCS	VTQTG	IVELMDEVGAPWPEAHTNP
MtbA <i>M. barkeri</i>	-----MAEYTP	KERLYR	ALRKQ	QVDRMP	AVCFTQ	TATVEQMEACGAYWPEAHS
SdmB <i>M. voltae</i>	---MISDTM	TPAQR	RARAKS	NGEPID	RLPCNP	NIINGIARIA---GYKISEFNSNSDALAD
SdmC <i>M. voltae</i>	MKDMMK	DKMTP	LQRAK	AKANGE	AVDRL	PCNPNSNGIARIS---GCKISDFNKDPRALAD
MtsA <i>M. barkeri</i>	----MVSE	MPTRR	VMAAV	LGGRV	DYVPP	ANPLAQTTELMOICNASWPKAHFDSKMMAD
	70	80	90	100	110	120
MtaA <i>M. barkeri</i>	LAIANYEL	SGLEAV	RVPYCL	TVLGE	AMGCEI	NMGTKNRQPSVTASPYK
MtaA <i>M. acetivorans</i>	LALANYEL	SGLEAV	RVPYCL	TVLVE	AMGCEI	NMGTKNRQPSVTGHPFPKALDGA
MtbA <i>M. barkeri</i>	LAEAHT	VVGFE	AVRVP	FDITAE	AEEFFG	GKAGDLKQQPSVIKPSVKNLE
SdmB <i>M. voltae</i>	AVIKSY	KFMG	MDGTR	VFTDL	FLIAE	AMGAKVNK-PEDNTADLE
SdmC <i>M. voltae</i>	AVIATY	RFRG	ADGAK	VFTDL	FLLE	AMGAKMM-PDDDTVDLLEPA
MtsA <i>M. barkeri</i>	LAAAPY	EICG	IEAAR	PQFDI	SLEAE	VLGCKLDWNKPD
	130	140	150	160	170	180
MtaA <i>M. barkeri</i>	LLQRN	RIPAV	LEAIK	IVREK	VGPD	VPIIGGMEGPVTLASDLISVKS
MtaA <i>M. acetivorans</i>	LLQKGR	IPAV	LEAIK	IIREK	VGPD	VPIIGGMEGPITVASDLVSVKS
MtbA <i>M. barkeri</i>	NLKEGR	IAVV	LEAVK	ILSEK	YGKEL	PIIGSMIGPFLA-QHINGDAW
SdmB <i>M. voltae</i>	PYKDGR	IP	IHLR	AMK	VKDEI	GDEVSVTASVVGPF
SdmC <i>M. voltae</i>	PYKDAR	LP	IHLK	AMEY	VHEEL	KDEVPCTALIVGPF
MtsA <i>M. barkeri</i>	LEEAGR	IPV	VLG	AIELR	KRYD	GMLPVI

	190	200	210	220	230	240
MtaA <i>M. barkeri</i>	ALDISAEAAIAYANAMVEAGADVIAIADPVPASDLMSPETFKQFLQSR	LQKFSAGVNS--				
MtaA <i>M. acetivorans</i>	SLDLATAASIAYANAMVEAGADIIAIAIDPVPASDLMSDFSFKQYLQ	PRLQKFS	SSSVSS--			
MtbA <i>M. barkeri</i>	LLDFCSDFNVAAYAKAMVENGADTIAIIDPTASYELIGGEFYEKYAL	PYQKKIVDAMKEL-				
SdmB <i>M. voltae</i>	LCEISLKSCKMLTDAALEQGVG-VTISEPLSSCTVISP	KHFRNYSAPYLKRLIDYMKSKG				
SdmC <i>M. voltae</i>	LCEISLENCIRFTDAAIKTGVG-ISIAEPMASCTVISP	KHFRNYSAPYLKRLIDYMKSKG				
MtsA <i>M. barkeri</i>	FIEAATDFVIAYGKLTAYGAHILFPADPSASGDLISGETYKEFVLP	PAHKRMAKEISCP-				
	250	260	270	280	290	300
MtaA <i>M. barkeri</i>	--VTVLHICGKVNAILSDMADCGFEGLSVEEKIGTAAEGKKIIGDRAR	LVGNISSPFTLL				
MtaA <i>M. acetivorans</i>	--VTVLHVCGNVNPILSYMACDGFEGLSVEEKIGSVKKAKEVIGTRAR	LIGNISSPFTLL				
MtbA <i>M. barkeri</i>	DVATVHICGNNTNGLGIMDKTGVNGISVDQKVDIKTATGSVKN--AI	IVGNLDPVAVLW				
SdmB <i>M. voltae</i>	VGNIVLHICGKTDPIDWDDLVDMGVNVLSIDDIADLKL	CAD-RVGDKMAVAGNVDP	SAIMY			
SdmC <i>M. voltae</i>	NG-VSIHICGQTKAIWTDIADMGINAFSIDDIADMEDCVN-TIGDRM	VVTGNVDPSAVMY				
MtsA <i>M. barkeri</i>	---LILHICGDTSKLLPYIKQSGIDCF	SFDVAVP--VWYCRQVMGNEMSILGSLDVIDLMP				
	310	320	330	340	350	360
MtaA <i>M. barkeri</i>	PGPIDKIKAEAKVALEGGID-----VLAPGCGIAPMTPLENVKALVAAR	DEYYA-----				
MtaA <i>M. acetivorans</i>	PGPVDKIKAESKQALADGVD-----VLAPGCGIAPMTPLENIKAMVEAR	NEFYA-----				
MtbA <i>M. barkeri</i>	NGTPEEIAEASKKALDAGVG-----LLTVGCGTVSMTPTVNLQKMI	CAKSHTY-----				
SdmB <i>M. voltae</i>	AGTKEQVRKATLKSISKEGYMAKKGFIIMSGCSLPVEVPIENIQ	TMMDTVREVGWPVTDEK				
SdmC <i>M. voltae</i>	AGTKEEVRKAVIKSVQOGYKAKKGYGIMSGCGLPVETPIENID	VMMDTAREIGWPVTDEK				
MtsA <i>M. barkeri</i>	NGTPEQVYNRTRECILOGAD-----IVGTACDVSFGT	SLENLRAYVRACKETPIPKYDDV				
	370	380				
MtaA <i>M. barkeri</i>	-----					
MtaA <i>M. acetivorans</i>	-----					
MtbA <i>M. barkeri</i>	-----					
SdmB <i>M. voltae</i>	LEKLMAITKYE-----					
SdmC <i>M. voltae</i>	LEYLLSINKYEE-----					
MtsA <i>M. barkeri</i>	EDIIRQIGVIGIRNMKENVLGGMQK					

Abb. 9: Sequenzvergleich verschiedener Methyltransferasen aus *M. barkeri* und *M. acetivorans* mit den Proteinen SdmB und SdmC aus *M. voltae*

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustlW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Die Aminosäuren der Konsensussequenz sind dunkelgrau, Aminosäuren mit chemisch ähnlichen Eigenschaften zum Konsensus sind hellgrau hinterlegt. Die Methyltransferasen SdmB und SdmC zeigen untereinander eine Identität von 66 %. MtsA (Zugangsnummer AAC46230) zeigt eine Übereinstimmung von 22 % zu SdmB und von 24 % zu SdmC, MtbA (Zugangsnummer AAC38632) von 23 % zu SdmB und von 24 % zu SdmC und MtaA (Zugangsnummer CAA62995) zeigt eine Sequenzidentität von 24 % zu SdmB und von 25 % zu SdmC. Das Protein MtaA aus *M. acetivorans* (Zugangsnummer NP_619241) ist zu 23 % identisch mit SdmB und zu 24 % mit SdmC.

5.5 Das Gen *sdmA* wird nur bei Selenmangel transkribiert

In der 2D-Elektrophorese wurde gezeigt, dass das Protein SdmA nur bei Selenmangel synthetisiert wird (Niess, 2001). Erfolgt die Regulation der Expression auf Transkriptionsebene, dann sollte der Messenger von *sdmA* nur unter Selenlimitierung nachweisbar sein. Dies wurde durch eine Northern-Blot-Analyse mit der Sonde I (siehe 5.2) geklärt. Die Hybridisierungstemperatur betrug dabei 55°C. Die Bindestelle der Sonde ist schematisch in der Abb. 10A dargestellt. In der Analyse wurde die RNA aus Kulturen mit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen miteinander verglichen. Dazu erfolgte die Präparation der RNA aus selenhaltigen bzw. selenlimitierten Kulturen. Zusätzlich wurde zur Kontrolle RNA aus Zellen gereinigt, die in selenhaltigem Medium einem permanenten Hitzestress von 42°C ausgesetzt waren.

Ein Transkript des Gens *sdmA* wurde tatsächlich nur bei Selenmangel nachgewiesen und nicht bei Anwesenheit von Selenit (Abb. 10B, Spur 1 und 2). Ein Signal wurde in der Northern-Blot-Analyse auch dann nicht festgestellt, wenn die Zellen in selenhaltigem Medium einem permanenten Hitzestress von 42°C ausgesetzt waren (Abb. 10B, Spur 3). Dadurch wurde ausgeschlossen, dass die Transkription des Gens *sdmA* der Regulation durch generellen Stress unterliegt. Die Hitzeschockantwort wird in *M. voltae* ab einer Temperatur von 40°C induziert. Dabei werden unter anderem generelle Stressproteine exprimiert, deren Synthese sich auch durch andere Faktoren induzieren lässt (Hebert *et al.*, 1991). Die Qualität der eingesetzten RNA wurde durch eine Färbung der Membran mit Methylblau überprüft. Die Banden der 23S und 16S rRNA sind dort deutlich erkennbar (Abb. 10C).

Wurde dem Medium Selen zu einer Endkonzentration zugesetzt, die über 100 nM lag, war das *sdmA*-Transkript nicht mehr nachweisbar (Abb. 10D, Spuren 4-9). Die unterschiedlichen Signalstärken in Abb. 10D beruhen darauf, dass nicht exakt die gleichen Gesamt-RNA-Mengen in dem Agarosegel aufgetrennt und dann transferiert wurden, wie die Methylblaufärbung der verwendeten Membran zeigt (Abb. 10E). Die längsten detektierten RNA-Moleküle hatten eine Größe zwischen 3 000 - 4 000 Nukleotiden. Die kürzeren Fragmente waren vermutlich durch den Abbau des vollständigen Messengers entstanden.

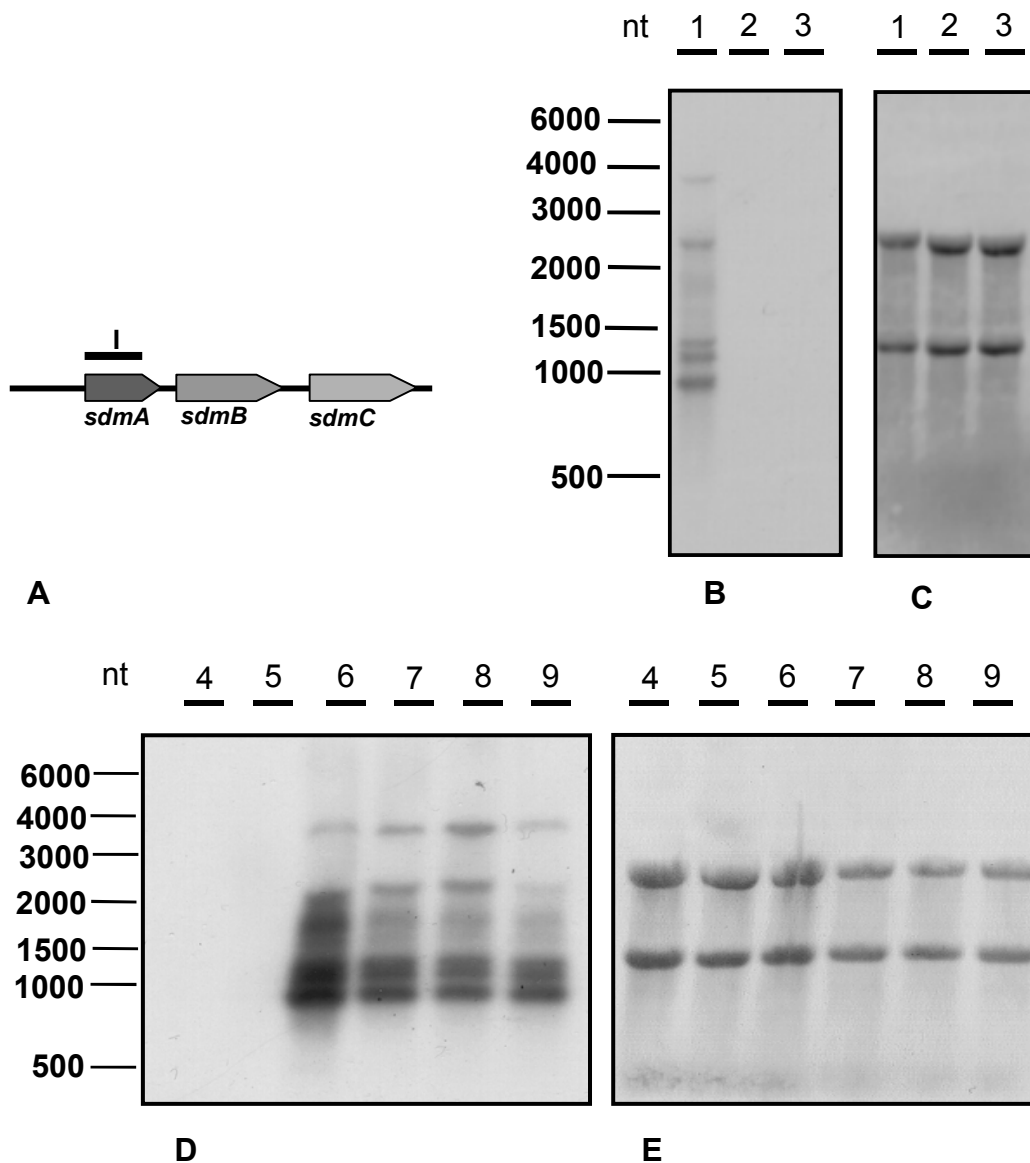


Abb. 10: Northern-Blot-Analyse des Gens *sdmA* mit der Sonde I

Für die Northern-Blot-Analysen wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA in einem 2 % denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. **A:** Schematische Darstellung der Bindestelle der Sonde I. **B:** Autoradiographie nach der Hybridisierung der Membran mit der Sonde I. nt: Größenstandard in Nukleotiden; Gesamt-RNA aus 1: einer selenfreien Kultur, 2: einer selenhaltigen Kultur, 3: einer selenhaltigen Kultur, die einem permanenten Hitzestress von 42°C ausgesetzt war. **C:** Methyleneblaufärbung der bei B zur Hybridisierung verwendeten Membran mit den zu erkennenden Banden der 23S und 16S rRNA. **D:** Autoradiographie nach einer Northern-Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus Kulturen mit unterschiedlichen Selenkonzentrationen. Spuren: 4 - 8: Gesamt-RNA aus Kulturen, denen zu einer Endkonzentration von 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM Selenit zugesetzt wurde; 9: Gesamt-RNA aus einer selenfreien Kultur; nt: Größenstandard in Nukleotiden. **E:** Methyleneblaufärbung der bei D zur Hybridisierung verwendeten Membran.

5.6 Bestimmung eines möglichen Transkriptionsstartpunkts des Gens *sdmA*

Die Gengruppen der Hydrogenasen Vhc und Frc werden, wie in der Einleitung erwähnt, nur bei Selenmangel transkribiert (Berghöfer *et al.*, 1994). Die Sequenzelemente, die für die Regulation verantwortlich sind, liegen in einer intergenen Region, die sich zwischen den Genen der beiden Hydrogenasen befindet (Noll *et al.*, 1999). Da sich das Transkript von *sdmA* auch nur bei Selenmangel nachweisen lässt, sollte überprüft werden, ob es zusammen mit den Hydrogenase-Genen zu einem gemeinsamen Regulon gehört. Dazu wurde die Umgebung des Transkriptionsstartpunkts von *sdmA* mit der intergenen Region der Hydrogenasen-Gene verglichen.

