

ulm university universität
uulm

Corrinoid-Metabolismus in *Sporomusa ovata* H1

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von
Andreas Hiergeist
aus Deggendorf

Ulm, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Dürre und Anleitung durch Herrn Dr. Erhard Stupperich durchgeführt.

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Axel Groß
1. Referent:	Prof. Dr. Peter Dürre
2. Referent:	Prof. Dr. Bernhard Eikmanns

Tag der Promotion: 16.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **1**

2 Einleitung **5**

3 Material und Methoden **15**

3.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenziensätze 15

3.1.1 Chemikalien 15

3.1.2 Enzyme 16

3.1.3 Gase 17

3.1.4 Molekularbiologische und biochemische Hilfsmittel und Reagenzien 17

3.2 Herstellung von Medien und Kultivierung von Bakterien 18

3.2.1 Bakterienstämme 18

3.2.2 Herstellen von Lösungen, Nährmedien und Puffern 18

3.2.3 Züchtung von *Sporomusa ovata* H1 in Minimalnährmedium . . . 19

3.2.4 Kultivierung von Bakterien 22

3.3 Extraktion und Quantifizierung von Corrinoiden aus *Sporomusa ovata* H1 23

3.3.1 Isolierung und Reinigung von Corrinoiden und Corrinoidvorstufen durch Umkehrphasen-HPLC 25

3.4 Molekularbiologische Hilfsmittel und Methoden 27

3.4.1 Behandlung von Lösungen, Gefäßen und Geräten 27

3.4.2 Standards und Laufpuffer für Nukleinsäuretrennungen 27

3.4.3 Vektoren 27

3.4.4 Oligodesoxynukleotide 31

3.4.5 Herstellung von Lösungen und Puffern 35

3.4.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien 35

3.4.7 Reinigen von Nukleinsäuren 37

3.4.8 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle nukleinsäurehaltiger Lösungen 39

3.4.9 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren 39

3.4.10 Herstellung von cDNA aus RNA und *In vitro*-Synthese von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 43

3.4.10.1 Expressionsanalyse durch RT-PCR 50

3.4.11 Analyse von mRNA durch das „Northern blot“-Verfahren 54

3.4.12 Agarose-Gelelektrophorese 57
3.4.13 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen 59
3.4.14 Nukleotidsequenzierung 60
3.4.15 Identifizierung von DNA-Bindestellen des transkriptionellen Regulators LuxR im Genom von *Sporomusa ovata* durch „**S**ystematische **E**volution von **L**iganden durch **ex**ponentielle Anreicherung“ (SELEX) 61
3.4.16 Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen durch Gelretardationsexperimente (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 64
3.5 Biochemische Methoden 65
3.5.1 Proteingrößenmarker und Laufpuffer für Proteine 65
3.5.2 Gewinnung der cytoplasmatischen Proteinfraktion 65
3.5.3 Gewinnung der unlöslichen Proteinfraktion und Lösen von „Inclusion bodies“ 66
3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration 66
3.5.5 Gewinnung unterschiedlicher Proteinfraktionen durch Molekularsieb-Filtration 67
3.5.6 Proteinexpression 68
3.5.7 Anreicherung und Reinigung „His-Tag“-markierter Proteine . . . 69
3.5.8 Enzymtest zur Analyse der CobT-Reaktion 71
3.5.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 72
3.5.9.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 72
3.5.9.2 Analyse von hochmolekularen Proteinkomplexen durch „Blue Native“ Gelelektrophorese (BN-PAGE) 74
3.5.10 Färbung von „Blue Native“ Gelen 76
3.5.11 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue . . 77
3.5.12 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silber 77
3.5.13 „Western-Blot“ Analyse von Proteinen 78
3.5.14 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen 81
3.5.15 Proteinbindung von Vitamin B_{12} 82

4 Ergebnisse **84**
4.1 Identifizierung von B_{12}-Riboschaltern in *Sporomusa ovata* H1 85
4.1.1 Southern-Blot-Analyse der B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 85
4.1.2 Identifizierung der B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 durch Adapter-PCR 86
4.1.3 Identifizierung der durch B_{12}-Riboschalter regulierten Gene und Operons in *Sporomusa ovata* H1 durch „genomic walking“ . . . 88
4.1.3.1 Untersuchungen zum transkriptionellen Regulator LuxR 97
4.1.3.2 Untersuchungen zu einer vorhergesagten Nikotinsäure-Mononukleotid-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (CobT) aus *Sporomusa ovata* H1 103
4.1.3.3 qRT-PCR Analyse der Genexpression in *Sporomusa ovata* H1. 117
4.2 Untersuchungen zur Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12} 124
4.3 Corrinoid-Verteilung in *Sporomusa ovata* H1 126
4.4 Analyse Corrinoid-bindender Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 129
4.4.1 Analyse hochmolekularer, Corrinoid-haltiger Proteinkomplexe in *Sporomusa ovata* H1 durch „Blue Native“-Gelelektrophorese . . 129
4.4.2 Identifizierung des Acetyl-CoA-Synthase Operons in *Sporomusa ovata* H1 131
4.4.3 Molekularbiologische Identifizierung Corrinoid-bindender Proteine über ein mögliches Vitamin B_{12}-Proteinbindemotiv 137
4.4.4 Heterologe Produktion möglicher Corrinoid-bindender/transportierender Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 und ihre biochemische Analyse 141

5 Diskussion **146**

6 Literaturverzeichnis **168**

7 Anhang **176**

Abkürzungen

A	Adenin, eine der vier Basen der DNA; Absorption
AG	Aktiengesellschaft
ALA	Aminolävulinsäure
Ap^r	Ampicilinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, eine der vier Basen der DNA
CAS	Chemical Abstract Service
cDNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
CIAP	alkalische Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*)
Co.	Kompanie (*Compagnie*)
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro(l,2-dioxethan-3,2′-(5′-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dekan)-4-yl)phenylphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DIG-UTP	Digoxigenin-11-2′-deoxyuridin-5′-triphosphat
DMB	5,6-Dimethylbenzimidazol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5′-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission (Number)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s) (*gravity*)
G	Guanin, eine der vier Basen der DNA
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Km^r	Kanamycinresistenz
λ	Wellenlänge
LB	Lysogeny Broth, ein Komplexmedium

mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)
NMR	Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*)
OD_{xxx}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
ORF	Offener Leserahmen (Open Reading Frame)
ori	Replikationsursprung (z. B. *origin of replication*)
p	Plasmid, Promotor
p. a.	pro analysis (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pCC	*para*-Kresolylcobamid
PCR	Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
qRT	quantitative „Real-Time“
®	eingetragenes Warenzeichen (*registered*)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RS	Riboschalter
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (*Sodiumdodecylsulfate*)
SELEX	**S**ystematische **E**volution von **L**iganden durch **ex**ponentielle Anreicherung
SSC	Natrium-Saline-Citrat-Puffer (*Sodium Saline Citrate*)
T	Thymin, eine der vier Basen der DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus*-Polymerase
TC	Transporter Classification (Number)
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
T_m	Schmelztemperatur
™	Warenzeichen (*trademark*)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
u.a.	und andere
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Das strikt anaerobe, essigsäurebildende Bakterium *Sporomusa ovata* H1 stellt die ungewöhnlichen Vitamin B_{12}-Derivate *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid statt dem sonst weit verbreiteten Vitamin B_{12} her. Diese Corrinoide sind als Kofaktoren an Methyltransferreaktionen beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle als Modell-Substanzen für die Vitamin B_{12}-Forschung. So erkennt das menschliche Vitamin B_{12}-Aufnahmesystem („intrinsic factor“) diese Corrinoide nicht. Die Corrinoidbiosynthese verläuft in *Sporomusa* über mindestens zwei ungewöhnliche biochemische Reaktionen. So wird der untere Coα-Nukleotidligand aus der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin durch einen bisher unbekannten radikalischen Mechanismus gebildet. Phenol und *p*-Kresol wird anschließend durch eine O-glykosidische Bindung an Ribose gebunden. Durch Zugabe von 5,6-Dimethylbenzimidazol, der Vorstufe der Vitamin B_{12}-Biosynthese, ins Wachstumsmedium, ist *Sporomusa ovata* H1 auch in der Lage Vitamin B_{12} zu synthetisieren. In diesem Vitamin ist diese Base N-glykosidisch mit Ribose verknüpft. *Sporomusa* enthält also wahrscheinlich eine unspezifische Glykosidase, die sowohl diese N- als auch O-Glykoside herstellen kann.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit war keine Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 publiziert. Deshalb war die Kenntnis corrinoidabhängiger Proteine und des Cobamid-Synthesewegs sehr begrenzt. In dieser Arbeit sollten die Gene molekularbiologisch analysiert werden, die für die hochinteressante Corrinoidbiosynthese in *Sporomusa ovata* H1 kodieren. Aus der bioinformatorischen Analyse vollständig sequenzierter Genome ist bekannt, dass die Expression der Gene, die für Enzyme der Corrinoidbiosynthese und des Corrinoidtransports kodieren, häufig auf mRNA-Ebene durch sogenannte B_{12}-Riboschalter reguliert werden. Da auch in *Sporomusa* solche Regulationselemente vorkommen sollten, wurde sein Genom auf die konservierten Nukleotidsequenzen dieser B_{12}-Riboschalter untersucht. Mit dem Verfahren der Adapter-PCR wurden dann, ausgehend von diesen Regulationselementen, die B_{12}-Riboschalter-regulierten Gene des Corrinoid-Metabolismus in *Sporomusa ovata* H1 identifiziert. Durch diese Vorgehensweise sollte der Biosyntheseweg der *Sporomusa*-Corrinoide und die Gene Corrinoid-abhängiger Reaktionen in diesem Bakterium aufgeklärt werden.

Durch die Synthese von Vitamin B_{12} wird das Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 gehemmt. Dies ist bisher das einzige bekannte Beispiel, bei dem Vitamin B_{12} als Hemmstoff auftritt. In dieser Arbeit wurde die Ursache dieses überraschenden Befundes weitergehend untersucht.

Auch ist die Bindung von unterschiedlichen Corrinoid-Kofaktoren an corrinoidabhängige Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 bislang wenig experimentell untersucht. In dieser Arbeit sollten deshalb auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene solche Corrinoid-abhängigen Proteine nachgewiesen werden.

Die Experimente meiner Arbeit führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Es gelang mir, durch eine Adapter-PCR-Technik auf konservierte Nukleotidsequenzbereiche bekannter B_{12}-Riboschalter aus nah verwandten Bakterien, zwölf B_{12}-Riboschalter und die dadurch regulierten Gene bzw. Operons in *Sporomusa ovata* H1 nachzuweisen.
2. In *Sporomusa ovata* H1 kontrollieren diese Corrinoid-Riboschalter die Expression von Genen, die für (I.) die Corrinringbiosynthese, (II.) die Synthese des unteren Kobalt-α-Liganden, (III.) eine Nitrogenase, (IV.) einen transkriptionellen Regulator der LuxR-Familie, (V.) zwei bisher unbekannte Genprodukte und (VI.) mehrere Vitamin B_{12}-Transporter kodieren.
3. Ich habe also ein B_{12}-Riboschalter-reguliertes Operon (*cobT*) in *Sporomusa ovata* H1 entdeckt, das für die Biosynthese des ungewöhnlichen unteren Corrinoid-Nukleotidliganden kodiert. In *Sporomusa* kodieren zwei offene Leserahmen für dieses CobT-Homolog. Die Expression dieser Gene habe ich charakterisiert; die kodierten Proteine konnte ich funktionell heterolog in *Escherichia coli* herstellen.
4. Meine molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen zum *cobT*-Operon und die Etablierung eines Enzymtests zur Analyse der CobT-Reaktion lassen vermuten, dass das CobT-Protein aus *Sporomusa ovata* H1 den unteren Kobalt-α-Liganden sowohl von Vitamin B_{12} als auch von *p*-Kresolylcobamid synthetisieren kann. Eine derartige unspezifische biochemische Reaktion (N- und O-Glykoside) aus der Corrinoidbiosynthese ist ungewöhnlich und bietet ein wertvolles Instrument für die Herstellung neuartiger Corrinoidderivate.
5. Ein B_{12}-Riboschalter-reguliertes Gen kodiert unerwartet für ein LuxR-ähnliches Regulatorprotein. Ein derartiger B_{12}-Riboschalter-kontrollierter Regulationsmechanismus ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es gelang mir eine Bindestelle dieses LuxR-Regulatorproteins im *Sporomusa ovata* H1-Genom durch eine SELEX-basierte Methode zu identifizieren und seine palindromische DNA-

Bindestelle durch Gelretardationsexperimente nachzuweisen. Das durch dieses Regulatorprotein kontrollierte Gen kodiert für die Kobaltchelatase (EC 1.4.99.1.3), welche den Einbau von Kobalt in den Porphyrinring katalysiert.

6. Einige der B_{12}-Riboschalter-kontrollierten Gene zeigen keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Nukleotidsequenzen bzw. zu abgeleiteten Proteinsequenzen. Die Expression dieser B_{12}-Riboschalter-regulierten Gene habe ich durch eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Dazu konnte ich für die Normalisierung der Genexpression drei Referenzgene identifizieren und die Methode der qRT-PCR erfolgreich für *Sporomusa ovata* H1 etablieren.
7. Ich habe ausserdem die Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12} abhängig vom vorgelegten Kohlenstoffsubstrat (Pyruvat, Methanol) untersucht. Außerdem habe ich die Hemmung bei Einsatz weiterer N-Heterozyklen als potenzielle Corrinoidvorstufen untersucht. Diese Ergebnisse legen einen sterischen Hemmeffekt durch die Corrinoidderivate nahe. Die Analyse der ^{57}Kobalt-markierten Proteinfraktionen gehemmter *Sporomusa*-Zellen lokalisiert diese Hemmung in der hochmolekularen Proteinfraktion (größer 100 kDa). Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen für eine Hemmung der zentralen Acetyl-CoA-Synthase.
8. Eine Analyse der Corrinoid-Verteilung in *Sporomusa ovata* H1-Proteinen ergab mehrere Corrinoid-abhängige hochmolekulare Proteinkomplexe (größer 100 kDa). So konnte ich nach „blue native“-Gelelektrophorese in mindestens fünf hochmolekularen Proteinfraktionen Corrinoid-haltige Proteine nachweisen.
9. Es gelang mir, die corrinoidabhängige Acetyl-CoA-Synthase, ein zentraler Enzymkomplex im Energie- und Baustoffwechsel des essigsäurebildenden Bakteriums, zu identifizieren. Alle kodierenden Gene dieser Acetyl-CoA-Synthase habe ich durch Adapter-PCR identifiziert sowie deren corrinoidabhängige Untereinheiten (Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein) heterolog in *Escherichia coli* hergestellt.
10. Ausserdem konnte ich über ein mögliches Corrinoid-Bindemotiv zwei Gene nachweisen, die für Corrinoid-abhängige Methyltransferasen kodieren. Zusätzlich wurde ein Gen für ein Methanol-induziertes Corrinoid-Protein identifiziert. Alle abgeleiteten Proteinsequenzen beinhalten das konservierte Vitamin B_{12}-Bindemotiv: **D**X**H**XX**G**.
11. Die molekularbiologische Analyse der Corrinoid-Riboschalter in *Sporomusa ova-*

ta H1 zeigte, dass mindestens vier Vitamin B_{12}-Transporter im Genom des homoacetogenen Bakteriums vorhanden sind, deren Expression über solche Regulationselemente kontrolliert werden. Die Vitamin B_{12}-Bindefähigkeit der identifizierten Transporter konnte ich nach Präsentation dieser Proteine auf Zelloberflächen von *Escherichia coli* funktionell nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wichtige Erkenntnisse zur Regulation und Biosynthese des Corrinoid-Metabolisums in *Sporomusa ovata* H1. Das Modell der Regulation durch die Corrinoid-Riboschalter aus *Sporomusa* weicht vom bisher bekannten Modell der Regulation durch B_{12}-Riboschalter anderer Bakterien ab. Die identifizierten Corrinoid-abhängigen Proteine, sowie die erfolgreiche heterologe Expression des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins der Acetyl-CoA-Synthase sollten eine experimentelle Analyse der Corrinoid-haltigen Holoproteine ermöglichen. Damit sollte die Wachstumshemmung durch Vitamin B_{12} auch strukturchemisch vollständig aufgeklärt werden können.

Der etablierte *in vitro*-Enzymtest zur CobT-Reaktion aus *Sporomusa ovata* H1 bietet ein wichtiges Instrument zur Herstellung von verschiedenen, auch unphysiologischen, Corrinoidderivaten. Durch diese Reaktion sollten sich verschiedene N- und O-glykosidisch verknüpfte untere Kobalt-α-Nukleotidliganden synthetisieren lassen. Auf diese Weise könnte ein Corrinoidderivat gefunden werden, durch welches das „intrinsic factor“-basierte Aufnahmesystem der Säuger blockiert werden könnte. Dadurch sollte in Zukunft im Tierexperiment ein künstlicher Vitamin B_{12}-Mangel induzierbar sein und dessen physiologische Auswirkungen untersucht werden können.

2 Einleitung

Vitamin B_{12} ist ein Corrinoid, das an vielen ökologisch und biochemisch bedeutenden Reaktionen beteiligt ist (Banerjee und Ragsdale, 2003). Außerdem wird es als essentieller Nahrungsbestandteil bei Menschen und anderen Säugern benötigt (Banerjee, 2006; Langan und Zawistoski, 2011). Da dieses Molekül wegen seiner Komplexität chemisch präparativ nicht dargestellt werden kann (Eschenmoser, 1994), sind Bakterien die einzigen Produzenten. Daher können durch Synthesechemie auch keine Derivate zur Untersuchung von biochemischen Reaktionen und für Untersuchungen zur Interaktion der Corrinoidkofaktoren mit Proteinen oder anderen Corrinoid-Rezeptoren hergestellt werden. Der jährliche Bedarf an Vitamin B_{12} beträgt weltweit circa 20 Tonnen (Martens u. a., 2002).

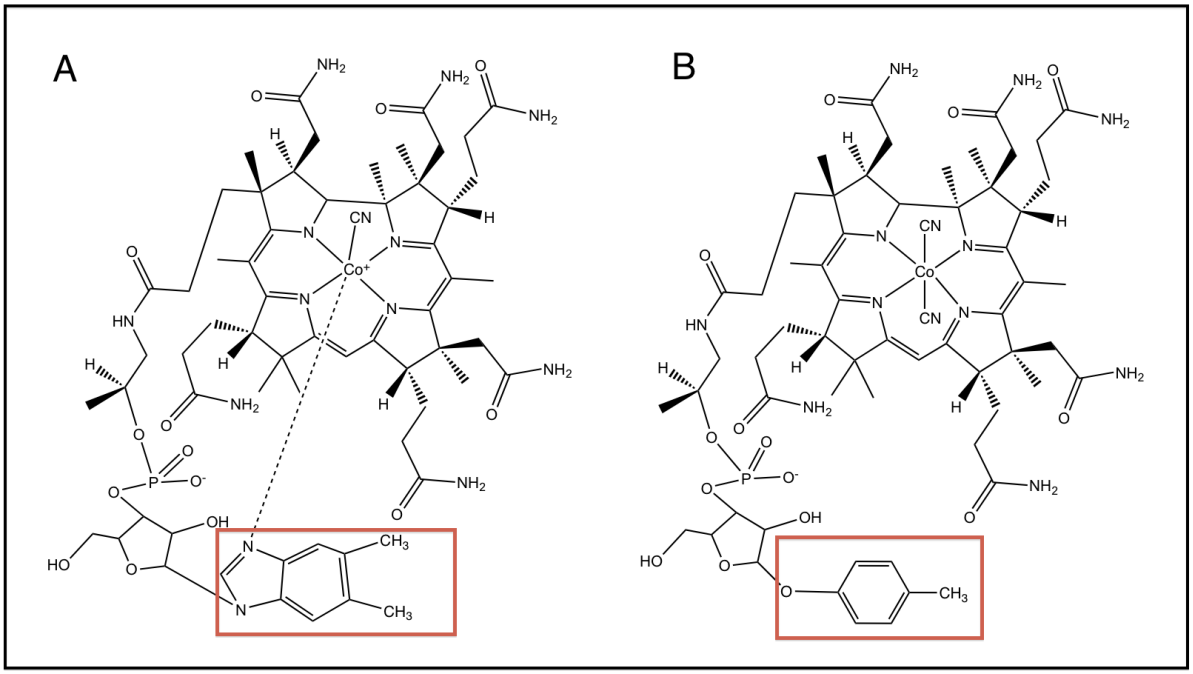


Abbildung 2.1: Chemische Struktur von Vitamin B_{12} (A) und *p*-Kresolylcobamid (B), einem ungewöhnlichen B_{12}-Derivat mit interessanten biochemischen Eigenschaften.

Menschen, Tiere und Bakterien haben ein spezifisches Erkennungs- und Aufnahmesystem für dieses lebenswichtige Molekül, das in sehr geringen Konzentrationen in ihrer Nahrung vorkommt. Daher wird Vitamin B_{12} über diese hoch effizienten Systeme erkannt und aufgenommen. An diesen Prozessen sind bei Menschen und Säugern die Proteine Intrinsic Faktor (Aufnahme), Transcobalamin (Transport) und Haptocorrin (Speicher) beteiligt. Es wird beobachtet, dass mit fortschreitendem Alter die Effizienz dieses B_{12}-Aufnahmesystems beim Menschen abnimmt (Carmel, 1997), was

bei der zu erwartenden Altersstruktur unserer Gesellschaft an steigender Bedeutung gewinnen wird (Gochard u. a., 2009). Auch hier wird vermutet, dass diese verringerte Vitamin B_{12}-Aufnahme in Verbindung mit Krankheiten wie Alzheimer stehen könnte (Cole und Prchal, 1984). Bisher ist die Entstehung dieser Krankheitsbilder nur unzulänglich experimentell untersucht worden. Unter dem Aspekt der „Überalterung“ der Gesellschaft erscheint es jedoch wichtig, die Aufnahme, den Transport und die Speicherung von Vitamin B_{12} in eukaryotischen Systemen zu erforschen. Eine Möglichkeit wäre die Erzeugung eines künstlichen Vitamin B_{12}-Mangels im Tierexperiment. Dazu sind jedoch Vitamin B_{12}-Derivate notwendig, die das Intrinsic Faktor-System blockieren. Corrinoide mit dieser Eigenschaft sind bisher nicht bekannt. Da Vitamin B_{12}-Derivate durch chemische Synthesen nicht effizient herstellbar sind, bleibt hier nur der Weg über die enzymatische Herstellung solcher Corrinoide. Die Identifizierung von Enzymen aus alternativen Corrinoid-Biosynthesewegen zur bekannten Vitamin B_{12}-Biosynthese stellt deshalb einen zukunftsweisenden Ansatz dar. Ebenso ermöglichen Untersuchungen zur Bindung von Corrinoiden an Corrinoid-abhängige Proteine sowie die Anreicherung und Aufreinigung von Vitamin B_{12} auch mit bakteriellen Transportproteinen einen Fortschritt im Verständnis von Corrinoid-Protein-Wechselwirkungen.

Bei einem Screening auf Vitamin B_{12}-Derivate in züchtbaren Bakterien wurde mit *p*-Kresolylcobamid ein Derivat gefunden (siehe Abbildung 2.1, B), das einen wesentlichen Fortschritt in der Vitamin B_{12}-Biochemie gebracht hat (Stupperich u. a., 1988). Biochemische Untersuchungen zum *p*-Kresolylcobamid in *Sporomusa ovata* H1 ergaben folgende Ergebnisse:

1. Die Vitamin B_{12}-aufnehmenden Proteine des Menschen („intrinsic Factor“) erkennen dieses Corrinoid-Derivat nicht (Stupperich und Nexø, 1991).
2. Die Bindung des *p*-Kresolylcobamidkofaktors an Proteine findet über die Aminosäure Histidin statt (Stupperich u. a., 1990).
3. Die Biosynthese des *p*-Kresolylcobamids verläuft über mindestens zwei völlig ungewöhnliche Reaktionen. Dabei wird freies Phenol und Kresol durch radikalische Spaltungen der Aminosäure Tyrosin gebildet (Feustel, 2000). Das Phenol und das Kresol werden in einer ungewöhnlichen α-O-glykosidischen Reaktion an Ribose gebunden. Alle bekannten Glykoside der Natur sind jedoch Verbindungen von Hexosen mit einem solchen Aglykon. Diese Reaktion der *p*-Kresolylcobamid-Biosynthese kann jedoch neben solchen O-Glykosiden auch N-Glykoside herstellen, wie sie bei der Biosynthese des Vitamin B_{12} gebildet

werden (Ibrahim, 1998).

4. Das Bakterium *Sporomusa ovata* H1 kann also auch Vitamin B_{12} herstellen. Völlig überraschend hemmt aber dieses sonst in der Natur weit verbreitete Vitamin das Wachstum des Bakteriums (Ibrahim, 1998). Dies ist bisher das einzige bekannte Beispiel, bei dem Vitamin B_{12} nicht als essentielle Stoffwechselkomponente sondern als Hemmstoff auftritt. Der Hemm-Mechanismus war noch ungeklärt.
5. Die Corrinoidbiosynthese ist in Bakterien, auch in *Sporomusa*, sehr gut reguliert. Es wird kein freies Corrinoid in größeren Mengen in den Organismen gefunden. Allerdings ist die ungewöhnlich lange Biosynthese, es sind mehr als 30 Gene daran beteiligt, in mindestens zwei Gen-Clustern organisiert. Ein Cluster enthält die Gene zur Biosynthese des Corrinrings, der andere Cluster die Gene für den unteren Coα-Nukleotidliganden. Es wurde gefunden, dass solche Gencluster durch Vitamin B_{12}-Riboschalter kontrolliert und reguliert werden (Rodionov u. a., 2003). Erste Hinweise zeigten, dass im Genom von *Sporomusa ovata* H1 auch solche Corrinoid-Riboschalter genutzt werden. Eine Abschätzung deutet auf 9-10 solcher genregulatorischen Nukleotidsequenzen hin (Hiergeist, 2006).

Die molekularbiologische Aufklärung dieser Reaktionen war bisher erschwert, weil keine genomischen Nukleotidsequenzen aus diesem Bakterium vorlagen. Daher kann auch nicht durch Homologievergleiche auf die kodierenden Gene der Corrinoidbiosynthese oder weiterer Corrinoid-abhängiger Enzyme geschlossen werden. Außerdem ist ein molekularbiologischer Zugang mit Vektoren zu *Sporomusa ovata* H1 erschwert. Im Bakterium wurden keine Plasmide gefunden und es kann bisher nicht durch verschiedenste Plasmide oder „broad host range“ Shuttle-Vektoren transformiert werden.

Ziel meiner Arbeit war es, die Gene und Genprodukte für zwei außergewöhnliche biochemische Reaktionen im strikt anaeroben, essigsäurebildenden Bakterium *Sporomusa ovata* H1 zu identifizieren. So sollte eine postulierte Nikotinatmononukleotid:*p*-Kresolyl Phosphoribosyltransferase (Homologie zu EC 2.4.2.21), sowie die Enzyme des Tyrosin-Abbaus in *Sporomusa ovata* H1 nachgewiesen werden. Zur Identifizierung sollten die hoch konservierten Nukleotidsequenzen von bekannten B_{12}-Riboschaltern genutzt werden. Dabei wird von der Hypothese ausgegangen, dass so-

wohl die Corrinoid-Biosynthese als auch möglicherweise der Abbau von L-Tyrosin zu *p*-Kresol und damit die Synthese der aromatischen Vorstufe des *p*-Kresolylcobamids durch B_{12}-Riboschalter reguliert sein könnte. Dieses CobT aus *Sporomusa ovata* H1 sollte in der Lage sein, O- und N-Glykoside herzustellen. Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war die Untersuchungen zur Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12}. Dabei sollte die Wachstumshemmung des Bakteriums beim Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob die Hemmung durch Vitamin B_{12} auf Proteinebene oder auf genregulatorischer Ebene durch Fehlschaltung von B_{12}-Riboschaltern stattfindet. Der molekularbiologische Nachweis Corrinoid-abhängiger Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 war bisher erschwert. Die molekularbiologische Identifizierung und der Nachweis Corrinoid-abhängiger Enzyme in diesem Bakterium stellte somit ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar.

Der Corrinoid-Stoffwechsel in Bakterien wird häufig durch B_{12}-Riboschalter geregelt. Bioinformatorische Analysen vollständig sequenzierter Genome (Rodionov u. a., 2003) und Metagenomen (Kazanov u. a., 2007) zeigten, dass (I.) die Biosynthese des Corrinrings und (II.) die Biosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden. Zusätzlich kontrollieren diese B_{12}-Riboschalter die Expression Vitamin B_{12}-unabhängiger Enzyme (III.), wenn sowohl ein Vitamin B_{12}-abhängiges und B_{12}-unabhängiges Isoenzym in den Zellen vorhanden ist. Solche Isoenzyme kommen vor allem in fakultativ anaeroben Bakterien vor. Hier ist häufig die B_{12}-unabhängige Methionin Synthase (EC 2.1.1.14) und die B_{12}-unabhängige Ribonukleotid Reduktase (EC 1.17.4.1) reguliert. Ebenfalls sind häufig (IV.) die Gene des Vitamin B_{12}- und (V.) Kobalt-Transports durch B_{12}-Riboschalter kontrolliert. Abbildung 2.2 fasst dieses Modell der B_{12}-Riboschalter-Regulation zusammen, das prinzipiell den Corrinoid-Gehalt im freien Corrinoid-Pool der Bakterienzelle reguliert.

Die Regulation der Genexpression über die B_{12}-Riboschalter findet auf der mRNA-Ebene statt. Durch direkte Bindung des Metaboliten an einen Bereich der 5'-untranslatierten Region (Aptamer), geht die mRNA eine Sekundärstrukturänderung ein. Diese Strukturänderung führt zur Ausbildung einer Terminatorstruktur, die zur Transkriptionstermination führt. Dieser Mechanismus entspricht der transkriptionellen Regulation der Genexpression. Betrifft die Metaboliten-induzierte Sekundärstrukturänderung die Ribosomenbindestelle, werden Ribosomen an der mRNA-Bindung gehindert. Da die Translation damit unterbunden wird, spricht man von einer translationalen Regu-

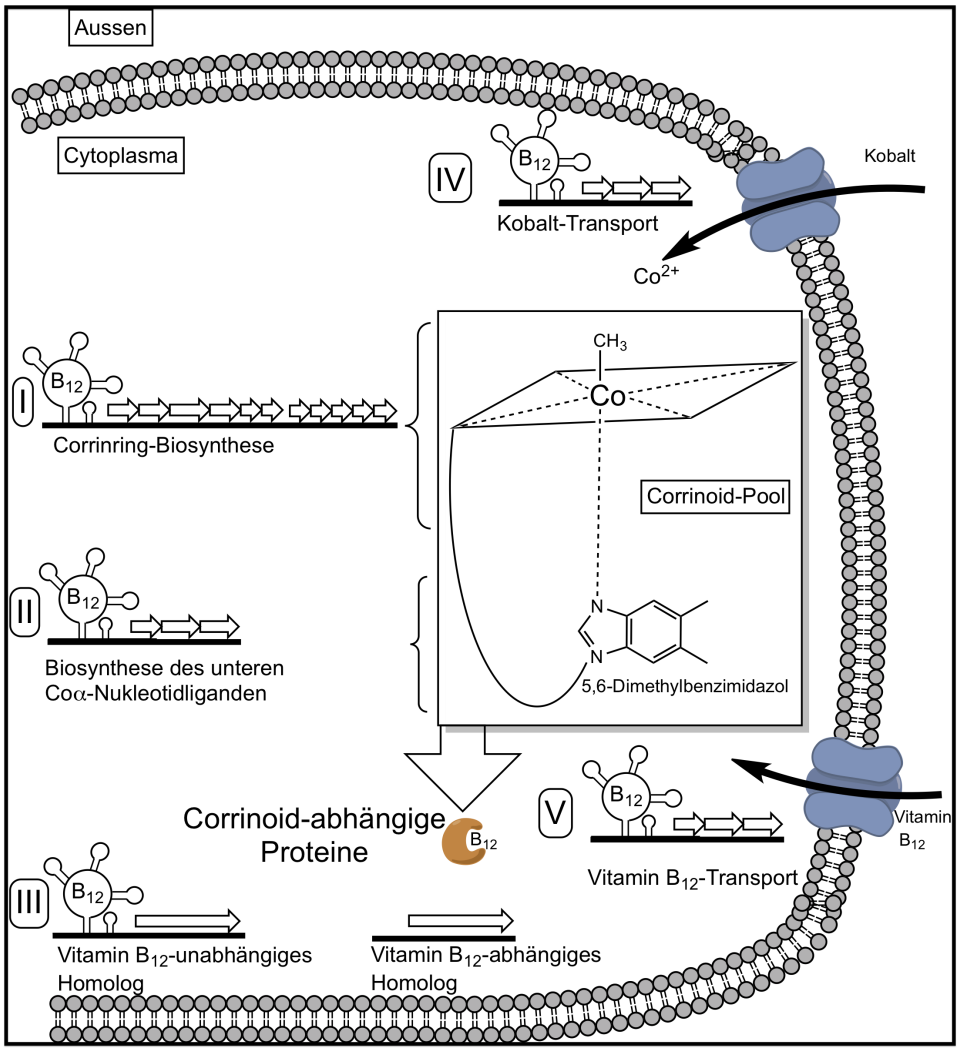


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zum Modell der B_{12}-Riboschalter-Regulation in Bakterien

lation der Genexpression. Zur Erkennung der Metaboliten ist eine strukturelle Interaktion der mRNA mit dem Metabolit notwendig. Die sensorische Sekundärstruktur wird von hoch konservierten Basen gebildet. Diese konservierten Nukleotidsequenzbereiche ermöglichen eine bioinformatorische und molekularbiologische Identifizierung. Die Funktionsweise eines Riboschalters am Beispiel des B_{12}-Riboschalters ist in Abbildung 2.3 zusammengefasst.

An der Vitamin B_{12}-Biosynthese in Bakterien sind etwa 30 Gene beteiligt. Die Biosynthese des Corrinrings und die Biosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden sind dabei häufig in zwei separaten Operons organisiert. Ein molekularbiologisch und

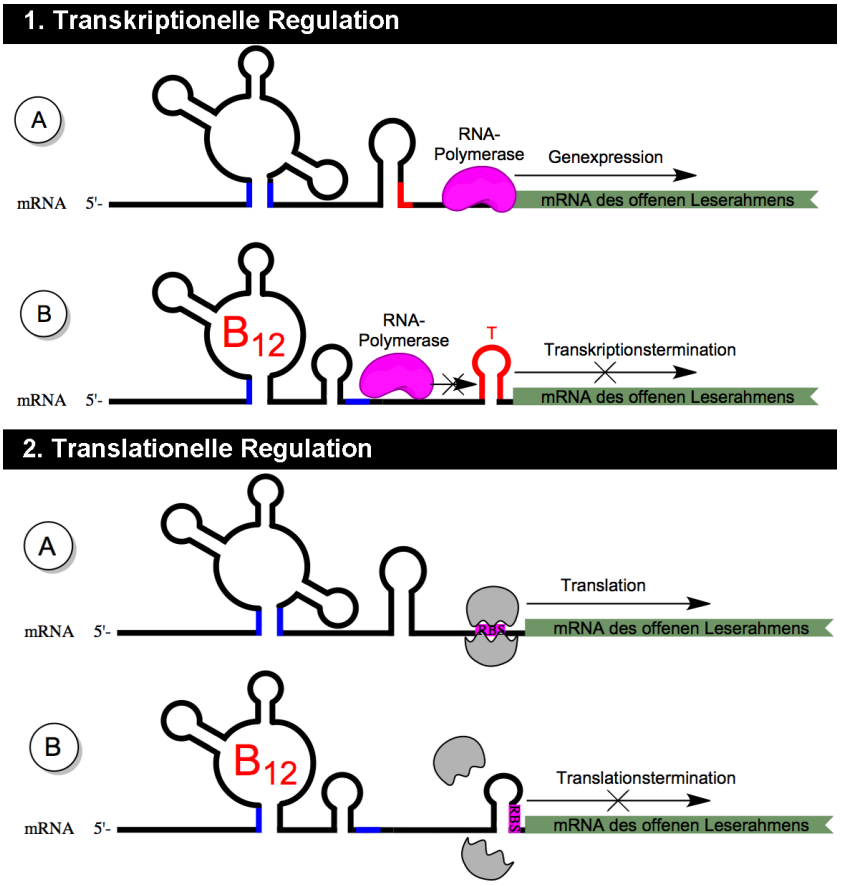


Abbildung 2.3: Transkriptionelle und translationelle Regulationsmodi der B_{12}-Riboschalter. Abkürzungen: Ribosomenbindestelle (RBS), Terminator (T), Genexpression (A), unterbrochene Genexpression (B)

biochemisch sehr gut charakterisiertes System ist *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Typhimurium LT2. Die Biosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden in *Salmonella* verläuft über eine Nikotinat-Mononukleotid-5,6-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (CobT, EC 2.4.2.21). Bei einer *in vitro*-Analyse der Substratspezifität dieser CobT-Reaktion (siehe Abbildung 2.4), war das Enzym aus *Salmonella* nur in der Lage, N-Glykoside herzustellen, wie sie in Vitamin B_{12} vorkommt. Es ist jedoch nicht möglich, eine O-glykosidische Verknüpfung der Aromaten *p*-Kresol oder Phenol (Cheong u. a., 2001) zu katalysieren, wie sie in den *Sporomusa*-Corrinoiden vorkommt. Eine unspezifische Phosphoribosyltransferase bietet jedoch ein wertvolles Instrument für die Herstellung unterschiedlicher, auch unphysiologischer Corrinoidderivate.

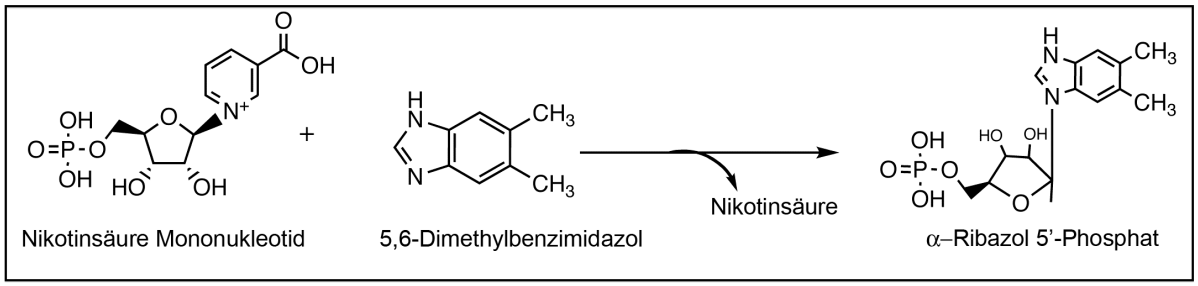


Abbildung 2.4: Reaktionsgleichung der durch CobT (Nikotinat-Mononukleotid-5,6-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase, EC 2.4.2.21) katalysierten, biochemischen Reaktion.

Sporomusa ovata H1 ist ein homoacetogenes, strikt anaerobes Bakterium aus dem Phylum der Firmicutes. Aufgrund des Stoffwechsels sind verschiedene Corrinoid-abhängige Reaktionen zu erwarten. Das zentrale Enzym des Energiestoffwechsels (siehe Abbildung 2.5) homoacetogener Bakterien ist die Acetyl-CoA Synthase (EC 2.3.1.169). *Sporomusa ovata* H1 kann homofermentativ aus reduziertem CO_2 und den Methyldonatoren Methanol, Betain (Möller u. a., 1985) oder verschiedenen aromatischen O-Methylarylethern (Stupperich u. a., 1996) Essigsäure bilden. Bei der Übertragung der Methylgruppe auf den Kofaktor Tetrahydrofolat (THF) sind Corrinoid-abhängige Methyltransferasen beteiligt (Stupperich und Konle, 1993). So ist aus physiologischen Experimenten bekannt, dass ein monomeres, Corrinoid-haltiges Protein beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 auf Methanol-haltigem Medium in den Zellen verstärkt gebildet wird (Stupperich u. a., 1992). Diese Untersuchungen zeigten auch, dass mehr als 90 % des Gesamtcorrinoids einer Zelle an diesem Protein mit einer molekularen Masse von etwa 40 kDa, gebunden waren. Die Tetrahydrofolat-gebundene Methylgruppe wird durch eine Methyl-Tetrahydrofolat:Corrinoid-Fe/S-Protein Methyltransferase (MeTr, EC 2.1.1.-) anschließend weiter auf das Corrinoid-Eisen/Schwefel Protein (CoFeSP), die Corrinoid-haltige Komponente der Acetyl-CoA-Synthase, übertragen (Ragsdale, 2007). Durch die Acetyl-CoA Synthase-Aktivität wird Acetyl-CoA aus diesen Methylgruppen, reduziertem CO_2 und Coenzym A gebildet. Bei der Umwandlung von Acetyl-CoA zu Essigsäure wird Energie für den Baustoffwechsel gewonnen. Beim Wachstum mit den Substraten Fruktose und Pyruvat (Möller u. a., 1985) wird ebenfalls Acetyl-CoA gebildet, welches unter Energiekonservierung zu Essigsäure umgesetzt wird. Die Acetyl-CoA Synthase ist jedoch an diesen enzymatischen Reaktionen nicht beteiligt.

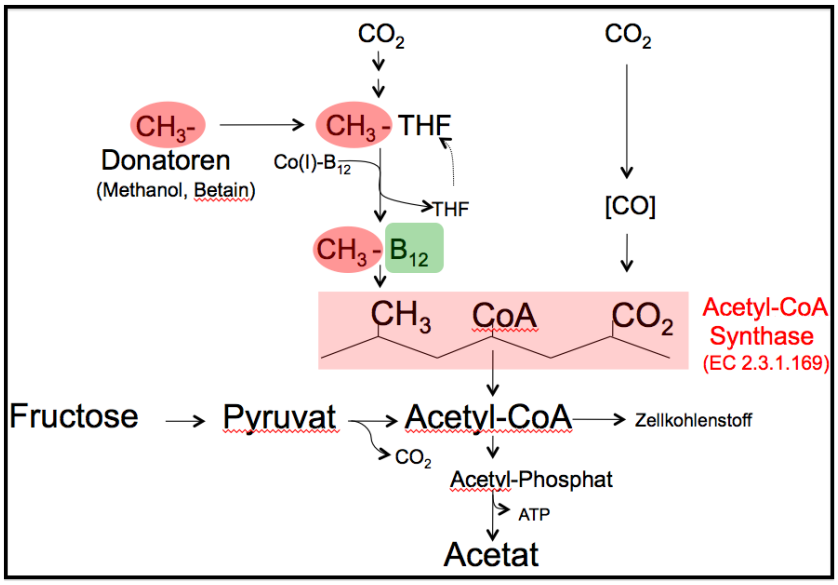


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des zentralen Energiestoffwechsels aus *Sporomusa ovata* H1. THF = Tetrahydrofolat, CoA = Koenzym A

Da freies, nicht Protein-gebundenes Vitamin B_{12} in der Natur nur in sehr geringen Konzentrationen und häufig in komplexen Matrices vorkommt, benötigen auch Bakterien ein spezifisches, effizientes Corrinoid-Aufnahmesystem. Die spezifischen Vitamin B_{12}-Transporter in Bakterien müssen, analog zum Intrinsic-Faktor der Säuger, Corrinoidstrukturen erkennen können. *Sporomusa ovata* H1 ist ein Gram-negatives Bakterium. Sein Corrinoid-Transport muss also über die äussere Membran, den periplasmatischen Raum und die Cytoplasmamembran in die Zelle stattfinden. Die Struktur der Transporter besteht somit aus mehreren Proteinkomponenten, die in verschiedenen Genen kodiert sind. Häufig sind diese Gene in einem Operon zusammengefasst (Vitreschak u. a., 2003), deren Expression in vielen Fällen durch einen B_{12}-Riboschalter kontrolliert wird. In Abbildung 2.6 ist der schematische Aufbau eines „Gram-negativen“ Vitamin B_{12}-Aufnahmesystems zu sehen. Dieses Vitamin B_{12}-Transportsystem wird zur Familie der TonB-abhängigen Transporter gezählt. In der äußeren Membran wird Vitamin B_{12} aus dem umgebenden Medium durch das Membranprotein BtuB gebunden. Die Bindung des Proteins TonB an BtuB führt zum Transport des Corrinoids ins Periplasma. Dort wird es von der periplasmatischen Komponente BtuF aufgenommen. Das B_{12}-haltige BtuF geht mit dem ABC-Transportersystem BtuCD einen Komplex ein, der in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Unter ATP-Verbrauch wird dann das Corrinoid über die Cytoplasmamembran ins Zellinnere ein-

geschleust (Cadieux u. a., 2007). Auf Grund ihrer unterschiedlichen Zellwände sind die Vitamin B_{12}-Transportersysteme in Gram-positiven vom hier beschriebenen Gram-negativen Modell verschieden.

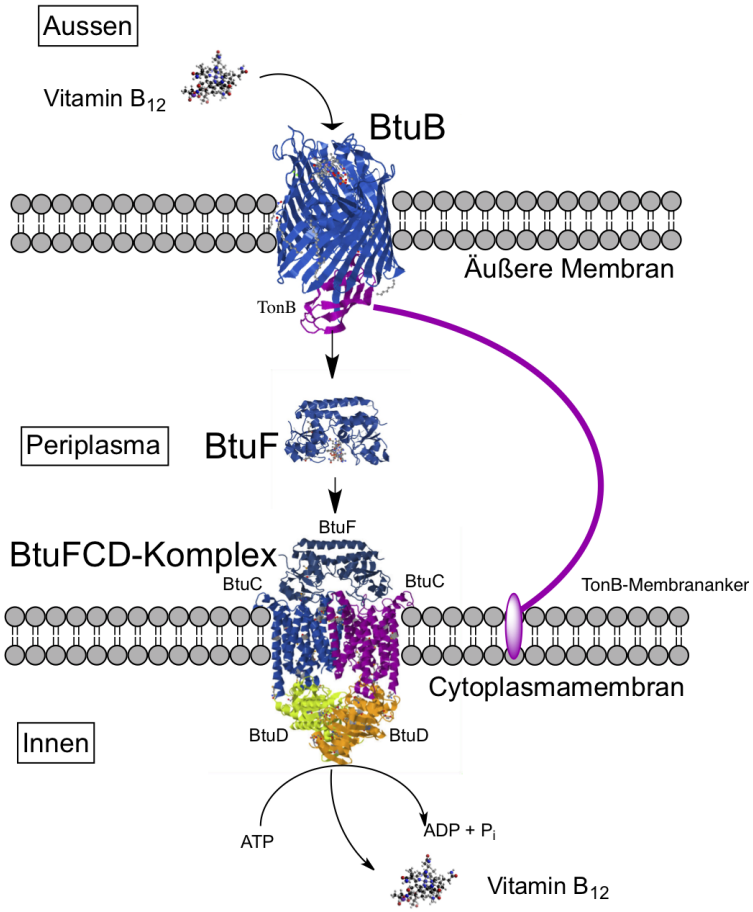


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Vitamin B_{12}-Transportsystems in Gram-negativen Bakterien.

Die Gewinnung von Vitamin B_{12} aus Lösungen ist bis heute aufwändig. Im Labormaßstab werden Corrinoide über eine Extraktion mit Kaliumcyanid in essigsaurer Lösung erhalten. Anschließend werden die Corrinoide über mehrere säulenchromatographische Schritte unter Verlusten angereichert und schließlich über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatografie aufgereinigt (Stupperich u. a., 1986). Die industrielle Vitamin B_{12}-Extraktion ist bis heute ebenfalls relativ aufwendig und mit mehreren Zwischenschritten verbunden (Kinoshita u. a., 1983).

Es gelang mir, zwölf B_{12}-Riboschalter und die dadurch regulierten Gene bzw. Operons nachzuweisen, die für die besondere Corrinoid-Biosynthese und den Corrinoidtransport in *Sporomusa ovata* H1 kodieren. Eines dieser Riboschalter-regulierten Operons kodiert für die hochinteressante Biosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden der *Sporomusa*-Corrinoide.

Außerdem ergaben meine Untersuchungen völlig unerwartete Befunde, die vom bisherigen Modell der Regulation durch B_{12}-Riboschalter abweichen. Einige der B_{12}-Riboschalter kontrollierten Gene zeigen keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Nukleotid- bzw. Proteinsequenzen. Ein weiteres B_{12}-Riboschalter-reguliertes Gen kodiert für ein Regulatorprotein. Meine Analysen zeigen, dass dieses Regulatorprotein vom Typ LuxR an der Regulation der Corrinoid-Biosynthese beteiligt ist. Zur Expressionsanalyse dieser B_{12}-Riboschalter-regulierten Gene habe ich die Methode der qRT-PCR in *Sporomusa ovata* H1 etabliert.

Die experimentelle Untersuchung der Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12} zeigte, dass die Hemmung in der hochmolekularen (größer 100 kDa) Proteinfraktion stattfindet. Eine Hemmung der Acetyl-CoA-Synthase, dem zentralen Enzymkomplex des Energiestoffwechsels in *Sporomusa ovata* H1, ist sehr wahrscheinlich. Deshalb habe ich die Gene des Acetyl-CoA-Synthase-Operons im essigsäurebildenden Bakterium identifiziert.

Ausserdem habe ich die Nukleotidsequenzen mehrerer Gene identifiziert, die für Corrinoid-abhängige Methyltransferasen kodieren. Eine dieser Gensequenzen, die für ein Methanol-induziertes Corrinoid-Protein (Stupperich u. a., 1992) kodiert, konnte ich ebenfalls molekularbiologisch nachweisen. Als weitere Corrinoid-bindende Proteine habe ich mehrere potentielle Vitamin B_{12}-Transporter im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifiziert. Die Vitamin B_{12}-Bindefähigkeit der postulierten Transporter konnte ich mit rekombinantem Protein biochemisch bestätigen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenziensätze

3.1.1 Chemikalien

Die wichtigsten Chemikalien, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien, ihre CAS-Nummern und die Lieferfirma

Substanz	**Lieferfirma**[1)]	**CAS-Nummer**
6-Aminocapronsäure	SV	60-32-2
Ampicillin	RO	69-53-4
Agar	FL	9002-18-0
Agarose	GE	9012-36-6
Benzimidazol	FL	51-17-2
Betainhydrochlorid	ME	590-46-5
Chloramphenicol	ME	56-75-7
Coomassie Brilliant Blue G-250	FL	6104-58-1
Cyanocobalamin (Vitamin B_{12})	FL	68-19-9
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	SI	1609-47-8
3,3'-Diaminobenzidin	CR	7411-49-6
5,6-Dimethylbenzimidazol	FL	582-60-5
Dithiothreitol (DTT)	FL	3483-12-3
Ethanol	RH	64-17-5
Ethidiumbromid	CR	1239-45-8
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	CR	60-00-4
Fructose	SI	57-48-7
Imidazol	FL	288-32-4
IPTG	FL	367-93-1
Isopropanol	FL	67-63-0
Kanamycin	ME	8063-07-8
^{57}Kobaltchlorid	CA	16413-89-1
Methanol	FL	67-56-1
Nikotinsäure Mononukleotid	SI	321-02-8
Pyruvat	FL	113-24-6
Resazurin (Natriumsalz)	ME	62758-13-8
Roti®-Phenol	CR	108-95-2

[1)] Lieferfirmen der Chemikalien und Enzyme:
CR = Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe; CA = Campro Scientific GmbH, Berlin; FL = Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz; GE = Genaxis Products/Inno-Train Diagnostik GmbH, Spechbach; ME = Merck KGaA, Darmstadt; RH = Riedel-de Haen GmbH, Seelze; RO = Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; SI = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; SV = Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden mindestens in p.a.-Qualität von folgen-

den Firmen bezogen:

- AppliChem GmbH & Co. KG; Darmstadt
- Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
- Fluka Chemie AG; Buchs, Schweiz
- Merck KGaA; Darmstadt
- Riedel-de Haen AG; Seelze
- Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

3.1.2 Enzyme

Alle Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Verwendete Enzyme, ihre EC-Nummern und die Lieferfirma

Substanz	**Lieferfirma**[1)]	**EC-Nummer**
CIAP -Alkalische Phosphatase	FE	3.1.3.1
Desoxyribonuklease I (DNase Baseline Zero)	EP	3.1.21.1
DreamTaq® DNA-Polymerase	FE	2.7.7.7
Lysozym	RO	3.2.1.17
Phusion™ DNA Polymerase	FY	2.7.7.7
Restriktionsendonukleasen Typ II:		3.1.21.4
*Bgl*II	FE	
*Bam*HI	FE	
*Dra*I	HY	
*Eco*47III	HY	
*Eco*RV	HY	
*Ehe*I	HY	
*Hind*III	FE	
*Hae*III	FE	
*Kpn*I	FE	
*Pst*I	FE	
*Pvu*II	HY	
*Sma*I	HY	
Reverse Transkriptase (RevertAid Premium Reverse Transkriptase)	FE	2.7.7.49
T4 DNA-Ligase	FE	6.5.1.1
Terminale Deoxyribonukleotidyl Transferase	RO	2.7.7.31

[1)] Lieferfirmen der Chemikalien und Enzyme:
EP: EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, U.S.A.; FE: Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; FY = Finnzymes Oy, Espoo, Finnland; HY: Hybaid Limited, Ashford, UK; NEB: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main; RO = Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.1.3 Gase

Von der MTI IndustrieGase AG (Elchingen) wurden Formiergas (N_2/H_2; 95:5; v/v) und Stickstoff/CO_2 (80:20; v/v) für die Begasung der Kulturmedien bezogen.

3.1.4 Molekularbiologische und biochemische Hilfsmittel und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen und biochemischen Hilfsmittel und Reagenziensätze sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Verwendete molekularbiologische und biochemische Reagenzien

Verwendung	Reagenziensatz	Hersteller
5'-RACE PCR	5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Antikörper	Anti-His Antibody	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
	S-Protein HRP-Konjugat	Merck KGaA, Darmstadt
	Goat Anti-Mouse Total Ig Peroxidase Conjugate	Merck KGaA, Darmstadt
Blockierungsreagenz	Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Blue Native Gelelektrophorese	SERVAGel™ N Native Gel Starter Kit	Serva Electrophoresis GmhB, Heidelberg
cDNA-Synthese	RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
DNA-Isolierung	AquaGenomic™ Solution	MOBITec, Göttingen
DNA-Aufreinigung	Zymoclean™ DNA Gel Recovery Kit	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
DNA-Größenstandards	Gene Ruler™ 1 kb Ladder	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
	Gene Ruler™ 50 bp Ladder	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
DNA-Polymerase	DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x)	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
	Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Mastermix	Finnzymes, Oy Espoo, Finnland
Gel-Ladepuffer für DNA-Proben	6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Gel-Ladepuffer für RNA-Proben	2x RNA Loading Dye	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Klonierung von PCR-Produkten	CloneJET® PCR Cloning Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lightcycler-Analysen (qRT-PCR)	DyNAmo Flash 2x MasterMix	Finnzymes, Oy Espoo, Finnland
Nickel-Affinitätschromatographie	HisTrap HP 1ml Säulen	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
PCR-Produkt Aufreinigung	High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plasmidisolierung	Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
Proteinbestimmung	BCA Protein Assay Reagent Kit	Merck KGaA, Darmstadt
Protein-Massenstandards	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNA-Isolierung	RNeasy® Mini Kit™	Qiagen GmbH, Hilden
RNA-Größenstandards	RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.2 Herstellung von Medien und Kultivierung von Bakterien

3.2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Verwendete Mikroorganismen

Stamm	relevanter Phäno- oder Genotyp[1)] Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
Sporomusa ovata H1 (DSM 2662)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Salmonella enterica Serovar Typhimurium LT2 (DSM 5569)	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
Escherichia coli (BL21 AI)	F$^-$, *ompT*, *gal*, *dcm*, *lon*, *hsdSB*(r_{B^-}, m_{B^-}) *araB*::T7RNAP-*tetA*	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Escherichia coli K12 DH5α (DSM 6897)	*supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, Δ*lacU*169(φ80*lacZ*ΔM15), *gyrA*96, *thi*1, *relA*1	Hanahan, 1983
Escherichia coli K12 M15 [pREP4]	*Nal*^{S} *str*^{S} *rif* ^{S} *thi*$^-$ *lac*$^-$ *ara*$^-$ *gal* $^+$ *mtl*$^-$ F$^-$ *rec*A$^+$ *uvr*$^+$ *lon*$^+$ [pREP4, Kn^R]	Qiagen GmbH, Hilden
Escherichia coli Rosetta2™ (DE3)	F$^-$ *ompT gal dcm hsdSB*(r_{B^-} m_{B^-}) [pRARE, Cm^R]	Merck KGaA, Darmstadt

[1)] Die Bedeutungen für die Abkürzungen der Genotypen sind in der Publikation von Berlyn (1998) ersichtlich.

3.2.2 Herstellen von Lösungen, Nährmedien und Puffern

Alle Medien wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage (Elgastat Maxima, USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach) hergestellt. Für die Herstellung von festen Medien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Anschließend wurden alle Medien bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Feste Medien wurden als Agarplatten gegossen. Dazu wurde das Medium nach dem Autoklavieren auf etwa 45 °C abgekühlt und anschließend in 25 ml Portionen in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem vollständigen Abkühlen der Agarplatten wurden

diese lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.3 Züchtung von *Sporomusa ovata* H1 in Minimalnährmedium

Sporomusa ovata H1 wächst auf verschiedenen Substraten: Kohlendioxid + Wasserstoff, Fructose, Propan-1-ol, Pyruvat, die Methylgruppen-Donatoren Methanol und Betain (Möller u. a., 1985) oder auf verschiedenen O-Methylarylether (Stupperich u. a., 1996). In dieser Arbeit wurde *Sporomusa ovata* H1 auf Fructose, Pyruvat, Methanol, Betain als Substrat kultiviert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 28 °C im Dunkeln. Die Stammkultur wurde alle 7 Tage in Minimalmedium (Tabelle 3.5) steril überimpft.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Minimalnährmediums (1 Liter) für die Kultivierung von *Sporomusa ovata* H1)

Substanz	**Konzentration in der Stammlösung**	**Menge**	**Endkonzentration im Medium**
Basalmedium	siehe Tabelle 3.6	940 ml	siehe Tabelle 3.6
Phosphat-Puffer	siehe Tabelle 3.7	2 ml	siehe Tabelle 3.7
$NaHCO_3$	1 M	50 ml	50 mM
Na_2S x 9 H_2O	25 mM	12 ml	300 µM
HCl	2 M	8 ml	16 mM
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,5 mM	1 ml	0,5 µM
Vitamin-Lösung	siehe Tabelle 3.9	6 ml	siehe Tabelle 3.9
Spurenelemente	siehe Tabelle 3.10	1 ml	siehe Tabelle 3.10
Kohlenstoffquellen[1)]			
Betain	2,5 M	20 ml	50 mM
Methanol	24 M	5 ml	120 mM
Pyruvat	2 M	10 ml	20 mM
Fructose	1 M	20 ml	20 mM
n-Propanol	13,3 M	2,3 ml	30 mM

[1)] Die Kohlenstoffquellen wurden jeweils als alleinige C-und Energiequelle pro Ansatz zugegeben.

Dabei wurden 20 ml einer ausgewachsenen *Sporomusa ovata-Kultur* als Inokulum für eine 250 ml Kultur verwendet. Für die Herstellung des Minimalmediums wurden zunächst 235 ml des Basalmediums in eine 500 ml Müller-Krempel-Flasche gegeben und die Flasche mit einem Naturgummistopfen luftdicht verschlossen. Die Flasche wurde mit einem Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gemisch (N_2/CO_2 80:20; v/v) in 10-minütigen Intervallen ent- und begast. Dieser Vorgang wurde achtmal wiederholt,

um allen Sauerstoff zu entfernen. Beim letzten Begasen wurde die Gasphase mit 1 bar Überdruck aufgepresst und anschließend die Lösung autoklaviert (121 °C, 20 min, 1 bar Wasserdampfdruck). Nach dem Autoklavieren wurden dem Basalmedium die in Tabelle 3.5 aufgeführten Lösungen, die ebenfalls anaerobisiert und sterilisiert wurden, zugegeben. Dazu wurden die Gummistopfen der jeweiligen Flaschen mit Ethanol benetzt und abgeflammt und die entsprechenden Lösungen mit einer sterilen Plastikspritze entnommen und ins Basalmedium gegeben.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Basalmediums

Substanz	**Menge**	**Endkonzentration im Medium**
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,1 g	0,7 mM
KCl	0,3 g	4 mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,5 g	2 mM
NaCl	1 g	17,1 mM
NH_4Cl	0,5	9,3 mM
Resazurin	0,25	0,2 µM
Selenit/Wolfram-Lösung	1 ml	Tabelle 3.8
H_2O	ad 1000 ml	

Die Vitamin-, die Spurenelemente-, die Pyruvat- und die Selenit/Wolfram-Lösung wurden durch Ent- und Begasen anaerobisiert und anschließend durch Nitrozellulosefilter (Porengröße 0,2 µm) in sterile Müller-Krempel-Flaschen sterilfiltriert. Das Natriumhydrogencarbonat und das Natriumsulfid wurden in der Anaerobenkammer unter Formiergasatmosphäre (N_2/H_2 95:5; v/v) in anaerobisiertes, demineralisiertes Wasser gegeben und anschließend autoklaviert (121 °C, 20 min, 1 bar Wasserdampf druck). Kobaltchlorid wurde in 30 mM Salzsäure gelöst. Die Betain-Lösung wurde vor dem Autoklavieren mit 6 M Salzsäure auf pH 7,1 eingestellt. Die Lagerung aller Lösungen erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Im Basalmedium ist Resazurin als Redoxindikator enthalten. Resazurin wird in zwei Stufen reduziert. Die erste Reduktion ist irreversibel. Sie wird durch einen Farbumschlag von blau nach rosa angezeigt. In der zweiten, reversiblen Reduktion wird die Lösung farblos. Das von *Sporomusa ovata* benötigte Redoxpotential liegt unterhalb des zweiten Umschlagpunktes von Resazurin (etwa -30 mV). Daher wurde nach der Zugabe des Reduktionsmittels Natriumsulfid zehn Minuten gewartet und dann direkt in die flüssige Phase des Mediums inokuliert.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Phosphatpuffers, pH 6,2

Substanz	Menge	Endkonzentration im Medium
KH_2PO_4	215 g	3,2 mM
K_2HPO_4	163,7 g	1,9 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der Selenit/Wolfram-Lösung

Substanz	Menge	Endkonzentration im Medium
Na_2SeO_3 x 5 H_2O	0,236 g	1,3 µM
Na_4WO_4 x 2 H_2O	0,329 g	1,0 µM
H_2O	ad 1000 ml	

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Vitaminlösung

Substanz	Menge	Endkonzentration im Medium
Biotin	2 mg	50 nM
Folsäure	5 mg	70 nM
Lipsonsäure	5 mg	150 nM
Nicotinsäureamid	20 mg	1 µM
Panthothensäure	10 mg	280 nM
Pyridoxin	50 mg	1,7 µM
p-Aminobenzoesäure	10 mg	440 nM
Riboflavin	10 mg	160 nM
Thiamin	20 mg	360 nM
H_2O	ad 1000 ml	

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Spurenelementelösung (1000 fach)

Substanz	Menge	Endkonzentration im Medium
Nitrilotriessigsäure-Natrium-Salz [1)]	12,8 g	67 µM
$CuCl_2$	2 mg	15 nM
$FeCl_2$ x 4 H_2O	2 g	15 µM
H_3BO_3	6 mg	100 nM
Mn_2Cl_2 x 4 H_2O	100 mg	51 nM
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	36 mg	1,5 µM
NiCl x 6 H_2O	24 mg	190 nM
$ZnCl_2$	70 mg	515 nM
H_2O	ad 1000 ml	

[1)] Die Substanz wurde in 500 ml Wasser aufgenommen und mit 10 M NaOH auf pH 6 eingestellt, bevor die weiteren Komponenten der Lösung hinzugegeben wurden.

Kultivierung von *Sporomusa ovata* H1 in Gegenwart von 5,6-Dimethylbenzimidazol
Zur Untersuchung der Wachstumshemmung durch eine Vorstufe der Vitamin B_{12}-Biosynthese wurde *Sporomusa ovata* H1 mit 5,6-Dimethylbenzimidazol gezüchtet. Dazu wurde zu 250 ml Minimalnährmedium (Tabelle 3.5) 5,6-Dimethylbenzimidazol in Endkonzentrationen von 10, 50, 100, 500 und 1000 µM zugegeben. Die Stammlösung wurde zuvor durch Ent- und Begasen (N_2/CO_2 80:20; v/v) anaerobisiert und anschließend autoklaviert (121 °C, 20 min). Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente Methanol/CO_2 oder Pyruvat/CO_2 (Tabelle 3.5). Die sterilen Medien wurden mit 5 % Inokulum einer logarithmisch wachsenden Methanol-Kultur von *Sporomusa ovata* H1 angeimpft. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Als Kontrolle der Wachstumshemmung diente eine *Sporomusa ovata*-Kultur, der kein 5,6-Dimethylbenzimidazol zugegeben wurde.

Kultivierung von *Sporomusa ovata* H1 in Gegenwart von $^{57}CoCl_2$
Zur Herstellung von radioaktiv markiertem [^{57}Co]-Vitamin B_{12} und [^{57}Co]-*p*-Kresolylcobamid wurde *Sporomusa ovata* H1 mit Methanol/CO_2 als Kohlenstoffquelle gezüchtet. Dazu wurde eine Vorkultur mit reduzierter $CoCl_2$-Konzentration (0,1 µM) angeimpft. Diese wurde bei einer OD_{600} von 1,0 in frisches Minimalnährmedium überimpft, welchem 3,67 x 10^5 Bq $^{57}CoCl_2$ (spezifische Radioaktivität: 4,6 pmol/Bq) als einzige Kobaltquelle zugesetzt worden war. Zur Herstellung von [^{57}Co]-Vitamin B_{12} wurde diesem Medium zusätzlich 100 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol zugegeben. Nach 5 Tagen erfolgte die Ernte der gewachsene Bakterienkulturen (Zentrifugation mit 7000 g, 10 Minuten). Aus dem Zellniederschlag wurden anschließend die Corrinoide extrahiert (siehe Kapitel 3.3).

3.2.4 Kultivierung von Bakterien

Das Wachstum von Bakterienkulturen in Flüssigmedium wurde durch Streulichtmessung bei 600 nm gemessen. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde 1 ml der Bakterienkultur abgenommen und abzentrifugiert (2 min, 13000 g). Bei gemessenen Werten von über OD_{600} 0,5 wurden sowohl die Zellsuspension mit dem bei der Kultivierung verwendeten Medium, als auch die Leerwert-Probe gleichermaßen verdünnt. Für das Wachstum von Bakterien auf festem Medium wurden Agarplatten verwendet. Hierfür wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben und dieses anschließend für 20 min

bei 121 °C und 1 bar Wasserdampfüberdruck autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50 °C wurde dem Medium bei Bedarf Antibiotika zugesetzt und dann zu Aliquots von etwa 20 ml in Petrischalen gegossen. Nach Erstarren und Trocknen dieser Agarplatten bei Raumtemperatur wurden sie lichtgeschützt in Plastiktüten bei 6 °C gelagert.

Kultivierung des Bakteriums *Escherichia coli*

Flüssige *Escherichia coli*-Kulturen wurden in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium (Tabelle 3.11) bei 37 °C auf einem Rundschüttler (250 Upm) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte aerob, die Reagenzgläser wurden mit Alukappen geschlossen. Für die Kultivierung von *Escherichia coli*-Kulturen auf festen Medien wurden 100 µl Bakterienkultur mit dem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert und die Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 3.11: LB-Medium

Substanz	Menge[g]	Endkonzentration im Medium
Pepton	15,0	1,5 % (w/v)
Hefeextrakt	3,0	0,3 % (w/v)
Natriumchlorid	6,0	100 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Zur Herstellung der Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar (w/v) zugegeben und nach dem Abkühlen auf 50 °C gegebenenfalls 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol oder 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt und dann zu Agarplatten zu je 25 ml Medium gegossen.

3.3 Extraktion und Quantifizierung von Corrinoiden aus *Sporomusa ovata* H1

Extraktion von Corrinoiden aus *Sporomusa ovata* H1

Die Extraktion von Corrinoiden erfolgte durch saure Cyanid-Extraktion (Stupperich u. a., 1986) aus Zellen von *Sporomusa ovata* H1. Pro Gramm Feuchtzellen wurde den Zellen 5 ml Essigsäurepuffer (100 mM, pH 5,5) zugegeben und erneut abzen-

trifugiert, um die Medienbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Extraktionspuffer (1 ml Essigsäurepuffer pro Gramm Feuchtzellen), bestehend aus Essigsäure (100 mM, pH 5,5) und KCN (100 mM), aufgenommen und in einer mit Butylgummistopfen verschlossenen Glasflasche für 15 Minuten im Wasserbad bei 100 °C inkubiert. Nach dem Aufkochen wurde das Gefäß auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierauf schloss sich eine Zentrifugation (10000 g, 10 min, Raumtemperatur) an. Der rotgefärbte Überstand enthielt die Corrinoide, während die denaturierten Zellen sedimentierten. Das Sediment wurde insgesamt dreimal mit dem Extraktionspuffer aufgekocht, um die Corrinoide vollständig aus den Zellen herauszulösen. Die zusammengeführten Überstände der Extraktionen wurden anschließend direkt zur Isolierung der Corrinoide durch Umkehrphasen-HPLC (Kapitel 3.3.1) verwendet.

Konzentrationsbestimmung von Corrinoiden in Corrinoid-haltigen Lösungen
Zur Quantifizierung des Corrinoidgehalts wurden Proben mit gasförmiger HCN nachbehandelt. Dazu wurde die Gasphase über einer 1 M KCN-Lösung, die mit 2 ml 1M H_2SO_4 angesäuert worden war, mit einer Kanüle abgezogen und in eine mit einem Gummistopfen verschlossene Quarzglasküvette (Schichtdicke d = 1 cm) injiziert. Durch mehrmaliges Schütteln wandelte sich die Monocyano-Form des *p*-Kresolylcobamids in die Dicyano-Form um, deren Extinktion bei 540 nm gemessen wurde.
Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz

$$E_{540\text{ nm}} = \varepsilon \cdot c \cdot d \tag{3.1}$$

kann nach der Konzentration c aufgelöst werden:

$$c = \frac{E_{540\text{ nm}}}{\varepsilon \cdot d} \tag{3.2}$$

ε beträgt für *p*-Kresolylcobamid 10.100 $\frac{1}{mol \cdot cm}$.

Radioaktivitätsmessung [^{57}Co]-markierter Corrinoide im Gamma-Zähler
Das Isotop ^{57}Co zerfällt durch Elektroneneinfang zum stabilen Isotop ^{57}Fe und setzt dabei Gammastrahlung der Energie 122,06 keV (85,6%) und 14,4 keV (9,16%) frei.

Die Halbwertszeit des Nuklids liegt bei 271,8 Tagen. Der Nachweis der Gammastrahlung erfolgt durch einen Szintillationsdetektor (Gammazähler), welcher einen Natriumiodidkristall enthält. Durch Anregung der Atome im Natriumiodidkristall werden Lichtquanten freigesetzt, welche durch einen Photomultiplier als Spannungsimpuls detektiert werden. Die Energie der Lichtquanten und damit der Spannungsimpuls geben Aufschluss über die Energie der Gammaquanten. Die Lichtquanten wurden für jede Probe über einen Zeitraum von 1 Minute gezählt. Die Zählausbeute des Gamma-Zählers lag bei 90 %. Die gezählten Lichtquanten (counts per minute, cpm) wurden unter Berücksichtigung dieser Zählausbeute in Zerfälle pro Sekunde (dps, decays per second = Bq) umgerechnet. In dieser Arbeit wurde zur Radioaktivitätsmessung der 2470 Wizard^2 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer; Waltham, USA) aus der Sektion Isotopenanwendung der Universität Ulm verwendet.

3.3.1 Isolierung und Reinigung von Corrinoiden und Corrinoidvorstufen durch Umkehrphasen-HPLC

Reinigung von Corrinoiden

Das *Sporomusa*-Corrinoid p-Kresolylcobamid kommt in wässriger Lösung in zwei Cyanidisomeren vor, die in der Umkehrphasen-Hochleistungschromatographie (C_{18} RP-HPLC) getrennt werden können. Die HPLC-Anlage (Waters GmbH, Eschborn) bestand aus 2 Pumpen (Waters, M45), einem Rheodyne-Ventil (Rheodyne L.P., Conati, California, USA) als Injektionseinheit, einem automatischen Gradienten-Steuergerät (Waters, Modell 680), einem variablen Vierwellenlängen-Detektor (Waters, Modell 490 E) und einem Zweikanalschreiber (Linseis GmbH, Selb; Modell LG 512).

Tabelle 3.12: Reinigung von Corrinoiden durch Umkehrphasen-HPLC

stationäre Phase	Nucleosil 120-10 RP-C_{18} in einer Stahlsäule (3,9 mm x 21 cm)
mobile Phase	A: 99 % (v/v) Methanol B: 0,1 % (v/v) wässrige Essigsäure
Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels	1 ml/min
Gradientenprogramm	linear ansteigender Methanolgehalt von 23 % A auf 60 % A in 30 min
detektierte Wellenlängen	254 nm: viele organische Verunreinigungen 540 nm: „corrinoidspezifische“ Wellenlänge

Die mobile Phase wurde in einem Gradientenprogramm auf die stationäre Phase gegeben (Tabelle 3.12). Vitamin B_{12} wurde unter diesen Bedingungen bei 12 min, das Isomer A des *p*-Kresolylcobamids (Coβ-Aquo-Coα-Cyano-*p*-Kresolylcobamid) nach 20 min und das Isomer B des *p*-Kresolylcobamids (Coβ-Cyano-Coα-Aquo-*p*-Kresolylcobamid) nach 23 min eluiert. Beide *p*-Kresolylcobamid-Fraktionen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt und in 1 ml Wasser aufgenommen.

Reinigung von Corrinoidvorstufen und Syntheseprodukten des Enzymtests zur CobT-Reaktion

Zur Durchführung des CobT-Enzymtests mussten die Edukte sowie die durch die enzymatische Umsetzung gebildeten Reaktionsprodukte zur weiteren Analyse voneinander getrennt werden. Die chromatographische Trennung der Corrinoidvorstufen *p*-Kresol, 5,6-Dimethylbenzimidazol und Nikotinat-Mononukleotid sowie gebildeter Syntheseprodukte wurde mit Hilfe einer Umkehrphasen-Hochleistungschromatographie (C_{18} RP-HPLC) durchgeführt. Die mobile Phase wurde in einem Gradientenprogramm auf die stationäre Phase gegeben. Die mobile Phase bestand aus Methanol (A) und einem 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 (B). Vor Beginn wurde die HPLC-Säule mindestens für 30 Minuten mit 2 % Methanol äquilibriert. Das Gradientenprogramm ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Reaktionsansatz (50 µl) aus dem CobT-Enzymtest wurde mit 500 µl 2 % Methanol (A), 98 % Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 (B) versetzt und in den Injektor gespritzt. Nach 10 Minuten wurde der Methanolgehalt in einem linearen Gradienten auf 60 % erhöht. Zum Waschen der Säule wurde der Methanolgehalt auf 100 % erhöht. Die Absorption im Eluat wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

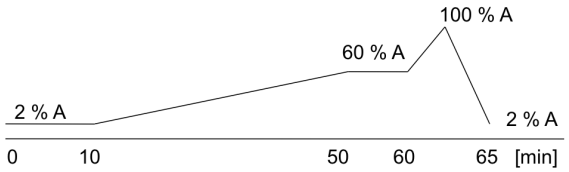


Abbildung 3.1: HPLC-Gradient zur Trennung von Corrinoidvorstufen und Syntheseprodukten aus dem CobT-Enzymtest. A = 100 % (v/v) Methanol, B = (100 % - A) = 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5

3.4 Molekularbiologische Hilfsmittel und Methoden

3.4.1 Behandlung von Lösungen, Gefäßen und Geräten

Bei den durchgeführten Versuchen muss stets auf Sterilität geachtet werden. Das gilt insbesondere für die Arbeit mit RNA. Aus diesem Grund wurden alle hitzestabilen Geräte, Gefäße und Lösungen bei 121 °C und 1 bar Wasserdampfdruck 20 Minuten lang autoklaviert. Dadurch werden Keime zerstört und Nukleasen inaktiviert. Geräte, Gefäße und Lösungen für RNA-Arbeiten wurden doppelt autoklaviert, Kleinteile aus Glas mit Ethanol (96 %) abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden durch einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) entweder direkt in autoklavierte Lösungen oder in autoklavierte Gefäße gegeben. Hitzelabile Geräte wurden mit unvergälltem Ethanol (70 %) gewaschen. Für die Versuche wurde nur Reinstwasser (Elgasat Maxima UF) verwendet, das zusätzlich autoklaviert wurde. Für RNA-Arbeiten wurde ausschließlich DEPC-Wasser verwendet. DEPC (Diethylpyrocarbonat, CAS 1609-47-8) bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine wie sie in der Aminosäure Histidin vorkommen. Dadurch werden die Ribonukleasen inaktiviert. Durch Autoklavieren zerfällt das DEPC in Ethanol und CO_2. Außerdem wurden beim Arbeiten mit RNA stets Einmalhandschuhe getragen, um eine Kontamination zu vermeiden. Des Weiteren wurden für diesen Zweck besonders gereinigte Pipetten verwendet.