Zuvor wurde der Startpunkt von *sdmA* mittels einer Primer-Extension bestimmt, indem ein DNA-Gegenstrang der mRNA nach Anlagerung des Primers exco¹ durch eine reverse Transkription synthetisiert wurde. Dieses Oligonukleotid bindet an eine Sequenz aus der kodierenden Region von *sdmA*. Um die Länge des Reaktionsproduktes bestimmen zu können, wurde ein entsprechendes Plasmid, das das Gen *sdmA* einschließlich des 5'-Bereichs der nicht-kodierenden Region enthielt, mit dem gleichen Primer sequenziert. Die Reaktionsprodukte aus der Sequenzierung wurden neben den Produkten der Primer-Extension aufgetragen und mittels eines Sequenzers analysiert (Abb. 11A). Dabei wurde ein 5'-Ende kartiert, das einem möglichen Transkriptionsstartpunkt entsprechen würde (Wich *et al.*, 1986). Der Startpunkt läge dann auf einem Thymin (+1, Abb. 11B). 23 Basenpaare stromaufwärts wurde eine mögliche TATA-Box (Reiter *et al.*, 1990) identifiziert. Gemeinsame Sequenzelemente zu der intergenen Region der Hydrogenasen-Gene, die auf eine gemeinsame Regulation hindeuten würden, konnten nicht gefunden werden.

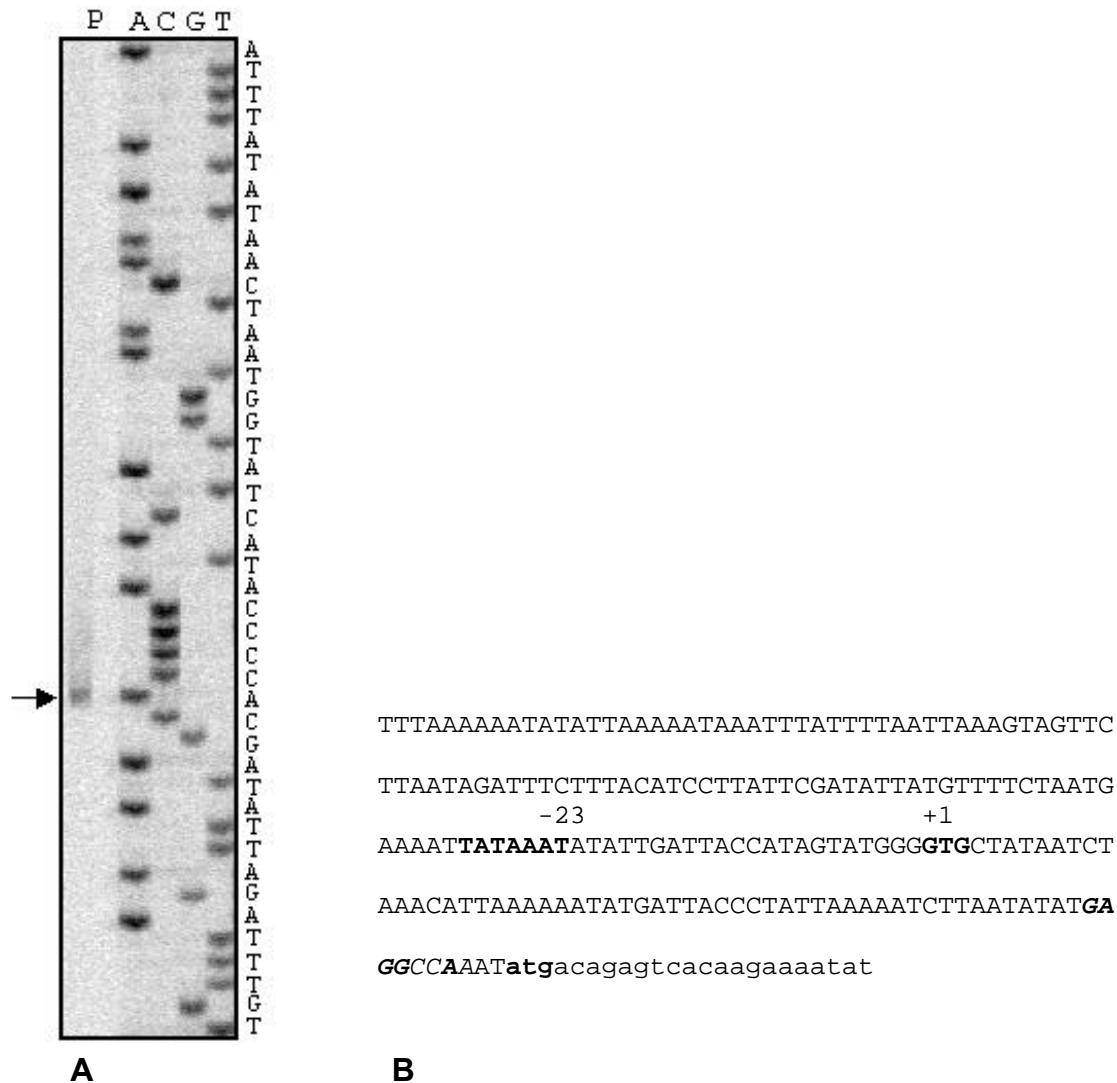


Abb. 11: Bestimmung eines Transkriptionsstartpunktes des Messengers von *sdmA*

A: Der Transkriptionsstartpunkt des Messengers von *sdmA* wurde durch eine Primer-Extension ermittelt. Für die Bestimmung des Startpunktes wurden 20 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Das Produkt der Primer-Extension (P) ist neben einer DNA-Sequenzleiter (A, C, G, T) dargestellt, die durch Sequenzierung des entsprechenden Plasmids erhalten wurde. Die Transkriptionsinitiationsstelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Sequenz der Umgebung der Transkriptionsinitiationsstelle ausgehend von der Translationsinitiationsstelle (atg), der Shine Dalgarno Sequenz (GAG—A), der Transkriptionsinitiationsstelle (GTG) und der TATA Box (TATAAAT).

5.7 Die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* liegen auf einem gemeinsamen polycistronischen Messenger

In der vorangegangenen Northern-Blot-Analyse wurde die Größe des mit Sonde I identifizierten Transkripts auf ca. 3000 – 4000 Nukleotiden geschätzt. Der eigentliche Messenger wäre demnach deutlich länger, als das Gen *sdmA* mit 672 bp. Ein möglicher Transkriptionsstartpunkt wurde im 5'-Bereich nicht sehr weit entfernt vom Translationsstart des Gens *sdmA* kartiert. Es lag daher die Vermutung nahe, dass die Gene *sdmB* und *sdmC* gemeinsam mit *sdmA* auf einem polycistronischen Messenger liegen. Deshalb wurde eine Northern-Blot-Analyse, außer mit der Sonde I, auch mit den Sonden II, III und III_{down} durchgeführt. Die Sonde II bindet an *sdmB*, Sonde III an *sdmC* und die Sonde III_{down} an das Gen, welches stromabwärts von *sdmC* liegt. Sie sollte zeigen, ob sich noch ein weiteres Gen auf dem gemeinsamen Messenger befindet. Die Bindestellen der Sonden sind schematisch im oberen Teil der Abb. 12 dargestellt. Die Fragmente für die radioaktiven Zufallsmarkierungen wurden mittels einer PCR gewonnen. Für die Sonde II wurden die Oligonukleotide metI2Hfw und metIHr, für die Sonde III die Oligonukleotide RTmetIIIfw und metII2Hrv und für die Sonde III_{down} die Oligonukleotide metIIIIfw und metIIIrv verwendet. Die Herstellung der Sonde I ist in 5.2 beschrieben. Die Hybridisierungstemperatur betrug bei den Sonden I, II, und III 55°C, bei der Sonde III_{down} 50°C.

Nach der Hybridisierung einer Membran mit Sonde II oder III (Abb. 12B oder D, Spur 1) wurde in einer Autoradiographie jeweils ein Signal in der gleichen Größe wie mit Sonde I (Abb. 12A, Spur 1) vorgefunden. Die Länge der Transkripte wurde auf je 3 500 Nukleotide geschätzt. Sie ließen sich nur in Gesamt-RNA aus selenarmen Kulturen, nicht aber in Gesamt-RNA aus selenhaltigen Kulturen nachweisen. Die verkürzten Fragmente sind vermutlich Abbauprodukte der vollständigen Messenger. Die Qualität der RNA wurde durch das Färben der Membranen mit Methylblau überprüft. Die Banden der 23S und 16S rRNA sind deutlich erkennbar (Abb. 12C und E).

Aus den erhaltenen Resultaten wurde geschlossen, dass die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* auf einem gemeinsamen Messenger liegen, da ihre Sonden in der Northern-Blot-Analyse jeweils ein Signal in der gleichen Größe zeigten. Unterstützt wird die Annahme durch die Kartierung des Transkriptionsstartpunkts, so dass der

Messenger bei einer Größe von 3500 nt die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* überdecken würde.

In einem weiteren Versuch wurde die Sonde III von der Membran aus Abb. 12E entfernt und dies durch eine Autoradiographie überprüft. Anschließend wurde sie mit der Sonde III down bei 50°C hybridisiert. Trotz der niedrigen Temperatur war ein Signal nicht nachweisbar, obwohl der Röntgenfilm über einen Zeitraum von 10 Tagen exponiert wurde (diese Daten sind nicht abgebildet). Danach erfolgte nochmals eine Überprüfung der Qualität der RNA, indem die Membran mit der Sonde I hybridisiert und diesmal ein Signal in der Autoradiographie gezeigt wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine gemeinsame Transkription des Gens stromabwärts von *sdmC* mit der Gengruppe *sdmABC* ausgeschlossen werden.

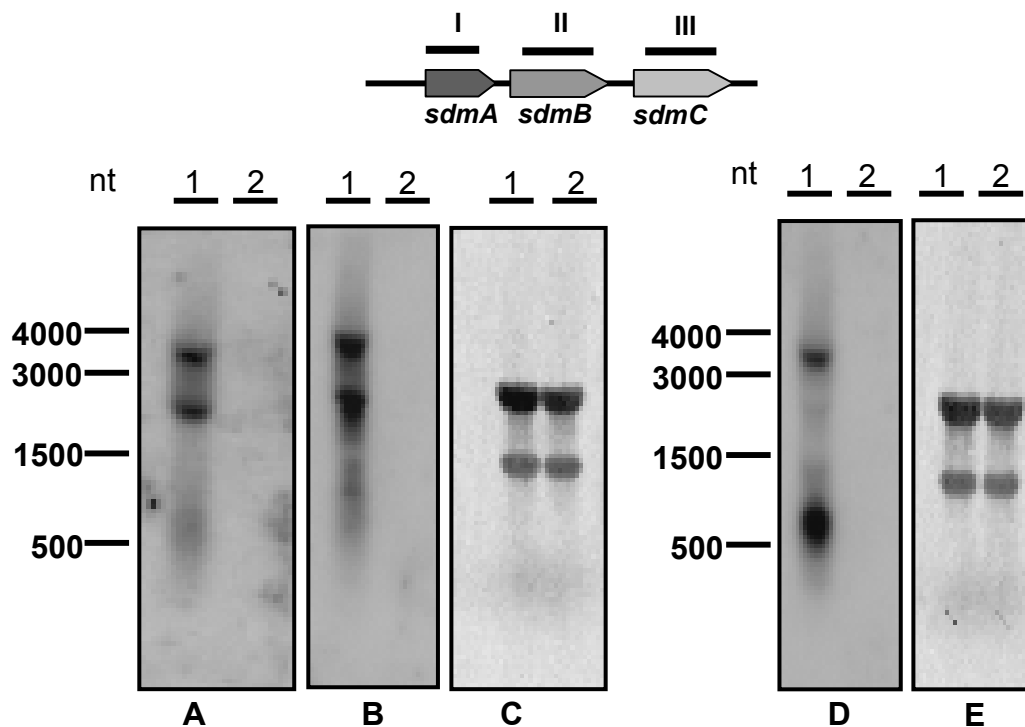


Abb. 12: Northern-Blot-Analyse der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC*

Im oberen Teil der Abb. sind die Bindestellen der Sonden schematisch angedeutet. Die RNA wurde in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Es wurden je 20 µg RNA eingesetzt. **A:** Autoradiographie nach einer Northern-Hybridisierung mit der Sonde I. **B:** Autoradiographie nach einer Northern-Hybridisierung mit der Sonde II. Dabei wurde zur Hybridisierung dieselbe Membran aus A verwendet, nachdem die Sonde I entfernt wurde. **C:** Methyleneblaufärbung der Membran aus A und B mit der rRNA 23S und 16S. **D:** Autoradiographie nach einer Northern-Hybridisierung mit der Sonde III mit einer zu A unterschiedlichen Membran. **E:** Methyleneblaufärbung der Membran aus D.

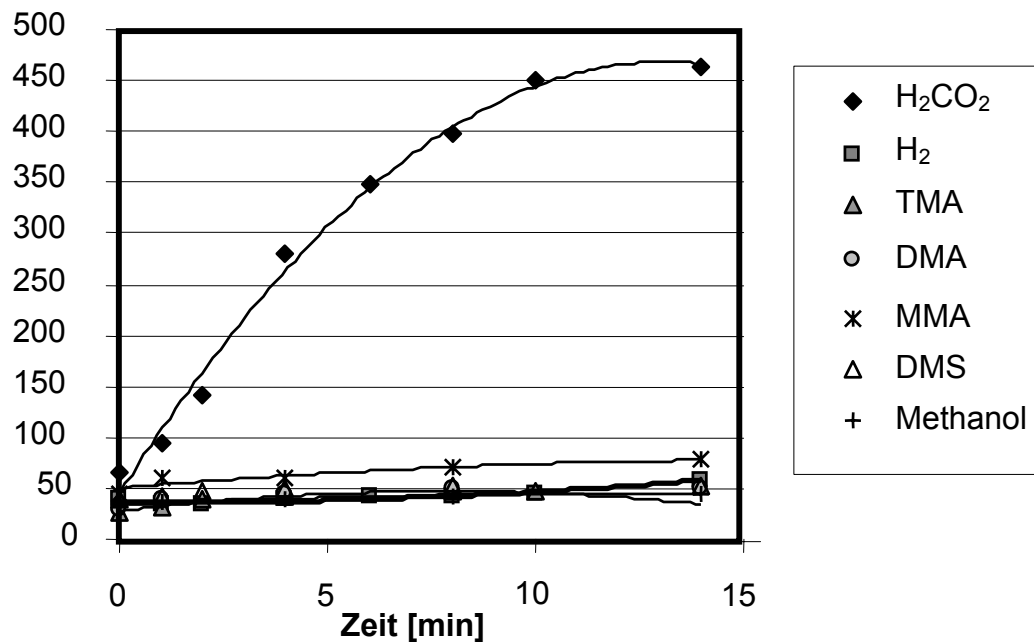
Spuren: 1: Gesamt-RNA aus einer selenfreien und 2: aus einer selenhaltigen Kultur.

5.8 *M. voltae* kann methylierte Amine, Dimethylsulfid oder Methanol nicht für die Methanogenese erschließen

In dem vorangegangenen Sequenzvergleichen wurde eine Verwandtschaft des Proteins SdmA zu Corrinoid-Proteinen und von SdmB und SdmC zu Methyltransferasen aus *Methanosarcina* gezeigt. Sie sind dort in der Methanogenese an der Erschließung von methylierten Substraten beteiligt. Es wurde daher überprüft, ob *M. voltae* unter Selenlimitierung, denn nur dann wird die Gengruppe *sdmABC* exprimiert, neben CO₂ und H₂, auch die methylierten Verbindungen für die Methanogenese nutzen kann.

Das Wachstumsmedium wurde hierfür zu einer Endkonzentration von 10 mM mit TMA, DMA, MMA, DMS oder Methanol versetzt und in einer H₂- oder H₂/CO₂-Atmosphäre inkubiert. Auf die Zugabe von Selen wurde verzichtet. Statt mit Na₂HCO₃ wurde dafür das Medium mit Imidazol gepuffert. Ein Wachstum der Zellen wurde nur in einer H₂/CO₂-Atmosphäre festgestellt, obwohl die Kultivierung über einen Zeitraum von 14 Tagen erfolgte.