3.4.2 Standards und Laufpuffer für Nukleinsäuretrennungen

3.4.3 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tabelle 3.13: Verwendete Vektoren

Plasmid	Größe [Bp]	Eigenschaften/Charakteristika	Referenz/Herkunft
pASKInt110	5 557	*intA*, *Cm*^{R}, P_{tet}	Prof. Kolmar, TU Darmstadt
pEST100	5 987	*estA*, *Cm*^{R}, P_{phoA}	Prof. Kolmar, TU Darmstadt
pET-16b	5 711	Expressionsvektor, *Ap*^{R}, P_{T7}, *lacI*	Merck KGaA, Darmstadt
pJET1.2/blunt	2 974	Klonierungsvektor *Ap*^{R}	Fermentas GmbH & Co. KG, St. Leon-Roth
pQE31	3 463	Expressionsvektor *Ap*^{R}, P_{M5}	Qiagen GmbH, Hilden
pRSF-Duet-1	3 829	Expressionsvektor, *Kn*^{R} P_{T7}, *lacI*	Merck KGaA, Darmstadt

pJET1.2/blunt (Genbank Accession Nummer EF694056)

Der pJET1.2/blunt Vektor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) ist ein „suicide vector“ (Selbstmordvektor), der als sogenanntes „suicide gene“ das Reportergen *eco*47IR trägt. Dieses bleibt intakt, wenn keine Fremd-DNA in die „multiple cloning site“ (MCS) einkloniert wird und der Vektor religiert. Dann wird die Restriktionsendonuklease funktionell exprimiert und die Wirts-DNA hydrolysiert, weil die zugehörige DNA-Methylase M.Eco47IR in den transformierten Zellen nicht vorhanden ist. Zusätzlich trägt der Vektor das Selektionsgen *bla*, welches für die β-Lactamase kodiert und somit die Ampicillin-Resistenz (Ap^R) ermöglicht. Des Weiteren sind auf dem Vektor ein T7-Promotor und ein modifizierter Lac-Promotor vorhanden.

pET-16b

Der pET-16b Expressionsvektor (Merck KGaA, Darmstadt) kodiert für einen N-terminalen His-Tag (10 x His), über welchen das rekombinante Protein durch Ni-Chelat-Affinitätschromatographie selektiv angereichert werden kann. Durch die Factor Xa-Schnittstelle kann dieser His-Tag später im exprimierten Protein durch die Factor Xa-Protease wieder entfernt werden. Auch dieser Vektor besitzt das *bla*-Gen für die β-Lactamase, welche für eine Ampicillin-Resistenz (Ap^R) kodiert, sowie einen T7-Promotor. Außerdem kodiert der Vektor für den LacI-Repressor, der die Expression bis zur Zugabe von IPTG reprimiert, sowie eine „multiple cloning site“. Bakterienstämme zur Proteinproduktion mit dem Vektor pET-16b müssen eine kodierende Se-

quenz der T7-RNA-Polymerase enthalten. Geeignet sind deshalb die hier verwendeten Stämme *Escherichia coli* BL21 AI und *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3).

pQE-31

Der Vektor pQE-31 (Qiagen GmbH, Hilden) kodiert für einen N-terminalen His-Tag (6 x His), über welchen das rekombinante Protein durch Ni-Chelat-Affinitätschromatographie selektiv angereichert werden kann. Dieser Vektor besitzt ausserdem das *bla*-Gen für die β-Lactamase, welche für eine Ampicillin-Resistenz (Ap^R) kodiert, sowie die Nukleotidsequenz eines M5-Promotors und eines *lac*-Operators. Der vom Hersteller empfohlene Bakterienstamm zur Proteinproduktion mit dem Vektor pQE-31 ist *Escherichia coli* M15 [pREP4]. Dieser Stamm enthält zusätzlich die kodierende Sequenz des Lac-Repressors (LacI) auf dem Plasmid pREP4. Dadurch ist das Vorhandensein von ausreichend Lac-Repressorprotein in der Zelle gewährleistet, welcher die Expression des Fusionsproteins bis zur Zugabe von IPTG reprimiert.

pRSFDuet-1

Der pRSFDuet-1 Expressionsvektor (Merck KGaA; Darmstadt) ist ein Vektor, der für die Koexpression von zwei Genen konzipiert ist (siehe Abbildung 3.2). Er enthält zwei „multiple cloning sites“, vor welchen jeweils ein T7*lac*-Promoter sowie eine Ribosomenbindestelle liegen. Ausserdem kodiert die Nukleotidsequenz des Vektors für einen N-terminalen His-Tag am ersten Zielprotein und für einen C-terminalen S-Tag am zweiten Protein, wodurch beide Proteine durch zwei unterschiedliche Affinitätschromatographien angereichert werden können. Der Vektor besitzt das *kanR*-Gen, welches für eine Kanamycin-Resistenz (Kn^R) kodiert sowie einen RSF-1030 Replikationsursprung. Außerdem kodiert der Vektor für den LacI-Repressor, der die Expression bis zur Zugabe von IPTG reprimiert. Bakterienstämme zur Proteinproduktion mit dem Vektor pRSF-Duet-1 müssen eine kodierende Sequenz der T7-RNA-Polymerase enthalten. Geeignet sind deshalb die Stämme *Escherichia coli* BL21 AI und *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3).

pEST100

Der Expressionsvektor pEST100 ermöglicht eine Präsentation von Proteinen an der

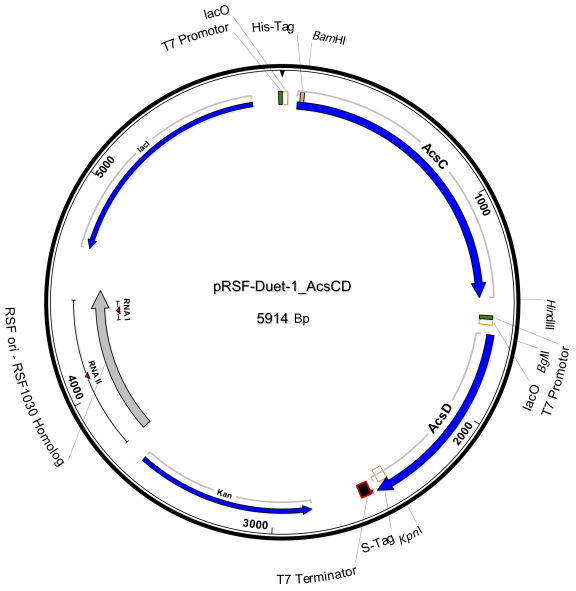


Abbildung 3.2: Vektorkarte des Vektors pRSF-Duet-1_AcsCD zur heterologen Koexpression der Acetyl-CoA-Synthase-Untereinheiten AcsC und AcsD aus *Sporomusa ovata* H1 in *Escherichia coli*.

Oberfläche von *Escherichia coli*-Zellen durch Bildung eines Fusionsproteins aus dem Zielprotein und dem Autotransporter Esterase A. Das Zielprotein wird dabei an den N-Terminus der Esterase fusioniert. Der Vektor trägt das *cat*-Gen, welches für die Chloramphenicol Acetyltransferase kodiert und somit für eine Chloramphenicol-Resistenz sorgt. Zusätzlich trägt der Vektor den Promotor phoA und einen Operator, der die Induktion des Esterase-Fusionsgens über IPTG ermöglicht. Des Weiteren enthält der Vektor eine „multiple cloning site“, in welche über *Sfi*I-Schnittstellen Fremd-DNA in den Vektor einkloniert werden kann. Die Genkarte des Vektors pEST100 ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

pASKInt110

Der Expressionsvektor pASKInt110 ermöglicht wie der Vektor pEST100 eine Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von *Escherichia coli*-Zellen. In diesem Fall wird jedoch ein Fusionsprotein aus dem Zielprotein und dem Membranprotein Intimin gebildet. Das Zielprotein wird hier im Gegensatz zum Vektor pEST100 an den C-Terminus des Intimin fusioniert. Auch hier ist eine „multiple cloning site“ mit *Sfi*I-Schnittstellen und eine Chloramphenicol-Resistenz vorhanden. Des Weiteren enthält

der Vektor einen tet-Promotor, der die Induktion des Intimin-Fusionsgens über Tetracyclin ermöglicht. Die Genkarte des Vektors pASKInt110 ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

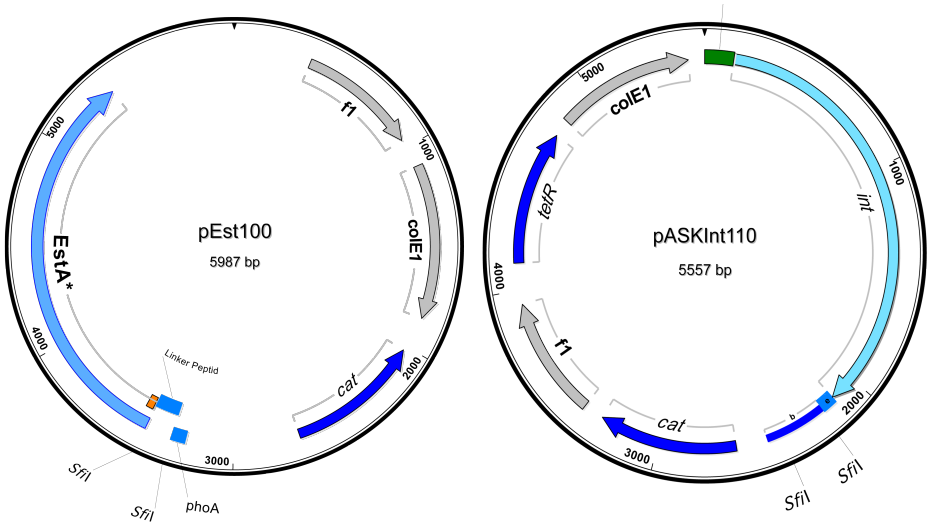


Abbildung 3.3: Vektorkarte der Vektoren pEST100 und pASKInt110 zur Präsentation von Proteinen an der Oberfläche von *Escherichia coli*-Zellen

3.4.4 Oligodesoxynukleotide

Die in diesen Versuchen verwendeten Oligodesoxynukleotide („Primer “) sind in der Tabelle 3.14 aufgeführt; sie wurden von der Firma „biomers.net GmbH“ (Ulm) synthetisiert. Die angegebene Hybridisierungstemperatur (T_m) wurde mit dem Programm OligoCalculator (Tabelle 6.1) nach der „nearest neigbour“-Methode berechnet.

Tabelle 3.14: Verwendete Oligodesoxynukleotide für die PCR-Analysen

Oligodesoxynukleotid	Nukleotidsequenz ($5' \rightarrow 3'$)	Restriktions-schnittstelle	T_m[°C]	Verwendung
16S_SO_qPCR_fw	aatggacgaaagtctgacgg		52,5	qRT-PCR, *rrnA*-Gen
16S_SO_qPCR_rev300	ctacgcatttcaccgctaca		53,8	qRT-PCR, *rrnA*-Gen
40kDa_pEST/ASK_fw	cagcc**ggcccagccggcc**atgtcaacacttgcttgcggc	*Sfi*I	56,6	Oberflächenpräsentation von McpA
40kDa_pASK_rev	cagcc**ggccccccgaggcc**ttcttgtttggcagctgcagtc	*Sfi*I	57,1	Oberflächenpräsentation von McpA
40kDa_RT300_fw	cgtcgtcaacctatccacct		53,2	qRT-PCR Analyse des mcpA-Transkripts
40kDa_RT300_rev	cgatggaggtgacataagca		52,4	qRT-PCR Analyse des mcpA-Transkripts
A_Primer1	gtaatacgactcactataggg		48,0	Oligonukleotidadapter-Primer 1
A_Primer2	actatagggcacgcgtggt		54,5	Oligonukleotidadapter-Primer 2
AcsC_Duet_fw	cg**ggatcc**gatggcattaaccggtttggata	*Bam*HI	53,3	Klonierung des *acsC*-Gens in pRSF-Duet-1
AcsC_Duet_rev	cccc**aagctt**ttatttcatgagttgggggtaac	*Hind*III	50,4	Klonierung des *acsC*-Gens in pRSF-Duet-1
AcsD_Duet_fw	ga**agatct**gatggagattcaggatattaatcctg	*Bgl*II	53,9	Klonierung des *acsD*-Gens in pRSF-Duet-1
AcsD_Duet_rev	cgg**ggtacc**aatttcaggttttaccattaacgcc	*Kpn*I	53,5	Klonierung des *acsD*-Gens in pRSF-Duet-1
AcsC_Seq2_fw	aggtcttggtgcagatttcgtgga		58,5	Doppelstrangsequenzierung des *acsC*-Gens
AcsC_Seq2_rev	tcgaaccgcacacttgccgc		60,0	Doppelstrangsequenzierung des *acsC*-Gens

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.14: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Nukleotidsequenz ($5' \rightarrow 3'$)	Restriktions-schnittstelle	T_m[°C]	Verwendung
B12-box_fw	agycaggagacctgcc		45 - 47	Bereich II von B_{12}-Riboschaltern
B12Motiv_fw	cgbgatgtdcatgatattggbaaaaatattgt		56,3 - 60	Identifizierung von B_{12}-Bindemotiven
BtuB5_So_pEST_fw	**ggcccagccggcc**atgaagatctcgcccaccgg	*Sfi*I	56,3	Oberflächenexpression von BtuB5
BtuB5_So_pEST_rev	**ggccccgaggcc**gaatttgtactccatggtcgcatagtaca	*Sfi*I	58,8	Oberflächenexpression von BtuB5
BtuB5_So_pASK_rev	cagcc**ggccccgaggcc**ttagaaattgcatgtcacagttaca	*Sfi*I	52,9	Oberflächenexpression von BtuB5
BtuB6_So_pEST_rev	**ggccccgaggcc**gacggcccgggctggtaaat	*Sfi*I	57,2	Oberflächenexpression von BtuB6
BtuB6_So_pASK_rev	cagcc**ggccccgaggcc**gaaattgcatgtcacagttaca	*Sfi*I	49,8	Oberflächenexpression von BtuB6
BtuB6_So_pEST-ASK_fw	cagcc**ggcccagccggcc**atgaaattaactgaatcttacaaacc	*Sfi*I	50,4	Oberflächenexpression von BtuB6
BtuBx_Sporo_pEST100_fw	**ggcccagccggcc**atgctgacacagtcagcatatg	*Sfi*I	54,5	Oberflächenexpression von BtuB1
BtuBx_Sporo_pEST100_rev	**ggccccgaggcc**aaaatcataacgtgcatttacaaag	*Sfi*I	51,7	Oberflächenexpression von BtuB1
BtuBy_Sporo_pEST100_fw	**ggcccagccggcc**atgaccgtgctgttcacc	*Sfi*I	50,1	Oberflächenexpression von BtuB4
BtuBy_Sporo_pEST100_rev	**ggcccagccggcc**cggtgtcatagctgtcctgg	*Sfi*I	54,8	Oberflächenexpression von BtuB4
BtuBz_pEST100_sporo_fw	**ggcccagccggcc**atgaaattaactgaatcttacaaacc	*Sfi*I	50,4	Oberflächenexpression von BtuB6(1-249)
BtuBz_pEST100_sporo_rev	**ggcccagccggcc**agcattggcagcagcgtccata	*Sfi*I	60,4	Oberflächenexpression von BtuB6(1-249)
cbiD_D1	ttgtttgccgccaggtaagg		54,8	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 1.Schritt
cbiD-D10	ggcgtaccgttggcttttt		52,5	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 10.Schritt
cbiD-D11	ttgctgcgcttattacgatg		53,7	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 11.Schritt
cbiD-D12	cctatggcgctgttactgaa		55,1	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 12.Schritt
cbiD-D13	cgagattgccgatattgctt		52,9	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 13.Schritt
cbiD-D14	gcgataagcagtcactatcacg		56,0	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 14.Schritt
CBID-D15b	gccgccagatttttggtatg		52,2	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 15.Schritt
CBID-D16	tcataccggaaatggctttctt		52,9	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 16.Schritt
cbiD-D2	tgcgctccacatcctgagag		57,5	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 2.Schritt
cbiD-D4	ggtgctatccaggaacaaatgg		53,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 4.Schritt
cbiD-D5b	gtgcctcagtatgaacggct		54,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 5.Schritt
cbiD-D6b	tacgactggggaaagtctgc		53,3	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 6.Schritt
cbiD-D7	gaactgctagacccggatga		53,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 7.Schritt
cbiD-D8	cgttgtccggcagggtctgg		58,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 8.Schritt
cbiD-D9	ggcgtagtgtggctggttat		53,5	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 9.Schritt
cbiD-sspI-D3	gcgccctatctggctgatttt		56,3	„genomic walking“ stromabwärts von RS01, 3.Schritt
cbiDRS_WalkUp	caaagcacccattcccttaca		52,3	„genomic walking“ stromaufwärts von RS01, 1.Schritt
cbiK_EMSA_fw	gaaatgcggcatgggcagcg		60,1	DNA-Sonde zur Identifizierung der LuxR-Bindestelle
cbiK_EMSA_rev	gccacagccacagattgcggt		59,1	DNA-Sonde zur Identifizierung der LuxR-Bindestelle
cbik-D2	ctgctgggcgtaagctatgt		55,8	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 2.Schritt
cbiK-D3	gctttgccggtgtaaaatgt		51,2	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 3.Schritt
cbiK-D4c	tattgtttcatccggcgaac		50,9	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 4.Schritt
cbiK-D5	ggtgctgcaatatggtgttg		51,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 5.Schritt
cbiK-D6	cggtttcggcactttgtatt		51,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 6.Schritt
cbiK-D7	gccggccaagattcttttat		51,3	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 7.Schritt
cbiK-D8	ggctgttcgatcggctatta		53,3	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 8.Schritt
cbiK-D9	gcggaggaagggctagttat		53,9	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 9.Schritt
cbiK-D10	gcctggtgatgatggtaggt		52,1	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 10.Schritt
cbiK-D11	atgcccattcggtacattgc		52,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS02, 11.Schritt
cbik-U2	tctcccggcaagatatttca		51,4	„genomic walking“ stromaufwärts von RS02, 2.Schritt
cbiK-U3	ctagctttttgagggcttcg		53,6	„genomic walking“ stromaufwärts von RS02, 3.Schritt
cbiK-U4	ttgtccaactgctgcaaaac		51,2	„genomic walking“ stromaufwärts von RS02, 4.Schritt
cbiK-U5	tcacacacggaagggtcata		51,5	„genomic walking“ stromaufwärts von RS02, 5.Schritt
cobT_5RACE_cDNA	atcggataggcactcaccac		53,0	Transkriptionsstartbestimmung des *cobT*-Transkripts
cobT_5RACE_SP1	gtcagctgaagctaccacca		53,9	Transkriptionsstartbestimmung des *cobT*-Transkripts
cobT_5Race_SP2	attcccgcatactgctcaac		52,8	Transkriptionsstartbestimmung des *cobT*-Transkripts
cobT_Bamfw	cg**ggatcc**atgaactgggagccaggagacctg	*Bam*HI	60,1	Klonierung von *cobT1* in pET16b
cobT_Bamrev	cg**ggatcc**ttaagacggctgtctgatatcccgg	*Bam*HI	59,6	Klonierung von *cobT1* in pET16b
cobT_ORF3bpet_fw	**ggatcc**gatgcttgaagaactaattg	*Bam*HI	43,9	Klonierung von *cobT2* in pQE31
cobT_ORF3pet_rev	**ggatcc**ctaatctctaacatccttgctttgcc	*Bam*HI	57,2	Klonierung von *cobT2* in pQE31
CobT_Salmonella_pET16b_rev	cg**ggatcc**ttatgttgcgtttgcgttccc	*Bam*HI	54,2	Expression von CobT aus *Salmonella*
CobT_Salmonella_pET22_fw	cg**ggatcc**gatgcagacactacacgctttac	*Bam*HI	55,2	Expression von CobT aus *Salmonella*
cobT_sequ2_fw	cgggccttagctgtgaataa		53,1	Doppelstrangsequenzierung des *cobT*-Operons
CobT_sequ2_rev	cgcaatctttgcttgtgcta		53,6	Doppelstrangsequenzierung des *cobT*-Operons
cobT_Up2	ggtcgagccggttacggtca		57,1	„genomic walking“ stromaufwärts von RS03, 2.Schritt
cobT01-Northern-fw	gcctatggcacacaggattt		51,9	*cobT1*-DNA-Sonden „Northern blot “ Analyse des *cobT*-Operons
cobT01-Northern-rev	ccactttggccagaacatct		52,0	*cobT1*-DNA-Sonden „Northern blot “ Analyse des *cobT*-Operons
cobT02-Northern-fw	gcccatccaggtgtttgc		50,9	*cobT2*-DNA-Sonden „Northern blot “ Analyse des *cobT*-Operons

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.14: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Nukleotidsequenz ($5' \rightarrow 3'$)	Restriktions-schnittstelle	T_m[°C]	Verwendung
cobT02-Northern-rev	taagccgggtagtggctgac		55,2	*cobT2*-DNA-Sonden „Northern blot " Analyse des *cobT*-Operons
CobT5_fw	tgtaccagtccccactgtca		52,2	„genomic walking" stromabwärts von RS03, 5.Schritt
cobTWalk_fw	cagcctggggcgattggaag		57,8	„genomic walking" stromabwärts von RS03, 1.Schritt
cobTWalk_rev	tgccggattcagttcgcctgt		58,5	„genomic walking" stromaufwärts von RS03, 1.Schritt
cobtWalk2	cagtgtcagcggcgagtcgat		60,5	„genomic walking" stromabwärts von RS03, 2.Schritt
CobTWalk3	tacggccgccctgattgcta		58,1	„genomic walking" stromabwärts von RS03, 3.Schritt
CobTWalk4	aacatgtccggagctgctttcg		58,9	„genomic walking" stromabwärts von RS03, 4.Schritt
CobTWalk6_fw	tgcttcctgcgtcattctgc		56,4	„genomic walking" stromabwärts von RS03, 6.Schritt
CODH-D5	actatgccattcctccattttgaa		53,7	„genomic walking" stromabwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 5. Schritt
codh-d6	aatgctgaggcgttaatggtaaaa		54,9	„genomic walking" stromabwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 6. Schritt
CODH-D7	gcttattaaccgcacctttgctat		55,9	„genomic walking" stromabwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 7. Schritt
CODH-U4	cttctttggcaatcctctcaaca		54,8	„genomic walking" stromaufwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 4. Schritt
CODH-U5	acgacctgggataacggtagg		54,7	„genomic walking" stromaufwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 5. Schritt
GlcN6P_D2b	ttcaaggaggtaccggtcaaa		52,5	„genomic walking" stromabwärts von RS09, 2.Schritt
GlcN6P_D3	cagtcatgaccgtgctgttcac		56,1	„genomic walking" stromabwärts von RS09, 2.Schritt
Klon54-D4	ataatggtattgcggcatcc		50,4	„genomic walking" stromabwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 4. Schritt
Klon54-downwalk1c	cgaatgccaatctgaatgaagcact		58,8	„genomic walking" stromabwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 1. Schritt
Klon54-pJETdown2	aaatggttgttaatgctgct		48,4	„genomic walking" stromabwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 2. Schritt
Klon54-upwalk2b	cggatggtttcgccctcaaa		54,9	„genomic walking" stromaufwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 2. Schritt
Klon54-upwalk3	aacgctcatccaatgctgagaaa		56,9	„genomic walking" stromaufwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 3. Schritt
Klon54Up1	tcatgccgcaaggagtgtcg		57,7	„genomic walking" stromaufwärts der Acetyl-CoA Synthase-Gene, 1. Schritt
luxR_fw+1	cg**ggatcc**gatgtattggtcaaactattgggaagc	*Bam*HI	54,8	Klonierung von *luxR* in pET16b
luxR_Up2	cgtcaggcacctatcccagca		58,4	„genomic walking" stromaufwärts von RS05, 2. Schritt
luxR_Up3	tgggacacagttgggatgggtta		55,4	„genomic walking" stromaufwärts von RS05, 3. Schritt
luxRb_RT300_fw	atgaaaaggcgaaacaggtg		51,3	(q)RT-PCR zur Expressionsanalyse des *luxR*-Gens
luxRb_RT300_rev	ggtttttccagctgcgatt		53,2	(q)RT-PCR zur Expressionsanalyse des *luxR*-Gens
LuxRSeq2_fw	ttccttttgccacctcattc		50,0	Doppelstrangsequenzierung des *luxR*-Gens
LuxRSeq2_rev	acgccgtcaacaaatactcc		52,3	Doppelstrangsequenzierung des *luxR*-Gens
mtmb_seq2_fw	tggcgttataatctaaaacgtaatg		52,8	Doppelstrangsequenzierung des *mtmC*-Gens
mtmb_seq2_rev	gctctttgtcggttgggata		51,8	Doppelstrangsequenzierung des *mtmC*-Gens
mtmB-D1	aggtccatgcaccgttatgt		52,3	„genomic walking" stromabwärts von *mtmC*, 1. Schritt
mtmB-D2	cggcgcaagctataactgat		55,1	„genomic walking" stromabwärts von *mtmC*, 2. Schritt
mtmB-D3	attgtaccaccggaaagcag		52,1	„genomic walking" stromabwärts von *mtmC*, 3. Schritt
mtmB-D4	gcagccacatcgtcaaagta		53,0	„genomic walking" stromabwärts von *mtmC*, 4. Schritt
mtmB-U1	ttgatgacttcaactacaaatcgag		54,1	„genomic walking" stromaufwärts von *mtmC*, 1. Schritt
mtmB-U2	cccctcgcaatgtctaaaaa		50,9	„genomic walking" stromaufwärts von *mtmC*, 2. Schritt
mtmB-U3	acgcaaaaagcaaccatacc		51,1	„genomic walking" stromaufwärts von *mtmC*, 3. Schritt
mtrH_seq2_fw	ggaaaagaagggctggataccaacaa		57,5	Doppelstrangsequenzierung des *mttC*-Gens
mtrH_seq2_rev	ctttttcgatgagcaaattcgacacca		59,2	Doppelstrangsequenzierung des *mttC*-Gens
mtrH-D1	cttggcaaggattcggcaat		53,9	„genomic walking" stromabwärts von *mttC*, 1. Schritt
MtrH-D3	ggaaaaaccgaaggtctaattgct		54,8	„genomic walking" stromabwärts von *mttC*, 3. Schritt
mtrH-d4	atttatccatgaagcagacggaac		54,8	„genomic walking" stromabwärts von *mttC*, 4. Schritt
MtrH-D5	ttttgcggtatctcaaaggtattg		53,6	„genomic walking" stromabwärts von *mttC*, 5. Schritt
MtrH-D6	aacttggtgcaagatggaaagc		54,3	„genomic walking" stromabwärts von *mttC*, 6. Schritt
mtrH-sma-D2	cggtttgccgaattcagtacg		55,4	„genomic walking" stromabwärts von *mttC*, 2. Schritt
MtrH-U2b	tgcaaaggatgggacattag		50,0	„genomic walking" stromaufwärts von *mttC*, 2. Schritt
Oligo_dT_anchor_Race	gaccacgcgtatcgatgtcgactttttttttttttttv		63,7	5'-RACE Oligo-dT-Primer
PCR_anchor_RACE	gaccacgcgtatcgatgtcgac		58,1	5'-RACE Anker-Primer
pET16b_fw	ctcgatcccgcgaaattaatacg		57,0	Sequenzierprimer für pET-16b
pET16b_rev	gttatgctagttattgctcagcggt		57,9	Sequenzierprimer für pET-16b
pJET1.2-forward	cgactcactatagggagagcggc		60,4	Sequenzierprimer für pJET1.2./blunt
pJET1.2-reverse	aagaacatcgattttccatggcag		55,8	Sequenzierprimer für pJET1.2./blunt
recA_qrt300_fw	aagaattcagccccaggatatt		52,1	qRT-PCR Analyse des *recA*-Transkripts
recA_qrt300_rev	tactataaacctcccccgacaa		52,2	qRT-PCR Analyse des *recA*-Transkripts

Fortsetzung folgt

Tabelle 3.14: Fortsetzung

Oligodesoxynukleotid	Nukleotidsequenz ($5' \rightarrow 3'$)	Restriktions-schnittstelle	T_m[°C]	Verwendung
recA_U1	cgacatcaatagccgcactacg		58,2	„genomic walking“ stromaufwärts von *recA*, 1. Schritt
recA-D1	gttacacgttattgctcaggctca		56,7	„genomic walking“ stromabwärts von *recA*, 1. Schritt
Ribo1_lang	ggtgmaaatccgghgcggtcccgccactgt		66,5-70,6	Identifizierung von B_{12}-Riboschaltern
rnasep_D1	gcgcaccagcagtcaggtaa		57,1	„genomic walking“ stromabwärts von *rnpA*, 1. Schritt
rnasep_fw	agtgccacagaraacagaccgcc		59,1-59,6	Identifizierung des *rnpA*-Gens
rnasep_rev	cttgctccgggtggggtttacc		57,6	Identifizierung des *rnpA*-Gens
rnasep_U1	ggggtttacctagccagccagt		56,9	„genomic walking“ stromaufwärts von *rnpA*, 1. Schritt
rnpA_qrt300_fw	tttaccgcttattgacttgttttg		52,4	qRT-PCR Analyse des *rnpA*-Transkripts
RS11-D1b	ccagtaaatgcctgggaaga		51,6	„genomic walking“ stromabwärts von RS11, Schritt 1
RS11-D2	agttatcccggcatacagga		52,0	„genomic walking“ stromabwärts von RS11, Schritt 2
RS11-D3	cgccagggtaaagcagtaag		54,1	„genomic walking“ stromabwärts von RS11, Schritt 3
RS11-D4	tatgggtggcgttgtcaata		50,5	„genomic walking“ stromabwärts von RS11, Schritt 4
RS11-U1	gaggtatgggagggggatta		50,4	„genomic walking“ stromaufwärts von RS11, Schritt 1
RS11D1_Walk	gggggttgcttgttttagttgc		53,8	„genomic walking“ stromabwärts von RS07, Schritt 1
RS11D2_walk	gcgagtgacagggaggggatt		57,0	„genomic walking“ stromabwärts von RS07, Schritt 2
RS11D3_walk	tttcgcggaaccagtaatgaacg		57,1	„genomic walking“ stromabwärts von RS07, Schritt 3
RS11Seq2_fw	tggcagcaaaggcttctatt		53,1	Doppelstrangsequenzierung des Genomabschnittes um RS11
RS11Seq2_rev	gccagtgtccttgtcggtat		53,0	Doppelstrangsequenzierung des Genomabschnittes um RS11
RS8_gap_fw	ctcgcatagttgccactgaa		53,8	„genomic walking“ stromabwärts von RS08, Schritt 1
RS8_walkDown2	agtcatgaccgtgctgttcacctg		59,3	„genomic walking“ stromabwärts von RS08, Schritt 2
RS8_walkDown3	gcgattggcaaaatggaacc		52,1	„genomic walking“ stromabwärts von RS08, Schritt 3
RS8_walkUp1	gctgtaggctcttttggctgttgg		59,7	„genomic walking“ stromaufwärts von RS08, Schritt 1
RS8a_RT300_fw	tgatttcgttcacctggaca		50,7	qRT-PCR Analyse des *crgA*-Transkripts
RS8a_RT300_rev	ggcatatacatcttcggtgct		53,1	qRT-PCR Analyse des *crgA*-Transkripts
RS8b_RT300_fw	tggcaatggttgaaaatgag		49,0	qRT-PCR Analyse des *crgB*-Transkripts
RS8b_RT300_rev	gcgaaaaagcctttgctactt		53,7	qRT-PCR Analyse des *crgB*-Transkripts
RS8D4Gap_fw	accggcgactataacacctg		53,8	„genomic walking“ stromabwärts von RS08, Schritt 4
RS8D5	ggcaggacgacaactggatg		54,6	„genomic walking“ stromabwärts von RS08, Schritt 5
RS8Seq2_fw	tagggaacaatgccaggaag		51,6	Doppelstrangsequenzierung des Genomabschnittes um RS08
RS8Seq2_rev	gtagccgccataggatttga		52,4	Doppelstrangsequenzierung des Genomabschnittes um RS08
Sporo_B12D6_walk	ggaattccatctgggacggcgacttcc		62,6	„genomic walking“ stromabwärts von *mttC*, 1. Schritt
Sporo_recA_fw	gagatatatggacctgaatcatcaggtaaaactac		60,0	Identifizierung des *recA*-Gens
Sporo_recA_rev	ggtacaagtgctgctacagaatctacaac		59,7	Identifizierung des *recA*-Gens
TonB_D3	aagacatctgggccacgtatcagc		59,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 3
TonB_D4	ctggaaatcggttattgcctca		54,0	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 4
TonB_D5	aggtgctgcggatgaaatga		54,5	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 5
TonB_Down1	tggcaattgactcccaacatcaga		56,8	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 1
TonB_Down2	aagacatctgggccacgtatcagc		59,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 2
TonB-D6	cagttgggcgataaaaccactaac		55,0	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 6
TonB-D7	cgggctttatacctcggttg		53,4	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 7
TonB-D8	taatatgagcaccggcacaa		51,9	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 8
TonB-D9	catttaccaccagcctgacc		51,7	„genomic walking“ stromabwärts von RS06, Schritt 9
WalkAd_down	PO_4^{2-}-accagccc-Aminolink[1)]		28,0	Oligonukleotidadapter für die Adapter-PCR
WalkAdDown_lux	PO_4^{2-}-accagcccgggcc		28,0	Oligonukleotidadapter für das SELEX-Verfahren
WalkAd_up	gtaatacgactcactatagggcacgc-gtggtcgacggcccgggctggt		75,6	Oligonukleotidadapter "fur die Adapter-PCR

[1)] Aminolink: Eine endständige Aminogruppe (NH_2) wird über einen C6-Linker an das 3'-Ende des Oligonukleotids angefügt. Dies Verhindert eine Synthese von weiteren Nukleotiden an dieses DNA-Ende.

3.4.5 Herstellung von Lösungen und Puffern

3.4.6 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien

Isolierung chromosomaler DNA

Um chromosomale DNA in hohen Ausbeuten aus Bakterienzellen zu extrahieren, sollte die Gram-Reaktion des Bakteriums bekannt sein. Gram-positive Bakterien erfordern im Gegensatz zu Gram-negativen eine besondere Behandlung durch Lysozym, um ihre wesentlich dickere Mureinzellwand zu permeabilisieren.

DNA-Isolierung aus Gram-negativen Bakterien

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* wurde die „AquaGenomic ™ Solution“ (MoBiTec GmbH, Göttingen) verwendet. Dazu wurde zunächst 1 ml einer Übernachtkultur in einem sterilen Reaktionsgefäß abzentrifugiert (15000 g, 30 s). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, der Niederschlag in 100 µl der „AquaGenomic™ Solution“ resuspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde zur Lyse der Bakterienzellen 15 Minuten lang auf 65 °C erhitzt. Nach der Lyse wurde das Reaktionsgemisch mit Hilfe des Vortexers 30 Sekunden lang geschüttelt und die Zelltrümmer anschließend wiederum bei 15000 g für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 Volumen Isopropanol (100 %) zur Fällung der DNA zugegeben und mit Hilfe des Vortexers etwa 30 Sekunden lang vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren (15000 g, 2 min) wurde der Überstand verworfen. Um den erhaltenen Niederschlag zu waschen, wurde 1 ml 4 °C kalter Ethanol (70 %) vorsichtig an den Wänden des Reaktionsgefäßes pipettiert. Danach wurde der Ethanol abgekippt und dieser Waschschritt zweimal wiederholt, um Salze von der DNA abzutrennen. Um nach dem dritten Waschschritt das restliche Ethanol zu entfernen, wurde das Reaktionsgefäß mehrmals umgekehrt auf einem Papiertuch ausgeklopft und anschließend etwa 10 Minuten lang bei 37 °C an der Luft getrocknet. Der getrocknete DNA-Niederschlag wurde in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und nach erneutem Zentrifugieren (15000 g, 1 min) der Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die so isolierte chromosomale DNA wurde bei -20 °C gelagert.

DNA-Isolierung aus Gram-negativen *Sporomusa ovata* H1

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *Sporomusa ovata* H1 kam das Protokoll für die Gram-positiven Organismen des „AquaGenomic™ Solution“ (MoBiTec GmbH, Göttingen) zur Anwendung. Für *Sporomusa ovata* H1 wurden 5 ml einer 4-Tages-Kultur abzentrifugiert (3000 g, 10 Minuten) und der jeweilige Überstand verworfen. Der Zellniederschlag wurde in 100 µl der „AquaGenomic™ Solution“ resuspendiert und anschließend 2 µg Lysozym und 50 µl Glas-Kügelchen (0,1 mm) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zur Lyse der Bakterienzellen 15 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 Sekunden gevortext und dann für 15 Minuten auf 65 °C erhitzt. Der restliche Ablauf entspricht der Vorgehensweise bei Gram-negativen Bakterien.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Zellen erfolgte über den „Zyppy Plasmid Miniprep Kit“ (Zymo Research Corp., Orange, USA). Die Prozedur basiert auf dem Verfahren der alkalischen Lyse. Hierfür wurden 600 µl aus einer Übernachtkultur zu 100 µl 7x Lysis-Puffer gegeben und 6 mal invertiert. Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer zugegeben, gut durchmischt und 4 Minuten bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zymo-Spin-Säule gegeben und für 15 s bei 10000 g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 200 µl Endo-Wash Puffer und anschließender Zentrifugation für 15 s bei 10000 g wurde auf die Säule nochmals 200 µl Zyppy-Wash Puffer zugegeben und für 30 s bei 10000 g zentrifugiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer, 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (15 s, 10000 g). Die gesamte Isolierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *Sporomusa ovata* H1 wurden 15 ml einer Kultur (OD_{600} = 0,5 - 0,6) abzentrifugiert (3000 g, 10 Min, 4°C) und der jeweilige Überstand verworfen. Zur Entfernung von Mediumsrückständen wurde der Niederschlag in 1 ml sterilem Reinstwasser resuspendiert, erneut abzentrifugiert (10000 g, 2 Min) und der Überstand ebenfalls verworfen. Zur Aufbewahrung wurden die Niederschläge mit

flüssigem Stickstoff gekühlt und bei -80 °C gelagert.

Für die Isolierung von RNA wurde der RNeasy® Mini Kit™ (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Dazu wurde der aufgetaute *Sporomusa*-Zellniederschlag in 700 µl Phenol-haltigem „QIAzol Lysis Reagenz“ resuspendiert. Anschließend folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten im 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nach der Zugabe von 140 µl Chloroform wurde das Gemisch 15 s lang invertiert. Nach einer erneuten Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten wurde das Reaktionsgemisch abzentrifugiert (12000 g, 15 Min, 4°C). Die RNA-haltige, obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Volumen (v/v) 100 %iger Ethanol bei Raumtemperatur zugegeben. Nach kurzem Mischen mit der Pipette wurden das Reaktionsgemisch in ein „RNeasy® Mini Spin Column“ überführt, geschlossen abzentrifugiert (8000 g, 15 s) und der Durchfluss verworfen. Um die Probe zu waschen, wurden erst 700 µl Puffer RWT und dann 500 µl Puffer RPE durch das geschlossene „RNeasy® Mini Spin Column“ zentrifugiert (8000 g, 15 s). Nach dem Verwerfen des Durchfluss wurden 500 µl Puffer RPE zugegeben und geschlossen abzentrifugiert (8000 g, 2 Min). Um die Säulenmembran zu trocknen, wurde das „RNeasy Mini Spin Column“ in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und geschlossen abzentrifugiert (10000 g, 2 Min). Nach erneutem überführen des „RNeasy Mini Spin Column“ in ein steriles Reaktionsgefäß wurden 30 µl Wasser (RNase-frei) auf die Säulenmenbran gegeben und geschlossen abzentrifugiert (8000 g, 1 Min), um die RNA zu eluieren.

Das Eluat wurde anschließend mit DNase behandelt (Kapitel 3.4.9), um eine eventuelle Anreicherung von chromosomaler DNA bei der RNA-Isolierung zu eliminieren.

3.4.7 Reinigen von Nukleinsäuren

Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel wurde das „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ (Zymo Research Corp., Orange, USA) verwendet. Zunächst wurde das Agarosegelstück, das die gewünschte Ethidiumbromid-gefärbte DNA-Bande enthält bei kurzer Beleuchtungszeit auf dem Transilluminator (TFP-M/WL 312 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Gelstück mit 3 Volumen des mitgelieferten „ADB Buffer™“ vermischt und so lange auf 55 °C erhitzt, bis sich das Gelstück vollständig gelöst hat. Das Gemisch wurde auf

die Kieselgelmatrix der „Spin Columns“ geladen und abzentrifugiert (15000 g, 30 s). Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Probe zu waschen, wurde zweimal 200 µl „Wash Buffer“ aufgeladen und abzentrifugiert (15000 g, 30 s). Um die DNA zu eluieren, wurden 6-20 µl steriles Wasser auf die Kieselgelmatrix gegeben und abzentrifugiert (15000 g, 60 s). Das Eluat enthält die reine DNA, die dann bei -20 °C gelagert wurde.

Aufreinigung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen
Für die Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde ebenfalls das „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ von Zymo Research (Orange, USA) verwendet. Die Vorgehensweise ist gleich wie in Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen beschrieben. Es wird jedoch auf die Inkubation bei 55 °C verzichtet.

Phenol-Chloroform-Extraktion
Bei der Isolierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen musste in der Regel als Hauptverunreinigung Protein abgetrennt werden. Dies geschah durch die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (Kirby, 1956). Dazu wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,5 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v); Roti®-Phenol P/C/I, Carl Roth GmbH &Co KG, Karlsruhe; pH 7,5-8; mit TE-Puffer gesättigt) versetzt. Die dabei entstehenden zwei Phasen wurden durch vorsichtiges, mehrmaliges Kippen des Eppendorfgefäßes vermischt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation (10000 g; 10 min; Raumtemperatur). Dann wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen, da sie die DNA enthält. Je nach Stärke der Proteinverunreinigung musste dieser Extraktionsschritt 2-3 mal durchgeführt werden. Durch erneutes Waschen der DNA-haltigen wässrigen Phase mit einem Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (24:1, v/v) im Verhältnis 2:1 wurden eventuell vorhandene Phenolreste entfernt.

Ethanolfällung von Nukleinsäuren (nach Wallace (1987), modifiziert)
Einer wässrigen DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen einer Natriumacetatlösung (3 M; pH 5,4) zugegeben. Anschließend wurde noch das 2,5-fache Volumen eiskalten Ethanols (96 %; v/v) beigegeben. Die DNA präzipitierte dann während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die gefällte Nukleinsäure abzentrifugiert (12000 g; 30 min; 4 °C). Das erhaltene Sediment wurde dann mit eiskaltem Ethanol (70 %; v/v) gewaschen und in einem SpeedVac Concentrator SVC 100H

(Bachofer GmbH, Reutlingen) getrocknet. Die so gereinigte DNA wurde in 50-100 µl sterilem Wasser aufgenommen und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.4.8 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle nukleinsäurehaltiger Lösungen

DNA-Konzentrationen wurden durch Analyse von Verdünnungsreihen in Stufen von 1:5 im Agarosegel bestimmt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid wurde angenommen, dass die letzte gerade noch sichtbare Bande einer Menge von 10 ng im Auftragevolumen entspricht. Daraus konnte durch Umrechnung der Verdünnung und unter Berücksichtigung der Volumina die DNA-Menge in der unverdünnten Ausgangslösung berechnet werden. Eine genauere Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption. In einer Quarzglasküvette (d = 10 mm, 70 µl Volumen) wurde die DNA- oder RNA-Probe bei 260 nm gemessen. Anhand eines Extinktionskoeffizienten (OD_{260} = 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA/ml und 40 µg einzelsträngiger RNA/ml) konnte daraus die Konzentration von DNA und RNA berechnet werden Die Berechnung der DNA- und RNA-Konzentration einer unbekannten Lösung waren wie folgt:
DNA (µg/ml) = (OD_{260}) x (Verdünnungsfaktor) x (50 µg DNA/ml) / (1 OD_{260})
RNA (µg/ml) = (OD_{260}) x (Verdünnungsfaktor) x (40 µg RNA/ml) / (1 OD_{260})
Zur Kontrolle der Reinheit wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 230 nm (weitere organische Verunreinigungen) gemessen und der Quotient aus A_{260} und A_{280} bzw. A_{260} und A_{230} gebildet. Die Werte für Protein- und phenolfreie Lösungen liegen zwischen 1,8 und 2,0. Höhere Werte deuten auf eine entsprechende Verunreinigung hin.

3.4.9 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Analytischer Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen
Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA hydrolysieren und damit das Biopolymer in kurze Fragmente schneiden. Für den analytischen Verdau von DNA werden verschiedene Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Das bedeutet, dass alle verwendeten Restriktionsendonukleasen ohne den Verbrauch von ATP

funktionsfähig sind, ihre Schnittstellen innerhalb der Erkennungssequenz liegen und damit genau definiert sind. Es wird zwischen Restriktionsendonukleasen, die einzelsträngige Überhänge („sticky ends“) hinterlassen, und solchen, die glatte Enden („blunt ends“) schneiden, unterschieden. Die verwendeten Nukleasen *Dra*I, *Eco*47III, *Eco*RV, *Ehe*I, *Pvu*II und *Sma*I hinterlassen glatte Enden. Für den Verdau von DNA wurde ein 20 µl Ansatz gewählt (siehe Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15: Zusammensetzung eines DNA-Restriktionsendonukleaseverdaus

Substanz	**Menge**
DNA	2 µg
Puffer (10-fach) [1)]	2 µl
Enzym (10 U/µl)	1 µl
H_2O	ad 20 µl

[1)] Die Puffer wurden vom Hersteller passend für jede einzelne Restriktionsendonuklease mitgeliefert.

Ligation restringierter DNA-Fragmente

Zur Klonierung von DNA-Fragmente in Vektoren wurden entweder glatte Enden oder überhängende Enden der Nukleinsäuren verwendet. Vektoren wurden außerdem dephosphoryliert, um ihre Religation zu verhindern. Bei überhängenden Enden wurden Vektor und zu klonierende DNA mit der gleichen Restriktionsendonuklease behandelt, um kompatible Enden dieser Nukleinsäuren zu erzeugen. Vor der Rekombination wurden dann die DNA-Fragmente und die Vektoren im 0,8 %igen Agarosegel gereinigt und daraus isoliert. Im Ligationsansatz kommen Insert und Vektor zusammen. Sie werden durch die im Ansatz enthaltene T4-Ligase kovalent miteinander verbunden.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

Substanz	**Menge**
Vektor (dephosphoryliert)	3 pmol DNA-Enden
DNA-Fragment („Insert“)	10 pmol DNA-Enden
Ligationspuffer (10-fach)	2 µl
T4-Ligase (1 U/µl)[1)]	1 µl
H_2O	ad 20 µl

[1)] Bei der Klonierung von „blunt-end“ DNA-Fragmenten wurde T4-Ligase mit 5 U/µl eingesetzt.

Ligation von DNA-Fragmenten in pJET1.2/blunt

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in die „multiple cloning site“ (MCS) des Vektors pJET1.2/blunt wurde folgender Ligationsansatz (Tabelle 3.17) verwendet.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden

Substanz	Menge
Verdaute DNA / PCR-Produkt (glatte Enden)	1 µl
Reaktionspuffer (2-fach)	5 µl
pJET 1.2/blunt (10 µM)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	0,5 µl
H_2O	ad 20 µl

Die Ligation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' verwendet.

Ligation von Oligonukleotidadaptern an DNA-Fragmente

Um eine Adapter-PCR durchzuführen, müssen zunächst Oligonukleotidadapter hergestellt werden. Dazu werden jeweils 100 pmol der zwei teilweise komplementären Oligonukleotide WalkAd_up und WalkAd_down (Sequenzen siehe Tabelle 3.14) im Verhältnis 1:1 vermischt und im Thermoblock einer PCR-Maschine 5 Minuten lang bei 80 °C denaturiert. Anschließend folgte ein langsames Abkühlen von 80 °C auf Raumtemperatur in 20 Minuten. Beim Abkühlen lagern sich die Oligonukleotide an den komplementären Stellen zusammen. Nach dem Zusammenlagern der Oligonukleotide wurden diese an vollständig verdaute chromosomale DNA ligiert. Die DNA wurde dabei mit Restriktionsenzymen, die glatte Enden liefern, verdaut. Für die Ligation wurde folgender Ansatz verwendet (Tabelle 3.18):

Tabelle 3.18: Ansatz zur Ligation von Oligonukleotidadaptern an DNA-Fragmente

Substanz	Menge
Verdaute chromosomale DNA	2 µg
T4 Ligase Puffer (10-fach)	5 µl
Oligonukleotide (100 µM)	2 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	1 µl
H_2O	ad 50 µl

Die Ligation fand bei Raumtemperatur für zwei Stunden statt. Anschließend wurden

die Ligationsansätze mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corp., Orange, USA) aufgereinigt, um überschüssige Oligonukleotide zu beseitigen.

Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation eines geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dieser Vektor mit alkalischer Phosphatase aus Kälbermagen (CIAP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Der Dephosphorylierungsansatz ist in Tabelle 3.19 aufgelistet. Der Ansatz wurde gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase in 15 min bei 85 °C inaktiviert.

Tabelle 3.19: Zusammensetzung eines Ansatzes zur Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden

Substanz	**Menge**
Linearisierte Vektor-DNA	1 µg
CIAP-Puffer (10-fach)	2 µl
CIAP (1 U/µl)	1 µl
H_2O	ad 20 µl

DNase-Verdau

Um eine RT-PCR aus isolierter RNA ausführen zu können, müssen zunächst Überreste chromosomaler DNA aus der RNA-Präparation entfernt werden. Das geschieht durch einen Verdau mit einer Desoxyribonuklease. Der Ansatz ist in Tabelle 3.20 aufgeführt. Hier wurde die Baseline-Zero™ DNase (Epicentre Biotechnologies, Madison, Wisconsin, U.S.A.) und eine rekombinante DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Das Ansatzvolumen betrug 50 µl.

Tabelle 3.20: Ansatz für eine DNase Behandlung isolierter Gesamt-RNA

Substanz	**Menge**
RNA	30 µg
DNase-Puffer (10-fach)	5 µl
DNAse Baseline Zero (2 U/µl)	1,5 µl
Rekombinante DNase I (2 U/µl)	1,5 µl
DEPC-H_2O	ad 50 µl

3.4.10 Herstellung von cDNA aus RNA und *In vitro*-Synthese von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Herstellung von cDNA aus mRNA

Für die Herstellung von cDNA aus mRNA wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Dieser Reagenziensatz enthält neben der rekombinanten RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase und den RiboLock™ RNase-Inhibitor noch „Random Hexamer“ Primer. Durch die Hexamere ist es möglich mit der Reversen Transkriptase die gesamte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Mit Hilfe der DNA-Polymerase-Aktivität wird dann aus der einzelsträngigen cDNA doppelsträngige cDNA hergestellt.

Für die Herstellung von cDNA wurde ein 20 µl Ansatz gewählt. Es wurden zunächst die RNA, die „Random Hexamer“ Primer, dNTPs und DEPC-Wasser vermischt (Tabellen 3.21 und 3.22).

Tabelle 3.21: Ansatz für die Herstellung von cDNA aus isolierter Gesamt-RNA

Substanz	Menge
RNA (DNase-verdaut)	100 ng
10 mM dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid)	1 µl
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	1 µl
DEPC-H_2O	ad 14,5 µl

Dieser Ansatz wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis für 2 Minuten abgekühlt. Dieser Schritt ermöglicht die effiziente Anlagerung der Hexamere über die gesamte RNA. Anschließend wurden dem Ansatz (Tabelle 3.21) die in Tabelle 3.22 aufgeführten Substanzen zugesetzt. Nach der Zugabe betrug das Ansatzvolumen 20 µl.

Tabelle 3.22: Zusätzliche Substanzen zur Herstellung von cDNA aus mRNA

Substanz	Menge
Reaktionspuffer (5-fach)	4 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

Zur Anlagerung der Hexamere wurde der Ansatz zunächst für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reverse Transkriptase durch 5-minütiges Erhitzen auf 85 °C inaktiviert. Die Lagerung

der cDNA erfolgte bei -20 °C. Die so hergestellte cDNA konnte anschließend zur Analyse durch RT-PCR oder qRT-PCR (Kapitel 3.4.10.1) eingesetzt werden.

In vitro-Synthese von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine weit verbreitete molekularbiologische Methode, die eine gezielte Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro* erlaubt. Dabei wird das Molekül theoretisch 2^n-fach vermehrt, wobei „n“ für die Anzahl der durchlaufenen Zyklen steht. Hierfür werden spezifisch hergestellte Oligonukleotide („Primer“) an die Matrizen-DNA gebunden. An diese bindet die Polymerase und der komplementäre Strang wird von ihrem 3'-Ende ausgehend synthetisiert.

PCR zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen

Im ersten Schritt einer PCR wird zunächst das doppelsträngige Matrizenmolekül erhitzt und damit denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich spezifische Oligonukleotide (Primer) an die nun einzelsträngige Matrize. Im dritten Schritt folgt die DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. In dieser Arbeit wurde neben der Taq-Polymerase die Phusion™ DNA Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) verwendet. Die Phusion DNA Polymerase ist ein rekombinantes Fusionsprotein, das in *Escherichia coli* hergestellt wird. Es zeichnet sich durch optimierte Eigenschaften aus. So ist die Fehlerrate mit 4 x 10^{-7} etwa 50-fach geringer als bei der Taq-Polymerase. Auch die Prozessivität ist mit 15-30 s/kBp etwa 6-fach schneller als die der Taq-Polymerase. Eine zusätzliche „hot start“-Modifikation aktiviert die Polymerase erst bei hohen Temperaturen, wodurch weniger Nebenprodukte in der PCR gebildet werden. Die mit OligoCalculator oder Primer 3 plus (siehe Tabelle 6.1) in den voreingestellten Bedingungen berechneten Hybridisierungstemperaturen wurden um 5 °C erhöht, wodurch eine weitere Spezifität der PCR-Reaktion erzielt wird. Ausserdem wurde in dieser Arbeit für Routine-Amplifikationen die DreamTaq™ DNA-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Für eine Standard-PCR wurde folgender 20 µl-Reaktionsansatz verwendet:

Tabelle 3.23: Versuchsansatz für eine Standard-PCR

Substanz	**Menge**
DNA-Matrize	1 µl
Primer A (20 µM Stammlösung)	1 µl
Primer B (20 µM Stammlösung)	1 µl
Phusion Flash 2x MasterMix oder DreamTaq™ Green 2x Mastermix	10 µl
H_2O	ad 20 µl

Tabelle 3.24: Temperaturprofil für eine Standard-PCR mit Phusion Flash DNA Polymerase

Schritte	**Temperatur in °C**	**Zeit**	**Anzahl der Zyklen**
Initiale Denaturierung	98	1 Min	1
Denaturierung	98	5 s	
Hybridisierung	siehe Tabelle 3.14	10 s	35
Elongation	72	15 s/kb	
Finale Elongation	72	1 Min	1

Tabelle 3.25: Temperaturprofil für eine Standard-PCR mit DreamTaq™ DNA-Polymerase

Schritte	**Temperatur in °C**	**Zeit**	**Anzahl der Zyklen**
Initiale Denaturierung	95	3 Min	1
Denaturierung	94	20 s	
Hybridisierung	siehe Tabelle 3.14	20 s	35
Elongation	72	1 Min/kb	
Finale Elongation	72	5 Min	1

Herstellung digoxigeninmarkierter, doppelsträngiger DNA-Sonden

Doppelsträngige DNA wurde mit Hilfe des „PCR-DIG Labeling Mix“ (Roche Applied Biosciences, Mannheim) digoxigeninmarkiert. Es handelt sich hierbei um eine Markierung der Sonden durch Einbau von DIG-11-dUTP während einer PCR-Amplifikation. Die immunologische Detektion der hybridisierten Sonden erfolgte später mit monoklonalen Anti-Digoxigenin-AP-Antikörpern (Anti-DIG konjugiert mit alkalischer Phosphatase). Die Sonden wurden aus chromosomaler *Sporomusa ovata* H1 DNA mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe Tabelle 3.14) amplifiziert, welche ein PCR-Amplifikat von etwa 300 Bp ergaben. Anschließend wurden die Amplifikate durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dort war zu erkennen, dass die markierte Sonde im Vergleich zur unmarkierten Sonde ein langsameres Laufverhalten zeigte. Nach der Aufreinigung der markierten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel konnten diese als Sonden für eine „Northern blot “-Hybridisierung verwendet werden; sie wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Der Reaktionsansatz zur Herstellung digoxigenin-

markierter Sonden ist in Tabelle 3.26 dargestellt. Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die DreamTaq™ DNA-Polymerase mit dem PCR-Programm aus Tabelle 3.25 verwendet.

Tabelle 3.26: PCR-Ansatz zur Herstellung digoxigeninmarkierter DNA-Sonden

Reagenz	**Menge**	**Endkonzentration**
10 x PCR-Puffer (15 mM $MgCl_2$)	5 µl	1,5 mM
dUTP-labeling Mix	5 µl	0,2 mM
Primer A (20 µM Stammlösung)	1 µl	0,1 µM
Primer B (20 µM Stammlösung)	1 µl	0,1 µM
DreamTaq™ DNA-Polymerase	1 µl	1 U/µl
DNA-Matrize	1 µl	0,5 ng/µl
H_2O	ad 50 µl	

Adapter-PCR zur Identifizierung von Corrinoid-Riboschaltern und flankierender Genombereiche

(a) Identifizierung von Corrinoid-Riboschaltern in *Sporomusa ovata* H1.

Zur Identifizierung von Corrinoid-Riboschaltern und ihrer flankierender Genombereiche durch „genome walking“ wurde eine Adapter-PCR durchgeführt. Dazu wurden Oligonukleotidadapter an vollständig verdaute chromosomale DNA ligiert (Kapitel 3.4.9). Anschließend wurde mit der ligierten DNA eine PCR durchgeführt. Als Primerpaar diente dabei der „A_Primer2“, welcher komplementär zur Nukleotidsequenz des Oligonukleotidadapters ist, und ein weiterer nukleotidsequenzspezifischer Primer aus dem 5’-Bereich des jeweils zu untersuchenden Gens aus *Sporomusa ovata* H1. Der PCR-Ansatz entspricht der Tabelle 3.23, das Temperaturprofil ist in Tabelle 3.27 dargestellt.

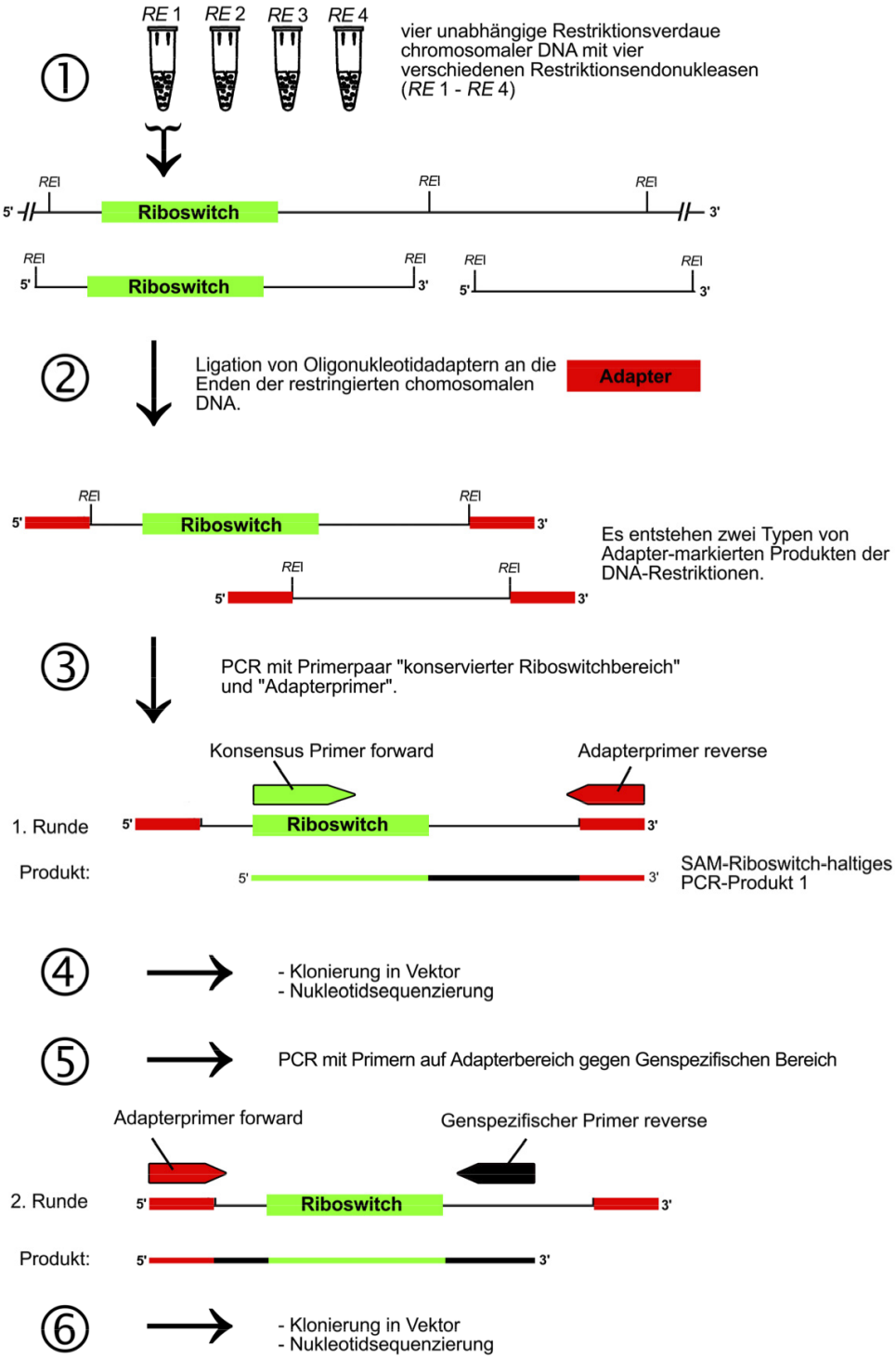


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Methode zur eindeutigen Identifizierung von B_{12}-Riboschalter in chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 durch Adapter-PCR (Gallinger, 2009).

Zur Identifizierung der Corrinoid-Riboschalter wurde zunächst ein Primer aus den hoch konservierten B_{12}-Riboschalter-Nukleotidsequenzen vollständig sequenzierter Genome abgeleitet. Dazu wurden aus nah verwandten Bakterien die 5'-untranslatierten Regionen von Genen, die für den Vitamin B_{12}-Transport oder die Vitamin B_{12}-Biosynthese kodieren, auf B_{12}-Riboschalter hin untersucht. Die Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe der rfam-Datenbank analysiert und durch clustalW2-Algorithmus miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.5). Auf diese Weise wurden 12 B_{12}-Riboschalter aus dem Phylum der Firmicutes miteinander verglichen und die Konsensus-Sequenz ihrer hoch konservierten Nukleotidsequenzabschnitte bestimmt.

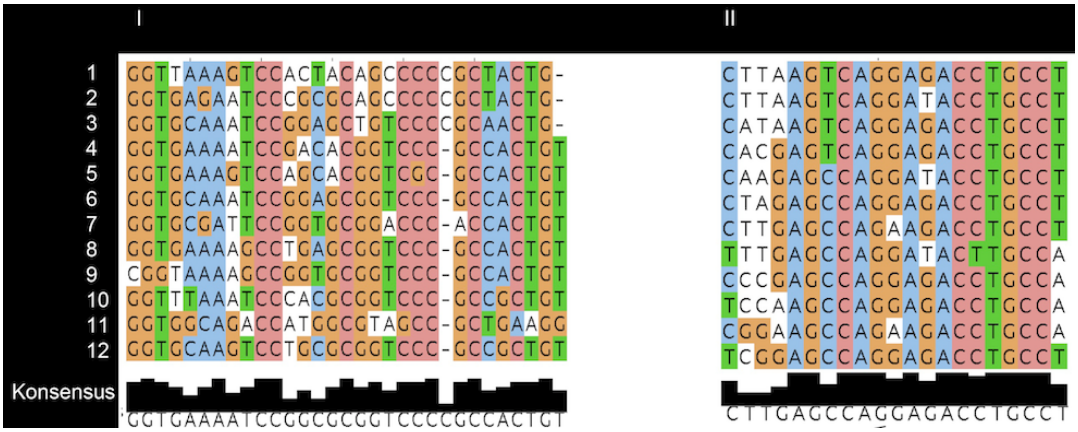


Abbildung 3.5: Ableitung der Konsensus-Sequenz von Vitamin B_{12}-Riboschaltern aus Nukleotidsequenzen vollständig sequenzierter Genome aus dem Phylum der Firmicutes
Dargestellt sind zwei der hochkonservierten Nukleotidsequenzbereiche eines Vitamin B_{12}-Riboschalters. Bereich I liegt am 5'-Ende, Bereich II am 3'-Ende der Riboschalter.
1-12: Organismen und Gene, deren 5'-UTR für den Vergleich verwendet wurden. 1: *Bacillus halodurans*, *nrdA*; 2: *Bacillus halodurans*, *cobT*; 3: *Bacillus halodurans*, *btuF*; 4: *Bacillus halodurans*, *metE*; 5: *Bacillus halodurans*, *achX*; 6: *Bacillus subtilis*, *btuF*; 7: *Clostridium acetobutylicum*, *cbiM*; 8: *Clostridium perfringens*, *cbiK*; 9: *Clostridium perfringens*, *cbiM*; 10: *Thermoanaerobacter tengcogensis*, *btuR*; 11: *Carboxydothermus hydrogenoformans*, *cobT*; 12: *Desulfitobacterium hafniense*, *cobT*

Zwei längere Nukleotidbereiche waren besonders hoch konserviert und waren deshalb geeignet, um Oligonukleotide für die Adapter-PCR Analyse abzuleiten. Der Bereich I befand sich am 5'-Ende der B_{12}-Riboschalter; von dieser Nukleotidsequenz wurde das Oligonukleotid Ribo1_lang (ggtgmaaatccgghgcggtcccgccactgt) abgeleitet. Der Bereich II befand sich am 3'-Ende der Riboschalter-Sequenz. Dieser Bereich ist hoch konserviert und wird in der Literatur (Vitreschak u. a., 2003) deshalb als B_{12}-Box bezeichnet. Aus der Konsensus-Sequenz dieses Bereichs wurde das Oligonu-

kleotid B12-Box_fw (agycaggagacctgcc) abgeleitet. Zur Identifizierung der Corrinoid-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 wurde Ribo1_lang zusammen mit dem adapterspezifischen A_Primer2 verwendet. Für diese Experimente wurde ausschließlich die Phusion™ DNA Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) eingesetzt.

Tabelle 3.27: Temperaturprofil für eine Adapter-PCR

Schritte	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	1 Min	1
Denaturierung	98	10 s	
Hybridisierung	siehe Tabelle 3.14	20 s	35
Elongation	72	90 s	
Finale Elongation	98	5 Min	1

(b) Adapter-PCR zur Amplifikation flankierender Nukleotidsequenzbereiche („genomic walking“)

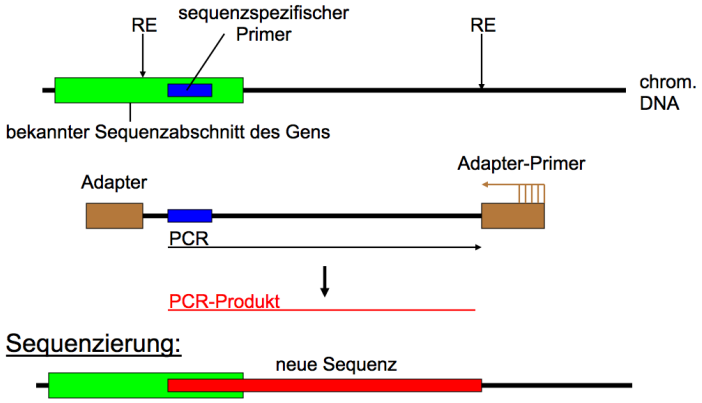


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Methode zur Identifizierung von flankierenden Nukleotidsequenzbereichen in chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 durch Adapter-PCR („genomic walking“).

Die beschriebene Adapter-PCR Technik wurde ebenfalls angewendet, um ausgehend von einer bekannten Nukleotidsequenz die flankierenden Genombereiche stromaufwärts und stromabwärts in *Sporomusa ovata* H1 zu identifizieren (siehe Abbildung 3.6). Dazu wurde ein sequenzspezifisches Oligonukleotid entworfen, welches mit dem bereits bekannten Nukleotidsequenzabschnitt hybridisiert. Zur Identifizierung

stromabwärts liegender Nukleotidsequenzen sollte der Primer etwa 200 Bp vom 5'-Ende, zur Identifizierung stromaufwärts liegender Bereiche etwa 200 Bp vom 3'-Ende der bekannten Nukleotidsequenz hybridisieren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.14 aufgelistet. Mit dem nukleotidsequenzspezifischen Primer wurde zusammen mit dem adapterspezifischen A_Primer2 eine Adapter-PCR durchgeführt. Als Matrize wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaute und adapterligierte chromosomale DNA von *Sporomusa ovata* H1 verwendet. Nach einer Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte wurden Banden, die größer als 1000 Bp waren ausgeschnitten und nukleotidsequenziert (Kapitel 3.4.14). Die Nukleotidsequenzen konnten anschließend durch die Überlappung von etwa 200 Bp der bereits bekannten Nukleotidsequenz zugeordnet und an diese angefügt werden.

3.4.10.1 Expressionsanalyse durch RT-PCR

Transkriptionsstartbestimmung durch 5'-RACE PCR (5'-rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction)

Für die Bestimmung des 5'-Transkriptionsstartpunktes wurde der 5'/3'-RACE Kit, 2nd Generation der Firma Roche verwendet. Bei der 5'-RACE wird ein interner reverser Primer genutzt, der spezifisch auf die mRNA-Nukleotidsequenz des zu untersuchenden Gens gerichtet ist. Mit diesem Primer wird aus dieser mRNA als Matrize und der Reversen Transkriptase cDNA synthetisiert. Die Polymerisation geschieht bis zum 5'-Ende der mRNA. Daraufhin wird mit einer terminalen Nukleotidyltransferase und dATP ein poly(A)-Schwanz an das 5'-Ende der cDNA angehängt. Danach wird die mRNA-Matrize durch einen Verdau mit der mitgelieferten RNase abgebaut. An diesen cDNA-poly(dA)-Schwanz wird nun ein Oligo (dT) Ankerprimer angelagert. Daraufhin wird eine zweite PCR mit einem weiteren internen reverse-Primer und dem Ankerprimer durchgeführt. Das so entstandene Produkt wird dann in einen Vektor ligiert, transformiert, vervielfältigt und aufgereinigt. Daraufhin wird es mit Vektor-spezifischen Primern sequenziert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proben wurden sofort nach jedem Versuchsschritt auf Eis gestellt. Bei allen Versuchsschritten wurden Latexhandschuhe getragen, da eine Kontamination mit RNase die vollständige Degradierung der RNA zur Folge hätte. Das Pipettierschema dieses Versuches ist in Tabelle 3.28 zu sehen.

Der Ansatz wurde anschließend für 60 Minuten bei 55 °C inkubiert. Zur Aufreinigung der gebildeten cDNA wurde der „High Pure PCR Product Purification Kit“ benutzt.

Tabelle 3.28: Versuchsansatz zur cDNA-Synthese[1)]

Substanz	Menge
cDNA Synthesepuffer	4 µl
Deoxynukleotidmischung	2 µl
cDNA Syntheseprimer SP1 (12,5 µM)	1 µl
RNA	0,2 - 2 µg
Reverse Transkriptase	1 µl
DEPC-H_2O	ad 20 µl

[1)] Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 55 °C inkubiert.

Jedoch wurde hierbei das spezielle Protokoll verwendet, welches auf den 5'/3'-RACE Kit, 2nd Generation angepasst ist.

1. Zugabe von 100 µl Bindungspuffer zu 20 µl cDNA und kurzes Vortexen.
2. Der gesamte Ansatz wird dann auf ein Aufreinigungssäulchen pipettiert und für 30 Sekunden bei 8000 g in ein Eppendorf Reaktionsgefäß zentrifugiert.
3. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µl Waschpuffer in das Filterhütchen pipettiert und für 30 Sekunden bei 6000 bis 8000 g zentrifugiert.
4. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und es wurde ein weiterer Waschschritt mit 200 µl Waschpuffer durchgeführt, bei dem für 2 Minuten bei 6000 bis 8000 g zentrifugiert wurde.
5. Das Filterhütchen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gereinigte cDNA mit 50 µl Elutionspuffer bei 8000 g 30 Sekunden lang eluiert.

Im folgenden Schritt wird mit einer terminalen Transferase an die aufgereinigte cDNA ein Poly-A-Schwanz synthetisiert.

Tabelle 3.29: Versuchsansatz für das polyA-tailing einer cDNA

Substanz	Menge
aufgereinigte cDNA	10 µl
dATP (2 mM)	2,5 µl
Reaktionspuffer (10-fach konzentriert)	2,5 µl
DEPC-H_2O	ad 20 µl

1. Nach einer kurzen Zentrifugation zum Sammeln der Lösungen, wurde der Ansatz für 3 Minuten bei 94 °C inkubiert und danach wieder auf Eis gestellt.
2. Es wurden 1 µl Terminale Transferase (rekombinant, 80 U/µl) zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 70 °C geheizt, um die Transferase zu inaktivieren.

In den folgenden Schritten wurde die cDNA mit Poly-A-Schwanz durch eine PCR vervielfältigt.

Tabelle 3.30: Versuchsansatz für eine PCR auf cDNA mit Poly-A-Schwanz

Substanz	Menge
cDNA mit Poly-A Schwanz	5 µl
Oligo dT-Ankerprimer	1 µl
Genspezifischer Primer (12,5 µM)	1 µl
Desoxynukleotide	1 µl
Phusion Flash 2x MasterMix	10 µl
DEPC-H_2O	ad 20 µl

Das Temperaturschema für die PCR ist in Tabelle 3.31 aufgeführt.

Tabelle 3.31: Temperaturprofil der PCR zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch 5'-RACE

Schritte	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	1 Min	1
Denaturierung	98	5 s	
Hybridisierung	60	10 s	35
Elongation	72	30 s	
Finale Elongation	98	1 Min	1

Das erhaltene PCR-Produkt wird nun über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Mit einem UV-Detektor (312 nm Anregungswellenlänge) werden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Produkte werden ausgeschnitten, aufgereinigt, in den Vektor pJET 1.2/blunt kloniert und nukleotidsequenziert (Kapitel 3.4.14).

Real-time-quantitative RT-PCR am LightCycler™480

Die real-time-quantitative PCR (qRT-PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und basiert damit auf dem Prinzip einer normalen PCR. Im Gegensatz zu dieser können mit Hilfe einer qRT-PCR jedoch genaue Aussagen über die Menge der neusynthetisierten, doppelsträngigen DNA während des Vervielfältigungsprozesses gemacht werden. Das geschieht durch Messung der zunehmenden Fluoreszenz des in

die gebildeten PCR-Produkte interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Ende jedes Elongationsschritts. Zur Überprüfung des PCR-Produkts wurde am Ende der PCR eine Schmelzkurve erstellt. Dabei wird die Temperatur schrittweise von 75 auf 98 °C erhöht und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Durch das Aufschmelzen des gebildeten PCR-Amplifikats wird der interkalierte Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I freigesetzt, was zu einer starken Abnahme der Fluoreszenz bei Erreichen des Schmelzpunktes führt. Dadurch kann auf eventuell gebildete Nebenprodukte oder Primer-Dimere geschlossen werden, welche das Ergebnis der qRT-PCR verfälschen würden. Im optimalen Fall sollte sich beim Vorhandensein eines einheitlichen Amplifikats ein einheitlicher Schmelzpunkt ergeben.

Es wurden Verdünnungsreihen (1/5; 1/25; 1/125; 1/625) der cDNA-Proben erstellt, um die PCR-Effizienz (aus der Standard-Kurve) zu bestimmen. Theoretisch sollte dieser Wert = 2 ergeben, d.h. pro Zyklus wird die Amplifikatmenge (=Fluoreszenz) verdoppelt. Da das in der Praxis allerdings nicht der Fall ist, muss der Wert erst experimentell ermittelt werden, indem die Cp-Werte in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen verglichen werden: Der Cp-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Kurve aus dem Fluoreszenzhintergrund hervortritt.

$$Effizienz = 10^{(-1/Steigung\ der\ Standard-Geraden)} \tag{3.3}$$

Die Bestimmung des Expressionsverhältnisses erfolgte durch die Bestimmung der einzelnen Cp-Werte der jeweiligen Proben (ZG = Zielgen, RG = Referenzgen), wobei darauf zu achten war, dass immer dieselbe Verdünnung der cDNA für diese Berechnungen eingesetzt wurde. Das Expressionsverhältnis wurde nach der $\triangle\triangle$ Cp-Methode wie folgt berechnet (Pfaffl, 2001):

$$Expressionsverhltnis = \frac{E_{ZG}{}^{(Cp_{ZG} - Cp_{ZG})}}{E_{RG}{}^{(Cp_{RG} - Cp_{RG})}} \tag{3.4}$$

Für die Reaktion wurde jeweils ein 20 µl Ansatz gewählt. Die entsprechenden Ansätze für die cDNA-Proben sind in Tabelle 3.32 dargestellt.

Tabelle 3.32: qRT-PCR Ansatz für cDNA Proben

Substanz	Menge
cDNA-Matrize	5 µl
Primer A (10 µM)	1 µl
Primer B (10 µM)	1 µl
DyNAmo Flash 2x MasterMix	10 µl
H_2O	ad 20 µl

Tabelle 3.33: Temperaturprofil für eine qRT-PCR

Schritte	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	7 Min	1
Denaturierung	98	10 s	
Hybridisierung	siehe Tabelle 3.14	10 s	45
Elongation	72	15 s	
Finale Elongation	98	5 Min	1
Schmelzkurve	75-98 (Gradient)	2 Min	1

3.4.11 Analyse von mRNA durch das „Northern blot“-Verfahren

Vakuumtransfer von RNA auf Nylonmembranen

Zur Bestimmung von Transkriptlängen wurde das „Northern blot“-Verfahren angewendet (Thomas, 1980). Hierzu wurden 10 µg Gesamt-RNA durch eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4.12) elektrophoretisch getrennt. Die RNA wurde danach durch Vakuum-Blot-Verfahren („Blotting“-Apparatur (VacuGene™ XL Blottingsystem, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg) und Vakuumpumpe (VacuGene™ Pump, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg)) auf eine Nylonmembran (Biodyne® B; Pall GmbH, Dreieich) übertragen. Die poröse Trägerplatte der Blotting-Apparatur wurde mit Wasser benetzt und darauf die Nylonmembran gelegt. Das Agarosegel wurde anschließend luftblasenfrei auf die befeuchtete Nylomembran gelegt. Durch Auflage einer Plastikmaske wurde die Blotting-Apparatur abgedichtet. Anschließend wurde das Agarosegel mit 20x SSC-Puffer (3.34) überschichtet. Der Transfer der RNA-Proben auf die Nylonmembran erfolgte durch Anlegen eines Unterdrucks von 5,5 hPa für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Das Gel wurde dabei alle 15 min mit 20x SSC-Puffer (3.34) benetzt. Nach dem Transfer der RNA auf die Nylonmembran wurde diese luftgetrocknet. Die kovalente Bindung der RNA an die Nylonmembran erfolgte mit Hilfe eines „UV-Crosslinkers“ (Ultraviolet Crosslinker, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) mit 5 x 10 µJ/cm^2 bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm.