Zusätzlich wurden gaschromatographische Methanmessungen durchgeführt (Abb. 13). Die Vorkulturen für die Herstellung der dafür verwendeten Zellsuspensionen enthielten kein Selen. Vor den Messungen wurden die Suspensionen zu einer Endkonzentration von 10 mM mit TMA, DMA, MMA, DMS oder Methanol versetzt und mit einer H₂-Atmosphäre überschichtet. Größere Methanmengen wurde jedoch nur bei der Verwendung des H₂/CO₂-Gasgemisches vorgefunden. Bei der Negativkontrolle, einer Zellsuspension ohne Substrat in einer H₂-Atmosphäre, wurde Methan nur in sehr geringen Mengen detektiert. Eine Erschließung der getesteten methylierten Verbindungen von *M. voltae* für die Methanogenese wurde anhand dieser Ergebnisse ausgeschlossen.

Methan [nmol]**Abb. 13: Gaschromatographische Methanmessungen**

Für die Methanmessungen wurde je 1 ml einer Zellsuspension, $OD_{600} = 0,8$, zu einer Endkonzentration von 10 mM mit TMA, DMA, MMA, DMS oder Methanol versetzt und mit H_2 überschichtet. Die Proben für die Messungen wurden in Zeitabständen genommen. Als Positivkontrolle diente eine Zellsuspension in einer H_2/CO_2 -Atmosphäre, als Negativkontrolle eine Zellsuspension ohne Substrat, die in einer H_2 -Atmosphäre inkubiert wurde.

5.9 Die Konstruktion von Deletionsmutanten der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC*

Durch den vorangegangenen Versuch konnte dem Corrinoid-Protein und den beiden Methyltransferasen aus *M. voltae* eine mögliche Funktion nicht zugewiesen werden. Für weitere Untersuchungen war es daher sinnvoll zunächst Deletionsmutanten der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* herzustellen. Dabei wurden die jeweiligen Gene durch den Resistenzmarker *pacN* ersetzt, der für die Puromycin-N-Acetyltransferase kodiert und eine Selektion der Mutanten erlaubt. Der Terminator für *pacN* stammte aus dem Gen der Methyl-Coenzym M-Reduktase, der Promotor aus dem S-layer-Gen (Kansy *et al.*, 1994; Konisky *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1985). Das Schema der Deletionsmutagenese ist zusammenfassend nur für *sdmA* in Abb. 14

dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass das Gen durch Rekombination zweier homologer Bereiche mit dem Konstrukt ausgetauscht und dabei der Resistenzmarker eingefügt wurde. Die Deletionsmutanten von *sdmB* und *sdmC* wurden auf die gleiche Weise hergestellt wie auch eine Doppelmutante der Gene *sdmB* und *sdmC*. Beim Austausch von *sdmC* in der Einzelmutante und in der Doppelmutante blieb ein ca. 570 bp großes Fragment des 3'-Bereichs dieses Gens erhalten.

Die jeweiligen Fragmente für die Deletionen wurden durch die Behandlung der Plasmide pNPAC-*sdmA*, pNPAC-*sdmB*, pNPAC-*sdmC* und pNPAC-*sdmBC* (siehe 4.7 in Material und Methoden) mit den Restriktionsendonukleasen *Spe* I und *Nhe* I erhalten. Nach der Auftrennung in einem Agarosegel wurden sie anschließend eluiert und jeweils 5 pmol für die Transformation verwendet. Die Transformation erfolgte mit dem *M. voltae*-Stamm V1, der eine chromosomale Kopie eines Reportergens trägt, das nur bei Selenmangel exprimiert wird (Pfeiffer *et al.*, 1998).

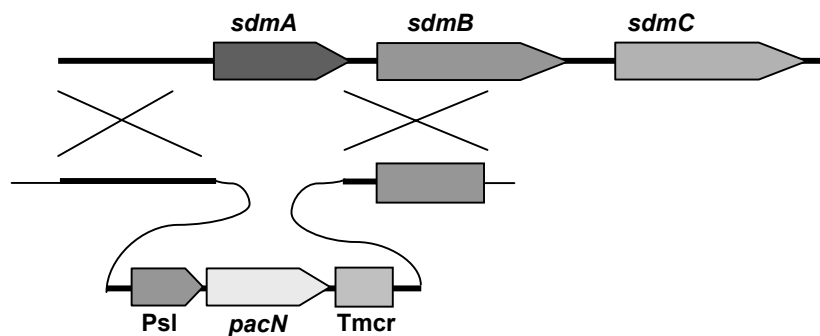


Abb. 14: Deletionsmutagenese des Gens *sdmA*

Die Deletion des Gens *sdmA* erfolgte durch eine zweifache homologe Rekombination, wie durch die Kreuze angedeutet ist. *Psl*: Promotor des S-layer-Gens (Kansy *et al.*, 1994; Konisky *et al.*, 1994); *pacN*: Gen der Puromycin-N-Acetyltransferase zur Selektion; *Tmcr*: Terminator der Gene der Methyl-Coenzym M-Reduktase (Müller *et al.*, 1985).

5.10 Charakterisierung der erhaltenen *M. voltae*-Klone $V1\Delta sdmA$, $V1\Delta sdmB$, $V1\Delta sdmC$ und $V1\Delta sdmBC$

Es wurde erwartet, dass die nach der Transformation erhaltenen, puromycinresistenten Klone von *M. voltae* V1 eine Deletion des jeweiligen Gens *sdmA*, *sdmB* oder *sdmC* aufweisen. Im Fall der Doppelmutante wurde ein Austausch

beider Gene *sdmB* und *sdmC* angenommen. Die Kontrolle der Klone erfolgte über eine Southern-Blot-Analyse. Die Fragmente für die radioaktiven Markierungen wurden für die Sonde IV mit den Oligonukleotide *corsenachfw* und *metlvorrv*, für die Sonde V mit den Oligonukleotide *pacsondefw* und *pacsonderv* und für die Sonde VI mit den Oligonukleotide *metllnachfw* und *metllnachrv* über eine PCR gewonnen. Die Sonde IV bindet an die intergene Region zwischen den Genen *sdmA* und *sdmB*, die Sonde VI an das 3'-Ende von *sdmC* und die Sonde V an das Gen *pacN* (oberer Teil der Abb. 15 und 16).

Für den Nachweis der Deletion von *sdmA* wurde die chromosomale DNA der Mutante und des Wildtyps mit den Restriktionsendonukleasen *Acc I* und *Nco I* behandelt und in einer Southern-Blot-Analyse untersucht. Dabei betrug die Hybridisierungstemperatur für alle verwendeten Sonden 55°C. Die Schnittstellen und die Größen der zu erwartenden Fragmente sind im oberen Teil der Abb. 15 für den Wildtyp und die Deletionsmutante *V1ΔsdmA* dargestellt. Nach der Hybridisierung mit der Sonde V bzw. IV ergab sich in der Autoradiographie wie erwartet für den Wildtyp kein bzw. ein Signal von ca. 3200 bp und für die Mutante ein Signal von 1200 bzw. 2600 bp (Abb. 15A und B).

Es kann aus dieser Analyse geschlossen werden, dass das Gen *sdmA* tatsächlich ausgetauscht wurde.

Für den Nachweis der Deletion von *sdmB*, *sdmC* oder beider Gene *sdmB* und *sdmC* wurde chromosomale DNA mit *Eco RI* und *Nco I* behandelt und ebenfalls in einer Southern-Blot-Analyse untersucht. Dabei betrug die Hybridisierungstemperatur für alle verwendeten Sonden ebenfalls 55°C. Die Schnittstellen sind schematisch im oberen Teil der Abb. 16 dargestellt. Wie zu erwarteten war, erhielt man nach der Hybridisierung mit der Sonde V in der Autoradiographie für den Wildtyp kein Signal, für die Mutante *V1ΔsdmB* bzw. *-C* ein Signal von ca. 1400 bzw. 2800 bp und für die Doppelmutante von ebenfalls 1400 bp (Abb. 16A, Spuren 1-4). Mit der Sonde IV ergaben sich Signale von ca. 4500 bp für den Wildtyp, von 2500 bp für *V1ΔsdmC* und von ca. 1400 bp für *V1ΔsdmB* und *-BC*. (Abb. 16B, Spuren 1-4). Mit der Sonde VI wurden in der Autoradiographie Signale von 4500 bp für den Wildtyp, von ca. 3400 für die Mutante *V1ΔsdmB* bzw. von 2500 bp für *V1ΔsdmC* und *-BC* detektiert (Abb. 16C, Spuren 1-4).

Eine Deletion der Gene *sdmB*, *sdmC* oder der beiden Gene *sdmBC* wurde mit dieser Southern-Blot-Analyse bestätigt.

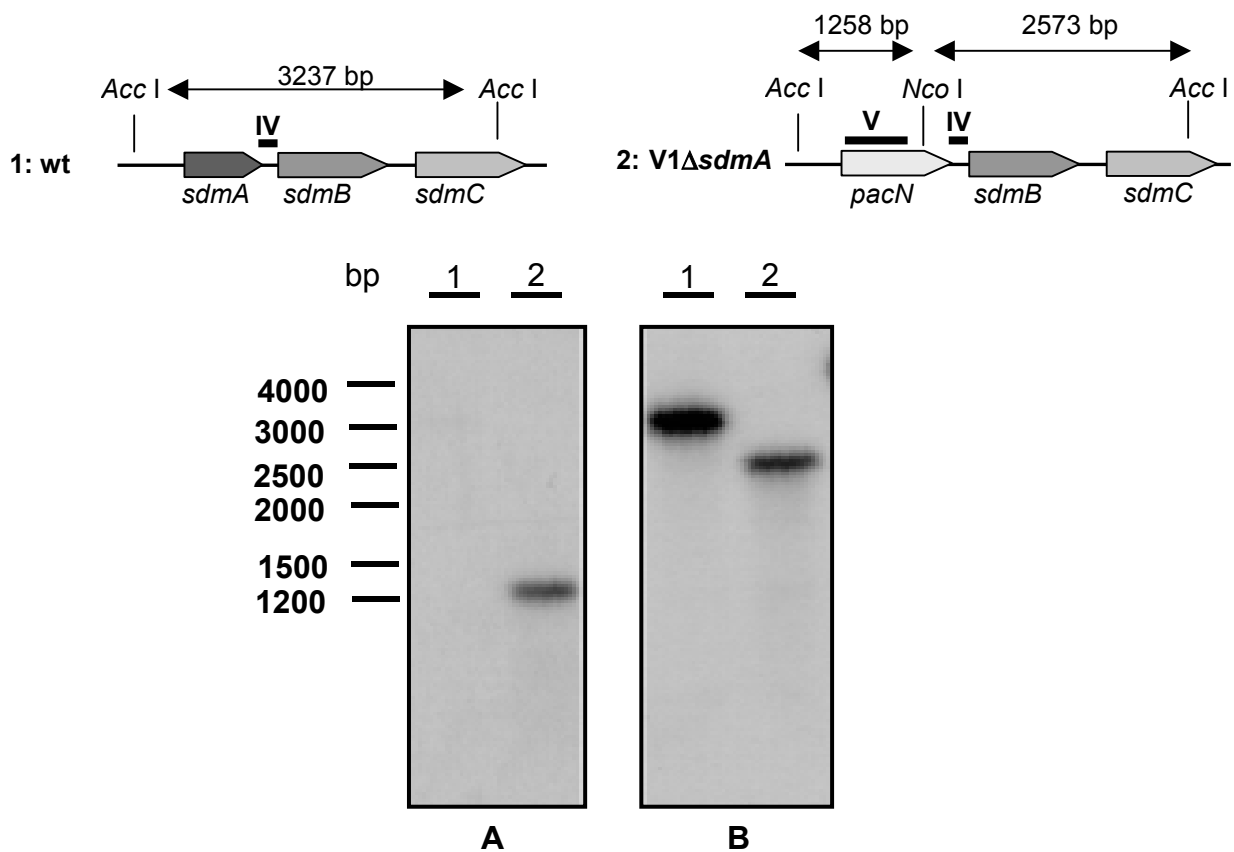


Abb. 15: Southern-Blot-Analyse der Deletionsmutante $V1\Delta sdmA$

Oberer Teil: Schematische Darstellung der Bindestellen der Sonden IV, V bzw. VI und der Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Acc I* und *Nco I* im Bereich der Gengruppe *sdmABC* für 1: den Wildtyp und 2: die Mutante $V1\Delta sdmA$,

Unterer Teil: Die genomische DNA 1: des Wildtyps und 2: der Mutante $V1\Delta sdmA$ wurde mit *Acc I* und *Nco I* behandelt und in einer Southern-Blot-Analyse mit **A:** der Sonde V bzw. **B:** der Sonde IV untersucht. bp: Größenstandard in Basenpaaren.

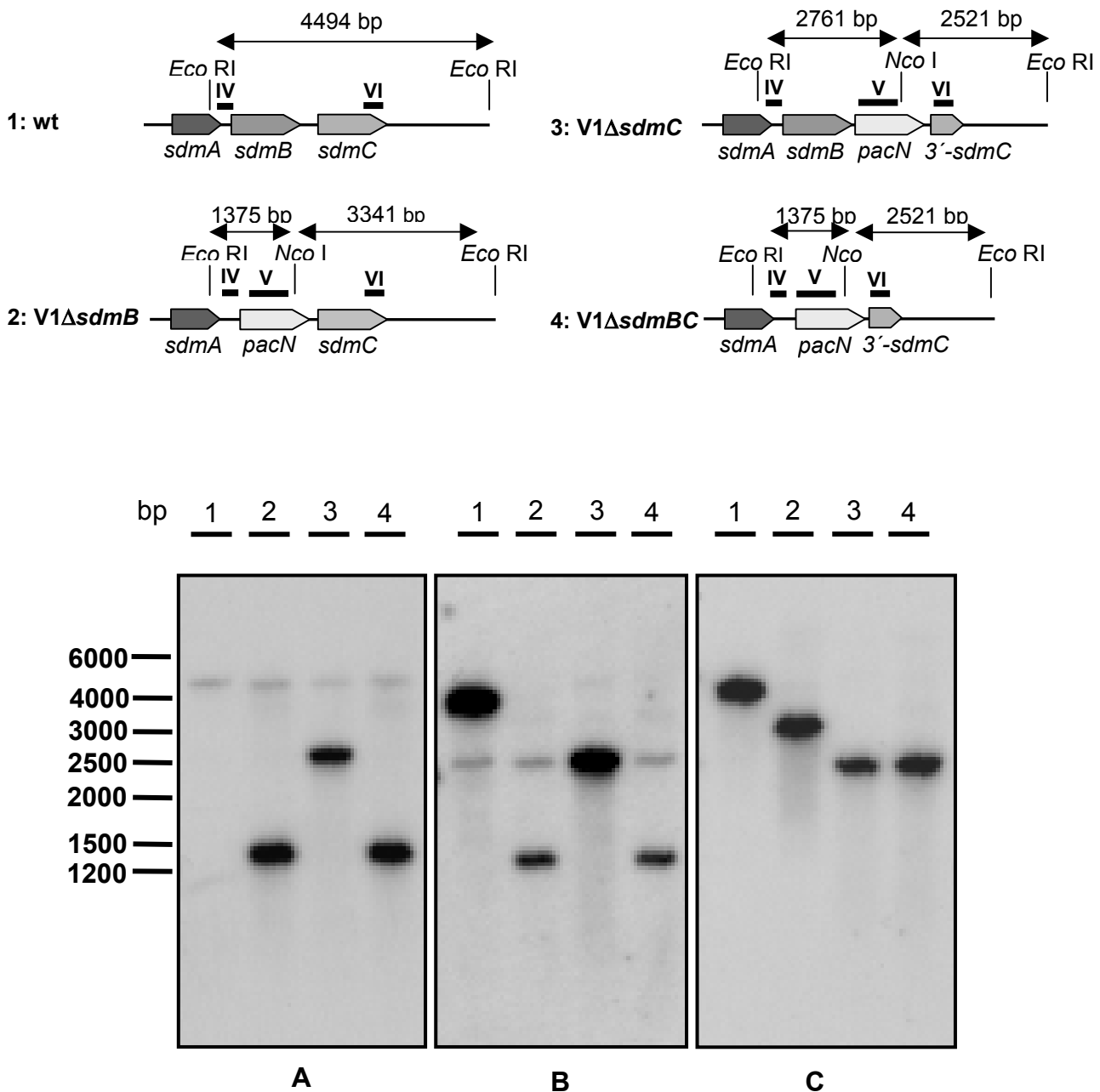


Abb. 16: Southern-Blot-Analyse der Deletionsmutanten *V1ΔsdmB*, *V1ΔsdmC* und *V1ΔsdmBC*

Oberer Teil: Schematische Darstellung der Bindestellen der Sonden IV, V bzw. VI und der Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Nco* I im Bereich der Gengruppe *sdmABC* für 1: den Wildtyp, 2: die Mutante *V1ΔsdmB*, 3: *V1ΔsdmC* und 4: die Doppelmutante *V1ΔsdmBC*

Unterer Teil: Die chromosomale DNA 1: des Wildtyps, 2: der Mutante *V1ΔsdmB*, 3: der Mutante *V1ΔsdmC* und 4: der Doppelmutante *V1ΔsdmBC* wurde mit *Eco* RI und *Nco* I behandelt und in einer Southern-Blot-Analyse mit **A:** der Sonde V, **B:** der Sonde IV bzw. **C:** der Sonde VI untersucht. bp: Größenstandard in Basenpaaren.