Tabelle 3.34: Zusammensetzung des SSC-Puffers[1)] (20x)

Substanz	Menge	Kontenztration
NaCl	175,32 g	3 M
Natriumcitrat x 2 H_2O	88,23 g	0,3 M
H_2O	ad 1000 ml	

[1)] Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Hybridisierung von RNA mit Digoxigenin-markierten DNA Sonden

Vor der Hybridisierung der auf der Nylonmembran gebundenen RNA mit Digoxigenen-markierten DNA-Sonden wurden unspezifische Bindestellen mit der Prähybridisierungslösung (Tabelle 3.35) geblockt. Dazu wurde die Nylonmembran in ein Glasröhrchen mit 20 ml Prähybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 50 °C in einem Hybridisierungsofen (Biometra OV 2, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen). Die Digoxigenin-markierten DNA-Sonden wurden vor der Hybridisierung für 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert. Es wurden 10 ml der Prähybridisierungslösung abgenommen und 2 µl Sonde pro ml Prähybridisierungslösung in das Glasröhrchen gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 50 °C in einem Hybridisierungsofen statt. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran zweimal für 15 min bei Raumtemperatur mit 20 ml Waschpuffer 1 (3.36) und einmal für 15 min bei 50 °C mit 20 ml Waschpuffer 2 (3.37) gewaschen. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis der „DIG-markierten“ DNA-Sonden.

Tabelle 3.35: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung

Substanz	Menge	Kontenztration
Formamid	10 ml	0,25 mM
20x SSC-Puffer	5 ml	
Laurylsarcosin-Lösung (10 % [w/v])	0,2 ml	1,7 mM
SDS-Lösung (10 % [w/v])	40 µl	0,7 mM
Blockierungs-Stammlösung (10x)	4 ml	2 % (w/v)
H_2O	ad 20 ml	

Zusammensetzung der Laurylsarcosin-Lösung (10 % [w/v]):

20 g Laurylsarcosin wurden in 200 ml H_2O gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 0,17 M.

Tabelle 3.36: Zusammensetzung des Waschpuffers 1 für die „Northern blot“-Analyse

Substanz	Menge	Kontenztration
20x SSC-Puffer	25 ml	
SDS-Lösung (10 % [w/v])	2,5 ml	35 mM
H_2O	ad 250 ml	

Tabelle 3.37: Zusammensetzung des Waschpuffers 2 für die „Northern blot“-Analyse

Substanz	Menge	Kontenztration
20x SSC-Puffer	1,25 ml	
SDS-Lösung (10 % [w/v])	2,5 ml	35 mM
H_2O	ad 250 ml	

Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Zur Detektion Digoxigenin-markierter Sonden (Kapitel 3.4.10) wurde Digoxigenin-spezifischer, monoklonaler Antikörper (Anti-DIG-Ap, GE-Healthcare Europe GmbH, Freiburg) verwendet. Die Antikörper enthalten ausserdem eine alkalische Phosphatase als Fusionsprotein. Durch die Zugabe des Substrates CSPD® wird durch die alkalische Phosphatase-Aktivität dieses Substrat unter Emmission von Lichtquanten dephosphoryliert. Durch Auflage eines Röntgenfilms kann diese Lichtemmission durch Schwärzung des Films detektiert werden. Alle Schritte der Detektion von Digoxigenin-markierten Sonden fanden bei Raumtemperatur statt. Zur Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden (Kapitel 3.4.10) wurde die Nylonmembran in einem Glasröhrchen für 4 min mit 20 ml Waschpuffer 3 (Tabelle 3.38) gewaschen. Der Waschpuffer 3 wurde verworfen und die Membran für 30 min in 10 ml Blockierungslösung inkubiert. Zu den 10 ml Blockierungslösung wurden 2 µl der Antikörperlösung (75 mU/ml) gegeben. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 30 min. Anschließend wurde die Membran zweimal mit jeweils 50 ml Waschpuffer 3 (Tabelle 3.38) für 15 min gewaschen. Danach wurde die Membran mit 10 ml Detektionspuffer, dem 10 µl CSPD® (25 mM) zugegeben worden waren, inkubiert. Die Membran wurde danach getrocknet, zwischen zwei Kopierfolien gelegt und in eine lichtundurchlässige Expositionskassette gegeben. Darauf wurde in der Dunkelkammer der Röntgenfilm („AGFA CRONEX 5“-Film (Agfa-Gevaert N.V.; Leverkusen) aufgelegt. Der Film wurde bis zur gewünschten Signalstärke exponiert und anschließend entwickelt.

Zusammensetzung der Blockierungslösung (1x):
1 g Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics AG, Mannheim) wurden in 100 ml Maleinsäurepuffer durch ständiges Rühren bei 65 °C auf einem Heizblock gelöst.

Tabelle 3.38: Zusammensetzung des Waschpuffer 3 für die „Northern blot"-Analyse. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

Substanz	Menge	Kontenztration
Maleinsäure	2,32 g	0,1 M
NaCl	1,75 g	0,15 M
Tween 20	0,6 ml	0,3 % (v/v)
H_2O	ad 200 ml	

Tabelle 3.39: Zusammensetzung des Detektionspuffers für die „Northern blot"-Analyse. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt

Substanz	Menge	Kontenztration
Tris	2,42 g	0,1 M
NaCl	1,17 g	0,1 M
H_2O	ad 200 ml	

Tabelle 3.40: Zusammensetzung des Maleinsäurepuffers für die „Northern blot"-Analyse. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

Substanz	Menge	Kontenztration
Maleinsäure	1,16 g	0,1 M
NaCl	0,88 g	0,15 M
H_2O	ad 100 ml	

3.4.12 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse von DNA- und RNA-Präparationen wurden nicht-denaturierende Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurde aufgekochte Agarose in eine Gelkammer (eigene Herstellung) gegossen und mit einem Kamm zum Aussparen der Probentaschen versehen. Für längere Nukleinsäuren wurde 0,8 %ige Agarose, für Fragmente kleiner 1000 Bp wurde 2,5 %ige Agarose verwendet (jeweils gelöst in 1x TAE-Puffer). Nach dem Erkalten der Agarose wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer

überschichtet und der Kamm entfernt. Die zu untersuchende Probe wurde mit „Loading Dye“ (6 x DNA „Loading Dye“, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) versehen und in die Probentaschen pipettiert. Zur Längenbestimmung wurde in eine Tasche 3 µl eines Größenstandards (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, für RNA „RiboRuler™ High Range RNA-Ladder“, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) gegeben. Anschließend wurde eine Spannung von 10 V pro cm Elektrodenabstand, also etwa 130 V angelegt. Diese Spannung wurde solange aufrecht erhalten, bis die gewünschte Auftrennung erhalten ist. Orientierung bietet hierbei die bei etwa 500 Bp laufende Bromphenolblau-Front. Das Agarosegel wurde in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg Ethidiumbromid/ml TAE-Puffer) 10 - 20 Minuten gefärbt. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA, was die Fluoreszenz von Ethidiumbromid etwa um den Faktor 50 - 100 steigert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe einer Photodokumentationsanlage aufgenommen und ausgedruckt bzw. elektronisch als TIFF-Datei gespeichert.

Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von RNA wurden denaturierende Agarosegele verwendet. Diesen Gelen wurden denaturierende Agenzien zugegeben, die die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert, welche das Laufverhalten der RNA im Agarosegel beeinflussen. Das Trennprinzip und die Durchführung ist identisch mit der in Kapitel 3.4.12 beschriebenen nicht-denaturierenden Agarosegelelektrophorese, nur dass zur Trennung der RNA 1 %ige Agarosegele verwendet wurden.

Für ein 1%iges (w/v), denaturierendes Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 108 ml H_2O gegeben und autoklaviert, wodurch sich die Agarose im Wasser löste. Nach Abkühlen der Agarose auf etwa 50 °C wurden 27 ml 37%iges (v/v) Formaldehyd und 15 ml 10x MAE-Puffer (Tabelle 3.41) zugegeben. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen, die zuvor mit 0,1%iger NaOH gesäubert worden war. Die Polymerisation des Agarosegels erfolgte unter einen Abzug; danach wurde dieses Gel mit 1x MAE-Puffer überschichtet. Ein RNA-Größenstandard („RNA Ladder™ High Range“) sowie die Proben, die zuvor mit einem Volumen 2x RNA Loading Dye (Fermentas GmbH, St. Leon Roth) versetzt worden waren, wurden vor dem Auftragen für 15 Minuten bei 95 °C im Thermoblock denaturiert. Der Trennung der RNA-Proben im Agarosegel erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand für 2 Stunden. Anschließend wurde das

Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml 1x TAE-Puffer) gefärbt und mit Hilfe der Photodokumentationsanlage fotografiert.

Tabelle 3.41: Zusammensetzung des MAE-Puffers (10x)

Substanz	Menge	Kontenztration
MOPS	41,85 g	200 mM
Natriumacetat x 3 H_2O	6,8 g	50 mM
EDTA-Natriumsalz	1,86 g	5 mM
H_2O	ad 1000 ml	

3.4.13 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Kompetente Zellen von *Escherichia coli* wurden nach der Methode von Hanahan (1983) hergestellt, die eine Transformation durch einen Hitzeschock ermöglicht. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der $CaCl_2$-Methode. Das Hanahan-Verfahren erzielt jedoch eine bessere Transformationsausbeute. Für die Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen wurden zwei 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit jeweils 250 ml LB-Medium befüllt und mit 1 ml einer Übernachtkultur von *Escherichia coli* angeimpft. Diese Kultur wurde auf dem Rundschüttler bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD_{600} 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 15 min auf Eis gestellt und dann 10 Minuten lang (3000 g, 4 °C) abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Niederschläge vereinigt, in insgesamt 200 ml TFB I (Tabelle 3.42) resuspendiert und erneut 15 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut abzentrifugiert (5 min, 3000 g, 4 °C) und der Niederschlag mit den kompetenten Zellen in 20 ml TFB II (Tabelle 3.43) aufgenommen. Zur Lagerung wurden die kompetenten *Escherichia coli*-Zellen in 100 µl Aliquots aufgeteilt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt. Die so behandelten Zellen bleiben etwa 12 Monate lang kompetent.

Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Kompetente *Escherichia coli*-Zellen wurden mit Hitzeschock in 1 ml-Eppendorf Reaktionsgefäßen transformiert. Dazu werden 100 µl *Escherichia coli*-Zellen (etwa 3 x 1^9 Zellen/ml), die durch die Rubidiumchlorid-Methode kompetent gemacht und bei -

Tabelle 3.42: Zusammensetzung der Lösung TFB I. Die Lösung wurde mit 0,5 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser) und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Substanz	Menge	Endkonzentration
RbCl	2,42 g	100 mM
$MnCl_2$	2,0 g	50 mM
Kaliumacetat	0,588 g	30 mM
$CaCl_2$	0,294 g	10 mM
Glycerin	30 ml	15 % (v/v)
H_2O	ad 200 ml	

Tabelle 3.43: Zusammensetzung der Lösung TFB II. Die Lösung wurde mit 0,5 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt, sterilfiltriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Substanz	Menge	Endkonzentration
MOPS	0,21 g	10 mM
$CaCl_2$	1,1 g	75 mM
RbCl	0,121 g	10 mM
Glycerin	15 ml	15 % (v/v)
H_2O	ad 100 ml	

80 °C gelagert worden waren, zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µl des Ligationsansatzes, der etwa 30 ng des Vektors enthält, vermischt und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 2 Minuten auf dem Heizblock. Danach wurden die Zellen erneut für 3 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium (Tabelle 3.11) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 30 - 60 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler bei 250 Upm inkubiert. Nach der Transformation folgte die Selektion der positiven Klone. Dies geschah durch Ausplattieren auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/ ml). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die positiven Klone haben durch die Transformation eine Antibiotika-Resistenz erhalten und können auf den Antibiotika-haltigen Agarplatten wachsen.

3.4.14 Nukleotidsequenzierung

PCR-Produkte wurden nach der Auftrennung über die Agarosegelelektrophorese aus dem Agarosegel isoliert (Kapitel 3.4.7) und in 10 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die so eluierten PCR-Amplifikate wurden zusammen mit ihren flankierenden Oligo-

nukleotiden (Tabelle 3.14) zur Nukleotidsequenzierung an die Firma LGC Genomics, Berlin versandt.

Plasmide mit einklonierten DNA-Fragmenten wurden nach der Isolierung aus den Zellen in sterilem Wasser aufgenommen und in Konzentrationen von mindestens 200 ng/µl an die Firma LGC Genomics, Berlin versandt. Dort wurden die Nukleotidsequenzierung der in den Vektor pJET1.2/blunt einklonierten DNA-Fragmente mit dem Oligonukleotid pJET1.2-forward oder pJET1.2-reverse (Tabelle 3.14) durchgeführt.

3.4.15 Identifizierung von DNA-Bindestellen des transkriptionellen Regulators LuxR im Genom von *Sporomusa ovata* durch „Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung“ (SELEX)

Zur Identifizierung von potentiellen DNA-Bindestellen des transkriptionellen Regulators LuxR im Genom von *Sporomusa ovata* H1 wurde eine Methode angewandt, die auf dem SELEX-Verfahren (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) basiert (Djordjevic, 2007). Voraussetzung für diese Methode ist, dass das zu testende Protein in der Lage ist, an spezifische Nukleotidsequenzen im Genom zu binden. Der Ablauf der Methode ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

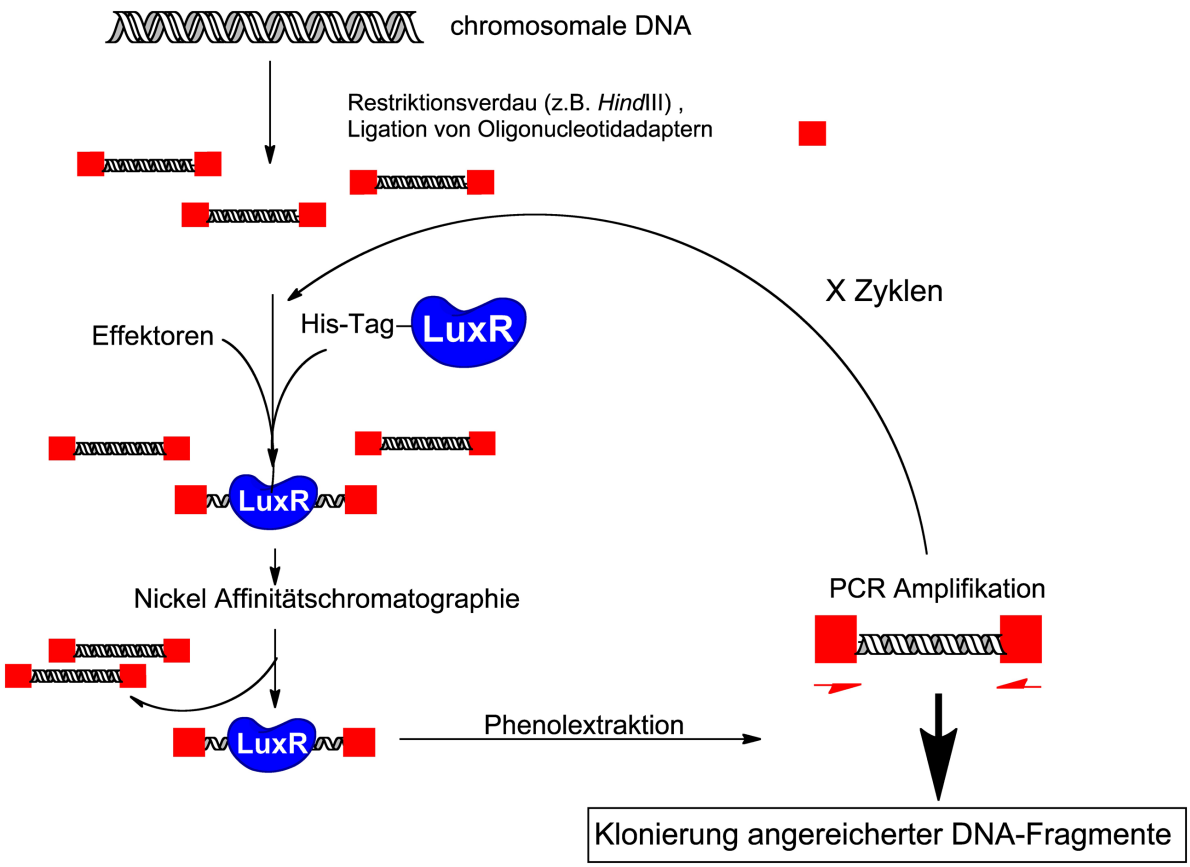


Abbildung 3.7: Identifizierung von DNA-Bindestellen am Beispiel des transkriptionellen Regulators LuxR durch „**S**ystematische **E**volution von **L**iganden durch **ex**ponentielle Anreicherung“ (SELEX)

Zunächst wurde chromosomale DNA von *Sporomusa ovata* H1 mit der Restriktionsendonuklease *Hae*III vollständig verdaut (Kapitel 3.4.9). An die so entstandenen glatten DNA-Enden wurden anschließend Oligonukleotidadapter ligiert. Diese Oligonukleotidadapter wurden vor der Ligation aus den Oligonukleotiden WalkdAd_Up und WalkAd_Down_Lux (siehe Tabelle 3.14) hergestellt. Die Herstellung der Oligonukleotidadapter und der Ligationsansatz ist in Kapitel 3.4.9 beschrieben. Ausserdem wurde der transkriptionelle Regulator LuxR aus *Sporomusa ovata* H1 als His-Tag Fusionsprotein heterolog in *Escherichia coli* hergestellt (Kapitel 3.5.6), durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend gegen Dialysepuffer (Tabelle 3.53) dialysiert. Danach wurde die Proteinkonzentration durch die BCA-Methode (Kapitel 3.5.4) bestimmt. Im ersten SELEX-Zyklus wurde zur Bindung des heterolog hergestellten Regulators LuxR an mögliche DNA-Bindestellen die vorher hergestellte,

verdaute und adapterligierte chromosomale DNA von *Sporomusa ovata* H1 zusammen mit dem LuxR-Protein inkubiert. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 3.44 zusammengefasst.

Tabelle 3.44: Reaktionsansatz zur Identifizierung von LuxR-DNA-Bindestellen im Genom von *Sporomusa ovata* H1.

Substanz	**Menge**	**Endkonzentration**
Verdaute, adapterligierte DNA	2 µg	40 ng/µl
His-Tag markiertes LuxR-Protein	40 pmol	800 nM
DNA-Bindepuffer (10-fach, Tabelle 3.46)	5 µl	1 x
H_2O	ad 50 µl	

Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Dem Ansatz werden daraufhin 10 µl Nickel-Agarose-Beads (Qiagen GmbH, Hilden) zugefügt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase, in dem das His-Tag markierte LuxR-Protein an die Nickel-Agarose binden sollte, wird der Ansatz zentrifugiert (2 min, 12000 g) und zweimal mit je 1 ml DNA-Bindepuffer (Tabelle 3.46) gewaschen. Zu den Nickel-Agarose-Beads wird anschließend 100 µl Wasser gegeben. Im Anschluss daran erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel 3.4.7). In diesem Schritt wird das an die Nickel-Agarose gebundene LuxR-Protein denaturiert und entfernt. Im wässrigen Überstand befinden sich die DNA-Fragmente, welche nach dem Waschen noch am LuxR-Protein gebunden vorliegen. Diese DNA-Fragmente wurden durch eine Ethanol-Präzipitation gereinigt und konzentriert. Die gebundenen Fragmente wurden durch Adapter-PCR mit dem Primer A_Primer2 vervielfältigt. Der komplette PCR-Ansatz wurde anschließend aufgereinigt (Kapitel 3.4.7) und erneut zusammen mit dem His-Tag markierten LuxR-Protein inkubiert. Der Selex-Zyklus wurde erneut durchlaufen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis durch Agarosegelelektrophorese separate DNA-Banden zu erkennen waren. Diese Banden sollten die DNA-Nukleotidsequenzen enthalten, die eine hohe Affinität zum transkriptionellen Regulator LuxR besitzen und damit potentielle DNA-Bindestellen aus dem *Sporomusa ovata* H1-Genom enthalten.

3.4.16 Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen durch Gelretardationsexperimente (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

Mit Gelretardationsexperimenten kann eine sequenzspezifische Interaktion von DNA mit einem Protein molekularbiologisch nachgewiesen werden. Das Experiment beruht darauf, dass die Mobilität eines Protein-DNA-Komplexes im Gegensatz zu Protein-freien DNA-Sonden in einem nativen Gel abnimmt. Für das Gelretardationsexperiment wurden Proteine und DNA-Sonden nach folgendem Reaktionsansatz (Tabelle 3.45) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend elektrophoretisch im Spreadex® EL 600 Mini-Gel aufgetrennt. Die DNA-Sonden im Gel wurden anschließend durch eine Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen und in der Photodokumentationsanlage als Bild digitalisiert.

Tabelle 3.45: Reaktionsansatz des Gelretardationsexperiments

Substanz	**Menge**	**Endkonzentration**
Protein (LuxR)	In variablen Mengen: 0-40 pmol	0 - 2 µM
Doppelsträngige DNA-Sonde	750 fmol	37,5 nM
EMSA-Bindepuffer (10x)	10,0	1 % (w/v)
Poly[d(I-C)]	0,5 µl	100 ng/µl
H_2O	ad 20 µl	

Tabelle 3.46: Zusammensetzung des DNA-Bindepuffers (10x). Die Pufferlösung wurde anschließend mit 1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Substanz	**Menge**	**Endkonzentration**
Tris	1,21 g	100 mM
EDTA	0,292 g	10 mM
KCl	3,73 g	500 mM
Nonidet P40	500 µl	0,5 % (v/v)
Glycerin	50 ml	50 % (v/v)
BSA	50 mg	500 µg/ml
DTT	154 mg	10 mM
H_2O	ad 100 ml	

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Proteingrößenmarker und Laufpuffer für Proteine

Proteingrößenmarker:
PageRuler™Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™Unstained Protein Ladder, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Native Marker Liquid Mix for BN/CN, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

3.5.2 Gewinnung der cytoplasmatischen Proteinfraktion

Zellaufschluss durch French Press

Die Bakterienkulturen wurden bis zum Erreichen einer gewünschten OD_{600} inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10000 g, 10 min, Raumtemperatur). Fünf Gramm Feuchtzellen wurden in 10 ml 150 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen und in einer „French Press“-Kammer (French Press SLM Instruments, Rochester USA) unter einem Druck von 110 MPa aufgeschlossen. Nach zweimaliger Wiederholung wurden die Zelltrümmer in einer Zentrifuge (15000 g , 4 °C, 30 Minuten) abgetrennt. Die Proteine im klaren Überstand wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Gewinnung rekombinanter Proteine aus Bakterienzellen durch Bug Buster™-Aufschluss

Nach dem Abzentrifugieren der Zellen einer 100 ml Kultur (4000 g, 20 min), wurde das Sediment in 5 ml 1x-konzentriertem Bug Buster™ (Novagen, Madison, WI, U.S.A.) pro Gramm Feuchtzellen homogen aufgenommen und bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler für 10 bis 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile bei 16000 g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Bei diesem Verfahren ist zu beachten, dass nur Proteine bzw. Proteinkomplexe kleiner 70 kDa aus *Escherichia coli* Zellen freigesetzt werden.

3.5.3 Gewinnung der unlöslichen Proteinfraktion und Lösen von „Inclusion bodies“

Die Gewinnung unlöslicher Proteinfraktionen wurde nach einer Methode nach McGettrick und Worrall (McGettrick und Worrall, 2004) durchgeführt. 5 ml *Escherichia coli* Suspension (ca. 1,5 g Feuchtgewicht) wurden in der French Press aufgeschlossen (3 Durchgänge, kleine Zelle, 6 MPa) und die Zelltrümmer abzentrifugiert (6000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde der Niederschlag zum ersten mal mit dem Waschpuffer (Tabelle 3.47) gewaschen (12000 g, 10 min, 4 °C).

Tabelle 3.47: Zusammensetzung des Waschpuffers

Substanz	Konzentration
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)
Harnstoff	1-4 M

Nach einem zweiten Waschen wurde der Niederschlag in 200 µl „Solubilization Buffer“ (Tabelle 3.48) resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die gelösten „Inclusion bodies“ von der ungelösten Fraktion durch Zentrifugation getrennt (60000 g, 10 min, 4 °C). Die gelösten Proteine wurden in „Refolding Buffer“ (Tabelle 3.49) durch tropfenweise Zugabe und 2 h Inkubation unter Rühren bei 4 °C renaturiert.

Tabelle 3.48: Zusammensetzung des „Solubilization Buffers“

Substanz	Menge
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
Harnstoff	8 M
DTT	1 mM

3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit dem „BCA Protein Assay Kit“ von Merck KGaA, Darmstadt quantifiziert. Dabei wurden die mitgelieferten Lösungen verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Bei dieser Methode reagiert Cu^{2+} mit

Tabelle 3.49: Zusammensetzung des „Refolding Buffers“

Substanz	Menge
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM
Oxidiertes Glutathion	0,5 mM
Reduziertes Glutathion	5 mM
L-Arginin	100 mM

Peptidbindungen quantitativ zu Cu^{1+}. Kupfer(I)-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Absorption im Photometer bei 562 nm gemessen wird. Aus der Steigung der Kalibriergeraden kann die Proteinmenge in Proteinlösungen mit unbekannter Konzentration errechnet werden. Zur Erstellung der Kalibriergeraden diente Rinderserum Albumin-Stammlösung (BSA-Lösung, 2 mg/ml), das in Konzentrationen von 5, 25, 50, 125 und 250 µg/ml verwendet wurde. Da die gemessenen Proteinproben in unterschiedlichen Puffern vorliegen, wurde auch die BSA-Stammlösung mit den entsprechenden Puffern verdünnt. Jeweils 50 µl der Proben zur Erstellung der Kalibriergeraden und der zu messenden Proteinproben werden mit 1 ml Arbeitsreagenz aus dem mitgelieferten Reagenziensatz versetzt und für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 562 nm im Photometer bestimmt. Zur Ermittlung des Leerwerts wurde die Absorption einer Reinstwasser-Probe bei 562 nm gemessen.

3.5.5 Gewinnung unterschiedlicher Proteinfraktionen durch Molekularsieb-Filtration

Konzentrierung von Proteinextrakten

Proteinextrakte wurden mit dem Microsep™ System (Pall GmbH, Dreieich) konzentriert. Hierbei handelt es sich um Membranfilter mit einer nominalen Ausschlussgröße, die höchstens 80 Prozent der Größe des zu konzentrierenden Proteins in kDa betrug. Die proteinhaltigen Lösungen wurden auf die Membranfilter pipettiert und anschließend bei 4 °C mit 5000 Upm für 45 min (EBA 35 Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen) zentrifugiert. Die Proteinfraktion wurde abschließend durch Umkehren der Filtereinheit und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5000 Upm, 5 min) mit 500 µl TBS-Puffer (Tabelle 3.71) ausgewaschen. Mit Hilfe dieses Filtersys-

tems konnten also Proteinfraktionen von Salzen und niedermolekularen Zellbestandteilen getrennt und gleichzeitig konzentriert werden.

Fraktionierung von Proteinextrakten

Neben der Konzentrierung von Proteinextrakten wurde die Molekularsieb-Filtration auch zur Herstellung verschiedener Proteinfraktionen aus *Sporomusa ovata* H1 verwendet. Dazu wurden Microsep™ Zentrifugenfilter (Pall GmbH, Dreieich) verwendet, die die nominalen Ausschlussgrößen 300, 100, 70, 50, 30 und 3 kDa aufwiesen. Durch Verwendung dieser Zentrifugenfilter in Stufen von der größeren zu kleineren Ausschlussgrößen konnten so verschiedene Proteinfraktionen gewonnen werden, indem durch Zentrifugation (4 °C mit 5000 Upm für 45 min) das im ersten Schritt entstandene Filtrat erneut auf Filter mit kleineren Ausschlussgrößen aufgetragen wurde. Das Retentat enthielt jeweils die konzentrierten Proteine der jeweiligen Fraktion (z.B. 100-300 kDa). Das Filtrat der Fraktion <3 kDa enthielt damit niedermolekulare Substanzen wie Corrinoide und kleinere Peptide, jedoch keine höhermolekularen Proteine.

3.5.6 Proteinexpression

Für die Proteinexpression wurde das 2 x TY-Medium verwendet. Die Zusammensetzung dieses Medium ist in Tabelle 3.50. zu sehen.

Tabelle 3.50: Zusammensetzung des 2 x TY Mediums

Substanz	Menge[g]	Endkonzentration im Medium
Trypton	16,0	1,6 % (w/v)
Hefeextrakt	10,0	1 % (w/v)
Natriumchlorid	5,0	86 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Der pH-Wert des 2 x TY-Mediums wurde mit 5 N Natronlauge auf pH 7 eingestellt und anschließend in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu je 100 ml-Portionen aufgeteilt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert (121 °C, 20 min, 1 bar Wasserdampfdruck). Proteinexpressionen wurden in dieser Arbeit mit verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen durchgeführt. Die benutzten Stämme sowie ihre Eigenschaften sind in der Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Die transformierten *Escherichia coli*-Zellen wurden zunächst über Nacht in 5 ml antibiotikumhaltigem LB-Medium (Tabelle 3.11) bei 37 °C auf einem Rundschüttler (250 Upm) gezüchtet. Die verwendeten Antibiotika sind abhängig vom verwendeten Vektor und Bakterienstamm. Die Antibiotikaresistenzen sind in den Tabellen 3.13 und 3.4 aufgeführt. Anschließend wurde das vorgewärmte (37 °C) 2 x TY-Medium in den Erlemeyerkolben auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft und auf einem Rundschüttler (250 Upm) gezüchtet, bis eine OD_{600} von etwa 0,6 erreicht war. Dann wurde 1 mM Endkonzentration IPTG (und zusätzlich 0,2 % L-Arabinose bei der Verwendung von *Escherichia coli* BL 21 AI™) ins Medium zugegeben und so die Gentranskription induziert. Nach der Induktion wurde die Kultur noch weitere drei bis vier Stunden auf einem Rundschüttler (250 Upm) bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4000 g für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit dem rekombinanten Protein bei -20 °C gelagert.

3.5.7 Anreicherung und Reinigung „His-Tag“-markierter Proteine

Die rekombinant hergestellten, cytoplasmatischen Proteine wurden zur selektiven Anreicherung durch His-Trap™ Nickel-Sepharose-Säulen (HisTrap™ HP-Säulen, 1 ml, GE-Healthcare Europe GmbH, Freiburg) aufgereinigt. Diese Säulen wurden bei einer Fliessrate von 1 ml/min zunächst mit 5 ml Reinstwasser gewaschen und dann mit 5 ml Bindepuffer (Tabelle 3.51) equilibriert. Anschließend wurde der cytoplasmatische Proteinextrakt (2 mg Protein/ml) in Volumina von 2 ml auf die Affinitätssäule aufgetragen. Dieses Verfahren wurde ebenfalls zur Aufreinigung von rekombinanten, His-Tag-markierten Proteinen aus unlöslichen Proteinfraktionen (Einschlusskörperchen) angewendet (siehe Kapitel 3.5.3). Hier wurden die in 8 M Harnstoff gelösten Proteine ebenfalls direkt auf die Nickel-Sepharose-Säulen aufgetragen. Die nicht bindenden Proteine wurden dann mit 5 ml Bindepuffer aus der Säule gewaschen. An die Nickel-Matrix gebundene Proteine wurden in 8 x 1 ml-Fraktionen des Elutionspuffers (Tabelle 3.52) von der Säule abgelöst. Diese Fraktionen wurden dann mit einem 10 kDa Microsep™-Filter (Pall GmbH, Dreieich) jeweils auf ca. 500 µl konzentriert. Anschließend wurden diese Proteinkonzentrate in einer SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 3.51: Zusammensetzung des nicht-denaturierenden „Bindepuffers“ einer Ni-Affinitätschromatographie. Der Bindepuffer wurde mit 1 M Phosphorsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Substanz	Endkonzentration
Natriumdihydrogenphosphat	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	20 mM

Tabelle 3.52: Zusammensetzung des nicht-denaturierenden „Elutionspuffers“ einer Ni-Affinitätschromatographie. Der Elutionspuffer wurde mit 1 M Phosphorsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Substanz	Endkonzentration
Natriumdihydrogenphosphat	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM

Entsalzung und Konzentration von Proteinlösungen durch Dialyse

Die Entsalzung und Konzentration von Proteinlösungen fand mittels Dialyse statt. Die Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 12 bis 14 kDa (Serva GmbH & Co KG) wurden in 50 mM EDTA-Lösung für 15 min gekocht, mit Wasser gespült, erneut in Reinstwasser aufgekocht und bis zur Verwendung in 30 % Ethanol (v/v) kühl gelagert. Die Proteinlösung wurde in den Dialyseschlauch gefüllt und mit Klemmen an beiden Enden verschlossen. Die Dialyse der Proteine fand über Nacht in mindestens 1000 Volumen Dialysepuffer (Tabelle 3.53) bezogen auf das Volumen der Proteinlösung unter leichtem Rühren bei 4 °C statt.

Tabelle 3.53: Zusammensetzung des Dialysepuffers. Der pH-Wert des Dialysepuffers betrug pH 7,4.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat	12,49 g	88 mM
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1,66 g	12 mM
Glycerin	100 ml	10 % (v/v)
H_2O	ad 1000 ml	

3.5.8 Enzymtest zur Analyse der CobT-Reaktion

Die Durchführung des enzymatischen Tests der CobT-Reaktion wurde von einem Enzymtest für eine Nikotinat-Mononukleotid-5,6-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (E.C. 2.4.2.21, CobT) aus *Pseudomonas denitrificans* (Cameron u. a., 1991) adaptiert. Der Test erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl und enthielt 1 mM Nikotinat-Mononukleotid und 10 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol beziehungsweise 10 µM *p*-Kresol. Der pH-Wert des Reaktionsansatzes wurde durch Verwendung verschiedener Puffer in Konzentrationen von jeweils 100 mM eingestellt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.54 (Glycin-Puffer, pH 9,7), Tabelle 3.55 (Tris-HCl-Puffer, pH 8,0) und Tabelle 3.56 (Phosphatpuffer, pH 7,0) beschrieben. Zur Herstellung reduzierter Reaktionsbedingungen wurde dem Tris-HCl-Puffer 1 mM Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Durch Zugabe von 25 pmol rekombinantem CobT-Protein wurde die enzymatische Reaktion gestartet und anschließend für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch eine 10-minütige Inkubation bei einer Temperatur von 80 °C gestoppt. Die Analyse der Reaktionsprodukte des Enzymtests erfolgt mit Hilfe einer C18-RP-HPLC (siehe Kapitel 3.3.1). Dazu wurde das Volumen der Proben vor der chromatographischen Trennung mit einem 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 auf 500 µl erhöht.

Tabelle 3.54: Zusammensetzung des Glycin-Puffers für den CobT-Enzymtest. Der pH-Wert des Puffers wurde mit 4 M NaOH auf pH 9,7 eingestellt.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Glycin	7,5 g	100 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Tabelle 3.55: Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers für den CobT-Enzymtest. Der pH-Wert des Puffers wurde mit 2 M HCl auf pH 8,0 eingestellt.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris	12,1 g	100 mM
(DTT	1,54 g	1 mM)
H_2O	ad 1000 ml	

Tabelle 3.56: Zusammensetzung des Phosphatpuffers für den CobT-Enzymtest. Der pH-Wert des Puffers betruh pH 7,0.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	12,49 g	88 mM
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1,66 g	12 mM
H_2O	ad 1000 ml	

3.5.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.5.9.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Diese Technik basiert auf der Auftrennung von negativ geladenen Proteinen im elektrischen Feld. Für eine untereinander vergleichbare Ladung sorgt hierbei das zugesetzte SDS, das sich stöchiometrisch an wasserlösliche Proteine anlagert und deren Eigenladung überdeckt. Ein Polyacrylamidgel besteht aus zwei Bereichen, dem Sammel- und dem Trenngel. Im oberen Teil, dem Sammelgel, laufen alle Proteine auf gleicher Höhe. So gelangen alle Proteine nahezu gleichzeitig in das darunter liegende Trenngel. Dort werden die Proteine dann nach ihrer Molekularen Masse aufgetrennt. Da die Ladung der Proteine direkt proportional zur Größe des Proteins ist, werden alle Proteine mit derselben Kraft zur Anode gezogen. Durch die Gelmatrix entsteht ein Siebeffekt, bei dem kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern als größere Proteine. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 3.57 aufgeführt. Das Polyacrylamid wurde zwischen zwei Glasplatten (10 x 10 cm, 0,75 mm Abstand) gegossen, welche mit Teflonstreifen abgedichtet waren. Dabei wurde zuerst das Trenngel angesetzt und zwischen die senkrecht stehenden Platten gegossen. Um eine gerade Oberfläche des Trenngels zu erhalten, wurde sofort nach dem Einfüllen das Gel mit H_2O überschichtet. Dies verhindert die Bildung eines Meniskus an der Oberfläche. Nach Festwerden des Trenngels wurde das H_2O entfernt, das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm mit zehn Zähnen für die Ausbildung der Probentaschen eingesetzt. Nach dem Festwerden wurde die Dichtung entfernt und das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Diese besteht aus zwei mit Elektroden versehenen, übereinander angeordneten Vorratsbehälter für SDS-Laufpuffer, zwischen denen das Gel eine senkrechte Verbindung herstellt. Nach dem Einspannen der Glasplatten mit dem Gel wurden die Vorratsbehälter mit SDS-Laufpuffer (Tabelle 3.58) befüllt und der Kamm entfernt. Die

Proteinproben wurden mit 4-5 µl Laemmli-Puffer (Tabelle 3.59) versetzt, aufgekocht (5 min, 95 °C) und in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Die Proteintrennung erfolgte im Sammelgel bei 100 V bei Raumtemperatur. Die Spannung wurde auf 180 V erhöht, sobald die Lauffront ins Trenngel gewandert war. Die Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis die Lauffront, erkennbar an der blauen Bromphenolblau-Bande, das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Tabelle 3.57: Zusammensetzung des verwendeten Trenn- und Sammelgels

Substanz	**Trenngel, 12,5 %**	**Sammelgel, 5 %**
Acrylamid-Lösung (30 %)	2,5 ml	0,55 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)	1,5 ml	–
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)	–	0,5 ml
SDS-Lösung (10 %(w/v) [1)]	60 µl	40 µl
H_2O	1,94 ml	2,91 ml
TEMED [2)]	6 µl	4 µl
APS (200 mg/ml) [2) 3)]	40 µl	20 µl

[1)] SDS = sodium (Natrium) dodecylsulfat
[2)] TEMED (CAS 110-18-9) und APS (CAS 7727-54-0) wurden erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben.
[3)] APS wurde wöchentlich frisch angesetzt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.58: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers (10x)

Substanz	**Menge**
Glycin	144,2 g
Tris	30,3 g
SDS	10 g
H_2O	ad 1000 ml

Tabelle 3.59: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers

Substanz	**Menge**
Bromphenolblau	20 mg
Glycerin	2,5 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
SDS	1,5 g
1 M Tris/HCl pH 6,8	3,2 ml

3.5.9.2 Analyse von hochmolekularen Proteinkomplexen durch „Blue Native“ Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die „Blue Native“ Gelelektrophorese (Schägger und von Jagow, 1991) dient der Trennung von Proteinen unter nativen Bedingungen. Durch diese nativen Bedingungen werden Proteine im Gegensatz zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nicht denaturiert und ihre Tertiärstruktur bleibt weitgehend erhalten. So können hochmolekulare Proteinkomplexe in ihrem nativen Zustand zusammen mit eventuellen Kofaktoren aufgetrennt werden. Die Komplexe werden durch die Beladung mit dem sauren Coomassie-Farbstoff (Serva Blue G-250, Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg) negativ geladen. Die negativ geladenen Protein-Farbstoff-Komplexe wandern so bei physiologischem pH-Wert, unabhängig von ihrem isoelektrischem Punkt, zur Anode. Dadurch ergibt sich eine verbesserte Trennschärfe. Zur Auftrennung der hochmolekularen Proteinkomplexe der Massen 100 bis 300 kDa wurden 4-16 %ige, für Proteinkomplexe, die größer als 300 kDa war wurden 3-12 %ige Gradientengele verwendet. Diese enthalten 3-12 % beziehungsweise 4-16 % Acrylamid und jeweils 2,6 % N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Gele wurden als Fertiggele (SERVAGel™N 3-12, Vertical Native Gel 3-12% bzw. SERVAGel™N 4-16, Vertical Native Gel 4-16%, Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg) bezogen. Diese bestanden aus einer Plastikkassette, welche die fertigen Gradientengele und einen zehnzähnigen Kamm für die Ausbildung der Probentaschen enthielt. Die Gelkassetten wurden in die Gelapparatur (Biometra Minigel; Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) eingespannt.

Die obere Vorratskammer der Gelapparatur wurden mit Kathodenpuffer (Tabelle 3.61), die untere mit Anodenpuffer (Tabelle 3.62) jeweils in einfacher Konzentration befüllt. Dem Kathodenpuffer war zuvor zusätzlich Serva Blue G-250 (0,02 % (v/v) Endkonzentration) zugesetzt worden, um eine ausreichende Beladung der Proteine mit dem Farbstoff und damit eine gleichmäßige Auftrennung während der Gelelektrophorese zu gewährleisten.

Nach der Entfernung des Kamms wurden die Proteinproben mit einem Volumen „2x Sample Buffer Blue Native“ versetzt und in die Auftragetaschen pipettiert. Taschen, die keine Proteinproben enthielten, wurden mit 20 µl 2x „Sample Buffer Blue Native“ befüllt. Die Zusammensetzung des Auftragepuffers ist in Tabelle 3.60 beschrieben. Als Proteinmassenstandard wurde der „SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN“ verwendet. Dieser setzt sich aus einer Mischung sechs verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Massen (21-720 kDa) zusammen. Die Zusammensetzung des Pro-

teingrößenstandards ist in Abbildung 3.8 zu sehen.

Die Proteintrennung erfolgte zunächst bei 50 V für 10 Minuten. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht und die Gelelektrophorese für weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur fortgesetzt. Nach der Proteintrennung wurde die Gelkassette mit dem mitgelieferten Schlüssel aufgebrochen und beide Plastikplatten entfernt. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde das Gel anschließend gefärbt (siehe Kapitel 3.5.10). Zur Analyse der Radioaktivtätsverteilung [^{57}Co]-Corrinoid-markierter Proteine wurde das Gel nicht gefärbt, um eine Freisetzung des Kofaktors aus dem Protein zu vermeiden. Hier wurden die einzelnen Spuren eines Gels mit einem Skalpell in etwa 1,5 mm große Stücke geschnitten. Diese Gelstücke konnten anschließend im Gammazähler auf [^{57}Co]-Radioaktivität untersucht werden.

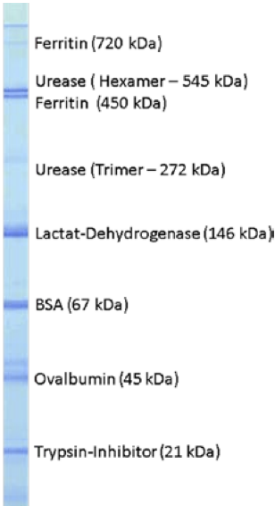


Abbildung 3.8: SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN

Tabelle 3.60: Zusammensetzung des Proben-Auftragepuffers für „Blue Native"-Gelelektrophorese (2 x Sample Buffer Blue Native). Der pH Wert des Probenauftragepuffers wurde mit 1 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.

Substanz	**Konzentration**
6-Aminocapronsäure	1 M
BisTris	100 mM
NaCl	100 mM
Glycerin	20 % (v/v)
Serva Blue G250	0,1 % (v/v)

Tabelle 3.61: Zusammensetzung des 10 x „Blue Native“ Kathodenpuffers. Dieser Kathodenpuffer wurde vor der Benutzung auf einfache Konzentration mit Reinstwasser verdünnt und mit 1 %iger „SERVA Blue G solution for BN/CN“ versetzt (0,02 % (v/v) Endkonzentration).

Substanz	Konzentration
Tricine	500 mM
BisTris	150 mM

Tabelle 3.62: Zusammensetzung des 10 x „Blue Native“ Anodenpuffers. Der Anodenpuffer wurde vor der Benutzung auf einfache Konzentration mit Reinstwasser verdünnt.

Substanz	Konzentration
BisTris-HCl, pH 7,0	500 mM

3.5.10 Färbung von „Blue Native“ Gelen

Nachdem die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde das Gel entnommen, für 30 Minuten in „Blue Native“ Fixierlösung (Tabelle 3.63) auf dem Taumelschüttler inkubiert und anschließend für eine Minute in Reinstwasser gewaschen. Danach wurde das Gel für 30 Minuten in Färbelösung (Tabelle 3.64) auf dem Taumelschüttler inkubiert. Zur Entfärbung wurde dann das Gel zunächst eine Minute in Reinstwasser gespült und anschließend zweimal für 60 Minuten in Entfärbelösung (Tabelle 3.65) inkubiert.

Tabelle 3.63: Zusammensetzung der „Blue Native“-Fixierlösung

Substanz	Konzentration
Trichloressigsäure	20 % (v/v)

Tabelle 3.64: Zusammensetzung der „Blue Native“-Färbelösung I

Substanz	Konzentration
Stammlösung I[1)]	
SERVA Blau R	0,2 % (v/v)
Ethanol	90 % (v/v)
Stammlösung II[1)]	
Essigsäure	20 % (v/v)

[1)] Stammlösung I und Stammlösung II wurden unmittelbar vor der Färbung zu gleichen Teilen gemischt

Tabelle 3.65: Zusammensetzung der „Blue Native“-Entfärbelösung

Substanz	Konzentration
Ethanol	20 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Glycerin	1 % (v/v)

3.5.11 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteine in Polyacrylamidgelen wurden durch Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue lagert sich an basische Seitengruppen der Proteine an, die so sichtbar werden (Weber und Osborn, 1969). Hierfür wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler in der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 3.66) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte in Entfärbelösung (Tabelle 3.67).

Tabelle 3.66: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung

Substanz	Menge
Coomassie Brilliant Blue R 250	1,0 g
Methanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
H_2O	ad 1000 ml

Tabelle 3.67: Zusammensetzung der Entfärbelösung

Substanz	Menge
Methanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
H_2O	ad 1000 ml

3.5.12 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silber

Nachdem die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde das Gel entnommen und für 20 min in einer Schale mit 100 ml Fixierlösung (10 % Eisessig) auf den Taumelschüttler gestellt. Anschließend wurde das Gel dreimal für jeweils 3 min mit 100 ml Reinstwasser gewaschen und dann in die Färbelösung (Tabelle 3.68)

gelegt. Nach 30 min wurde das Gel für 5-10 sec in eine Schale mit Reinstwasser gelegt und sofort weiter in 100 ml Entwicklerlösung (Tabelle 3.69) gegeben. In dieser Lösung wurde an Protein-haltigen Banden im Gel das Silber reduziert. Dabei entstanden schwarze Banden metallischen Silbers. Bei ausreichender Farbintensität wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 ml 10 %iger Essigsäure gestoppt. Das Gel wurde dann 10 min später noch einmal in Wasser gewaschen.

Tabelle 3.68: Färbelösung zum Nachweis von Proteinen durch Silberfärbung

Substanz	Menge	Endkonzentration
$AgNO_3$	1 g	5,8 mM
Formaldehyd (37 %)	1,5 ml	0,055 %
H_2O	ad 1000 ml	

Tabelle 3.69: Zusammensetzung der Entwicklerlösung zum Nachweis von Proteinen durch Silberfärbung

Substanz	Menge	Endkonzentration
Na_2CO_3	30 g	283 mM
Formaldehyd (37 %)[1)]	1,5 ml	0,011 %
$Na_2S_2O_3$ (40 mM)[1)]	200 µl	8 µM
H_2O	ad 1000 ml	

[1)] Formaldehyd und $Na_2S_2O_3$ wurden erst kurz vor Verwendung der Lösung zugegeben.

3.5.13 „Western-Blot“ Analyse von Proteinen

übertragung von Proteinen aus SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran („Western Blot“)

Mit Hilfe des „Western-Blots“ wurden im elektrischen Feld Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE (Tabelle 3.57) aufgetrennt worden waren, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und fixiert. Für den Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran wurde ein Elektroblot (Fastblot B33, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) verwendet. Diese Apparatur bestand aus zwei Graphitelektroden, wobei die Anode am Bodenteil und die Kathode am Deckel des Blots angebracht war. Auf die Anode wurden drei Lagen Whatman-Filterpapier (Blotting Paper 703, VWR Scientific Products, West Chester, U.K.) in der Größe des SDS-Gels aufgelegt, die in Transferpuffer getränkt worden waren. Darauf wurde die ebenfalls mit

Transferpuffer befeuchtete Nitrozellulosemembran (PROTRAN BA 85, Cellulosenitrat, Schleicher & Schuell, Dassel) platziert. Darauf wurde das SDS-Polyacrylamidgel luftblasenfrei aufgelegt und darüber wieder 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier. Die Zusammensetzung des „Western-Blot“ Transferpuffers wird aus Tabelle 3.70 ersichtlich. Der Elektroblot erfolgte bei 3,5 mA/cm^2 für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Der erfolgreiche Transfer auf die Nitrozellulosemembran wurde durch die gefärbten, im SDS-Gel aufgetrennten Proteinmassenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) kontrolliert.

Tabelle 3.70: Zusammensetzung des „Western Blot“ Transferpuffers

Substanz	**Menge**
Tris	5,8 g
Glycin	2,8 g
Methanol	200 ml
SDS 10 % (w/v)	3,8 g
H_2O	ad 1000 ml

Serologischer Nachweis von Proteinen

Im serologischen Nachweis reagiert der polyklonale Erst-Antikörper mit dem Antigen auf der Nitrozellulosemembran. Nach Anlagerung des Erst-Antikörpers bindet ein enzymgekoppelter Zweit-Antikörper an den ersten Antikörper. Dieses Enzym lässt sich anschließend über eine enzymatische Reaktion nachweisen. Nach dem Elektroblot wurde die mit Protein beladene Nitrozellulosemembran zunächst über Nacht in TBS-Puffer (Tabelle 3.71) mit 0,1 % (v/v) Tween 20 und 5 % (w/v) Milchpulver bei 4 °C inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran abzudecken. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler durchgeführt. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran mit 40 ml TBS-T Puffer abgewaschen. Anschließend wurde in Mäusen hergestellte primäre Antikörper 1:3000 in TBS-T Puffer verdünnt und die Nitrozellulosemembran für eine Stunde inkubiert. In dieser Arbeit wurden die primären, monoklonalen Antikörper „S-Protein HRP Konjugat“ zum Nachweis von S-Tag-haltigen Proteinen oder der Antikörper „Anti-His Antibody“ zum Nachweis His-Tag-haltiger Proteine verwendet. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran zweimal 15 Minuten in jeweils 50 ml TBS-T Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Goat Anti-Mouse Total Ig Peroxidase Conjugate; Merck KGaA,

Darmstadt), wurde 1:1000 in TBS-T Puffer verdünnt und die Nitrozellulosemembran mit dieser Lösung wieder für eine Stunde inkubiert. Bei Verwendung des primären Antikörpers „S-Protein HRP Konjugat“ konnte dieser Schritt ausgelassen werden, da die zum Nachweis notwendige Peroxidase bereits an diesen Antikörper gekoppelt war. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgten je zwei 15-minütige Waschschritte mit 50 ml TBS-T Puffer. Im Anschluss daran erfolgte der colorimetrische Nachweis der Peroxidase-Reaktion.

Tabelle 3.71: Zusammensetzung des TBS Puffers.

Substanz	**Menge**
Tris-HCl (1 M), pH 7,5	20 ml
NaCl	8 g
H_2O	ad 1000 ml

Tabelle 3.72: Zusammensetzung des TBS-T Puffers.

Substanz	**Menge**
Tween 20	1 ml
TBS-Puffer (Tabelle 3.71)	ad 1000 ml

Colorimetrischer Nachweis von Peroxidase

Zum colorimetrischen Nachweis der Antikörper-gekoppelten Peroxidase wurde das Substrat 3,3-Diaminobenzidin verwendet. Diese Substanz wird durch die Peroxidase-Reaktion oxidiert und bildet ein braunes, nicht wasserlösliches Präzipitat. Die Zusammensetzung des Nachweisreagenz ist in Tabelle 3.73 aufgeführt. Für den Nachweis wurden zur Nitrozellulosemembran 30 ml des Reagenz gegeben und solange auf dem Taumelschüttler inkubiert, bis die gewünschte Farbstärke erreicht war (5-20 Minuten). Nach der Inkubation wurde die Nitrozellulose mit Reinstwasser gewaschen und digital dokumentiert.

Tabelle 3.73: Zusammensetzung des Detektionsreagenz zum colorimetrischen Nachweis von Peroxidase

Substanz	**Menge**
3,3’-Diaminobenzidin	5 g
Wasserstoffperoxid	1 ml
TBS-Puffer (Tabelle 3.71)	ad 1000 ml

3.5.14 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen

Unter MALDI-TOF wird die „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight “ verstanden. Mit dieser Analysemethode können Biopolymere wie Proteine massenspektrometrisch untersucht werden. Dabei werden die Analyte in sich schnell bewegende, ionisierte Gasmoleküle überführt, deren Flugzeit in einem elektrischen Hochspannungsfeld proportional zu ihrer molekularen Masse ist. Dazu werden Proteine in einer Matrix (α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure) auf einem metallischen Träger aufgetragen. Der Laserbeschuss überträgt die Energie durch die Matrix auf das Proteinmolekül, das dabei ionisiert oder fragmentiert wird. Die so entstandenen Ionen werden in einer evakuierten Röhre durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Je nach Verhältnis von Masse zu Ladung benötigt ein Ion eine individuelle Zeit bevor es den Detektor erreicht. Der TOF-Analysator (Ionendetektor) wandelt dann die ankommenden Ionen in ein Messsignal um. Das Massenspektrum stellt also die Auftrennung der Ionen im elektrischen Feld dar. Die zu untersuchenden Proteinproben werden vor der Analyse proteolytisch verdaut, so dass verschiedene Massen einzelner Peptide durch die MALDI-TOF-Analyse erhalten werden. In dieser Arbeit wurden Proteine mit Hilfe der Serinprotease Trypsin behandelt. Diese Endopeptidase spaltet Aminosäuresequenzen selektiv nach den Aminosäuren Lysin und Arginin. Die so gemessenen Peptidmassen wurden mit den errechneten Peptidmassen rekombinanter Proteine im Programm Mmass (siehe Tabelle 6.1) verglichen. Zur MALDI-TOF-Analyse wurde das Gerät Bruker Daltonics REFLEX III (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet.

Probenvorbereitung

Bei einer MALDI-TOF Analyse werden die zu analysierenden Proteinproben durch eine SDS-PAGE (Tabelle 3.57) aufgetrennt und etwa 30-60 Minuten mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G 250 angefärbt. Bei allen weiteren Schritten ist es unbedingt erforderlich Latexhandschuhe zu tragen, da sonst der Analyt mit Hautkeratin verunreinigt werden kann. Diese Keratin-Kontamination führt zur Ergebnisverfälschung. Die zu untersuchende Proteinbande wurde mit einem Skalpell aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 750 µl 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler inkubiert, um Verunreinigungen aus dem Polyacrylamidgel zu lösen. Anschließend wurde der Überstand

vorsichtig abgenommen und die Prozedur noch einmal wiederholt. Zum Trocknen der Gelstücke wurden diese für 20 Minuten in einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C zentrifugiert. Die trockenen Gelstückchen wurden dann in 6 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 rehydratisiert, der die Serinprotease Trypsin (10 ng/µl Endkonzentration) für den proteolytischen Verdau des Zielproteins enthielt. Durch kurzes Zentrifugieren wurden am Boden des Reaktionsgefäßes Puffer und Gelstückchen gesammelt und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden noch einmal weitere 6 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 jedoch ohne Trypsin zugegeben. Dann wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann 12 µl Reinstwasser hinzupipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine weitere Zugabe von 10 µl 30 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die Peptidstücke des Trypsin-Verdaus aus dem Agarosegel gelöst. Die Proben konnten dann auf die Probenplatte aufgetragen oder bei -20 °C gelagert werden.

Probenauftragung auf die MALDI-TOF-Probenplatte
Zunächst wurde die frisch gesättigte α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure-Lösung (Matrix) in 50 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure hergestellt, direkt 0,5 µl Matrix auf die Probenplatte pipettiert und anschließend sofort 0,5 µl Probe hinzugegeben. Der Proteinstandard („Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“, Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) (0,5 µl) kommt immer auf die zentrale Position 56 der Probenplatte. Generell werden die Messproben schneckenförmig nahe dieser Position aufgetragen. Alle Proben sollten mittig zentriert auf ihre Probenposition platziert werden.

3.5.15 Proteinbindung von Vitamin B_{12}

Um die Bindefähigkeit von Vitamin B_{12} an transformierten *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'-Zellen zu testen, wurde ^{57}Co-markiertes Vitamin B_{12} verwendet. Dazu wurde zunächst die Expression der zu testenden Corrinoid-bindenden Proteine in Kulturen, die bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,7 gewachsen waren, je nach enthaltenem Vektor (Tabelle 3.13) mittels IPTG (0,5 mM) bzw. Tetracyclin (10 µg/ml) induziert und die Kulturen anschließend unter Schütteln inkubiert (37 °C, über Nacht). Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde der Zellniederschlag in PBS-Puffer (Tabelle 3.74) aufgenommen und eine definierte Menge an radioaktiv markiertem Vitamin B_{12} zugegeben. Nach ei-

ner Inkubationszeit von 30 - 60 Sekunden wurde durch Abzentrifugieren (5 min, 6000 g) das nicht gebundene ^{57}Co-markierte Vitamin B_{12} von den Zellen abgetrennt. Im Anschluss wurde sowohl im Zellniederschlag als auch im Überstand die vorhandene γ-Strahlung und damit die Menge an vorhandenem radioaktiv markiertem Vitamin B_{12} gemessen. Dazu wurde das Gerät 2470 Wizard^2 Automatic Gamma Counter der Firma Perkin Elmer, Waltham, MA verwendet. Als Negativkontrolle diente eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue MRF', die den Expressionsvektor pEST100 ohne Insert enthielt. Als Positivkontrolle diente eine *Escherichia coli* JM109-Kultur mit dem Expressionsvektor pEST100, der als Insert das Gen *btuB* aus *Escherichia coli* trug, welches für ein Vitamin B_{12}-Transportprotein kodiert (Bischof, 2010).

Tabelle 3.74: Zusammensetzung des PBS Puffers. Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Substanz	**Konzentration**
NaH_2PO_4	15 mM
Na_2HPO_4	85 mM
NaCl	100 mM
H_2O	ad 1000 ml

4 Ergebnisse

Sporomusa ovata H1 weist in seinem Corrinoid-Stoffwechsels drei beachtenswerte Merkmale auf. (I.) Statt des sonst üblichen Vitamin B_{12}, synthetisiert das Bakterium die Corrinoide *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid. Diese Vitamin B_{12}-Derivate sind als Kofaktoren am Energie- und Baustoffwechsel des strikt anaeroben Bakteriums beteiligt. So ist (II.) der untere Nukleotidligand dieser Corrinoide O-glykosidisch mit dem Cobamid verknüpft, statt der sonst üblichen N-glykosidischen Verknüpfung des Aglykons wie im Vitamin B_{12}. Außerdem werden (III.) die unteren Nukleotidliganden der *Sporomusa*-Corrinoide in einem noch unbekannten radikalischen Mechanismus aus L-Tyrosin gebildet (Feustel, 2000).

Meine Arbeit richtete sich an folgenden Zielen aus:

1. Solche Gene in *Sporomusa ovata* H1 zu identifizieren, die für diese ungewöhnlichen biochemischen Reaktionen der Corrinoidbiosynthese kodieren. Die Nukleotidsequenz des Genoms war bis zum Abschluss der Arbeiten nicht zugänglich.
2. Durch bioinformatorische Analysen vollständig sequenzierter Genome (Rodionov u. a., 2003) ist bekannt, dass der Corrinoid-Stoffwechsel und somit der freie Corrinoid-Pool einer Zelle durch Vitamin B_{12}-Riboschalter auf mRNA-Ebene reguliert wird. Die hochkonservierten Nukleotidbereiche von Vitamin B_{12}-Riboschaltern sollten genutzt werden können, auch in *Sporomusa ovata* H1 solche Regulationselemente und die dadurch regulierten Gene zu identifizieren. Das Vorhandensein Corrinoid-abhängiger Riboschalter in diesem strikt anaeroben Bakterium konnte durch Southern-Blot-Hybridisierung mit konservierten Nukleotidsequenzbereichen der Vitamin B_{12}-Riboschalter bereits gezeigt werden (Hiergeist, 2006). Hier galt es, die Nukleotidsequenzen der Corrinoid-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 und die davon stromabwärts liegenden Gene und Operonstrukturen zu identifizieren.
3. *Sporomusa ovata* H1 ist ausserdem in der Lage, Vitamin B_{12} durch Einbau der Corrinoid-Vorstufe 5,6-Dimethylbenzimidazol herzustellen. Allerdings hemmt dieses ansonsten sehr weit verbreitete Corrinoid überraschenderweise das Wachstum des anaeroben Bakteriums (Ibrahim, 1998). Diesen ungewöhnlichen Befund habe ich ebenfalls in meiner Arbeit genauer untersucht.
4. Eine Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 ist bisher nicht publiziert. Aus diesem Grund waren Gensequenzen bisher unbekannt, die für mögliche Corrinoid-haltige Proteine kodieren. Bisher ist nur ein Corrinoid-haltiges Protein aus

diesem Bakterium bekannt (Stupperich u. a., 1992). Es handelt sich dabei um ein Methanol-induziertes, Corrinoid-bindendes, monomeres Protein. Seine N-terminale Aminosäuresequenz (21 Aminosäuren) ist bekannt. Die Untersuchung dieser Proteine müsste jedoch einen entscheidenden Fortschritt zur Analyse der Bindung der *Sporomusa*-Corrinoide und des hemmenden Vitamin B_{12} an das jeweilige Apoprotein liefern. Daher sollten möglichst viele Corrinoid-bindende Proteine in *Sporomusa ovata* H1 identifiziert werden, die jedoch nicht über den Nachweis der Riboschalter zu finden waren.

5. Die Aufnahme von Vitamin B_{12} in die Bakterienzelle geschieht bei Gram-negativen Bakterien über das Btu-Transportsystem. Die Struktur der Transporter besteht aus verschiedenen Proteinkomponenten. Häufig sind diese kodierenden Gene in einem Operon zusammengefasst (Rodionov u. a., 2003). Die Expression dieser Operons wird in Bakterien häufig durch Vitamin B_{12}-Riboschalter kontrolliert. Die Corrinoid-Transporter im Genom von *Sporomusa ovata* H1 sollten über diese Regulationselemente identifiziert und anschließend funktionell überprüft werden.

4.1 Identifizierung von B_{12}-Riboschaltern in *Sporomusa ovata* H1

4.1.1 Southern-Blot-Analyse der B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1

Durch Southern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass konservierte B_{12}-Riboschalter DNA-Sonden, welche mit Digoxigenin markiert waren, mit vollständig verdauter chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 etwa 10 Hybridisierungssignale lieferten (siehe Abbildung 4.1). Durch dieses Ergebnis waren also etwa zehn Vitamin B_{12}-Riboschalter im Genom dieses homoacetogenen Bakteriums zu erwarten.

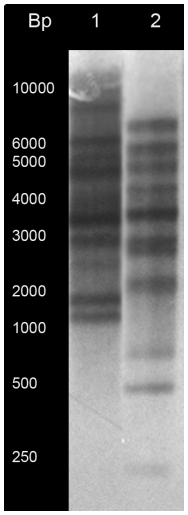


Abbildung 4.1: Hybridisierung einer Digoxigenin-markierten Vitamin B_{12}-Riboschalter-Sonde mit vollständig verdauter chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1. Die Riboschalter-Sonde wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden Ribo1_lang und B12Box_rev hergestellt. Die chromosomale DNA war verdaut worden mit:
Spur 1: *Hind*III; Spur 2: *Pst*I; (Hiergeist, 2006)

4.1.2 Identifizierung der B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 durch Adapter-PCR

Auf der Basis bereits identifizierter Vitamin B_{12}-Riboschalter aus vollständig sequenzierten bakteriellen Genomen wurden anhand konservierter Nukleotidsequenzbereiche Oligonukleotide abgeleitet, die für die Identifizierung Corrinoid-abhängiger Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 durch eine Adapter-PCR genutzt wurden. Durch den Vergleich von B_{12}-Riboschaltern aus dem Phylum der Firmicutes ergaben sich zwei konservierte Sequenzbereiche, die sich für die Ableitung von Oligonukleotiden für die Adapter-PCR eignen.

Aus diesen Konsensus-Sequenzen wurden die PCR-Oligonukleotide Ribo1_lang (siehe Tabelle 3.14) vom konservierten Bereich I und B12Box_fw (siehe Tabelle 3.14) vom konservierten Bereich II (B_{12}-Box) abgeleitet (siehe Abbildung 3.5) und synthetisiert. Für die anschließende Adapter-PCR wurde das Oligonukleotid Ribo1_lang verwendet. Das Vorhandensein des konservierten Bereichs II diente in Form einer „nested“-PCR zur Kontrolle der identifizierten Vitamin B_{12}-Riboschalter. Vor der Durchführung der Adapter-PCR wurde chromosomale DNA aus *Sporomusa ovata* H1 isoliert und vollständig mit den Restriktionsendonukleasen *Pvu*II und *Ehe*I verdaut, wel-

che glatte DNA-Enden liefern. An diese glatten Enden wurden Oligonukleotidadapter ligiert. Dieser Ansatz diente anschließend als DNA-Matrize für die Adapter-PCR. Zum Nachweis möglicher Vitamin B_{12}-Riboschalter wurden die Oligonukleotide Ribo1_lang und A_Primer2 eingesetzt. Da durch vorangegangene Southern-Blot-Analysen etwa 10 Vitamin B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 vorhergesagt waren, sind auch in der Adapter-PCR etwa zehn PCR-Amplifikate zu erwarten. Die PCR-Reaktionsprodukte wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert. Das Ergebnis dieser Adapter-PCR ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

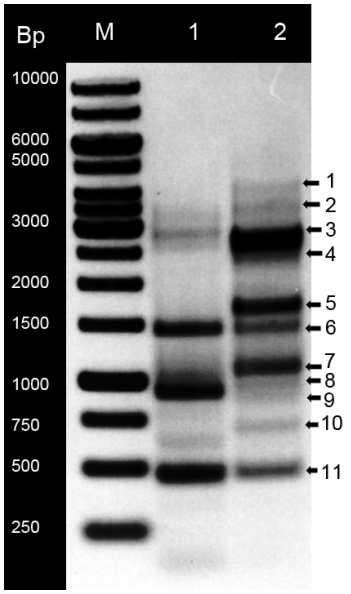


Abbildung 4.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (0,8 (w/v)) der PCR-Produkte am 3'-Ende der Vitamin B_{12}-Riboschalter (Adapter-PCR). Die chromosomale DNA war mit den Restriktionsendonukleasen *Pvu*II und *Ehe*I verdaut worden. Anschließend wurden Oligonukleotidadapter an die glatten DNA-Enden ligiert. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden „A_Primer2“ und „Ribo1_lang“ durchgeführt.
Spur 1: PCR-Produkt aus *Pvu*II-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1;
Spur 2: PCR-Produkt aus *Ehe*I-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1;
M: Gene Ruler^{TM} 1 kBp DNA-Längenstandard

Durch die Adapter-PCR konnten im jeweiligen Ansatz 8-10 Amplifikate nachgewiesen werden. Diese sollten die konservierten Nukleotidsequenzbereiche der B_{12}-Riboschalter enthalten. Alle im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel unter UV-Licht (356 nm) sichtbaren PCR-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel extrahiert und in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt kloniert. Anschließend erfolgte eine Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli* XL1 Blue. Der Ansatz wurde dann auf ampi-

cillinhaltige LB-Agarplatten ausplattiert, bei 37 °C inkubiert und einzelne Klone am folgenden Tag in 5 ml ampicillinhaltiges Flüssigmedium überimpft. Nach Isolierung der Plasmide aus den Bakterienkulturen wurde die Insertion der PCR-Amplifikate in den Klonierungsvektor durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II überprüft. Alle positiven Klone wurden anschließend nukleotidsequenziert und die erhaltenen Nukleotidsequenzen durch Abgleich mit der rfam-Datenbank (siehe Tabelle 6.1) auf Vitamin B_{12}-Riboschalter untersucht.

Um die vollständige Nukleotidsequenz der Vitamin B_{12}-Riboschalter zu erhalten, wurde ausgehend von der erhaltenen Nukleotidsequenz der Adapter-PCR-Amplifikate neue Oligonukleotide entworfen. Mit Hilfe einer erneuten Adapter-PCR konnten die Nukleotidsequenzbereiche im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifiziert werden, die stromaufwärts von potentiellen Vitamin B_{12}-Riboschaltern liegen. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass diese mit den potentiellen Riboschaltersequenzen überlappten, so dass diese Sequenzbereiche anschließend doppelsträngig sequenziert vorlagen und die Nukleotidsequenz unabhängig von der Riboschaltersonde auf genomischer Ebene verifiziert wurde. Die so erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden erneut mit Hilfe der rfam-Datenbank (siehe Tabelle 6.1) auf Vitamin B_{12}-Riboschalter untersucht. Die Nukleotidsequenzen aller identifizierten Vitamin B_{12}-Riboschalter sind in Abbildung 4.3 abgeglichen. Der Vergleich wurde mit Hilfe des clustalw2-Algorithmus durchgeführt. Durch diese Methode konnte ich die vollständigen Nukleotidsequenzen von zwölf verschiedenen Vitamin B_{12}-Riboschaltern im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifizieren. Das Ergebnis des Sequenzabgleichs ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

4.1.3 Identifizierung der durch B_{12}-Riboschalter regulierten Gene und Operons in *Sporomusa ovata* H1 durch „genomic walking“

Um nun die stromabwärts von identifizierten Vitamin B_{12}-Riboschaltern liegenden Nukleotidsequenzbereiche zu erhalten, wurde das genannte Adapter-PCR-Verfahren erneut angewendet („genomic walking“). Die Oligonukleotide zur Durchführung der Adapter-PCR waren so gewählt, dass die bekannte Nukleotidsequenz mit der Sequenz des neuen PCR-Amplifikats etwa 200 Bp überlappte. Die Nukleotidsequenzüberlappung wurde mit Hilfe des Programms DNA-merger (siehe Tabelle 6.1) untersucht und

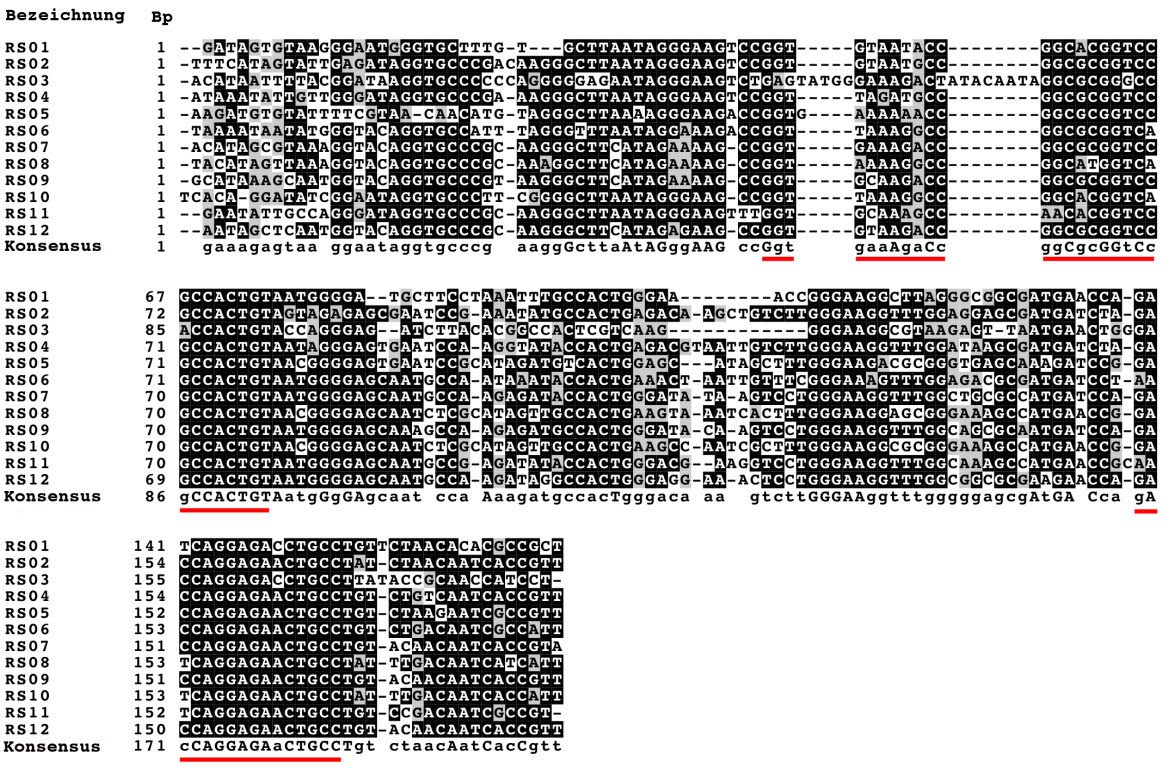


Abbildung 4.3: Vergleich der Nukleotidsequenzen der identifizierten Vitamin B_{12}-Riboschalter aus *Sporomusa ovata* H1. Die Nukleotidsequenzen wurden durch Abgleich mit der rfam-Datenbank identifiziert. Der Vergleich der Sequenzen aus *Sporomusa ovata* H1 untereinander und die Ableitung der Konsensussequenz erfolgte mit Hilfe des clustalW2-Algorithmus. Rot unterstrichen sind die Nukleotidsequenzen der konservierten Bereiche I und II der Vitamin B_{12}-Riboschalter.

zusammengefügt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen habe ich dann mit Hilfe des ORF-Finders (siehe Tabelle 6.1) auf offene Leserahmen analysiert und mit der NCBI-Datenbank (BLASTp, siehe Tabelle 6.1) abgeglichen.

Durch wiederholtes Anwenden der Adapter-PCR konnten so die stromabwärts liegenden Nukleotidsequenzen vervollständigt werden. Das Verfahren wurde sowohl für stromauf- als auch stromabwärts von B_{12}-Riboschaltern liegende Sequenzbereiche so lange angewendet, bis ein Nukleotidsequenzabschnitt erhalten wurde, welcher durch Homologie-Vergleich der abgeleiteten Genprodukte eindeutig nicht mehr dem Corrinoid-Metabolismus zugeordnet werden konnten. Die identifizierten Gene, deren Expression durch Vitamin B_{12}-Riboschalter reguliert werden und ihre benachbarten Nukleotidsequenzbereiche, sind in den folgenden Abbildungen und Tabellen darge-

stellt.

Ein Vitamin B_{12}-Riboschalter liegt stromaufwärts eines Gens, dessen Genprodukt eine 70 %ige Identität mit einem Protein der Corrinring-Biosynthese (CbiD, EC 2.1.1.152) in *Thermosinus carboxydivorans* Nor1 aufweist. Durch wiederholte Adapter-PCR konnten 15 weitere offene Leserahmen identifiziert werden, deren Genprodukte für Enzyme der Corrinring-Biosynthese kodieren. Exemplarisch ist in Abbildung 4.4 das Ergebnis der Adapter-PCR des 12. Schritts des „genomic walking“ abgebildet.

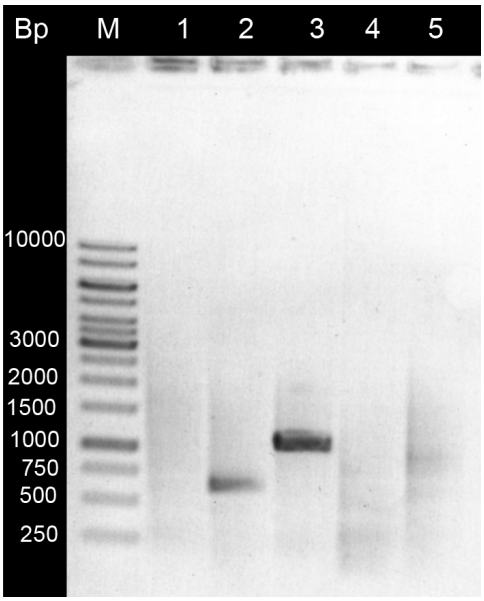


Abbildung 4.4: 0,8 %iges Agarosegel der PCR-Produkte der Adapter-PCR zur Vervollständigung der Genomabschnitte in *Sporomusa ovata* H1, welche stromabwärts eines B_{12}-Riboschalters liegen („genomic walking“). Beispielhaft ist hier der 12. Schritt des „genomic walking“ stromabwärts des Corrinoid-Riboschalters RS01 abgebildet. Die chromosomale DNA war mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*II *Dra*I, *Eco*47III, *Eco*RV und *Ehe*I verdaut worden. Anschließend wurden Oligonukleotidadapter an die glatten DNA-Enden ligiert. Als sequenzspezifisches Oligonukleotid wurde hier cbiD-D12 verwendet. M: Gene Ruler^{TM} 1 kBp DNA-Längenstandard Spur 1: PCR-Produkt aus *Bgl*II-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1; Spur 2: PCR-Produkt aus *Dra*I-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1; Spur 3: PCR-Produkt aus *Eco*47III-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1; Spur 4: PCR-Produkt aus *Eco*RV-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1; Spur 5: PCR-Produkt aus *Ehe*I-geschnittener chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1.