5.11 Die Proteine SdmA und SdmC sind an der Erschließung von Selen aus Dimethylselenid beteiligt

Im Abschnitt 5.8 wurde gezeigt, dass die Induktion der Transkription der Gengruppe *sdmABC* nicht dazu führt, dass *M. voltae* alternative Substrate wie methylierte Amine und Sulfide oder Methanol für die Methanogenese erschließen kann. Jedoch zeigen die Proteine SdmA bzw. SdmB und SdmC Sequenzübereinstimmungen zu Corrinoid-Proteinen bzw. zu Methyltransferasen, die beispielsweise in *Methanosarcina* an der Erschließung dieser Substrate beteiligt sind. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob das Corrinoid-Protein und die Methyltransferasen in *M. voltae*, Selen aus organischen Verbindungen für die Biosynthese der Selenoproteine zur Verfügung stellen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, haben hohe Selenkonzentrationen auf eukaryotische und prokaryotische Zellen meist eine toxische Wirkung. Die Detoxifizierung beinhaltet unter anderem die Methylierung anorganischer Selenverbindungen zu flüchtigem DMSe (Chasteen & Bentley, 2003). Daher kommt es auch in der Umwelt vor (Amouroux *et al.*, 2001). Bei einem Selenit- oder Selenatmangel wäre es denkbar, dass *M. voltae* das DMSe als Selenquelle erschließen könnte. Eine solche Nutzung des DMSe wurde in früheren Arbeiten bislang noch nicht gezeigt.

Der *M. voltae*-Stamm V1 (Pfeiffer *et al.*, 1998) trägt, wie die in dieser Arbeit hergestellten Deletionsstämme, eine chromosomale Kopie des Gens *uidA* aus *E. coli*. Es kodiert für die β -Glucuronidase und steht in V1 unter der Kontrolle des Promotors der Gene der Hydrogenase Vhc (Berghöfer *et al.*, 1994). Das Reporterogen wird deshalb nur unter Selenlimitierung exprimiert, wodurch eine Untersuchung ermöglicht wird, die klären soll, ab welcher Selenit- bzw. DMSe-Konzentration ein zellulärer Selenmangel vorliegt. Es könnten dadurch auch Erkenntnisse gewonnen werden, die zeigen, ob die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* an der Erschließung des DMSe beteiligt sind. Bei einer Deletion sollte dann, trotz DMSe-Zugabe, *uidA* exprimiert werden.

In Tab. 5 findet sich eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse. Alle getesteten Stämme zeigten eine Reportergenaktivität bei einer Selenitkonzentration von 100 nM und darunter. Wurde dagegen das DMSe zu unterschiedlichen Konzentrationen als Selenquelle zugegeben, waren Abweichungen in der Reportergenaktivität zwischen den getesteten Stämmen erkennbar. So fällt auf, dass

das Reporter-gen bei den Stämmen *V1ΔsdmA*, *V1ΔsdmC* und *V1ΔsdmBC* bereits ab einer DMSe-Konzentration von 10 μM und darunter, bei den Stämmen *V1* und *V1ΔsdmB* ab 100 nM und weniger exprimiert wurde. Die Aktivität der β-Glucuronidase wurde in voneinander unabhängigen Messungen quantifiziert. Alle negativen Ergebnisse der qualitativen Messungen aus Tab. 5 entsprachen einer Aktivität von < 0,3 mU/mg Protein, die positiven Ergebnisse einer Aktivität zwischen 4 und 15 mU/mg Protein.

Zusammenfassend kann zu den erhaltenen Resultaten bemerkt werden, dass eine Deletion des Gens *sdmA* bzw. *sdmC* oder der beiden Gene *sdmB* und *sdmC* dazu führt, dass die betroffenen Stämme bereits bei einer 100 mal höheren DMSe-Konzentration einen Selenmangel aufweisen, als der Wildtyp (*V1*) oder wenn *sdmB* entfernt wurde. Es wurde daher Folgendes angenommen: Das DMSe wird von *M. voltae* wahrscheinlich als Selenquelle genutzt und die Stämme *V1ΔsdmA*, *V1ΔsdmC* und *V1ΔsdmBC* haben vermutlich die Fähigkeit verloren diese Verbindung zu erschließen. Interessanterweise verhält sich die Mutante *V1ΔsdmB* in Bezug auf die Expression des Reporter-gens wie der Stamm *V1*. Dies hätte man aufgrund eines polaren Effektes durch den Austausch von *sdmB* mit dem Resistenzmarker *pacN* nicht erwartet, denn es wurde eine gemeinsame Transkription der Gengruppe *sdmABC* angenommen. Eine Expression von *sdmC* lässt sich bei einer Deletion von *sdmB* nur dadurch erklären, dass *sdmC* unter der Kontrolle eines eigenen Promotors steht oder dass der verwendete Terminator des Resistenzgens durchlässig ist.

Selenquelle [μM]		β -Glucuronidaseaktivität in Extrakten aus den Stämmen					
NaSelenit	DMS _e	V1	V1 Δ <i>sdmA</i>	V1 Δ <i>sdmB</i>	V1 Δ <i>sdmC</i>	V1 Δ <i>sdmBC</i>	
10	-	-	-	-	-	-	
1	-	-	-	-	-	-	
0.1	-	+	+	+	+	+	
0.01	-	+	+	+	+	+	
	100	-	-	-	-	-	
	10	-	+	-	+	+	
	1	-	+	-	+	+	
	0.1	+	+	+	+	+	
	0.01	+	+	+	+	+	

Tab. 5: Reporterogenaktivität der Stämme V1, V1 Δ *sdmA*, V1 Δ *sdmB*, V1 Δ *sdmC* und V1 Δ *sdmBC* bei unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Selenquellen

Als Selenquelle wurde NaSelenit oder Dimethylselenid in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Reporterogenaktivität ist durch + gekennzeichnet, ein Ausbleiben durch -. Ferner wurde die Aktivität der β -Glucuronidase in unabhängigen Messungen quantifiziert. Ein negatives Ergebnis entspricht bei allen qualitativen Messungen einer Aktivität von $< 0,3$ mU/mg Protein. Positive Ergebnisse entsprechen Aktivitäten zwischen 4 und 15 mU/mg Protein.

5.12 Die Stämme V1 Δ *sdmA*, V1 Δ *sdmC* und V1 Δ *sdmBC* zeigen bei Anwesenheit von Dimethylselenid eine geringere Wachstumsrate als die Stämme V1 und V1 Δ *sdmB*

In der vorangegangenen Untersuchung wurde eine Erschließung des DMS_e als Selenquelle von *M. voltae* angenommen. Die Zugabe dieser Verbindung sollte, wie die Zugabe von Selenit oder Selenat, einen stimulierenden Effekt auf die Wachstumsrate haben. Bei einer Deletion der Gene *sdmA* oder *sdmB* würde man dagegen erwarten, dass nur die anorganischen Selenverbindungen das Wachstum beschleunigen.

In früheren Arbeiten wurde unter Selenmangelbedingungen, d.h. bei einer Selenat- bzw. Selenitkonzentration von 1 bzw. 3 nM und darunter, ein sehr stark reduziertes Wachstum von *M. voltae* festgestellt (Berghöfer & Klein, 1995; Whitman *et al.*, 1982). Darum wurde bei der Erstellung der Wachstumskurven in vorliegender Arbeit aus Selenmangel-Kulturen Selenit zu einer Konzentration von 10 nM zugegeben. Das selenhaltige Medium enthielt entweder 10 µM DMSe oder 10 µM Selenit.

Der Stamm V1 wuchs mit Selenit nahezu genauso schnell wie mit DMSe als Selenquelle. Bei Selenmangel war die Wachstumsrate hingegen deutlich reduziert (Abb. 17A). Ein ähnliches Verhalten wurde bei einer Deletion von *sdmB* festgestellt. Auch hier ist die Wachstumsrate nur bei Selenmangel niedriger (Abb. 17C). Die Stämme V1Δ*sdmA*, V1Δ*sdmC* und V1Δ*sdmBC* zeigten jedoch bei der Zugabe von DMSe wie bei Selenmangel eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit. Das Selenit hatte dagegen wieder eine stimulierende Wirkung (Abb. 17B und Abb. 18).

Bei einem Vergleich der Wachstumsexperimente mit den Reportergergen-Tests kann festgestellt werden, dass beide Versuche eine Beteiligung der Proteine SdmA und SdmC an der Erschließung des DMSe vermuten lassen. Eine Deletion der jeweiligen Gene führt trotz der Zugabe des DMSe zu einer reduzierten Wachstumsrate und zur Expression des Reportergergens *uidA*.

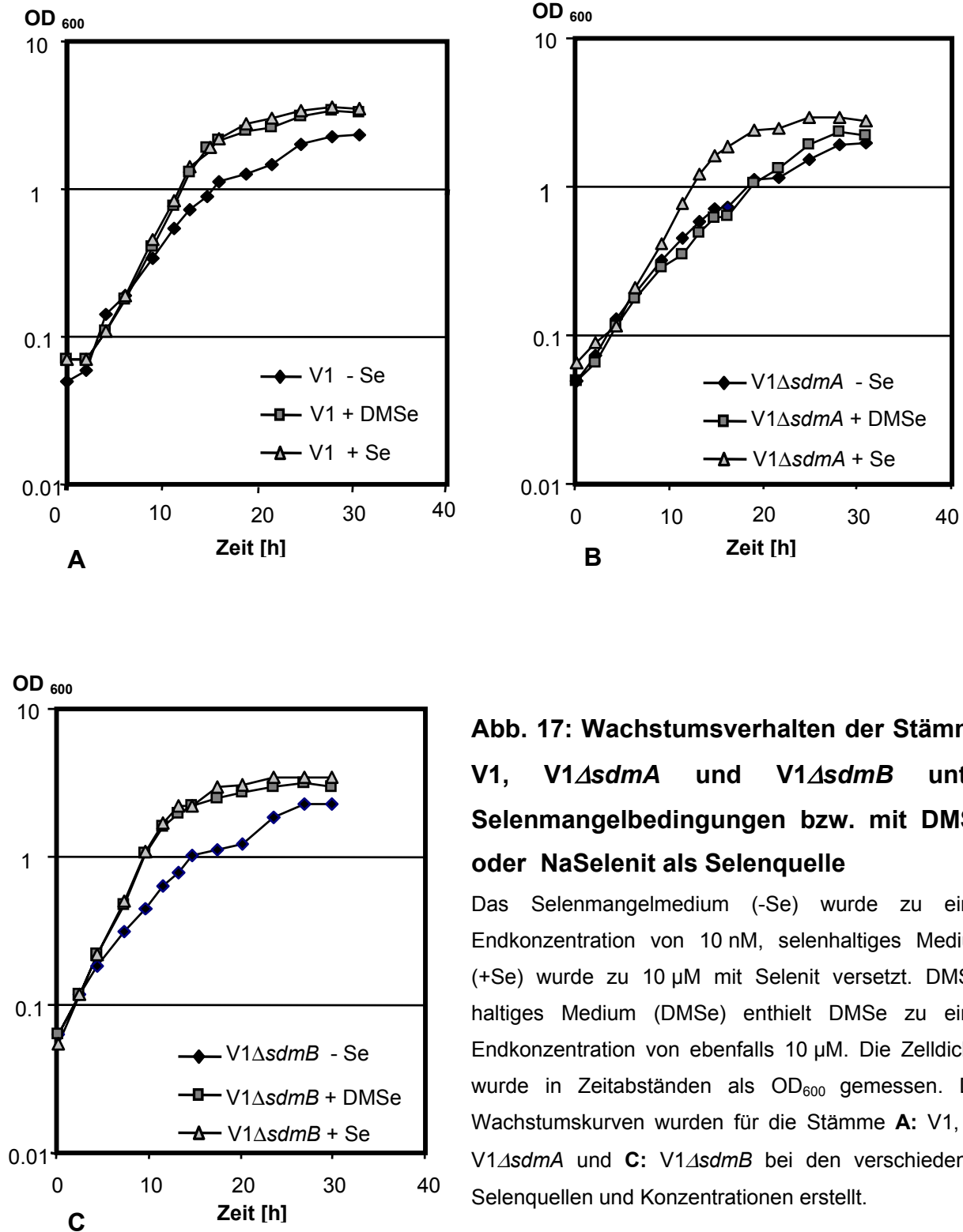


Abb. 17: Wachstumsverhalten der Stämme V1, V1ΔsdmA und V1ΔsdmB unter Selenmangelbedingungen bzw. mit DMSe oder NaSelenit als Selenquelle

Das Selenmangelmedium (-Se) wurde zu einer Endkonzentration von 10 nM, selenhaltiges Medium (+Se) wurde zu 10 μM mit Selenit versetzt. DMSe-haltiges Medium (DMSe) enthielt DMSe zu einer Endkonzentration von ebenfalls 10 μM. Die Zelldichte wurde in Zeitabständen als OD₆₀₀ gemessen. Die Wachstumskurven wurden für die Stämme **A**: V1, **B**: V1ΔsdmA und **C**: V1ΔsdmB bei den verschiedenen Selenquellen und Konzentrationen erstellt.