PCR-Produkte wurden in einem 0,8 %igem Agarosegel analysiert und anschließend nukleotidsequenziert. Die identifizierten offenen Leserahmen des untersuchten Genomabschnitts aus *Sporomusa ovata* H1 sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Eben-

so wurde das Gen, welches stromaufwärts des vorhergesagten Corrinring-Biosynthese-Operons lag, durch Adapter-PCR identifiziert. Die Organisation der identifizierten Gene ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Dieser identifizierte Genomabschnitt ist insgesamt 18.124 Bp lang.

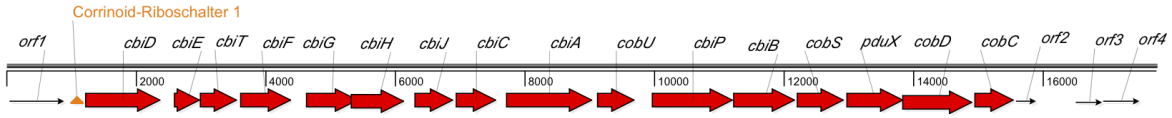


Abbildung 4.5: Anordnung der identifizierten offenen Leserahmen aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der einen Corrinoid-Riboschalter und Gene aus dem Corrinring-Biosynthese-Operon enthält. Rot dargestellt sind die offenen Leserahmen, deren Produkte eindeutig der Corrinring-Biosynthese zugeordnet werden konnten.

Tabelle 4.1: Identifizierte offene Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der einen Corrinoid-Riboschalter (orange) und Gene aus dem Corrinring-Biosynthese-Operon enthält. Angegeben ist die Länge der vorhergesagten Proteine (AS = Aminosäuren) und die Ergebnisse des Abgleichs auf Proteinebene mit der NCBI-Datenbank.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	44	287	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Protein der YdjC Familie	
cbiD	70	387	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobalamin Biosynthese Protein CbiD	2.1.1.152
cbiE	61	210	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-6y C5, 15-Methyltransferase, CbiE-Untereinheit	2.1.1.132
cbiT	64	191	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-6y C5, 15-Methyltransferase, CbiT-Untereinheit	2.1.1.132
cbiF	76	262	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-4 C11-Methyltransferase	2.1.1.133
cbiG	64	296	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobalamin Biosynthese, CbiG Protein	2.1.1.131
cbiH	69	274	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-3B C17-Methyltransferase	2.1.1.131
cbiJ	58	253	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-6x Reduktase	1.3.1.54
cbiC	71	208	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	cbiC, Precorrin 8x Methylmutase	5.4.1.2
cbiA	62	443	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobyrsäure a,c Diamid Synthase	6.3.5.9
cobU	68	193	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	CobU, Adenosylcobinamidphosphat Guanylyltransferase	2.7.7.62
cbiP	84	417	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobyrsäure Synthase	6.3.5.10
cbiB	65	318	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	CobD/CbiB Adenosylcobinamid Phosphat Synthase	6.3.1.10
cobS	58	243	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobalamin-5'-Phosphat Synthase, CobS	2.7.8.26
pduX	58	294	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	L-Threonin Kinase	2.7.11.1
cobD	57	369	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	L-Threonin-O-3-Phosphat Decarboxylase	6.3.1.10
cobC	55	200	*Mitsuokella multacida*	Alpha-Ribazol-5'-Phosphat Phosphatase	3.1.3.73
orf2	56	108	*Anaerobaculum hydrogeniformans*	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase Untereinheit	4.1.1.21
orf3	49	141	*Burkholderia dolosa* AUO158	Hämolysin Aktivatorprotein, äußere Membran	
orf4	48	191	*Herbaspirillum seropedicae* SmR1	Hämolysin Aktivatorprotein	

Die vorhergesagten Genprodukte der identifizierten Gene aus dem Corrinring-Biosynthese-Operon zeigen eine hohe Identität (größer 55 %) zu Enzymen aus dem anaeroben Vitamin B_{12}-Biosynthese-Weg anderer Prokaryoten. Diese Bakterien gehören wie *Sporomusa ovata* H1 dem Phylum der Firmicutes an.

Im anaeroben Vitamin B_{12}-Biosynthese-Weg findet der Einbau von Kobalt in den Corrinring im Gegensatz zum aeroben Weg bereits zu Beginn des Stoffwechselweges statt. Dieser Kobalt-Einbau wird durch die Kobaltchelatase (EC 4.99.1.3) katalysiert. In *Sporomusa ovata* H1 konnte ich eine solche Kobaltchelatase durch Adapter-PCR identifizieren. Das Genprodukt hat eine 43 %ige Identität zu einer „anaeroben“ Kobaltchelatase aus *Clostridium carboxidivorans* P7. In *Sporomusa ovata* H1 liegt diese Chelatase stromaufwärts eines B_{12}-Riboschalters (RS02, Abbildung 4.3), der die Expression eines möglichen Nitrogenase-Operons kontrollieren sollte. Stromaufwärts des Kobaltchelatasegens (*cbiK*) liegt ein palindromisches Nukleotidsequenzmotiv. Die gesamte in diesem Bereich des Genoms von *Sporomusa ovata* H1 identifizierte Nukleotidsequenz ist 10.526 Bp lang. Die durch den ORF-Finder nachgewiesenen offenen Leserahmen in dieser Sequenz sind in Abbildung 4.6 dargestellt und die vorhergesagten Funktionen der abgeleiteten Genprodukte ist in Tabelle 4.2 aufgeführt.

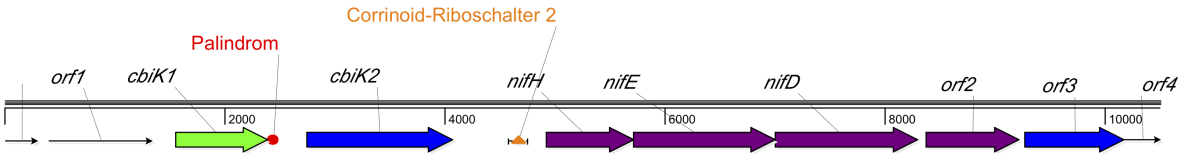


Abbildung 4.6: Anordnung der identifizierten offenen Leserahmen aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der einen Corrinoid-Riboschalter und die Gene zu einer Kobaltchelatase aus der Corrinoidbiosynthese enthielt.

Tabelle 4.2: Identifizierte offene Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der einen Corrinoid-Riboschalter und die Gene zu einer Kobaltchelatase aus der Corrinoidbiosynthese enthält. Angegeben ist die Länge der vorhergesagten Proteine (AS = Aminosäuren) und die Ergebnisse des Abgleichs auf Proteinebene mit der NCBI-Datenbank.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	28	334	*Frankia sp.* EUN1f	Aminoglykosid Phosphotransferase	1.2.7.95
cbiK1	43	281	*Clostridium carboxidivorans* P7	Anaerobe Kobaltchelatase CbiK	1.4.99.1.3
cbiK2	57	261	*Selenomonas sp.*	Kobaltchelatase CbiK	1.4.99.1.3
nifH	68	268	*Dialister invisus*	Nitrogenase Eisen Protein	1.18.6.1
nifE	43	432	*Selenomonas noxia*	Nitrogenase Eisen/Molybdän-Kofaktor Biosyntheseprotein	1.18.6.1
nifD	42	434	*Selenomonas noxia*	Oxidoreduktase/Nitrogenase, Komponente I	1.18.6.1
orf2	32	284	*Pelobacter propionicus*	Hypothetisches Protein	
orf3	51	315	*Pelobacter propionicus*	4Fe-4S Ferredoxin, Protein mit Eisen-Schwefel Bindedomäne	1.19.6.1
orf4	45	142	*Pelobacter propionicus*	2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase, Komponente D	4.2.1.-

Ein weiterer Vitamin B_{12}-Riboschalter (RS03) liegt im Genom von *Sporomusa ovata*

H1 stromaufwärts von zwei offenen Leserahmen, deren Genprodukte für eine mögliche Nikotinat-Mononukleotid:Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.21) kodieren. *Sporomusa ovata* H1 synthetisiert unter physiologischen Wachstumsbedingungen die beiden Vitamin B_{12}-Derivate Phenolylcobamid und *p*-Kresolylcobamid. Das Genprodukt des identifizierten *cobT* katalysiert deshalb vermutlich den Einbau von Phenol und *p*-Kresol in die biochemisch ungewöhnlichen *Sporomusa*-Corrinoide. Diese Aromaten werden durch eine O-glykosidische Bindung an die Ribose gebunden. In Vitamin B_{12} ist der untere Coα-Nukleotidligand N-glykosidisch mit Ribose verknüpft. Da *Sporomusa ovata* H1 auch Vitamin B_{12} herstellen kann, kodieren diese identifizierten offenen Leserahmen möglicherweise für Enzyme mit unspezifischer Glykosidase-Aktivität. Durch Adapter-PCR konnte die Nukleotidsequenz eines B_{12}-Riboschalters vollständig erhalten und durch Abgleich mit der rfam-Datenbank identifiziert werden. Dieser Riboschalter befindet sich stromaufwärts von zwei *cobT*-Genen. Insgesamt habe ich in diesem Bereich des Genoms von *Sporomusa ovata* H1 einen Sequenzabschnitt von 6.498 Bp durch Adapter-PCR identifiziert.

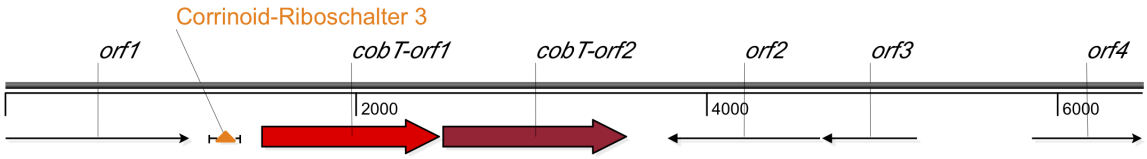


Abbildung 4.7: Anordnung der identifizierten offenen Leserahmen aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der einen Corrinoid-Riboschalter und Gene der Corrinoid-Biosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden enthält.

Tabelle 4.3: Identifizierte offene Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der einen Corrinoid-Riboschalter und Gene der Corrinoid-Biosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden enthält. Angegeben ist die Länge der vorhergesagten Proteine (AS = Aminosäuren) und die Ergebnisse des Abgleichs auf Proteinebene mit der NCBI-Datenbank.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	82	344	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Extrazelluläres Rezeptorprotein	
cobT1	54	346	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Nikotinat-Mononukleotid–Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase	2.4.2.21
cobT2	45	350	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Nikotinat-Mononukleotid–Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase	2.4.2.21
orf2	25	292	*Bacillus pseudomycoides* DSM 12442	Hypothetisches Protein bpmyx0001-2490	
orf3	45	183	*Brevibacillus brevis* NBRC 100599	Hypothetisches Protein BBR47-18120	
orf4	77	211	*Syntrophus aciditrophicus* SB	Glutamat Synthase	1.4.1.13

Im folgenden Genomabschnitt von *Sporomusa ovata* H1 konnten drei B_{12}-Riboschalter (RS04, RS05, RS06, siehe Abbildung 4.3) identifiziert werden. Zwei der Riboschalter folgen im Abstand von 562 Bp direkt aufeinander. Im Genomabschnitt zwischen diesen beiden Riboschaltern befinden sich keine nachweisbaren offenen Leserahmen. Stromabwärts dieser Riboschalter befindet sich ein offener Leserahmen, welcher für einen transkriptionellen Regulator der LuxR-Familie kodiert. Das Genprodukt hat eine 29 %ige Identität mit einem solchen LuxR-Regulatorprotein aus *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01. Im Anschluss an diesen offenen Leserahmen befindet sich ein weiterer Corrinoid-Riboschalter. Stromabwärts dieses dritten Riboschalters folgt ein offener Leserahmen, welcher möglicherweise für TonB-abhängige Rezeptorproteine kodiert. Die Organisation des beschriebenen Genomabschnitts ist in Abbildung 4.8 und die durch den ORF-Finder nachgewiesenen offenen Leserahmen in Tabelle 4.4 dargestellt. Dieser durch Adapter-PCR identifizierte Genomabschnitt umfasst eine Länge von 9.748 Bp.

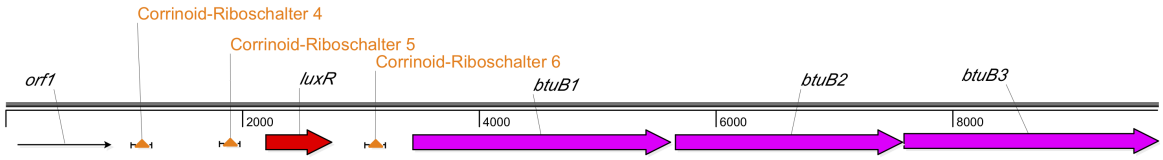


Abbildung 4.8: Anordnung der identifizierten offenen Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte zu einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, welcher drei Corrinoid-Riboschalter und die Gene eines möglichen transkriptionellen Regulators und putativer Corrinoid-Transporter enthält

Tabelle 4.4: Identifizierte offene Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte zu einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, welcher drei Corrinoid-Riboschalter und die Gene eines möglichen transkriptionellen Regulators und eines putativen Corrinoid-Transporters enthält. Angegeben ist die Länge der vorhergesagten Proteine (AS = Aminosäuren) und die Ergebnisse des Abgleichs auf Proteinebene mit der NCBI-Datenbank.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
orf1	36	265	*Photorhabdus luminescens subsp. laumondii* TTO1	Hypothetisches Protein plu2216	
luxR	29	144	*Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01	Transkriptioneller Regulator der LuxR-Familie	
btuB1	42	539	*Dialister invisus* DSM 15470	TonB-abhängiger Rezeptor	1.B.14.3.1
btuB2	33	642	*Selenomonas noxia* DSM 15470	Hypothetisches Protein	
btuB3	45	367	*Selenomonas noxia* DSM 15470	Hypothetisches Protein	

Ein weiterer, durch Adapter-PCR identifizierter Genomabschnitt aus *Sporomusa ovata*

H1 umfasst 10.575 Bp. Der Bereich enthält am 5'-Ende zwei B_{12}-Riboschalter (RS07 und RS08, siehe Abbildung 4.3), nach welchen sich jeweils stromabwärts des genregulatorischen Elements ein einzelner offener Leserahmen befindet. Für diese offenen Leserahmen konnte durch Abgleich mit der NCBI-Datenbank kein eindeutiges Genprodukt oder eine mögliche Funktion vorhergesagt werden. Weiter stromabwärts folgen erneut zwei weitere B_{12}-Riboschalter (RS09 und RS10, siehe Abbildung 4.3), hinter welchen sich stromabwärts ein offener Leserahmen befindet, dessen vorhergesagtes Genprodukt eine 55 %ige Identität mit einem TonB-abhängigen Rezeptorprotein aus *Dialister invisus* DSM 15470 aufweist. Im Anschluss an diesen Leserahmen konnte nach Datenbankabgleich (BLASTp) auf Ebene der Aminosäuresequenz ein N-Terminus eines bereits früher identifizierten Proteins aus *Sporomusa ovata* H1 gefunden werden. Dieses Protein wurde als Methanol-induziertes, Corrinoid-bindendes Protein identifiziert und dessen N-terminale Aminosäuresequenz durch Edman-Abbau bestimmt (Stupperich u. a., 1992). Diese N-terminale Aminosäuresequenz stimmt zu 99 % mit meinen Analysen überein. Die Organisation der identifizierten offenen Leserahmen ist in Abbildung 4.9 dargestellt und die vorhergesagten Genprodukte sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

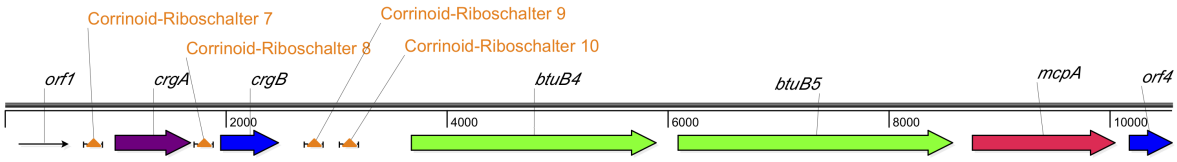


Abbildung 4.9: Anordnung der identifizierten offenen Leserahmen aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, welcher vier Corrinoid-Riboschalter (orange) enthält.

Tabelle 4.5: Identifizierte offene Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte eines Genomabschnitts in *Sporomusa ovata* H1, welcher vier B_{12}-Riboschalter enthält (siehe Abbildung 4.9). Angegeben ist die Länge der vorhergesagten Proteine (AS = Aminosäuren) und die Ergebnisse des Abgleichs auf Proteinebene mit der NCBI-Datenbank.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
orf1	48	154	*Dialister invisus* DSM 15470	putativer Autotransporter	1.B.12
crgA	35	232	Petunia Vein Clearing Virus (PVCV)	ORF I Polyprotein	
crgB	29	177	*Dialister invisus* DSM 15470	konserviertes hypothetisches Protein	
btuB4	32	741	*Fusobacterium mortiferum* ATCC 9817	Autotransporter Beta-Domäne	1.B.12
btuB5	55	831	*Selenomonas noxia* ATCC 43541	TonB-abhängiger Rezeptor	1.B.14.3.1
mcpA	96	433	*Sporomusa ovata* H1	Methanol-induziertes, Cobamid-haltiges Protein	
orf4	35	134	*Coraliomargarita akajimensis* DSM 45221	Valyl-tRNA Synthetase	6.1.1.9

Ausserdem konnte ich einen weiteren Genomabschnitt durch Adapter-PCR identifizieren. Der Abschnitt hat eine Länge von 5521 Bp und enthält zwei aufeinanderfolgende Corrinoid-Riboschalter (RS11 und RS12, siehe Abbildung 4.3). Stromabwärts dieser genregulatorischen Elemente befindet sich ein offener Leserahmen, welcher eine 54 %ige Identität mit einem Vitamin B_{12}-Transportprotein BtuB aus *Fusobacterium sp.* D12 aufweist.



Abbildung 4.10: Identifizierte offene Leserahmen eines Genomabschnitts in *Sporomusa ovata* H1, welcher zwei Corrinoid-Riboschalter (orange) enthält.

Tabelle 4.6: Identifizierte offene Leserahmen und vorhergesagte Genprodukte aus einem Genomabschnitt in *Sporomusa ovata* H1, der zwei Corrinoid-Riboschalter enthält. Angegeben ist die Länge der vorhergesagten Proteine (AS = Aminosäuren) und die Ergebnisse des Abgleichs auf Proteinebene mit der NCBI-Datenbank.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
ompH	36	158	*Acidaminococcus fermentans* DSM 20731	Chaperon Skp, äußere Membran (OmpH)	
btuB6	54	951	*Fusobacterium sp.* D12	Vitamin B_{12}-Transportprotein BtuB	1.B.14.3.1
orf1	38	123	*Dialister invisus* DSM 15470	konserviertes hypothetisches Protein	

Durch erfolgreiche Anwendung der Adapter-PCR auf die konservierten Bereiche der B_{12}-Riboschalter konnte ich also in *Sporomusa ovata* H1 insgesamt zwölf dieser genregulatorischen Elemente nachweisen. Die Gene stromabwärts der Riboschalter kodieren neben Genen der Corrinring-Biosynthese oder des Corrinoid-Transports auch die Gene, deren Produkte für die Synthese des unteren Coα-Nukleotidliganden der *Sporomusa*-Corrinoide verantwortlich sein sollten. Damit habe ich die Gene identifiziert, welche für die ungewöhnliche Corrinoidbiosynthese in *Sporomusa ovata* H1 kodieren. Ausserdem habe ich einen B_{12}-Riboschalter identifiziert, welcher die Expression eines transkriptionellen Regulatorproteins kontrolliert. Ein solcher Regulationsmechanismus ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Ich habe deshalb die Gene, die für die Synthese des unteren Nukleotidliganden und die Gene, welche für diesen transkriptionellen Regulator LuxR kodieren näher untersucht und charakteri-

siert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.1.3.1 Untersuchungen zum transkriptionellen Regulator LuxR

Durch Adapter-PCR wurde stromabwärts eines B_{12}-Riboschalters eine Gensequenz identifiziert, dessen Produkt für einen transkriptionellen Regulator der LuxR-Familie kodieren sollte (siehe Abbildung 4.8 und Tabelle 4.4). Um die Rolle des Regulatorproteins im Stoffwechsel von *Sporomusa ovata* H1 zu analysieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Wird *luxR* beim Wachstum auf allen Substraten exprimiert, dann sollte das Regulatorprotein eine zentrale Reaktion des Corrinoid-Stoffwechsels regulieren. Eine substratspezifische Expression hingegen würde für die Regulation einer Corrinoid-abhängigen Reaktion eines substratabhängigen Stoffwechselweges sprechen.

Für diese Analysen wurde *Sporomusa ovata* H1 auf den Substraten Methanol, Betain, Fructose beziehungsweise Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiequellen gezüchtet. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} = 0,6) geerntet, die RNA isoliert und die isolierten Gesamt-RNA Proben durch DNase-Behandlung von DNA-Kontamination befreit. Diese Probe diente jeweils als Negativkontrolle der RT-PCR. Ausgehend von 100 µg der DNA-freien RNA-Proben wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und dabei die komplette RNA durch Verwendung von DNA-Hexameren als Primer in cDNA umgeschrieben. Diese Proben dienten als Matrize zur Analyse der Genexpression von *luxR* durch RT-PCR. Dazu wurden die Oligonukleotide luxRb_RT300_fw und luxRb_RT300_rev verwendet. Das Ergebnis der Expressionsanalysen durch RT-PCR bei verschiedenen Wachstumssubstraten ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

Die Analyse der *luxR*-Expression durch RT-PCR zeigt, dass das Gen unter allen getesteten Wachstumsbedingungen exprimiert wird. So kann das *luxR*-Transkript bei Wachstum auf den Substraten Methanol, Betain, Fructose und Pyruvat nachgewiesen werden. LuxR kontrolliert deshalb möglicherweise eine zentrale Reaktion im Corrinoidstoffwechsel. Um diese Rolle des transkriptionellen Regulators in *Sporomusa ovata* H1 zu untersuchen, habe ich das Protein zunächst heterolog in *Escherichia coli* hergestellt und damit DNA-Bindungsstudien durchgeführt.

Die kodierende Gensequenz wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide luxR_fw+1

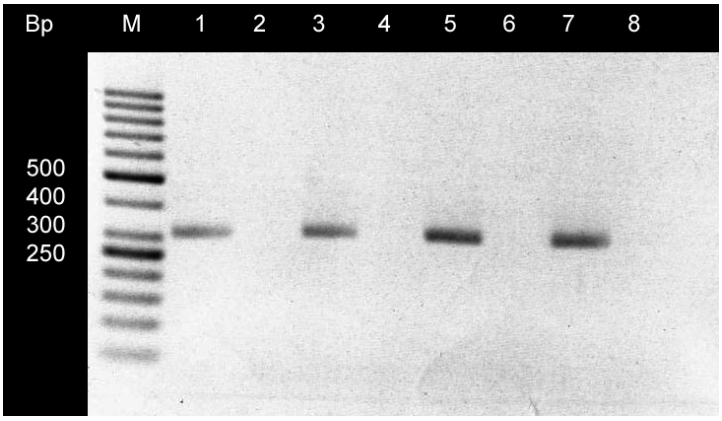


Abbildung 4.11: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (2,5 % (w/v)) der Produkte zur Expressionsanalyse des transkriptionellen Regulators LuxR aus *Sporomusa ovata* H1 durch RT-PCR. Die Expression wurde beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen untersucht. Die cDNA-Synthese erfolgte ausgehend von 100 ng Gesamt-RNA.
M: „O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas"
Spur 1: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Methanol
Spur 3: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Betain
Spur 5: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Fructose
Spur 7: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Pyruvat
Spuren 2, 4, 6, 8: Jeweilige Kontrolle der Kontamination durch chromosomale DNA: PCR RNA nach DNase-Verdau.

und SporoLuxR_rev vervielfältigt, in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert und in chemisch kompetente *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' transformiert. Einzelne Klone wurden in ampicillinhaltigem Flüssigmedium (5 ml) gezüchtet und die Plasmide isoliert. Die inserierten PCR-Amplifikate enthielten an ihrem 5'- und 3'-Ende die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *Bam*HI. Durch Restriktionsverdau wurden diese LuxR-kodierenden DNA-Abschnitte ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pET-16b kloniert. Der Ligationsansatz wurde in *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' transformiert und von den einzelnen Klonen die korrekte Insertionsrichtung durch Verdau mit *Hind*III kontrolliert. Das isolierte Plasmid, welches das *luxR*-Amplifikat in richtiger Orientierung in pET-16b enthielt, wurde nun in *Escherichia coli* BL21 AI transformiert. Ein Klon, welcher das gewünschte Konstrukt enthielt, wurde verwendet, um den transkriptionellen Regulator LuxR heterolog als His-Tag Fusionsprotein herzustellen. Die erwartete molekulare Masse des hergestellten LuxR-His-Tag Fusionsproteins betrug 25,0 kDa.

Seine Proteinsequenz wurde durch Trypsin-Verdau und anschließende MALDI-TOF-

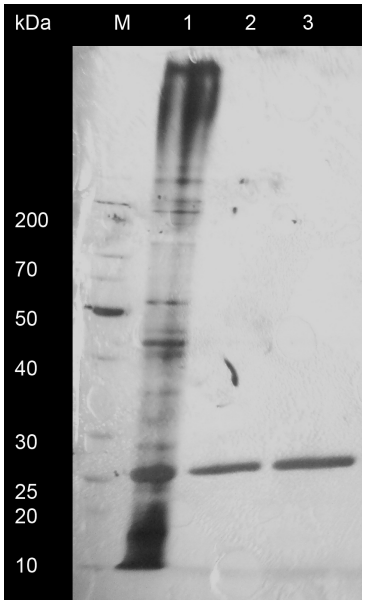


Abbildung 4.12: Proteinexpression von His-Tag markiertem LuxR in *Escherichia coli* BL21 AI/pET-16b. Rekombinantes, cytoplasmatisches LuxR wurde auf eine Ni-Chelatsäule aufgetragen, mit 40 mM Imidazolpuffer pH 7,4 gewaschen und mit 500 mM Imidiazolpuffer pH 7,4 von der Affinitätssäule gelöst. Zur Proteinanalyse wurde ein 12,5 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel genutzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.
M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas
Spur 1: Proteinextrakt aus *Escherichia coli* BL21-pET-16b-luxR
Spur 2: 10 µl Proteinfraktion, Elutionsschritt 1 (1,5 ml) mit 500 mM Imidazol
Spur 3: 10 µl Proteinfraktion, Elutionsschritt 2 (1,5 ml) mit 500 mM Imidazol

Analyse bestätigt. Die nachgewiesenen Peptide nach der Trypsin-Behandlung decken 36,5 % der Gesamtproteinsequenz ab (siehe Abbildung 4.13.

MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMLEDPMYWSNYWEAFHQDNQGICILNHKLENIYTNE
KAKQVFKNLSPGLYQQLKSVCRRFMAMVKAKETNLSNYSGMLNHQRDTISFSCFSFYL
DKQSYIMVVFDYRASDEINLAGGTTFTLREKDILQAIAAGKTNKEISEILRIGFETVKSHVK
NLLAKTGTSSRTELISKYWYLKNNTVDTPNYAVFRKK

Abbildung 4.13: Identifizierte Peptide der MALDI-TOF-Analyse des heterolog hergestellten, mit Trypsin verdauten LuxR-Proteins aus *Sporomusa ovata* H1. Die identifizierten Peptide sind in der Proteinsequenz rot hervorgehoben. Blau markiert ist die Proteinsequenz, welche auf dem Expressionsvektor pET-16b kodiert ist. Diese enthält den His-Tag (10x His), welcher zur Isolierung des Proteins genutzt wurde. Unterstrichen ist die Aminosäuresequenz, welche ein mögliches DNA-Bindemotiv (Helix-Turn-Helix) enthält.

Das Protein LuxR sollte ein DNA-bindendes Regulatorprotein sein und deshalb in seiner Aminosäuresequenz ein DNA-Bindemotiv enthalten. Mit Hilfe der Software NPS-HTH (siehe Tabelle 6.1) konnte ein solches DNA-Bindemotiv (Helix-Turn-Helix-Motiv) in der Proteinsequenz identifiziert werden. Dieses DNA-Bindemotiv befindet sich im carboxyterminalen Teil des Proteins und enthält die Aminosäuresequenz KTNKEISEILRIGFETVKSHVK (siehe Abbildung 4.13).

Um nun die DNA-Bindestelle des Regulatorproteins LuxR im Genom von *Sporomusa ovata* H1 und damit auch die durch LuxR regulierten Gene zu identifizieren, kam das SELEX-Verfahren zum Einsatz. Dazu wurden 400 pmol des isolierten LuxR-His-Tag-Fusionsproteins mit 10 µg, mit *Hind*III verdauter, chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 inkubiert und anschließend über den 9x-His-Tag an eine Nickel-Affinitätssäule gebunden.

Nach zweimaligem Durchlaufen des SELEX-Zyklus (siehe Kapitel 3.4.15) konnten auf einem 0,8 %igen Agarosegel mehrere Amplifikate nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

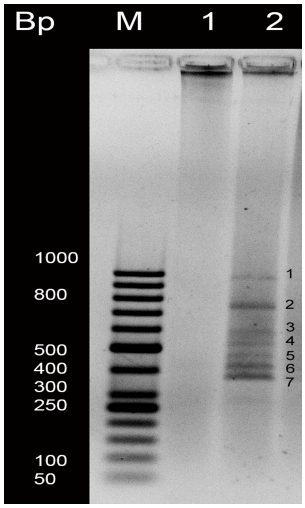


Abbildung 4.14: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (2,5 % (w/v)) der PCR-Produkte nach dem SELEX-Verfahren zur Identifizierung der LuxR-DNA-Bindestelle im Genom von *Sporomusa ovata* H1. M: „O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas"
Spur 1: PCR-Produkte nach erster Selektionsrunde
Spur 2: PCR-Produkte nach zweiter Selektionsrunde

Die Nukleotidsequenzen der PCR-Produkte sollten potentielle, palindromische LuxR-Bindestellen enthalten. Alle Banden, die im Agarosegel sichtbar waren, wurden deshalb in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert und anschließend die Nukleotidsequenz

aller Amplifikate bestimmt. Diese Nukleotidsequenzen sind im Anhang (Kapitel 7.4) dieser Arbeit aufgeführt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden dann mit dem ORF-Finder auf offene Leserahmen untersucht. Die ermittelten offenen Leserahmen der Nukleotidsequenzen, die im SELEX-Verfahren zur Bestimmung der LuxR-Bindestellen im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifiziert wurden, sind in der Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: Identifizierte offene Leserahmen der möglichen DNA-Bindestellen des transkriptionellen Regulators LuxR aus *Sporomusa ovata* H1 durch das SELEX-Verfahren.

Bande	Länge [Bp]	Vorhergesagtes Genprodukt			
		Identität [%]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
1	865	68	*Clostridium ljungdahlii* DSM 13528	Uroporphyrinogen III Decarboxylase	4.1.1.37
2	830	74	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Peptidketten Release Faktor 2	3.6.5.3
3	516	57	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	DNA-abhängige DNA-Polymerase	2.7.7.6
4	456	67	*Desulfitobacterium hafniense*	Protein mit Molydopterindinukleotid-Bindemotiv	
5	262	34	*Selenomonas sp.* F0430	TonB-abhängiges Rezeptorprotein	1.B.14.3.1
6	274	80	*Thermosinus carboxydivorans*	Thiaminmonophosphat Kinase	2.7.4.16
7	**268**	**55**	***Clostridium carboxidivorans* P7**	**Anaerobe Kobaltchelatase CbiK**	**1.4.99.1.3**

Die in Tabelle 4.7 beschriebenen Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Software Palindrome (siehe Tabelle 6.1) auf palindromische Sequenzmotive untersucht. Die Nukleotidsequenz stromaufwärts eines offenen Leserahmens, der für eine anaerobe Kobaltchelatase (CbiK, Bande 7 in Abbildung 4.6) kodiert, enthält ein palindromisches Nukleotidsequenzmotiv (AAATACTGTTCATAACCAACAGTATTT). Dieses Motiv hat eine Länge von 27 Bp, wobei die 10 Bp langen, komplementären Bereiche, durch 7 Bp voneinander getrennt sind.

Durch ein Gelretardationsexperiment („electrophoretic mobility shift assay“, EMSA) sollte überprüft werden, ob diese palindromische Nukleotidsequenz stromaufwärts des Kobaltchelatase kodierenden Gens *cbiK* eine Bindestelle des transkriptionellen Regulators LuxR darstellt. Dazu wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide cbiK_EMSA_fw und cbiK_EMSA_rev eine doppelsträngige, 220 Bp lange, DNA-Sonde erstellt. Diese Sonde enthielt das mögliche palindromische LuxR-Bindemotiv. Die Bindung an diese DNA-Sonde wurde mit gereinigtem LuxR-His-Tag Fusionsprotein (siehe Abbildung 4.12) durchgeführt und dabei steigende Mengen (0 - 40 pmol) des rekombinanten LuxR bei gleich bleibender DNA-Sonden-Menge (750 fmol) verwendet. Das Ergebnis der EMSA-Analyse ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Rinderserumalbumin (BSA) diente in diesem Experiment als Negativkontrolle, um eine unspe-

zifische Protein-Bindung der DNA-Sonde auszuschließen. Zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindestellen des LuxR-Proteins wurde jedem Ansatz Poly[d(I-C)]-DNA (100 ng/µl) beigefügt.

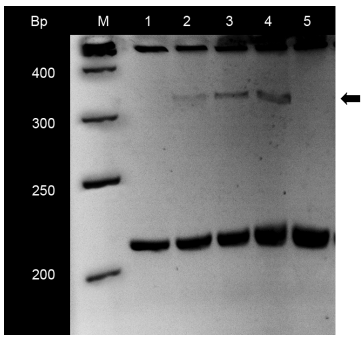


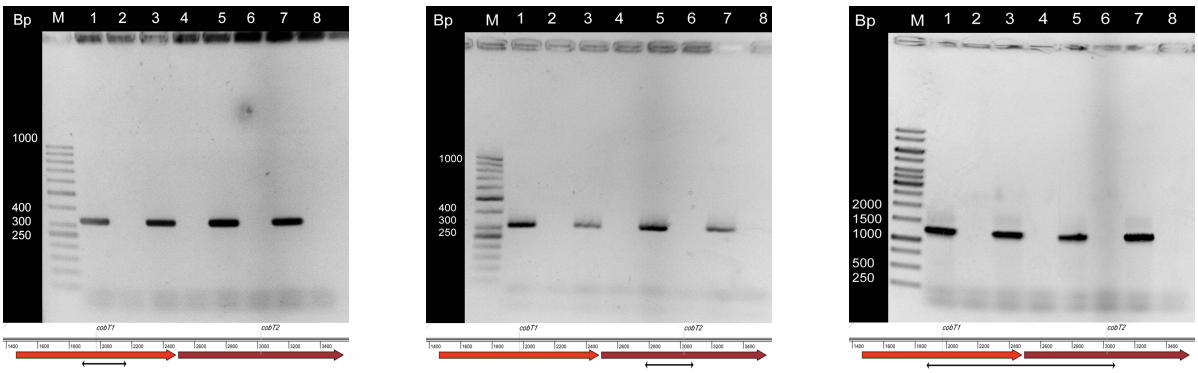
Abbildung 4.15: Ethidiumbromid-gefärbtes Spreadex® EL 600 Mini-Gel des Gelretardationsexperiments (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) mit rekombinantem His-Tag-LuxR-Fusionsprotein und einer PCR-Sonde, welche das palindromische Nukleotidsequenzmotiv stromaufwärts des Kobaltchelatase-Gens *cbiK* enthält. Eingesetzt wurden steigende Konzentrationen LuxR-Protein und jeweils 750 fmol der doppelsträngigen DNA-Sonde. Als Negativkontrolle dienten 40 pmol Rinderserumalbumin.
M: O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas; Spur 1: 0 pmol LuxR; Spur 2: 4 pmol LuxR; Spur 3: 20 pmol LuxR; Spur 4: 40 pmol LuxR; Spur 5: 40 pmol Rinderserumalbumin

Mit steigender Konzentration an aufgereinigtem LuxR-Protein konnte eine steigende Retardation der DNA-Sonde im Spreadex® EL 600 Mini-Gel beobachtet werden, während Rinderserumalbumin (BSA), wie erwartet, nicht mit der DNA-Sonde wechselwirkte. Dieses Ergebnis zeigt eine Bindung des LuxR-Proteins an die doppelsträngige DNA-Sonde. Der transkriptionelle Regulator LuxR ist also wahrscheinlich an der Regulation der Genexpression der anaeroben Kobaltchelatase CbiK beteiligt. Damit ist ein weiteres Gen der Corrinoid-Biosynthese identifiziert.

4.1.3.2 Untersuchungen zu einer vorhergesagten Nikotinsäure-Mononukleotid-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (CobT) aus *Sporomusa ovata* H1

Durch Analyse der B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 und durch Vervollständigung der stromabwärts liegenden Nukleotidsequenzbereiche durch Adapter-PCR („genomic walking“) konnten zwei offene Leserahmen identifiziert werden, welche eine 54 %ige beziehungsweise 45 %ige Identität mit einer Nikotinsäure-Mononukleotid-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase aus *Thermosinus carboxydivorans* Nor1 aufweist (siehe Abbildung 4.7 und Tabelle 4.7). Da *Sporomusa ovata* H1 unter physiologischen Wachstumsbedingungen statt des sonst weit verbreiteten Vitamin B_{12} die Corrinoide Phenolylcobamid und *p*-Kresolylcobamid bildet, ist es wahrscheinlich, dass die beiden *cobT*-Gene in *Sporomusa* für Proteine kodieren, welche den Einbau der unteren Nukleotidliganden in die *Sporomusa*-Corrinoide katalysieren.

Da in *Sporomusa ovata* H1 zwei dieser CobT-kodierenden offenen Leserahmen direkt aufeinander folgen, wurde zunächst mit Hilfe einer RT-PCR die Expression der beiden *cobT*-Gene bei verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Analysiert wurde ebenfalls, ob die beiden Gene polycistronisch auf einer mRNA kodiert sind. Dazu wurde zunächst *Sporomusa ovata* H1 auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoff- und Energiequellen gezüchtet. Diese waren: Betain, Fructose, Methanol oder Pyruvat. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 - 0,6 wurde aus 15 ml Bakterienkultur RNA isoliert. Nach einem DNase-Verdau wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und jeweils 100 ng Gesamt-RNA für eine cDNA-Synthese mit Hilfe von Hexamer-Primern verwendet. Die anschließende RT-PCR wurde mit den Oligonukleotiden cobT01-Northern-fw und cobT01-Northern-rev zur Expressionsanalyse des ersten *cobT*-Gens (*cobT1*) beziehungsweise mit den Oligonukleotiden cobT02-Northern-fw und cobT02-Northern-rev zur Expressionsanalyse des zweiten *cobT*-Gens (*cobT2*) durchgeführt. Zur Analyse der polycistronischen Expression beider Gene wurden für die RT-PCR-Analyse das Oligonukleotid cobT01-Northern-fw zusammen mit cobT02-Northern-rev verwendet und die PCR-Produkte durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft. Das Ergebnis der RT-PCR ist in Abbildung 4.16 dargestellt; es spricht für eine Koexpression beider *cobT*-Gene.