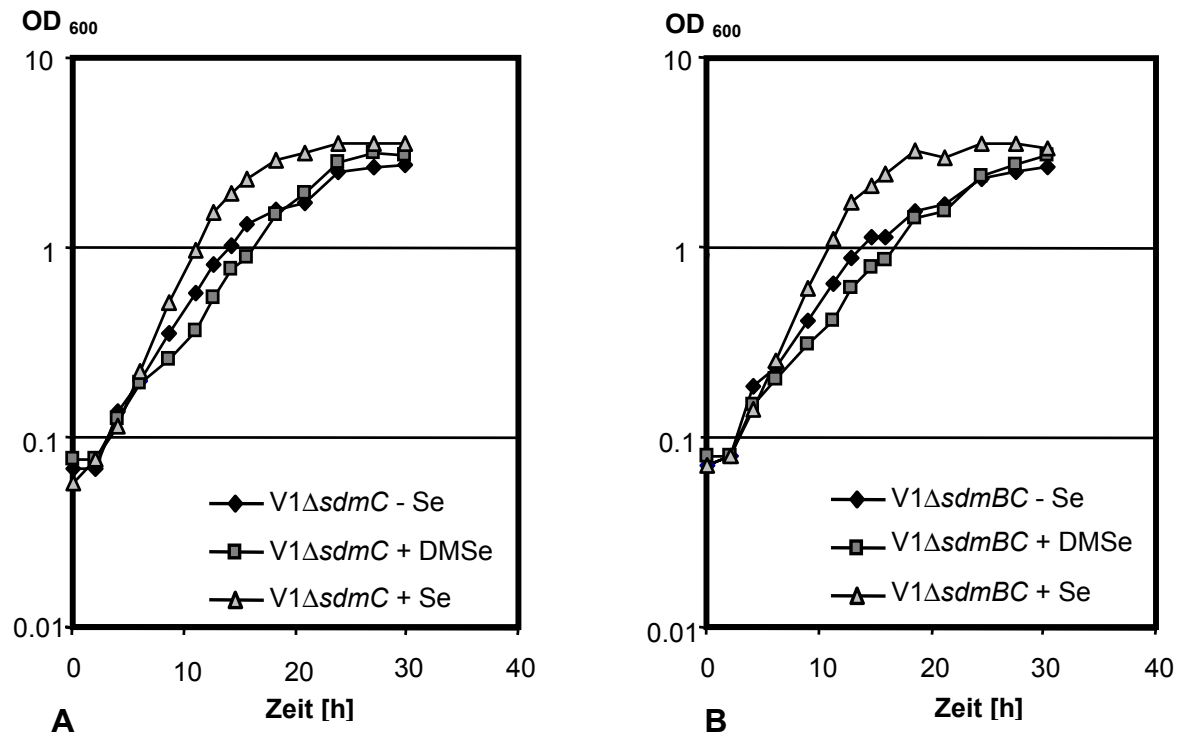


Abb. 18: Wachstumsverhalten der Stämme $V1\Delta sdmC$ und $V1\Delta sdmBC$ unter Selenmangelbedingungen bzw. mit DMSe oder NaSelenit als Selenquelle

Das Selenmangelmedium (-Se) wurde zu einer Endkonzentration von 10 nM, selenhaltiges Medium (+Se) wurde zu 10 μ M mit Selenit versetzt. DMSe-haltiges Medium (DMSe) enthielt DMSe zu einer Endkonzentration von ebenfalls 10 μ M. Die Wachstumskurven wurden für die Stämme **A**: $V1\Delta sdmC$, **B**: $V1\Delta sdmBC$ bei den verschiedenen Selenquellen und Konzentrationen erstellt.

5.13 Das Gen *sdmC* besitzt für seine Transkription einen zusätzlichen Startpunkt

Wie schon erwähnt, wurden die Deletionsmutanten durch den Austausch des jeweiligen Gens mit dem Resistenzmarkers *pacN* hergestellt und dabei auch der Terminator *T_{mcr}* der Methyl-Coenzym M-Reduktase eingeführt. Bei der Deletion von *sdmB* wurde deshalb ein polarer Effekt auf das Gen *sdmC* erwartet, wenn *sdmC* zusammen mit *sdmA* und *sdmB* auf einen gemeinsamen polycistronischen Messenger liegen sollte. Hinweise auf einen gemeinsames Transkript ergaben sich durch die Northern-Blot-Analyse unter Abschnitt 5.7 im Zusammenhang mit der Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts unter Abschnitt 5.6. Es war überraschend, dass sich der Stamm $V1\Delta sdmB$ in den Reporter-gen-Tests (5.11) und

in der Wachstumsrate (5.12) wie der Stamm V1 verhielt, so als würde das Gen *sdmC* exprimiert. Daher lag die Vermutung nahe, dass das Gen *sdmC* unter der Kontrolle eines zweiten separaten Promotors steht, der zwischen *sdmB* und *sdmC* liegen müsste. Unter dieser Annahme wäre die mRNA von *sdmC* im Deletionsstamm V1 Δ *sdmB* bei Selenmangel mittels einer RT-PCR nachweisbar.

Mit dem Primer RTmetIIIB wurde mittels einer reversen Transkription ein DNA-Gegenstrang zur mRNA des Gens *sdmC* synthetisiert. Die dafür verwendete Gesamt-RNA wurde aus dem Stamm V1 Δ *sdmB* präpariert. Das Transkript von *sdmC* wurde dann durch die Amplifikation eines ca. 400 bp großen Fragments über die Oligonukleotide RTmetIIfw und RTmetIIrv am Gegenstrang nachgewiesen (Abb. 19A, Spur 2 und 4). Die Bindestellen der Oligonukleotide sind schematisch im oberen Teil der Abb. 19A dargestellt. Das Produkt wurde nicht erhalten, wenn die Amplifikation vor der reversen Transkription durchgeführt wurde (Abb. 19A, Spur 3 und 5). Wurde als Positivkontrolle eine PCR mit den Oligonukleotiden an der chromosomalen DNA aus dem Stamm V1 Δ *sdmB* durchgeführt, dann wurde das Fragment ebenfalls nachgewiesen (Abb. 19A, Spur 6). Die Oligonukleotide, jeweils einzeln in der PCR eingesetzt, erzeugten kein Signal (Abb. 19A, Spuren 6, 7 und 8).

Die Anwesenheit der mRNA von *sdmC* im Stamm V1 Δ *sdmB* ließe sich auch erklären, wenn der eingefügte Terminator des Gens *pacN* ein Überlesen der Polymerase zuließe. Dies wurde ebenfalls über eine RT-PCR überprüft. Die mRNA sollte sich dann von *pacN* über das Gen *sdmC* erstrecken. Mit dem Primer RTmetIIIB wurde ein DNA-Gegenstrang zur mRNA von *sdmC* aus einem Gesamt-RNA-Extrakt aus dem Stamm V1 Δ *sdmB* synthetisiert. Bei anschließender Amplifikation mit den Oligonukleotiden RTpac und RTmetIrvB wurde jedoch das erwartete ca. 850 bp große Fragment nicht erhalten (Abb. 19B, Spuren 2 u. 4). Eine PCR war nur an der chromosomalen DNA erfolgreich (Abb. 19B, Spur 6). Ein Überlesen des Terminators wurde somit ausgeschlossen und angenommen, dass sich zwischen den Genen *sdmB* und *sdmC* ein zweiter separater Promotor des Gens *sdmC* befindet. Zur Übersichtlichkeit sind die Bindestellen der Oligonukleotide im oberen Teil der Abb. 19B schematisch dargestellt.

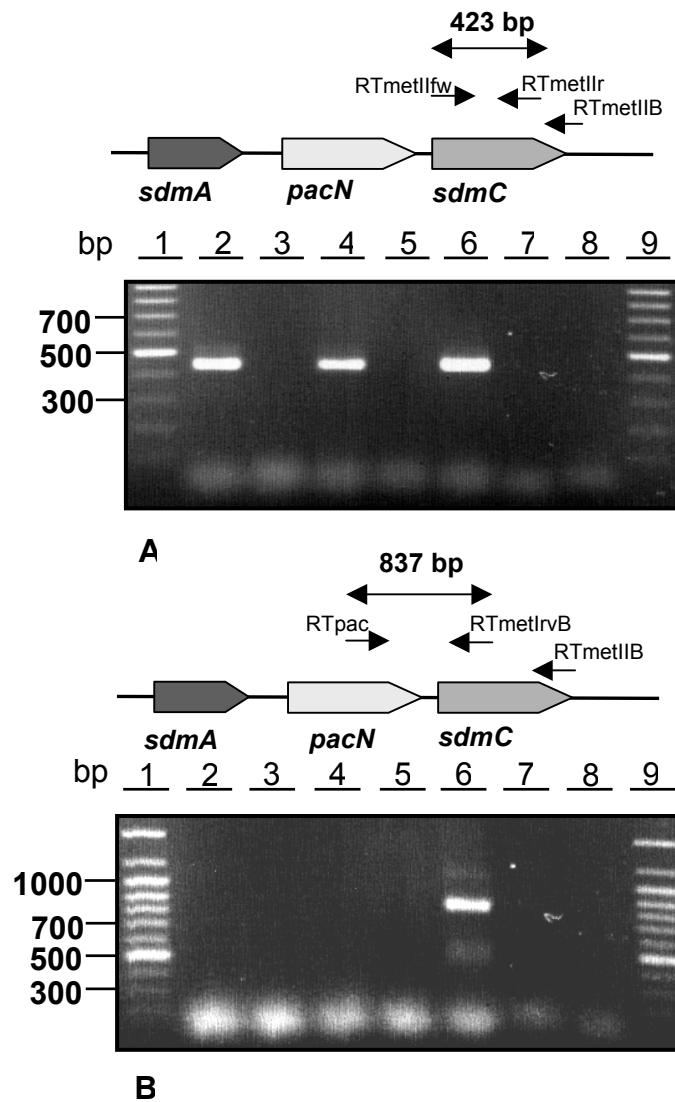


Abb. 19: RT-PCR zum Nachweis eines separaten Transkriptionsstarts des Gens *sdmC*

A: Das *sdmC*-Transkript wurde in der Gesamt-RNA aus dem Stamm V1Δ*sdmB* nachgewiesen. Die Kultivierung der Zellen zur RNA-Präparation erfolgte unter Selenlimitierung. Die reverse Transkription wurde mit dem Primer RTmetIIB durchgeführt, die Amplifikation mit den Primern RTmetIlfw und RTmetIrv. Die Bindestellen der Oligonukleotide sind im oberen Teil der Abb. schematisch dargestellt.

B : Die reverse Transkription wurde mit dem Primer RTmetIIB durchgeführt, die Amplifikation jedoch mit den Primern RTpac und RTmetIrvB. Die Bindestellen der Oligonukleotide sind schematisch im oberen Teil der Abb. dargestellt.

Spuren: bp: Größenstandard in Basenpaaren; 1 u. 9: GenRuler™ DNA Ladder; 2, 4: 1 µg oder 5 µg Gesamt-RNA; 3, 5: Kontrollreaktion ohne Addition der reversen Transkriptase; 6: Kontrollreaktion mit 20 ng chromosomaler DNA; 7, 8: Kontrollreaktionen mit 20 ng chromosomaler DNA, aber mit jeweils einem Amplifikationsprimer.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Gen eines Proteins identifiziert, das in *Methanococcus voltae* nur unter Selenlimitierung synthetisiert wird. Es wurde als *sdmA* benannt (für Dimethylselenid Demethylierung). Eine Ähnlichkeit von SdmA zu Corrinoid-Proteinen aus *Methanosarcina* zeigte ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene. *sdmA* liegt zusammen mit den Genen *sdmB* und *sdmC* auf einem gemeinsamen polycistronischen Messenger, der nur bei Selenmangel nachweisbar war. Die Proteine SdmB und SdmC haben gemeinsame Sequenzmotive mit Methyltransferasen, die in einigen Methanoarchaeen die Methylgruppe aus methylierten Substraten von Corrinoid-Proteinen auf den Akzeptor Coenzym M übertragen. Es wurde daher untersucht, ob *M. voltae* TMA, DMA, MMA, Methanol oder DMS für die Methanogenese unter Selenmangel nutzen kann. Dies konnte jedoch in Wachstumsversuchen und gaschromatographischen Messungen nicht festgestellt werden. In Reportergergen-Tests mit Deletionsstämmen stellte sich dann heraus, dass sich von *M. voltae* bei Mangel an anorganischem Selenit eine weitere Selenquelle erschließen lässt, das DMSe. Dabei stand das Gen der β -Glucuronidase unter der Kontrolle des Promotors der Gene der selenfreien Hydrogenase Vhc. Eine Expression war daher nur unter Selenmangel zu erwarten. Die daraus erhaltenen Resultate wurden durch Wachstumsexperimente untermauert. Ferner wurde gezeigt, dass die beiden Gene *sdmA* und *sdmC* für die Erschließung des DMSe nötig sind. Eine Mutante mit einer Deletion des Gens *sdmB* behielt jedoch die Fähigkeit, diese Verbindung zu nutzen, was man aber aufgrund eines polaren Effektes nicht erwartet hätte. Es lagen, wie bereits erwähnt, Hinweise vor, dass die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* auf einem gemeinsamen polycistronischen Messenger liegen. Jedoch konnte aus einer RT-PCR an Gesamt-RNA aus der Δ *sdmB*-Mutante geschlossen werden, dass vor dem Gen *sdmC* ein zweiter separater Promotor lokalisiert sein könnte.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Funktion des Corrinoid-Proteins und der Methyltransferasen sowie deren Regulation im Zusammenhang mit der Verfügbarkeit verschiedener Selenquellen diskutiert.

Die möglichen Anpassungsmechanismen von *M. voltae* an Selenmangel

Selen kommt in der Umwelt in unterschiedlichen Verbindungen und Konzentrationen vor. Die biologisch am interessantesten sind die oxidierten Selenverbindungen wie das Selenit und das Selenat, da diese in Wasser sehr gut löslich sind (Fishbein, 1991). In hohen Konzentrationen haben sie daher auch eine toxische Wirkung (Kramer & Ames, 1988). In geringen Mengen hingegen ist Selen essentiell, da es in Form von Selenocystein und -methionin in unverzichtbaren Selenoproteinen vorkommt (Stadtman, 1990; Stadtman, 1996). Zudem findet es sich in bestimmten tRNAs als ein Bestandteil eines speziellen Nukleotids, dem 5-[(Methylamino)Methyl]-2-Selenouridin (Wittwer *et al.*, 1984). Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit hat elementares Selen eine geringere biologische Bedeutung. Diese Eigenschaft wird jedoch zur Detoxifikation von einigen Organismen genutzt, indem sie das Selenit oder Selenat zu elementarem Selen reduzieren (Gerrard *et al.*, 1974; Kessi *et al.*, 1999; Moore & Kaplan, 1992). Ein weiterer Möglichkeit zur Detoxifikation ist die Bildung flüchtiger Selenverbindungen durch die Biomethylierung (Chasteen & Bentley, 2003). Die am häufigsten gefundenen flüchtigen Selenverbindungen sind das DMSe, DMDSe und das DMSeS (Amouroux *et al.*, 2001; Chau *et al.*, 1976; Francis *et al.*, 1974; Reamer & Zoller, 1980).

Im Folgenden soll zunächst der in dieser Arbeit häufig verwendete Begriff des Selenmangels in Bezug auf *M. voltae* näher erläutert werden. In *M. voltae* werden die Gene der Hydrogenasen Vhc und Frc nur unter Selenlimitierung transkribiert (Berghöfer *et al.*, 1994). In den entsprechenden Untersuchungen wurde für die Kultivierung ein definiertes Aminosäuremedium verwendet, dessen Selengehalt durch Hydrid-Atom-Adsorptions-Spektrometrie auf weniger als 3 nM bestimmt wurde. Die Wachstumsrate von *M. voltae* war in diesem Medium sehr stark reduziert (Berghöfer & Klein, 1995). Im Vergleich dazu waren die Wachstumskurven, die in der vorliegenden Arbeit unter Selenmangel erstellt wurden, weniger stark herabgesetzt. Die Selenitkonzentration des Mangelmediums lag dabei jedoch bei 10 nM. *M. maripaludis* exprimiert unter Selenmangel das Gen einer Untereinheit einer selenfreien Hydrogenase (Rother *et al.*, 2003). Die dort ermittelten Wachstumsraten unterschieden sich zwischen der Kultivierung bei Selenzugabe und -mangel nicht. Der Selengehalt des Mangelmediums lag dabei bei 100 nM und war niedrig genug,

um bereits die Synthese der oben genannten selenfreien Hydrogenase zu induzieren. In β -Glucuronidase-Reporter-Gen-Tests unter Verwendung des *vhc*-Promotors, welcher nur bei Selenmangel aktiv ist, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass auch in *M. voltae* ab einer Selenitkonzentration von 100 nM und darunter bereits ein Selenmangel vorliegt. Denn ab dieser Konzentration wird das Reporter-Gen bereits im Stamm V1 exprimiert.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass es in *M. voltae* bei einer Selenkonzentration von 100 nM bereits zu einer Antwort auf Selenmangel kommt. Ob die Wachstumsrate dabei schon reduziert ist, ist jedoch nicht bekannt.

In Wasserproben aus verschiedenen Flussmündungen wurden Selenkonzentrationen zwischen 0,1 und 63 nM vorgefunden (Conde & Sanz Alaejos, 1997) und liegen damit deutlich unter 100 nM. Im natürlichen Lebensraum von *M. voltae* scheint anhand dieser Angaben der Selenmangel ein durchaus üblicher Zustand zu sein.

Prinzipiell kann man sich zwei verschiedene Anpassungsmöglichkeiten von *M. voltae* an Selenlimitierung vorstellen. Die eine ist die Expression selenfreier Isoenzyme, wie im Fall der Hydrogenasen Vhc und Frc. Dadurch könnte sichergestellt werden, dass in der Methanogenese genügend Elektronen zur Reduktion des CO₂ zu Methan zur Verfügung stehen. Die andere Möglichkeit wäre die Erschließung einer zweiten Selenverbindung, wenn die eine nicht mehr oder nur in geringem Maße zur Verfügung steht.

Als alternative Selensubstrate kämen die oben erwähnten flüchtigen, organischen Selenverbindungen wie beispielsweise das DMSe in Frage, da diese in der Umwelt häufig anzutreffen sind. Die Löslichkeit des DMSe in Wasser wurde in vorangegangenen Arbeiten bestimmt (Guo *et al.*, 2000). Gibt man 0,2 ml gasförmiges DMSe in ein geschlossenes Gefäß mit einem Volumen von 21 ml zu Wasser, dann war die Konzentration, abhängig vom Flüssigkeitsvolumen und von der Temperatur, im Wasser bis zu 31 mal höher, als in der Gasphase. Zwischen 4 und 40°C war im Wasser stets mehr DMSe gelöst. Diese Verbindung kann daher zur Detoxifizierung, aber auch als Selenquelle genutzt werden.

So sind zahlreiche Organismen in der Lage das DMSe bei Zugabe von Selenit zur Entgiftung zu bilden. Beispielsweise wurde dies für eine *Chlorella*-Art (Fan *et al.*, 1997) und auch für einige Vertreter der Bacteria gezeigt (Doran & Alexander, 1977; Dungan & Frankenberger, 2000; Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000). Bei Archaea wurde

die Synthese des DMSe nach Selenitzugabe bei *M. barkeri* beobachtet (Michalke *et al.*, 2000).

Wenn das DMSe nun als Selenquelle erschlossen werden soll, dann müssten die Methylgruppen entfernt werden, um das Selen zur Biosynthese des Selenophosphats als Selenwasserstoff für die Selenophosphat-Synthetase zur Verfügung zu stellen (Veres *et al.*, 1994).

Die Regulation der Transkription der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC*

In der Northern-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass das Gen *sdmA* nur unter Selenlimitierung exprimiert wird. Ferner konnten in der Umgebung des Transkriptionsstarts keine Elemente identifiziert werden, die in den selenfreien Hydrogenasen für die positive und negative Regulation verantwortlich sind (Noll *et al.*, 1999). Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass das Gen *sdmA* demselben Regulon angehört, wie die Gene der selenfreien Hydrogenasen *Frc* und *Vhc*.

Durch eine weitere Northern-Blot-Analyse wurde festgestellt, dass die Sonden der Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* jeweils zu einem Signal derselben Größe führen. Die Länge des so gefundenen Transkripts lag bei ca. 3 500 Nukleotiden. Es kann daher angenommen werden, dass diese Gene zusammen auf einem polycistronischen Messenger liegen. Unterstützt wird die Annahme durch die Kartierung eines möglichen Transkriptionsstartpunkts (Wich *et al.*, 1986), so dass das Transkript die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* überdecken würde. Das Gen stromabwärts von *sdmC* liegt wahrscheinlich nicht mehr auf diesem Transkript, da es in der Northern-Blot-Analyse nicht detektiert wurde. Stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes wurde eine mögliche TATA-Box (Reiter *et al.*, 1990) identifiziert.

Polycistronische Messenger finden sich häufig in Archaea. In *M. voltae* ist beispielsweise auch bei Flagellin-Genen eine gemeinsame Transkription festgestellt worden (Thomas & Jarrell, 2001). In einer Northern-Blot-Analyse zeigte dort eine Sonde gegen das erste Gen der Transkriptionseinheit ein ähnliches Bandenmuster wie in dieser Arbeit die Sonde I, welche gegen das Gen *sdmA* gerichtet war. Die Autoren nahmen an, dass eine poly-T-Sequenz am Ende der ersten beiden Flagellin-Genen eine unvollständige Termination des Transkripts bewirkt. Durch ein Überlesen dieser Stelle könnte ein zweites und längeres Transkript entstehen. Beispielsweise

führen auch Deletionen im vorgeschlagenen archaeeellen Terminationssignal (Wich *et al.*, 1986) zu einer reduzierten Abbrucheffizienz (Thomm *et al.*, 1994). In den intergenen Regionen der Gengruppe *sdmABC* wurden zwar auch thymin-reiche Sequenzen gefunden, die erhaltenen Transkriptgrößen konnten jedoch nicht eindeutig angenommenen Längen zugeordnet werden. Die Frage bleibt offen, ob es sich bei den verkürzten Fragmenten um die Terminationsprodukte handelt, oder ob es Abbauprodukte des vollständigen Messengers sind. Die Fragmente ließen sich dann, durch die für den Abbau unterschiedliche Zugänglichkeit von Sequenzelementen, erklären.

Wie bereits angemerkt, wurden durch die Northern-Blot-Analysen Hinweise erhalten, dass die Gene *sdmA*, *sdmB* und *sdmC* auf einem gemeinsamen polycistronischen Messenger liegen. Die Transkription des Gens *sdmC* wird möglicherweise zusätzlich durch einen zweiten Promotor reguliert, der zwischen den Genen *sdmC* und *sdmB* lokalisiert sein könnte. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse aus der RT-PCR unterstützt, in der das *sdmC*-Transkript in der Δ *sdmB*-Mutante nachgewiesen wurde. Es stellt sich die Frage, ob dieser Promotor ebenfalls einer selenabhängigen Regulation unterliegt. Ein Hinweis darauf liefert die Northern-Blot-Analyse mit der Sonde III gegen das Gen *sdmC*. Ein Signal wurde dort nur bei Selenmangel detektiert. Dabei hatte ein Fragment eine Größe von ca. 3 500 Nukleotiden, welches das komplette Transkript repräsentieren könnte. Die kleineren Fragmente, in der Größe zwischen ca. 500 und 1000 Nukleotiden, könnten Abbauprodukte, aber auch ein Transkript ausgehend vom zweiten Promotor darstellen. Es kann anhand dieser Analyse angemerkt werden, dass die Transkription vom zweiten Promotor ebenfalls nur unter Selenlimitierung erfolgen sollte.

Eindeutige Promotor-Elemente konnten in der intergenen Region zwischen den Genen *sdmB* und *sdmC* nicht identifiziert werden. Mögliche regulatorische Sequenzmotive, die in den beiden Promotorregionen vorkommen, wurden ebenfalls nicht gefunden.

Unter der Annahme, dass die Proteine SdmA und SdmC an der Bereitstellung des Dimethylselenids zur Biosynthese der Selenoproteine beteiligt sind, ist es vorstellbar, dass die Induktion der Transkription der Gengruppe *sdmABC* aufgrund eines Mangels anorganischer Selenverbindungen erfolgt.

Eine andere Möglichkeit wäre eine Induktion aufgrund eines veränderten Redoxstatus der Zelle, da bei Fehlen der selenhaltigen Hydrogenasen die Wasserstoffaktivierung zumindest reduziert sein könnte.

In *M. maripaludis* wurde beispielsweise durch Reporter-Gen-Tests gezeigt, dass die Transkription der Gene einer Formiat-Dehydrogenase nicht etwa von der Anwesenheit des Formiats, sondern von der Verfügbarkeit des Wasserstoffs abhängt (Wood *et al.*, 2003). Dieses Enzym katalysiert in Methanogenen die Oxidation des Formiats, wodurch reduziertes Coenzym F₄₂₀ zur Verfügung gestellt wird (Jones & Stadtman, 1980; Jones & Stadtman, 1981; Schauer & Ferry, 1982). In *Methanothermobacter thermautotrophicus* wurde ebenfalls eine Induktion der Expression der Formiat-Dehydrogenase-Gene unter der Wasserstofflimitierung (Nölling & Reeve, 1997), wie auch eine höhere Transkriptionsrate der Gene der Methyl-Coenzym M-Reduktase, der F₄₂₀-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase Mtd (Bonacker *et al.*, 1992; Nölling & Reeve, 1997) und der F₄₂₀-reduzierenden Hydrogenase Frh beobachtet (Morgan *et al.*, 1997). Die Transkriptmenge der H₂-bildenden Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase Hmd nahm dagegen ab (Morgan *et al.*, 1997). In *Methanothermobacter marburgensis* blieb die Expression der Hmd konstant, aber es wurde ebenfalls eine Induktion der Expression der Hydrogenase Frh und der F₄₂₀-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase Mtd beobachtet (Afting *et al.*, 2000).

Eine Zerstörung des Gens des Transkriptionsfaktors SelB, der an der Biosynthese von Selenoproteinen beteiligt ist, führt in *M. maripaludis* zu einer erhöhten Expressionsrate der Gene der Hmd und der Formylmethanofuran:Tetrahydromethanopterin-N-Formyltransferase, wie anhand der 2D-Elektrophorese gezeigt wurde (Rother *et al.*, 2003). Dieselben Ergebnisse können bei der Kultivierung von *M. maripaludis* unter Selenmangel beobachtet werden. Ob die Expression dieser Gene von der Verfügbarkeit des Wasserstoffs abhängt, wurde dort nicht überprüft. Aber eine Deletion von *selB*, wie auch ein Selenmangel, führt zu einem Verlust der selenhaltigen Hydrogenasen. Davon könnte auch die Aktivierung des Wasserstoffs und die Bereitstellung der Elektronen betroffen sein.

Die Transkripte der Gene der selenfreien Hydrogenasen Frc und Vhc aus *M. voltae* könnten sich außer bei Selenmangel ebenfalls bei Wasserstofflimitierung nachweisen lassen, was in früheren Arbeiten jedoch nicht untersucht wurde. Ob dies

auch für die an der Bereitstellung des DMSe beteiligten Gene der Proteine SdmA und SdmC gilt, bleibt eine offene Frage.

Es ist vorstellbar, dass die Induktion der Transkription der Gengruppe *sdmABC* nicht durch das Substrat DMSe selbst erfolgt, denn dieses wird auch zur Detoxifikation bei hohen Selenat- oder Selenitkonzentration von zahlreichen Organismen gebildet. Eine gleichzeitige Erschließung des DMSe würde dann der Detoxifikation entgegen wirken. Aus diesem Grunde stellt das DMSe vermutlich nur ein alternatives Selensubstrat dar, auf das immer dann zurückgegriffen wird, wenn andere Selenverbindungen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

Das Corrinoïd-Protein SdmA und die Methyltransferase SdmC sind an der Erschließung des Dimethylselenids beteiligt

In einem Vergleich von SdmA zu verschiedenen Corrinoïd-Proteinen wurden Sequenzidentitäten zwischen 35 und 45 % festgestellt. Die Aminosäuresequenz von SdmA weist zudem ein Motiv mit der Sequenz Asp₁₀₄-X-His₁₀₆-X-X-G₁₀₉-X_n-Ser₁₅₁-X-Leu₁₅₃-X_n-Gy₁₈₂-Gly₁₈₃ auf, das als Cobalamin-Bindemotiv vorgeschlagen wurde (Marsh & Holloway, 1992). Das Motiv Asp-X-His-X-X-Gly-X₄₁₋₄₂-Thr/Ser-X-Leu-X₂₄₋₂₈-Gly-Gly kommt in einer Reihe anderer Corrinoïd-abhängiger Enzyme, wie z.B. in der Cobalamin-abhängigen Methionin-Synthase MetH aus *E. coli* (Banerjee *et al.*, 1989), der Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii* (Marsh *et al.*, 1989), der Glutamat-Mutase aus *Clostridium cochlearium* (Zelder *et al.*, 1994) und in MtaC aus *M. barkeri* (Sauer & Thauer, 1998), vor. Die Methyltransferasen SdmB und SdmC aus *M. voltae* sind auf Aminosäureebene untereinander zu 66 % identisch. Zu anderen Methyltransferasen aus *Methanosarcina* haben sie Sequenzidentitäten zwischen 22 und 25 %. Dort sind diese in der methylotrophen Methanogenese an der Übertragung der Methylgruppen auf den Akzeptor Coenzym M beteiligt (Burke & Krzycki, 1995; Burke & Krzycki, 1997). Es ist erwähnenswert, dass die gefundenen Übereinstimmungen nicht besonders hoch sind, jedoch zeigen die im Vergleich dargestellten Sequenzen, beispielsweise aus *M. barkeri*, nicht nur gegenüber den Sequenzen aus *M. voltae*, sondern auch untereinander geringe Übereinstimmungen. So zeigt MtbA eine Identität von nur 36 % zu MtaA und von 31 % zu MtsA. Das Protein MtaA ist nur zu 27 % identisch mit MtsA.

In der Aminosäuresequenz beider Methyltransferasen, SdmB bzw. SdmC, wurde auch ein mögliches Zinkbindemotiv, His₂₃₉-X-Cys₂₄₁-X_N-Cys₃₂₂ bzw. His₂₄₁-X-Cys₂₄₃-X_N-Cys₃₂₄, vorgefunden. Von dem Motiv His-X-Cys-X_N-Cys wurde gezeigt, dass in der Cobalamin-unabhängigen Methionin-Synthase MetE und der Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase MtbA der Imidazolring des Histidins und die beiden Thiolgruppen der Cysteine Zink koordinieren (Gencic *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1999).

Anhand der vorgefundenen Sequenzidentitäten von SdmA zu Corrinoide-Proteinen bzw. von SdmB und SdmC zu Methyltransferasen und der oben beschriebenen identifizierten Sequenzmotive wurde vermutet, dass die Proteine SdmA, SdmB und SdmC an der Demethylierung eines Substrats in *M. voltae* beteiligt sein könnten. Ein möglicher Akzeptor für die Methylgruppe wäre dann das Coenzym M.

Im Allgemeinen werden in der methylotrophen Methanogenese für die Mobilisierung der Methylgruppe aus dem Substrat zwei Methyltransferasen benötigt (Ferry, 1999). Die eine überträgt die Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoide-Protein und die zweite transferiert die Methylgruppe dann vom Corrinoide-Protein auf das Coenzym M.

Unter anderem können folgende chromosomale Anordnungen der daran beteiligten Gene vorgefunden werden: In *M. barkeri* befinden sich beispielsweise die Gene, die zur Demethylierung des MMA benötigt werden, in einem Cluster (Burke *et al.*, 1998), wie auch die Gene der substratspezifischen Methyltransferasen und Corrinoide-Proteine, welche bei der Demethylierung des TMA und DMA eine Rolle spielen (Paul *et al.*, 2000). Bei der Demethylierung des Methanols liegt die substratspezifische Methyltransferase MtaB neben dem Corrinoide-Protein MtaC, während die zweite Methyltransferase MtaA sich an einer anderen Stelle im Genom befindet (Sauer *et al.*, 1997). In *M. voltae* liegen die Gene der Methyltransferasen SdmB und SdmC neben dem für das Corrinoide-Protein SdmA. Eine weitere Methyltransferase, die Sequenzübereinstimmungen zu substratspezifischen Methyltransferasen zeigen könnte, wurde in der unmittelbaren Nachbarschaft nicht gefunden. Allerdings wäre diese auch nicht zwingend erforderlich, denn zur Demethylierung des DMS in *M. barkeri* wird ausschließlich die Methyltransferase MtsA und das Corrinoide-Protein MtsB benötigt (Tallant & Krzycki, 1997; Tallant *et al.*, 2001).

Wie bereits oben erwähnt, wurde angenommen, dass die Proteine SdmA, SdmB und SdmC an der Demethylierung eines bestimmten Substrats unter Selenmangel beteiligt sein könnten.

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass *M. voltae* auf Methanol oder Methylaminen nicht wächst (Whitman *et al.*, 1982). Dabei enthielt das Kulturmedium jedoch Selen und es wurden dort auch keine gaschromatographischen Messungen zur Methanbestimmung durchgeführt.

Unter Selenlimitierung konnte aber auch in der vorliegenden Arbeit weder Wachstum noch Methanbildung bei *M. voltae* unter Zugabe von TMA, DMA, MMA, DMS oder Methanol festgestellt werden. Deshalb wurde eine Beteiligung der Proteine SdmA, SdmB und SdmC an der Demethylierung dieser Substrate ausgeschlossen.

Eine in der Umwelt häufig vorkommende organische Selenverbindung ist das DMSe (Amouroux *et al.*, 2001; Chau *et al.*, 1976; Francis *et al.*, 1974; Reamer & Zoller, 1980). Es wäre daher denkbar, dass *M. voltae* bei Mangel anorganischer Selenverbindungen auf dieses methylierte Substrat zurückgreift. Diese Annahme wurde durch die Reportergergen-Tests mit Stämmen, die Deletionen der Gene *sdmA*, *sdmB* oder *sdmC* bzw. beider Genen *sdmB* und *sdmC* aufwiesen, bestätigt. Der für die Transformation verwendete *M. voltae*-Stamm V1 trägt eine chromosomale Kopie des Reportergergens *uidA* unter der Kontrolle des *vhc*-Promotors (Pfeiffer *et al.*, 1998). Eine Aktivität des Reportergergens war daher bei Selenmangel zu erwarten, denn nur dann werden die Gene der Hydrogenase Vhc transkribiert (Berghöfer *et al.*, 1994). Wenn das DMSe von *M. voltae* als Selenquelle genutzt werden kann, müsste dies eine Repression des Reporters zur Folge haben. Sind zudem die Produkte der Gene *sdmA*, *sdmB* oder *sdmC* an der Erschließung des DMSe beteiligt, sollten Deletionen in diesen Genen hingegen zu einer Expression des *uidA*-Gens führen.

Der Wildtyp wie auch die Mutanten zeigten in den durchgeführten Reportergergen-Tests ab einer Selenit-Konzentration von 100 nM und weniger eine Aktivität. Wurde jedoch das DMSe als Selenquelle zugegeben, dann wurde eine Expression des Reportergergens in den Deletionsstämmen V1 Δ *sdmA*, V1 Δ *sdmC* und V1 Δ *sdmBC* bereits bei einer Konzentration von 10 μ M festgestellt. Daraus wurde geschlossen, dass diese Stämme das DMSe nicht mehr als Selenquelle erschließen können. Im Gegensatz dazu exprimiert der Wildtyp und die Mutante V1 Δ *sdmB* das Reportergergen erst ab einer DMSe-Konzentration von 100 nM und weniger. An der Demethylierung

müssten deshalb das Corrinoid-Protein SdmA und die Methyltransferase SdmC beteiligt sein, jedoch nicht SdmB. Bei der Deletion von *sdmB* wurde eigentlich ein polarer Effekt auf das Gen *sdmC* erwartet. Es wurde aber, wie bereits erwähnt, das Transkript des Gens *sdmC* durch eine RT-PCR in der Mutante *V1ΔsdmB* nachgewiesen und ein zweiter separater Promotor dieses Gens angenommen.

Ein Ausbleiben der Aktivität in den Reporter-gen-Tests für alle verwendeten Stämme bei einer DMSe-Endkonzentration von 100 μM ließe sich durch eine Verunreinigung des DMSe mit anderen Selenverbindungen erklären, so dass diese für eine Repression verantwortlich wären.

Eine Untermauerung der erhaltenen Ergebnisse ergab sich aus der Erstellung der Wachstumskurven. Der Wildtyp und die Mutanten zeigten bei Selenitzugabe und bei Selenlimitierung ein vergleichbares Wachstumsverhalten. Dagegen war die Wachstumsrate bei der Zugabe von DMSe in den Stämmen *V1ΔsdmA*, *V1ΔsdmC* und *V1ΔsdmBC* reduziert, was ebenfalls auf einen Verlust der Fähigkeit hindeutete, das DMSe zu erschließen. Wie erwartet, war beim Wildtyp und der Mutante *V1ΔsdmB* keine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt worden.

Aus den bisherigen Resultaten und Folgerungen kann ein nur unvollständiges Bild über den Mechanismus der Demethylierung des DMSe und damit der Bereitstellung des Selens zur Biosynthese gegeben werden. So ist nicht klar, an welcher Stelle der Weg der Erschließung des DMSe in den Deletionsmutanten unterbrochen worden ist. Wahrscheinlich wird bei der Demethylierung des DMSe zunächst das Methanselenol gebildet, das dann weiter demethyliert werden müsste. Beispielsweise werden bei der Demethylierung von TMA, DMA und MMA verschiedene Stoffwechselwege beschrieben, aber alle führen zur Bildung von Methan (Ferry, 1998). Ein Protein, MtbA, kommt in allen drei Stoffwechselwegen vor, es überträgt die Methylgruppe vom jeweiligen Corrinoid-Protein auf das Coenzym M (Yeliseev *et al.*, 1993; Ferguson *et al.*, 1996). Zur Aktivierung der Substrate sind allerdings unterschiedliche Methyltransferasen nötig, die die Methylgruppe zunächst auf die entsprechenden Corrinoid-Proteine übertragen. Die Methyltransferase MtmB verwendet das MMA als Substrat und methyliert ihr Corrinoid-Protein MtmC (Burke & Krzycki, 1997). Für die Demethylierung des DMA ist MtbB die substratspezifische Methyltransferase und MtbC das entsprechende Corrinoid-Protein (Wassenaar *et al.*, 1998a; Wassenaar *et al.*, 1998b). Der Methylgruppentransfer vom TMA auf das MttC-Protein katalysiert

vermutlich die Methyltransferase MttB (Ferguson & Krzycki, 1997). Die Demethylierung des TMA führt zum DMA, das weiter zum MMA demethyliert werden kann. Ob man sich eine ähnliche Kaskade bei der Erschließung des DMSe vorstellen kann, konnte nicht geklärt werden. Eine Beteiligung an der Erschließung wurde nur für die Methyltransferase SdmC und dem Corrinoïd-Protein SdmA angenommen. Substratspezifische Methyltransferasen wurden im Genom von *M. voltae* nicht gefunden, jedoch weitere, die ebenfalls Sequenzidentitäten mit MtbA, MtsA oder MtmA aufwiesen. Die substratspezifischen Methyltransferasen sind jedoch nicht immer erforderlich, wie bei der Demethylierung des DMS gezeigt wurde (Tallant & Krzycki, 1997; Tallant *et al.*, 2001). Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit über ein Yeast-Two-Hybrid-System nach möglichen Interaktionspartnern zu SdmC gesucht. Dies scheiterte daran, dass das verwendete System auf *M. voltae* nicht anwendbar war. Würde die Erschließung des DMSe in zwei Schritten über das Methanselenol erfolgen, dann müsste noch ein zweites Corrinoïd-Protein-Gen im Genom vorhanden sein oder aber SdmA wäre der Akzeptor der Methylgruppen beider Substrate.

Ferner wäre es nicht ungewöhnlich, wenn die Methylgruppen des DMSe in *M. voltae* zu Methan reduziert werden würden. Beispielsweise wurde Methanbildung bei der Zugabe von DMSe zu anaeroben Bodenproben beobachtet (Ansede & Yoch, 1997; Zehr & Oremland, 1986). Die Autoren hatten Hinweise darauf, dass dafür methylorophe Methanoarchaen verantwortlich sein könnten, welche auch das DMS als Substrat nutzen. Ob diese das DMSe tatsächlich als Selenquelle erschließen, wurde dort nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, die Methanbildung gaschromatographisch bei Zugabe von DMSe zu einer Zellsuspension aus einer Selenmangelkultur von *M. voltae* zu messen. Dabei wurde angenommen, dass Verunreinigungen des DMSe mit anderen Selenverbindungen dazu führen könnte, dass die Synthese der Proteine SdmA und SdmB bei einer DMSe-Konzentration von 100 μM und darüber inhibiert wäre. Deshalb wurde zu der Zellsuspension das DMSe zu einer Endkonzentration von nur 10 μM zugegeben und die Zellen mit Wasserstoff überschichtet und für 24 h inkubiert. Anschließend konnte unter den gewählten Messbedingungen keine Methanbildung festgestellt und nicht bestätigt werden, dass die Methylgruppen bei der Erschließung des DMSe in *M. voltae* zu Methan reduziert werden.

Ferner kann vermutet werden, dass die Demethylierung des DMSe zur Bildung des Selenwasserstoffs führen könnte, der dann der Selenophosphat-Synthetase als Substrat dient (Veres *et al.*, 1994). So wird beispielsweise auch angenommen, dass das Selenat und Selenit nach der Aufnahme zunächst mit Hilfe des Glutathions zum Selenwasserstoff reduziert wird (Ganther, 1968; Sandholm & Sipponen, 1973; Turner *et al.*, 1998). Es muss bemerkt werden, dass jedoch nicht geklärt ist, ob dieses Selenid tatsächlich das natürliche Substrat der Selenophosphat-Synthetase ist (Ogasawara *et al.*, 2001).

Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Corrinoid-Protein SdmA und die Methyltransferase SdmC an der Erschließung des DMSe als Selenquelle beteiligt sein könnten. Ihre Transkripte sind nur bei Selenmangel, d.h. ab einer Selenitkonzentration von 100 nM und weniger, nachweisbar. Es wurde nicht geklärt, ob die Expression der Gengruppe *sdmABC* auch von der Verfügbarkeit des Wasserstoffs abhängig ist. Ferner konnte in der Promotorregionen von *sdmA* keine Sequenzelemente gefunden werden, die normalerweise die Transkription der Gene der selenfreien Hydrogenasen regulieren. Durch Reportergernefusionen mit der Promotorregion von *sdmA* und entsprechenden Mutationsanalysen könnten regulatorische Sequenzen identifiziert und anschließend geklärt werden, bei welchen Genen diese Elemente noch vorkommen. Außerdem könnten sich daraus eventuell Rückschlüsse ergeben, ob diese Gene dann auch an der Demethylierung des DMSe oder des Methanselenols beteiligt sind.

In der Diskussion wurde angemerkt, dass unklar ist, an welcher Stelle in den Deletionsmutanten die Erschließung des DMSe unterbrochen wurde. Wäre die Demethylierung des Methanselenols gestört, dann müsste sich das durch die Reportergerne-Tests nachweisen lassen. Bei der Zugabe von Methanselenol sollten die Deletionsmutanten dann keine Aktivität anzeigen. Ist dagegen die Demethylierung des DMSe unterbrochen, dann sollte das Methanselenol noch erschlossen werden können und eine Expression des Reportergerne ausbleiben.

Ein direkter Nachweis, ob das Selen aus dem DMSe tatsächlich in die Selenoproteine inkorporiert wird, könnte durch Zugabe von [⁷⁵Se]-DMSe erbracht

werden. Die Deletionsmutanten $V1\Delta sdmA$ und $V1\Delta sdmC$ sollten dann im Gegensatz zum Wildtyp keine markierten Selenoproteine synthetisieren.

7 Literaturverzeichnis

- Afting, C., Kremmer, E., Brucker, C., Hochheimer, A. & Thauer, R. K. (2000).** Regulation of the synthesis of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) and of HmdII and HmdIII in *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch Microbiol* **174**, 225-232.
- Agha-Amiri, K. & Klein, A. (1993).** Nucleotide sequence of a gene encoding a histone-like protein in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Nucleic Acids Res* **21**, 1491.
- Amouroux, D., Liss, P. S., E., T., Hamren-Larsson, M. & O.F., D. (2001).** Role of oceans as biogenic source of selenium. *Earth Planet Sci Lett* **189**, 277-283.
- Ansele, J. H. & Yoch, D. C. (1997).** Comparison of selenium and sulfur volatilization by dimethylsulfoniopropionate lyase (DMSP) in two marine bacteria and estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **23**, 315-324.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. e. (1996).** *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Avazeri, C., Turner, R. J., Pommier, J., Weiner, J. H., Giordano, G. & Vermeglio, A. (1997).** Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* **143 (Pt 4)**, 1181-1189.
- Banerjee, R. V., Johnston, N. L., Sobeski, J. K., Datta, P. & Matthews, R. G. (1989).** Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli* metH gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J Biol Chem* **264**, 13888-13895.
- Beneke, S., Bestgen, H. & Klein, A. (1995).** Use of the *Escherichia coli* uidA gene as a reporter in *Methanococcus voltae* for the analysis of the regulatory function of

the intergenic region between the operons encoding selenium-free hydrogenases. *Mol Gen Genet* **248**, 225-228.

Berghöfer, Y. & Klein, A. (1995). Insertional Mutations in the Hydrogenase *vhc* and *frc* Operons Encoding Selenium-Free Hydrogenases in *Methanococcus voltae*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1770-1775.

Berghöfer, Y., Agha-Amiri, K. & Klein, A. (1994). Selenium is involved in the negative regulation of the expression of selenium-free [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*. *Mol Gen Genet* **242**, 369-373.

Böck, A. (2000). Biosynthesis of selenoproteins--an overview. *Biofactors* **11**, 77-78.

Bonacker, L. G., Baudner, S. & Thauer, R. K. (1992). Differential expression of the two methyl-coenzyme M reductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* as determined immunochemically via isoenzyme-specific antisera. *Eur J Biochem* **206**, 87-92.

Boone, D. R., Whitman, W. B. & Rouvière, P. (1993). Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 35-80. Edited by J. G. Ferry. New York: Chapman & Hall.

Brown, T. A. & Shrift, A. (1980). Assimilation of selenate and selenite by *Salmonella typhimurium*. *Can J Microbiol* **26**, 671-675.

Brown, T. A. & Shrift, A. (1982). Selective assimilation of selenite by *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **28**, 307-310.

Burggraf, S., Fricke, H., Neuner, A., Kristjansson, J., Rouvier, P., Mandelco, L., Woese, C. R. & Stetter, K. O. (1990). *Methanococcus igneus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen from a shallow submarine hydrothermal system. *Syst Appl Microbiol* **13**, 263-269.

- Burke, S. A. & Krzycki, J. A. (1995).** Involvement of the "A" isozyme of methyltransferase II and the 29-kilodalton corrinoid protein in methanogenesis from monomethylamine. *J Bacteriol* **177**, 4410-4416.
- Burke, S. A. & Krzycki, J. A. (1997).** Reconstitution of Monomethylamine: Coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem* **272**, 16570-16577.
- Burke, S. A., Lo, S. L. & Krzycki, J. A. (1998).** Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *J Bacteriol* **180**, 3432-3440.
- Chasteen, T. G. & Bentley, R. (2003).** Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem Rev* **103**, 1-25.
- Chau, Y. K., Wong, P. T. S., Silverberg, B. A., Luxon, P. L. & Bengert, G. A. (1976).** Methylation of selenium in the aquatic environment. *Science* **192**, 1130-1131.
- Chomczynski, P. (1992).** One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* **201**, 134-139.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Clarke, L. & Carbon, J. (1976).** A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**, 91-99.
- Conde, J. E. & Sanz Alaejos, M. (1997).** Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters. *Chem Rev* **97**, 1979-2004.
- Cutter, G. A. (1982).** Selenium in Reducing Waters. *Science* **217**, 829-831.
- Doran, J. W. & Alexander, M. (1977).** Microbial Transformations of Selenium. *Appl Environ Microbiol* **33**, 31-37.

Dungan, R. S. & Frankenberger, W. T. (2000). Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *Soil Biol Biochem* **32**, 1353-1358.

Ehrenreich, A., Forchhammer, K., Tormay, P., Veprek, B. & Bock, A. (1992). Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur J Biochem* **206**, 767-773.

Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H. & Soda, K. (1982). Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. Mammalian distribution and purification and properties of pig liver enzyme. *J Biol Chem* **257**, 4386-4391.

Fan, T. W., Lane, A. N. & Higashi, R. M. (1997). Selenium Biotransformation by a Euryhaline Microalga Isolated from a Saline Evaporation pond. *Environ Sci Technol* **31**, 569-576.

Ferguson, D. J., Jr., Krzycki, J. A. & Grahame, D. A. (1996). Specific roles of methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes in metabolism of methanol and methylamines in *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem* **271**, 5189-5194.

Ferguson, D. J., Jr. & Krzycki, J. A. (1997). Reconstitution of trimethylamine-dependent coenzyme M methylation with the trimethylamine corrinoid protein and the isozymes of methyltransferase II from *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* **179**, 846-852.

Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 13-38.

Fishbein, L. (1991). *Metals and metalloids, and their ions and compounds*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

Forchhammer, K. & Bock, A. (1991). Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J Biol Chem* **266**, 6324-6328.

Forchhammer, K., Leinfelder, W. & Bock, A. (1989). Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* **342**, 453-456.

Forchhammer, K., Rucknagel, K. P. & Bock, A. (1990). Purification and biochemical characterization of SELB, a translation factor involved in selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* **265**, 9346-9350.

Forchhammer, K., Leinfelder, W., Boesmiller, K., Veprek, B. & Bock, A. (1991). Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (*selA*) and purification of the protein. *J Biol Chem* **266**, 6318-6323.

Francis, A. J., Duxbury, J. M. & Alexander, M. (1974). Evolution of dimethylselenide from soils. *Appl Microbiol* **28**, 248-250.

Ganther, H. E. (1968). Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* **7**, 2898-2905.

Gencic, S., LeClerc, G. M., Gorlatova, N., Peariso, K., Penner-Hahn, J. E. & Grahame, D. A. (2001). Zinc-thiolate intermediate in catalysis of methyl group transfer in *Methanosarcina barkeri*. *Biochemistry* **40**, 13068-13078.

Gerrard, T. L., Telford, J. N. & Williams, H. H. (1974). Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy. *J Bacteriol* **119**, 1057-1060.

Glass, R. S., Singh, W. P., Jung, W., Veres, Z., Scholz, T. D. & Stadtman, T. C. (1993). Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. *Biochemistry* **32**, 12555-12559.

Guo, L., Jury, W. A. & Frankenberger, W. T., Jr. (2000). Measurement of the Henry's Constant of Dimethyl Selenide as a Function of Temperature. *J Environ Qual* **29**, 1715-1717.

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

Hebert, A. M., Kropinski, A. M. & Jarrell, K. F. (1991). Heat shock response of the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *J Bacteriol* **173**, 3224-3227.

Hippe, H., Caspari, D., Fiebig, K. & Gottschalk, G. (1979). Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 494-498.

Hudman, J. F. & Glenn, A. R. (1984). Selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminantium*. *Arch Microbiol* **140**, 252-256.

Jones, J. B. & Stadtman, T. C. (1980). Reconstitution of a formate-NADP⁺ oxidoreductase from formate dehydrogenase and a 5-deazaflavin-linked NADP⁺ reductase isolated from *Methanococcus vannielii*. *J Biol Chem* **255**, 1049-1053.

Jones, J. B. & Stadtman, T. C. (1981). Selenium-dependent and selenium-independent formate dehydrogenases of *Methanococcus vannielii*. Separation of the two forms and characterization of the purified selenium-independent form. *J Biol Chem* **256**, 656-663.

Jones, J. B., Dilworth, G. L. & Stadtman, T. C. (1979). Occurrence of selenocysteine in the selenium-dependent formate dehydrogenase of *Methanococcus vannielii*. *Arch Biochem Biophys* **195**, 255-260.

Kansy, J. W., Carinato, M. E., Monteggia, L. M. & Konisky, J. (1994). In vivo transcripts of the S-layer-encoding structural gene of the archaeon *Methanococcus voltae*. *Gene* **148**, 131-135.

Keltjens, J. T. & Vogels, G. D. (1993). Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. In *Methanogenesis*, pp. 253-303. Edited by J. G. Ferry. New York London: Chapman & Hall.

Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M. & Bachofen, R. (1999). Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4734-4740.

Konisky, J., Lynn, D., Hoppert, M., Mayer, F. & Haney, P. (1994). Identification of the *Methanococcus voltae* S-layer structural gene. *J Bacteriol* **176**, 1790-1792.

Kramer, G. F. & Ames, B. N. (1988). Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* **201**, 169-180.

Künkel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K. & Hedderich, R. (1998). An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **252**, 467-476.

Lacourciere, G. M. & Stadtman, T. C. (1998). The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. *J Biol Chem* **273**, 30921-30926.

Lacourciere, G. M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N. & Stadtman, T. C. (2000). *Escherichia coli* NifS-like proteins provide selenium in the pathway for the biosynthesis of selenophosphate. *J Biol Chem* **275**, 23769-23773.

LeClerc, G. M. & Grahame, D. A. (1996). Methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes from *Methanosarcina barkeri*. Physicochemical characterization, cloning, sequence analysis, and heterologous gene expression. *J Biol Chem* **271**, 18725-18731.

Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A. & Bock, A. (1988). Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* **331**, 723-725.

Lindblow-Kull, C., Kull, F. J. & Shrift, A. (1985). Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**, 1267-1269.

Marsh, E. N. & Holloway, D. E. (1992). Cloning and sequencing of glutamate mutase component S from *Clostridium tetanomorphum*. Homologies with other cobalamin-dependent enzymes. *FEBS Lett* **310**, 167-170.

Marsh, E. N., McKie, N., Davis, N. K. & Leadlay, P. F. (1989). Cloning and structural characterization of the genes coding for adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* **260**, 345-352.

Metcalf, W. W., Zhang, J. K., Apolinario, E., Sowers, K. R. & Wolfe, R. S. (1997). A genetic system for Archaea of the genus *Methanosarcina*: liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2626-2631.

Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Kunkel, A. & Hedderich, R. (1999). Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* **265**, 325-335.

Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R. & Metcalf, W. W. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5632-5637.

Michalke, K., Wickenheiser, E. B., Mehring, M., Hirner, A. V. & Hensel, R. (2000). Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2791-2796.

Moore, M. D. & Kaplan, S. (1992). Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class Proteobacteria: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **174**, 1505-1514.

Morgan, R. M., Pihl, T. D., Nolling, J. & Reeve, J. N. (1997). Hydrogen regulation of growth, growth yields, and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH. *J Bacteriol* **179**, 889-898.

Mukhopadhyay, B., Johnson, E. F. & Wolfe, R. S. (1999). Reactor-scale cultivation of the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* to high cell densities. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5059-5065.

Müller, B., Allmansberger, R. & Klein, A. (1985). Termination of a transcription unit comprising highly expressed genes in the archaebacterium *Methanococcus voltae*. *Nucleic Acids Res* **13**, 6439-6445.

Müller, S. & Klein, A. (2001). Coordinate positive regulation of genes encoding [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*. *Mol Genet Genomics* **265**, 1069-1075.

Niess, U. M. (2001). Differentielle Proteinsynthese bei *Methanococcus voltae*: Proteomuntersuchungen zur Anpassung von *M.voltae* an Selenmangel und Charakterisierung differentiell exprimierter Proteine. *Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Genetik, Philipps-Universität Marburg*.

Noll, I., Muller, S. & Klein, A. (1999). Transcriptional regulation of genes encoding the selenium-free [NiFe]-hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae* involves positive and negative control elements. *Genetics* **152**, 1335-1341.

Nölling, J. & 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.

Ogasawara, Y., Lacourciere, G. & Stadtman, T. C. (2001). Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9494-9498.

Paul, L., Ferguson, D. J., Jr. & Krzycki, J. A. (2000). The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons. *J Bacteriol* **182**, 2520-2529.

Pfeiffer, M., Bestgen, H., Burger, A. & Klein, A. (1998). The *vhuU* gene encoding a small subunit of a selenium-containing [NiFe]-hydrogenase in *Methanococcus voltae* appears to be essential for the cell. *Arch Microbiol* **170**, 418-426.

Reamer, D. C. & Zoller, W. H. (1980). Selenium Biomethylation Products from Soil and Sewage Sludge. *Science* **208**, 500-502.

Reiter, W. D., Hudepohl, U. & Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9509-9513.

Rother, M., Wilting, R., Commans, S. & Bock, A. (2000). Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Mol Biol* **299**, 351-358.

Rother, M., Resch, A., Wilting, R. & Bock, A. (2001). Selenoprotein synthesis in archaea. *Biofactors* **14**, 75-83.

Rother, M., Mathes, I., Lottspeich, F. & Bock, A. (2003). Inactivation of the selB gene in *Methanococcus maripaludis*: effect on synthesis of selenoproteins and their sulfur-containing homologs. *J Bacteriol* **185**, 107-114.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandholm, M. & Sipponen, P. (1973). Formation of unstable selenite-glutathione complexes in vitro. *Arch Biochem Biophys* **155**, 120-124.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

Sauer, K. & Thauer, R. K. (1998). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*--identification of the active-site histidine in the corrinoid-harboring subunit MtaC by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem* **253**, 698-705.

Sauer, K., Harms, U. & Thauer, R. K. (1997). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *Eur J Biochem* **243**, 670-677.

Schauer, N. L. & Ferry, J. G. (1982). Properties of formate dehydrogenase in *Methanobacterium formicicum*. *J Bacteriol* **150**, 1-7.

Sitzmann, J. & Klein, A. (1991). Physical and genetic map of the *Methanococcus voltae* chromosome. *Mol Microbiol* **5**, 505-513.

Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Prosser, I. M. & Clarkson, D. T. (1995). Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Mol Gen Genet* **247**, 709-715.

Stadtman, T. C. (1990). Selenium biochemistry. *Annu Rev Biochem* **59**, 111-127.

Stadtman, T. C. (1996). Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* **65**, 83-100.

Sun, J. (2003). A LysR-family transcriptional regulator is involved in the selenium-dependent transcriptional repression of selenium-free hydrogenase gene groups in *Methanococcus voltae*. *Dissertation, Fachbereich Biologie, Genetik, Philipps-Universität Marburg*.

Sunde, R. A. & Evenson, J. K. (1987). Serine incorporation into the selenocysteine moiety of glutathione peroxidase. *J Biol Chem* **262**, 933-937.

Tallant, T. C. & Krzycki, J. A. (1997). Methylthiol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate. *J Bacteriol* **179**, 6902-6911.

Tallant, T. C., Paul, L. & Krzycki, J. A. (2001). The MtsA subunit of the methylthiol:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* catalyses both half-reactions of corrinoid-dependent dimethylsulfide: coenzyme M methyl transfer. *J Biol Chem* **276**, 4485-4493.

Thauer, R. K. (1993). Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. In *Methanogenesis*, pp. 209-252. Edited by J. G. Ferry. New York: Chapman & Hall.

Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* **144 (Pt 9)**, 2377-2406.

Thomas, N. A. & Jarrell, K. F. (2001). Characterization of flagellum gene families of methanogenic archaea and localization of novel flagellum accessory proteins. *J Bacteriol* **183**, 7154-7164.

Thomm, M., Hausner, W. & Hethke, C. (1994). Transcription Factors and Termination in *Methanococcus*. *System Appl Microbiol* **16**, 648-655.

Turner, R. J., Weiner, J. H. & Taylor, D. E. (1998). Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Biomaterials* **11**, 223-227.

Van Fleet-Stalder, V., Chasteen, T. G., Pickering, I. J., George, G. N. & Prince, R. C. (2000). Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4849-4853.

- Veres, Z., Kim, I. Y., Scholz, T. D. & Stadtman, T. C. (1994).** Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *J Biol Chem* **269**, 10597-10603.
- Vorholt, J. A., Vaupel, M. & Thauer, R. K. (1997).** A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Mol Microbiol* **23**, 1033-1042.
- Walther, R., Fahlbusch, K., Sievert, R. & Gottschalk, G. (1981).** Formation of trideuteromethane from deuterated trimethylamine or methylamine by *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* **148**, 371-373.
- Ward, J. M., Smith, P. H. & Boone, D. R. (1989).** Emended Description of Strain PS (= OGC 70 = ATCC 33273 = DSM 1537), the Type of *Methanococcus voltae*. *Int J Sys Bacteriol* **39**, 493-494.
- Wassenaar, R. W., Keltjens, J. T. & van der Drift, C. (1998a).** Activation and reaction kinetics of the dimethylamine/coenzyme M methyltransfer in *Methanosarcina barkeri* strain Fusaro. *Eur J Biochem* **258**, 597-602.
- Wassenaar, R. W., Keltjens, J. T., van der Drift, C. & Vogels, G. D. (1998b).** Purification and characterization of dimethylamine:5-hydroxybenzimidazolylcobamide methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *Eur J Biochem* **253**, 692-697.
- Whitman, W. B., Ankwanda, E. & Wolfe, R. S. (1982).** Nutrition and carbon metabolism of *Methanococcus voltae*. *J Bacteriol* **149**, 852-863.
- Wich, G., Hummel, H., Jarsch, M., Bar, U. & Bock, A. (1986).** Transcription signals for stable RNA genes in *Methanococcus*. *Nucleic Acids Res* **14**, 2459-2479.

- Wilting, R., Schorling, S., Persson, B. C. & Bock, A. (1997).** Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. *J Mol Biol* **266**, 637-641.
- Wittwer, A. J., Tsai, L., Ching, W. M. & Stadtman, T. C. (1984).** Identification and synthesis of a naturally occurring selenonucleoside in bacterial tRNAs: 5-[(methylamino)methyl]-2-selenouridine. *Biochemistry* **23**, 4650-4655.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-4579.
- Wood, G. E., Haydock, A. K. & Leigh, J. A. (2003).** Function and regulation of the formate dehydrogenase genes of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* **185**, 2548-2554.
- Yamazaki, S. (1982).** A selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*. Identification of the selenium moiety as a selenocysteine residue. *J Biol Chem* **257**, 7926-7929.
- Yeliseev, A., Gartner, P., Harms, U., Linder, D. & Thauer, R. K. (1993).** Function of methylcobalamin: coenzyme M methyltransferase isoenzyme II in *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **159**, 530-536.
- Zehr, J. P. & Oremland, R. S. (1986).** Formation of Methane and Carbon Dioxide from Dimethylselenide in Anoxic Sediments and a Methanogenic Bacterium. *Appl Environ Microbiol* **52**, 1031-1036.
- Zelder, O., Beatrix, B., Leutbecher, U. & Buckel, W. (1994).** Characterization of the coenzyme-B12-dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium* produced in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **226**, 577-585.

Zhou, Z. S., Peariso, K., Penner-Hahn, J. E. & Matthews, R. G. (1999).

Identification of the zinc ligands in cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 15915-15926.

Zinoni, F., Heider, J. & Bock, A. (1990). Features of the formate dehydrogenase

mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4660-4664.

Dank:

Herrn Prof. Dr. A. Klein gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu dieser Arbeit, seiner Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Prof. Dr. R. K. Thauer, Prof. Dr. A. Batschauer und Prof. Dr. M. Bölker danke ich für die Übernahme der Gutachten meiner Arbeit.

Ein Dankeschön geht auch an Markus Krüer, der mir bei den Messungen zur Methanbildung geholfen hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bölker und Klein gilt mein Dank. Besonders hervorheben möchte ich meine Labornachbarin Isabell Heinicke für nette Zusammenarbeit und Hannelore Steinebach für mühseliges Korrekturlesen.

Meinen Eltern danke ich vor allen Dingen für ihre Hilfe jeglicher Art während des Studiums und der Promotion. Meiner Frau Antje danke ich herzlich für ihre besondere Unterstützung in der letzter Zeit und für manch ermunterndes Wort.

Lebenslauf :

Persönliche Daten:

Name: Niess
Vornamen: Ulf Michael
Geburtsdatum: 23.11.1973
Geburtsort: Göppingen

Schulbildung:

1980-84: Grundschule in Winzingen
1984-90: Geschwister-Scholl-Realschule Süßen (Abschluss: Mittlere Reife)
1990-93: Technisches Gymnasium der Gewerblichen Schulen Göppingen
(Abschluss: Abitur)

Zivildienst:

1993-94: Zivildienst am Krankenhaus in Geislingen

Studium:

1994-96 Grundstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
(Abschluss: Vordiplom)
1996-2001 Hauptstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg mit
den Schwerpunkten Genetik, Mikrobiologie, Biochemie und
Zellbiologie (Abschluss: Diplom). Thema der Diplomarbeit:
Differentielle Proteinsynthese in *Methanococcus voltae*:
Proteomuntersuchungen zur Anpassung von *M. voltae* an
Selenmangel und Charakterisierung differentiell exprimierter
Proteine.
2001-04 Promotion am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. A. Klein

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Die Demethylierung von Dimethylselenid ist eine adaptive Antwort des
Archaeons *Methanococcus voltae* auf Selenmangel**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)