(a) *cobT1* (b) *cobT2* (c) *cobT1+cobT2*

Abbildung 4.16: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (2,5 % (w/v)) der Produkte zur Expressionsanalyse von *cobT* aus *Sporomusa ovata* H1 durch RT-PCR. Analysiert wurde die Expression der beiden kodierenden offenen Leserahmen (*cobT1* und *cobT2*) sowie die gemeinsame Expression beider Leserahmen. Die Genexpression wurde beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen untersucht.
M(a+b): „O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas"; M(c): „O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas"; Spur 1: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Betain; Spur 3: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Fructose; Spur 5: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Methanol; Spur 7: PCR-Produkte der RT-PCR beim Wachstum auf Pyruvat; Spuren 2, 4, 6, 8: Jeweilige Kontrolle der Kontamination durch chromosomale DNA: PCR auf RNA nach DNase-Verdau

Bestimmung des Transkriptionsstarts des *cobT*-Operons

Zur weiteren Charakterisierung des *cobT*-Operons aus *Sporomusa ovata* H1 wurde ebenfalls sein Transkriptionsstartpunkt durch 5'-RACE bestimmt. Da durch die RT-PCR Analysen bekannt war, dass die *cobT*-Gene in Gegenwart verschiedener Wachstumssubstrate exprimiert werden, wurde aus Methanol-gewachsenen *Sporomusa ovata* H1-Zellen RNA isoliert. Anschließend wurde die noch vorhandene DNA durch einen DNase-Verdau vollständig entfernt und 100 ng DNase-freie RNA für die Durchführung der 5'-RACE verwendet. Das Amplifikat der 5'-RACE-PCR (etwa 550 Bp) wurde aus dem 2,5 %igen Agarosegel aufgereinigt, in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert und in chemisch kompetente *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' transformiert. Die Nukleotidsequenz des klonierten PCR-Produkts wurde durch Nukleotidsequenzierung der isolierten Plasmide mit Hilfe des Oligonukleotids pJET1.2-forward bestimmt. Der ermittelte Transkriptionsstartpunkt und die Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts dieses Bereiches ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

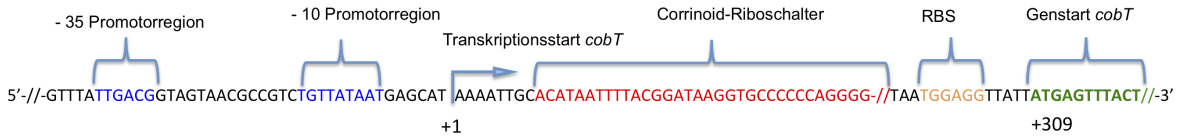


Abbildung 4.17: Analyse des Transkriptionsstarts der mRNA des *cobT1* Gens (kodiert für eine Nikotinat:p-Kresol Phosphoribosyltransferase, Homologie zu E.C. 2.4.2.21) aus *Sporomusa ovata* H1

Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich 309 Bp stromaufwärts des *cobT1*-Startcodons. Stromaufwärts (6 Bp) des Transkriptionsstarts konnte mit Hilfe der Software BPROM (siehe Tabelle 6.1) ein möglicher Promotor identifiziert werden. Unmittelbar nach dem Transkriptionsstart (8 Bp) befindet sich der bereits identifizierte Corrinoid-Riboschalter (RS03), welcher die Expression des *cobT*-Operons kontrolliert.

Die beiden *cobT*-Genewerden folglich polycistronisch unter allen getesteten Wachstumsbedingungen exprimiert. Dieses Ergebnis sollte durch eine Northern-Blot Hybridisierung mit *cobT*-spezifischen DNA-Sonden bestätigt und die Länge des *cobT*-Transkripts bestimmt werden. Die DNA-Sonden wurden durch PCR mit Digoxigenin-markiertem Uridin-5'-Triphosphat (DIG-11-UTP) und den Oligonukleotiden CobTO1-Northern-fw und CobTO1-Northern-rev (*cobT1*-DNA-Sonde) beziehungsweise CobTO2-Northern-fw und CobTO2-Northern-rev (*cobT2*-DNA-Sonde) hergestellt. Die Produkte der PCR wurden auf einem 2,5 %igem (w/v) Agarosegel analysiert. Das Ergebnis dieser Gelelektrophorese ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Zur Kontrolle des Einbaus von DIG-11-UTP wurde die PCR ebenfalls ohne Digoxigenin-markierte Nukleotide durchgeführt. Durch den Einbau von DIG-11-UTP wandert die doppelsträngige DNA langsamer im elektrischen Feld als die gleiche DNA ohne entsprechende Markierung.

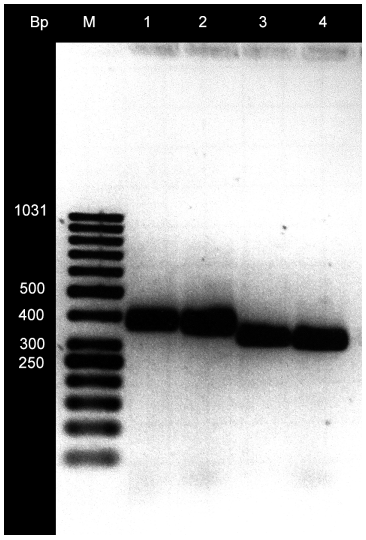


Abbildung 4.18: 2,5 %iges Agarosegel der PCR-Produkte zur Herstellung der doppelsträngigen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden zur anschließenden Northern-Blot-Analyse des *cobT*-Operons aus *Sporomusa ovata* H1. Zur Kontrolle des Einbaus von Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat (DIG-11-UTP) wurde die PCR mit den Oligonukleotiden jeweils mit und ohne DIG-11-UTP durchgeführt. In die PCR-Reaktion wurden die Oligonukleotide CobTO1-Northern-fw und CobTO1-Northern-rev (*cobT1*-DNA-Sonde) beziehungsweise CobTO2-Northern-fw und CobTO2-Northern-rev (*cobT2*-DNA-Sonde) verwendet.
M: O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas; Spur 1: PCR-Produkt zur *cobT1*-DNA-Sonde mit DIG-11-UTP; Spur 2: PCR-Produkt zur *cobT2*-DNA-Sonde mit DIG-11-UTP; Spur 3: PCR-Produkt zur *cobT1*-DNA-Sonde ohne DIG-11-UTP; Spur 4: PCR-Produkt zur *cobT2*-DNA-Sonde ohne DIG-11-UTP

Die Digoxigenin-markierten PCR-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt und zur Northern-Blot Analyse verwendet. Hierzu wurde aus der exponentiellen Wachstumsphase Methanol-gezüchteter *Sporomusa ovata* H1-Zellen Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit DNase I, um Kontamination mit chromosomaler DNA zu vermeiden. Jeweils 1 µg der DNA-freien RNA wurden auf ein denaturierendes Agarosegel (0,8 % (w/v)) aufgetragen. Als Größenstandard diente der RNA-Standard RiboRuler™ High Range RNA Ladder. Die DNA-freie RNA wurde dann auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit jeweils 100 µmol denaturierter *cobT1*-DNA-Sonde beziehungsweise *cobT2*-DNA-Sonde.

Die Northern-Blot Hybridisierung (Abbildung 4.19) zeigt sowohl bei Verwendung der denaturierten *cobT1*-DNA-Sonde als auch der denaturierten *cobT2*-DNA-Sonde ein Hybridisierungssignal bei etwa 2500 Bp. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die beiden *cobT*-Gene polycistronisch in mRNA umgeschrieben werden. Die Länge des *cobT*-

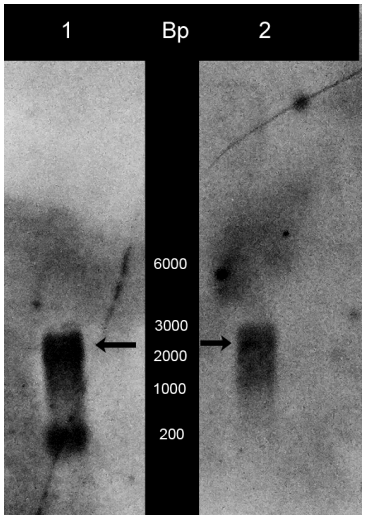


Abbildung 4.19: Northern-Blot Hybridisierung der denaturierten DNA-Sonden *cobT1*-DNA-Sonde (A) und *cobT2*-DNA-Sonde (B) auf 1 µg DNase-verdaute Gesamt-RNA aus einer Methanol-Kultur von *Sporomusa ovata* H1. M: RiboRuler™ High Range RNA Ladder

Transkripts beträgt wie erwartet etwa 2500 Bp.

Heterologe Produktion von CobT1 und CobT2 aus *Sporomusa ovata* H1 in *Escherichia coli*

Sporomusa ovata H1 kann neben *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid auch Vitamin B_{12} herstellen. Das Enzym CobT aus dem anaeroben Bakterium sollte also in der Lage sein, O-und N-glykosidische Verknüpfungen zu synthetisieren. Diese These wurde experimentell überprüft. Da *Sporomusa ovata* H1 molekularbiologisch bisher nicht zugänglich ist, mussten zunächst die Proteine heterolog in *Escherichia coli* hergestellt werden. Das *cobT1*-Gen wurde durch PCR aus chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 mit Hilfe der Oligonukleotide cobTlang_PET_fw und CobT-bamrev amplifiziert. Diese Oligonukleotide enthielten an ihren 5'-Enden *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen. Das PCR-Produkt (1035 Bp) sowie die DNA des Plasmids pET-16b wurden mit *Bam*HI verdaut und die 5'-Enden der geschnittenen Vektor-DNA dephosphoryliert, um seine Rezyklisierung zu verhindern. Vektor- und Insert-DNA wurden aufgereinigt und ligiert. Die Transformation erfolgte dann in *Escherichia coli* XL1 blue MRF' und die Selektion positiver Klone auf ampicillinhaltigen Agarplatten. Durch Verdau der isolierten Plasmide verschiedener Klone mit der Restriktionsen-

donuklease *Pst*I wurde die korrekte Orientierung des eingefügten *cobT1*-Fragments überprüft und dieses Plasmid in *Escherichia coli* BL21 AI transformiert. Dieser Stamm diente zur heterologen Herstellung des CobT1-Proteins. Nach der Produktion des rekombinanten CobT1-His-Tag-Fusionsproteins wurden die Zellen mit Hilfe der French Press aufgeschlossen und das rekombinante His-Tag Fusionsprotein aus der löslichen Proteinfraktion durch Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen dieser Aufreinigung wurden durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Die erwartete molekulare Masse des heterolog hergestellten CobT1-Proteins war 25,6 kDa. Abbildung 4.20 zeigt nach Coomassie-Färbung die Aufreinigung einer Proteinbande der erwarteten molekularen Masse (26 kDa).

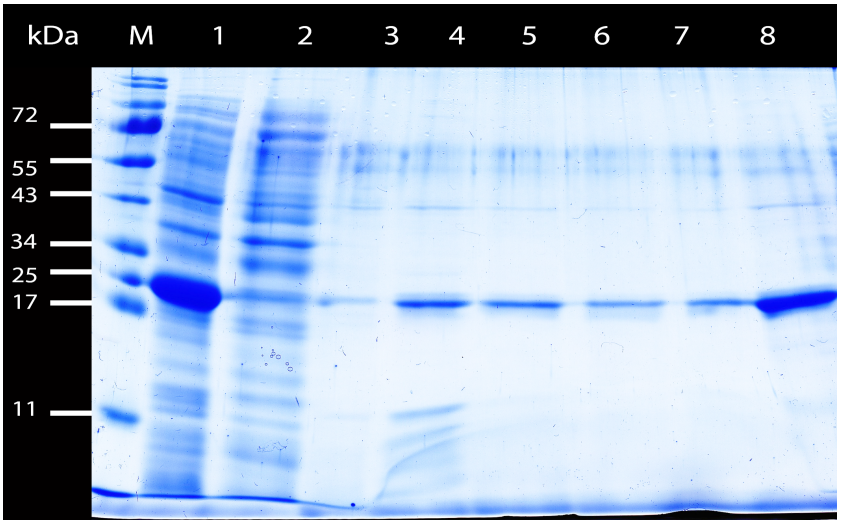


Abbildung 4.20: Proteinexpression von His-Tag markiertem CobT1 aus *Sporomusa ovata* H1 in *Escherichia coli* BL21 AI/pET-16b. Rekombinantes, cytoplasmatisches CobT wurde auf eine Ni-Chelatsäule aufgetragen, mit 30 mM Imidazolpuffer pH 7,4 gewaschen und mit 500 mM Imidazolpuffer pH 7,4 von der Affinitätssäule gelöst. Zur Proteinanalyse wurde ein 12,5 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel genutzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht.
M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas; Spur 1: Proteinextrakt der cytoplasmatischen Fraktion aus *Escherichia coli* BL21 AI/pET-16b/CobT1; Spur 2: 10 µl Proteinfraktion, Waschschritt (1,5 ml) mit 30 mM Imidazol; Spur 3-8:10 µl Proteinfraktion, Elutionsschritte (1,5 ml) mit 500 mM Imidazol

Die Elutionsfraktionen der Spuren 5 bis 8 (Abbildung 4.20) wurden vereinigt, dialysiert und die Proteinlösung mit einem 10 kDa Molekularsiebfilter konzentriert (Abbildung 4.21).

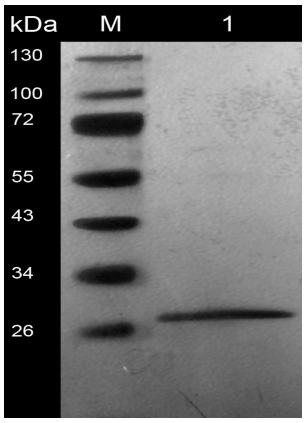


Abbildung 4.21: Nach Umpuffern der Imidazolhaltigen CobT1-Proteinlösung in PBS-Puffer, pH 7,5 durch Dialyse und Konzentrierung
M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas; Spur 1: 10 µl Proteinfraktion des dialysierten (PBS-Puffer) und konzentrierten CobT1-Proteins

Ein Aliquot (2 µg) des durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigten His-Tag-CobT1-Fusionsproteins wurde erneut auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinbande nach 30-minütiger Färbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung aus dem Gel ausgeschnitten. Nach einem proteolytischen Trypsin-Verdau wurde das Protein durch eine MALDI-TOF-Analyse untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in der folgenden Proteinsequenz (Abbildung 4.22) dargestellt. Rot markiert sind die Peptide, deren Massen durch MALDI-TOF bestätigt werden konnten. Diese deckten 21,2 % des gesamten Proteins ab. Blau markiert ist die Plasmid-kodierte Aminosäuresequenz dargestellt, welche die His-Tag (10x His)-Sequenz enthielt.

Die Analyse des *cobT*-Transkripts durch Northern Blot und RT-PCR-Analysen, sowie der Abgleich der vorhergesagten offenen Leserahmen mit der NCBI-Datenbank zeigte, dass das Transkript zwei Gene enthielt, welche beide für eine mögliche Nikotinat-Mononukleotid:Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase kodieren. Deshalb habe ich neben CobT1 auch CobT2 für weitere Untersuchungen in *Escherichia coli* heterolog hergestellt. Hierfür wurde das *cobT2*-Gen durch PCR mit den Oligonukleotiden cobT_ORF3bpet_fw und cobT_ORF3pet_rev aus chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 amplifiziert. Das 1065 Bp lange Amplifikat enthielt anschließend am 5'- und 3'-Ende jeweils eine *Bam*HI-Schnittstelle, über welche die Leserahmen-

MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMLEDPMSLLQATVAKIMRPDTVIKDQVKTKLAGVLQS
AGSLGRLEDMVEQYAGITGELNPALPKPCMVVASADHGVARRVVSAYPIETTIHMTANYL
ISQGASANAFANFCGADMVVVDMGVAGDLSYVPGLWHRKIAYGTQDFTEGPAMTREQA
IQAVETGIDIVNDRVKHGNRCFCLGEMGIGNTTSSATIVGAFTGLAPGESYRAGHRDIRQP
S

Abbildung 4.22: Identifizierte Peptide der MALDI-TOF-Analyse des heterolog hergestellten CobT1-Proteins aus *Sporomusa ovata* H1. Die identifizierten Peptide sind in der Proteinsequenz rot hervorgehoben. Blau markiert ist die Proteinsequenz, welche auf dem Expressionsvektor pET-16b kodiert ist. Diese enthält den His-Tag (10x His), welcher zur Isolierung des Proteins genutzt wurde.

korrekte Klonierung in den ebenfalls *Bam*HI geschnittenen und zusätzlich dephosphorylierten Vektor pQE-31 erfolgte. Vektor- und Insert-DNA wurden ligiert und in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' transformiert. Einzelne Klone wurden durch Verdau der isolierten Plasmid-DNA mit *Pst*I analysiert. So konnte die korrekte Orientierung des *cobT*-Gens im Vektor pQE-31 überprüft werden. Plasmide positiver Klone wurden danach in *Escherichia coli* M15 [pREP4] transformiert und dieser Stamm anschließend zur heterologen Produktion des His-Tag markierten CobT2-Proteins verwendet. Die erwartete molekulare Masse dieses rekombinanten Proteins betrug 37,8 kDa. Nach der Produktion des Proteins wurden die Zellen des Produktionsstamms durch French Press aufgeschlossen. Das His-Tag markierte CobT2-Protein befand sich nach Abtrennung der löslichen Proteinfraktion durch Zentrifugation (12000 g, 20 min, 4 °C) in der unlöslichen Zellfraktion (Abbildung 4.23). Deshalb musste zur Isolierung eines funktionellen Proteins dieses zunächst aus den Einschlusskörperchen aufgereinigt und renaturiert werden.

Die gewaschenen Einschlusskörperchen wurden in 8 M Harnstoff, 1 mM DTT gelöst und das denaturierte, His-Tag markierte CobT2-Protein mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Reinigungsprozedur wurde unter nativen Bedingungen mit Imidazolpuffer durchgeführt und die einzelnen Elutionsfraktionen mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Die Fraktionen, welche eine Proteinbande der erwarteten Größe (37,8 kDa) enthielten, wurden anschließend zur weiteren Renaturierung verwendet und dialysiert. Die renaturierte Proteinfraktion sollte im Anschluss funktionelles CobT2-Protein enthalten. Diese Fraktion wurde mit Hilfe eines 10 kDa Molekularsiebfilters konzentriert.

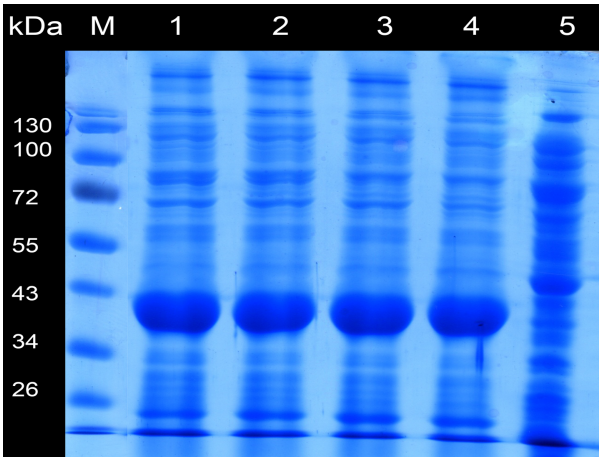


Abbildung 4.23: 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Aufreinigung des in *Escherichia coli* M15/pREP4/pQE-31/CobT2 rekombinant hergestellten CobT2 aus *Sporomusa ovata* H1 aus Einschlusskörperchen. Die unlösliche Proteinfraktion wurde zur Reinigung der Einschlusskörperchen mit 1-4 M Harnstoff gewaschen.
M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas; Spur 1: Proteinextrakt nach Waschen mit 1 M Harnstoff; Spur 2: Proteinextrakt nach Waschen mit 2 M Harnstoff; Spur 3: Proteinextrakt nach Waschen mit 3 M Harnstoff; Spur 4: Proteinextrakt nach Waschen mit 4 M Harnstoff; Spur 5: Proteinextrakt der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion

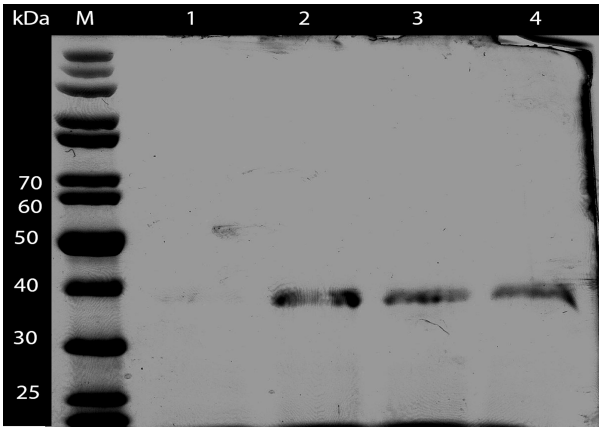


Abbildung 4.24: 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Aufreinigung des in *Escherichia coli* M15/pREP4/pQE-31/CobT2 rekombinant hergestellten, His-Tag markierten CobT2 aus *Sporomusa ovata* H1 durch Nickel-Affinitätschromatographie. Auf die Nickel-Chelatsäule wurde der Proteinextrakt nach Aufreinigung des CobT2-Proteins aus Einschlusskörperchen aufgetragen und enthielt 8 M Harnstoff. Die Elution des Proteins erfolgte zur Renaturierung unter nativen Bedingungen mit 500 mM Imidazolpuffer, pH 7,4. Die Proteinbanden wurden nach der Gelelektrophorese durch Silberfärbung sichtbar gemacht.
M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas; Spur 1-4: 10 µl Proteinfraktionen, Elutionsschritt (1,5 ml) mit 500 mM Imidazol

Eine sehr gut untersuchte Nikotinat-Mononukleotid:Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.21) ist das Protein CobT aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. Ein funktioneller Enzymtest für dieses System ist bereits etabliert (Cameron u. a., 1991). Zur Analyse der CobT-Reaktion in *Sporomusa ovata* H1, wurde deshalb das CobT-Protein aus *Salmonella* als Referenzenzym verwendet. Dazu habe ich das Protein zunächst ebenfalls als His-Tag Fusionsprotein heterolog in *Escherichia coli* hergestellt. Klonierung, Expression und Reinigung des Proteins erfolgte analog zum CobT1-Protein aus *Sporomusa ovata* H1. Das *cobT*-Gen wurde aus chromosomaler DNA von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 mit den Oligonukleotiden CobT_Salmonella_pET22_fw und CobT_Salmonella_pET16b_rev durchgeführt. Das Amplifikat hatte eine Länge von 1100 Bp. Der Produktionsstamm war *Escherichia coli* BL21 AI/pET-16b/CobT-Sal. Die erwartete molekulare Masse des rekombinant hergestellten, His-Tag markierten CobT-Proteins aus *Salmonella* betrug 39,7 kDa. Das Ergebnis der Analyse durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Reinigung des Proteins ist in Abbildung 4.25 dargestellt.

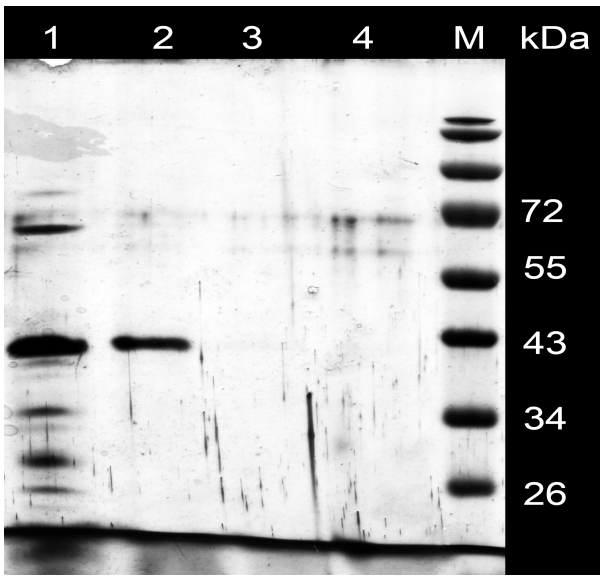


Abbildung 4.25: Proteinexpression von His-Tag markiertem CobT aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 in *Escherichia coli* BL21 AI/pET-16b. Rekombinantes, cytoplasmatisches CobT wurde auf eine Ni-Chelatsäule aufgetragen, mit 30 mM Imidazolpuffer pH 7,4 gewaschen und mit 500 mM Imidazolpuffer pH 7,4 von der Affinitätssäule gelöst. Zur Proteinanalyse wurde ein 12,5 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel genutzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.
M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas; Spur 1-4: 10 µl Proteinfraktionen, Elutionsschritt (1,5 ml) mit 500 mM Imidazol

Die zweite Elutionsfraktion (Abbildung 4.25) enthielt nach Silberfärbung des Polyacrylamidgels eine Bande der gewünschten molekularen Masse (circa 40 kDa). Diese Proteinfraktion wurde für weitere Untersuchungen verwendet, zunächst dialysiert und auf einem 10 kDa Molekularsiebfilter konzentriert.

Abbildung 4.26 zeigt den Vergleich der Proteinsequenzen der CobT-Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2.

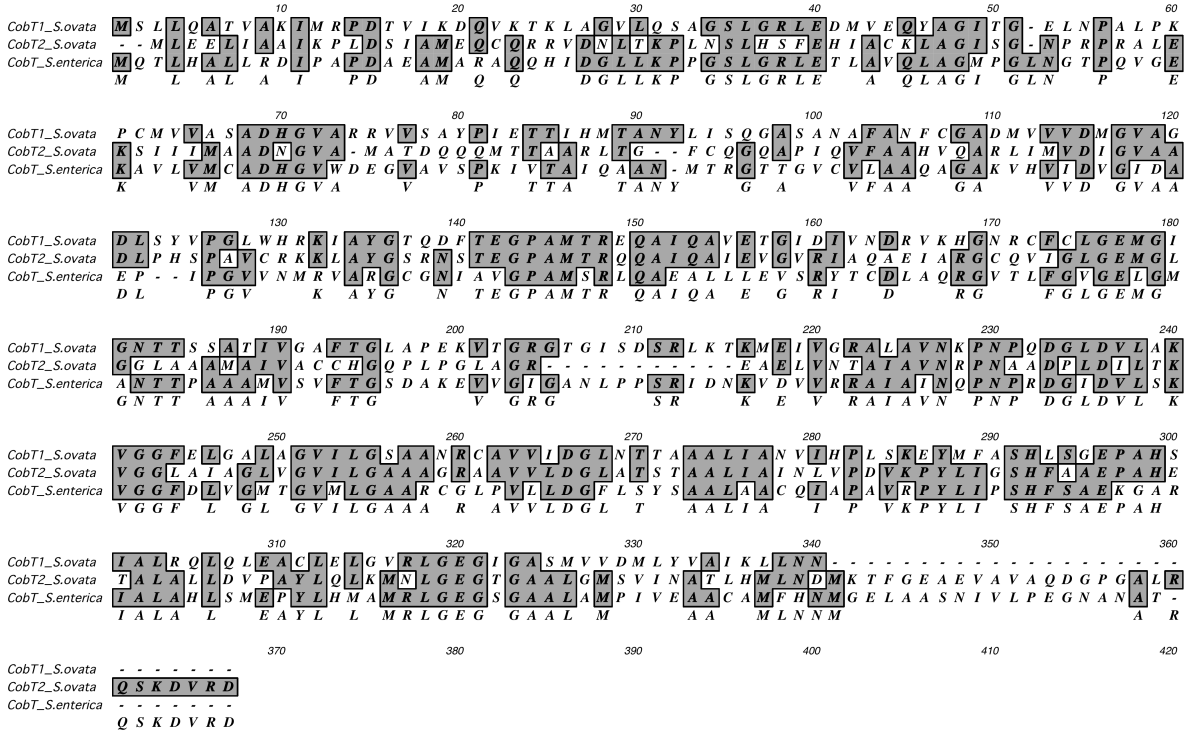
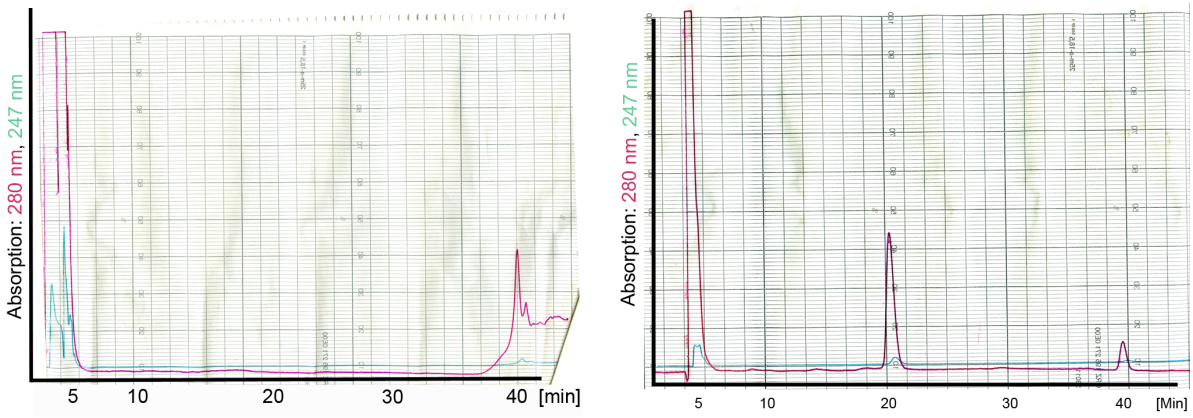


Abbildung 4.26: Proteinsequenzvergleich der identifizierten CobT-Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 mit CobT (Nikotinat-Mononukleotid:Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase, EC 2.4.2.21) aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2.

Die Proteinsequenz von CobT aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 zeigt 33 % Identität zu CobT1 und 34 % zu CobT2 aus *Sporomusa ovata* H1. Die beiden CobT-Proteine aus *Sporomusa* sind ebenfalls auf Aminosäuresequenz zu 34% miteinander identisch.

Enzymtest zur Analyse der CobT-Reaktion

Die biochemische Funktionalität der rekombinant hergestellten CobT-Proteine und deren Substratspezifität wurde in einem Enzymtest geprüft. Das Enzym CobT aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 sollte in der Lage sein, 5,6-Dimethylbenzimidazol als Substrat zu verwenden und durch eine N-glykosidische Bindung mit Nikotinsäure-Mononukleotid zu verknüpfen. Eine O-glykosidische Verknüpfung von *p*-Kresol oder Phenol, wie sie bei *Sporomusa*-Corrinoiden zu finden ist, kann durch das *Salmonella*-CobT nicht katalysiert werden (Cheong u. a., 2001). Die enzymatische Reaktion wurde deshalb mit dem Substrat 5,6-Dimethylbenzimidazol beim pH-Optimum von 9,7 durchgeführt. Der Ansatz enthielt 25 pmol des aufgereinigten, His-Tag markierten *Salmonella*-CobT-Proteins. Die Reaktionsprodukte wurden einmal nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C und zum Vergleich ohne diesen Inkubationsschritt analysiert. Die Analyse erfolgte durch Trennung der Substrate und Reaktionsprodukte in einer C18-RP-HPLC mit Methanolgradienten.



(a) *Salmonella* - DMB - 0 Stunden

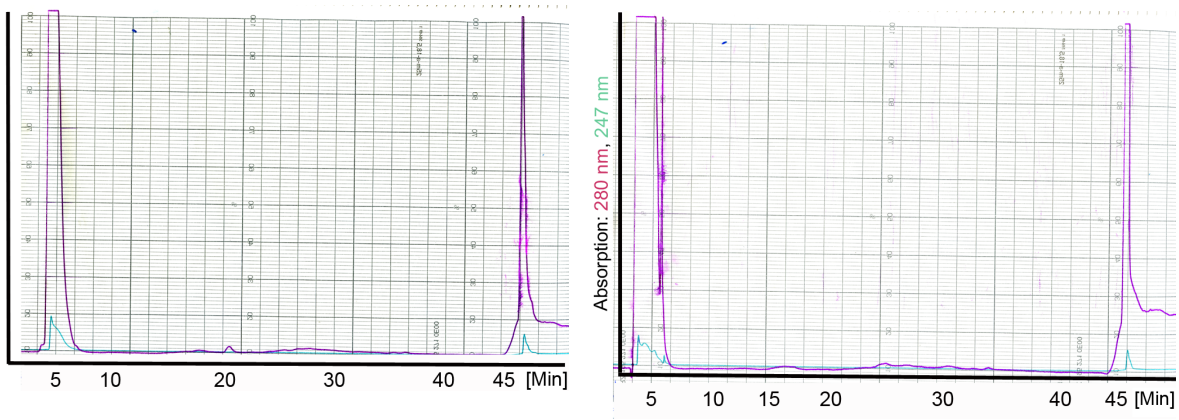
(b) *Salmonella* - DMB - 1 Stunde

Abbildung 4.27: HPLC-Analyse der Produkte des CobT-Enzymtests mit rekombinant hergestelltem CobT aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 (Abbildung 4.25). Für den Enzymtest wurden 25 pmol des gereinigten Proteins, 100 mM Nikotinat-Mononukleotid und 10 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol eingesetzt. Der Ansatz wurde in 50 µl 100 mM Glycin-Puffer, pH 9,7 für eine Stunde bei 30 °C inkubiert.

Die HPLC-Chromatogramme (Abbildung 4.27) zeigen ohne Inkubation der Enzymreaktion zwei Peaks bei einer Wellenlänge von 280 nm bei Retentionszeiten von 5 Minuten und 45 Minuten. Das hydrophobere Molekül 5,6 Dimethylbenzimidazol wird dabei

zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt eluiert als Nikotinsäure-Mononukleotid. Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C war in einer erneuten HPLC-Analyse ein zusätzliches Reaktionsprodukt mit einer Retentionszeit von 20 Minuten sichtbar. Durch die enzymatische Reaktion sollte das CobT-Reaktionsprodukt 5,6-Dimethylbenzimidazol-Ribose-5'-Phosphat gebildet werden.

Da *Sporomusa ovata* H1 neben den Corrinoiden *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid auch Vitamin B_{12} herstellt, sollte durch die *Sporomusa*-CobT-Proteine möglicherweise neben den O-glykosidisch gebundenen *p*-Kresol bzw. Phenol ebenfalls 5,6-Dimethylbenzimidazol als Vorstufe von Vitamin B_{12} enzymatisch umgesetzt werden. Dies sollte ebenfalls in einem *in vitro*-Test mit rekombinantem CobT gezeigt werden. Da das pH-Optimum dieser enzymatischen Reaktion unbekannt war, wurde die Reaktion bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt.



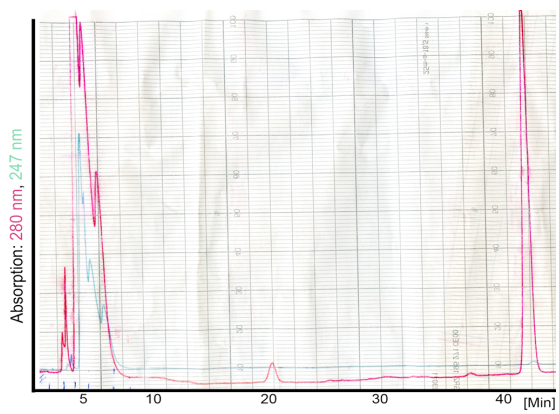
(a) DMB - pH 7,0

(b) DMB - pH 8,0

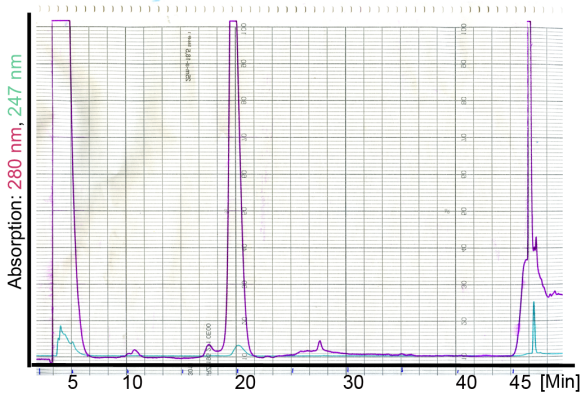
Abbildung 4.28: **HPLC-Analyse der Produkte des CobT-Enzymtests mit rekombinant hergestelltem CobT aus *Sporomusa ovata* H1 mit 5,6-Dimethylbenzimidazol. Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite.**

Nach einer Stunde Inkubation der Reaktion bei 30 °C konnte bei den pH-Werten 7,0 und 8,0 nach Trennung der Reaktionsedukte und -produkte durch C18-RP-HPLC (Abbildung 4.28) nur die beiden Reaktionsedukte bei 5 Min und 45 Minuten Retentionszeit nachgewiesen werden. Ein zusätzliches Produkt wie bei der CobT-Reaktion des *Salmonella*-Enzyms war nicht nachweisbar.

Auch bei einem pH-Wert von 9,7, dem pH-Optimum des CobT-Enzyms aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 war kein 5,6-Dimethylbenzimidazol-Ribose-5'-Phosphat nachweisbar.



(c) DMB - pH 9,7

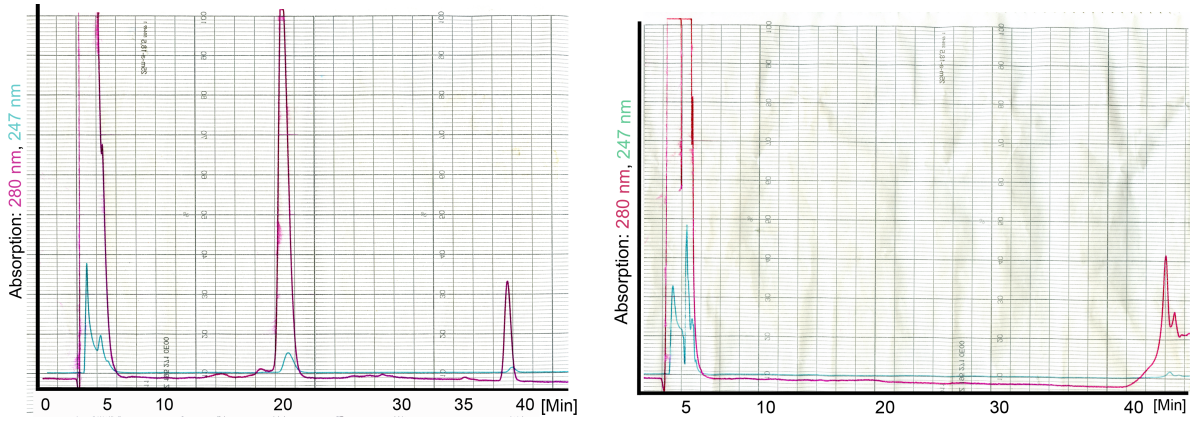


(d) DMB - pH 8,0 + DTT

Abbildung 4.28: HPLC-Analyse der Produkte des CobT-Enzymtests mit rekombinant hergestelltem CobT aus *Sporomusa ovata* H1. Für den Enzymtest wurden jeweils 25 pmol der gereinigten Proteine CobT1 und CobT2, 100 mM Nikotinat-Mononukleotid und 10 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol eingesetzt. Die Reaktion wurde unter verschiedenen Pufferbedingungen in jeweils 50 µl Volumina durchgeführt: (a): 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,0; (b): 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; (c): 100 mM Glycin-Puffer, pH 9,7 und (d) 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM DTT. Die Ansätze wurden jeweils für eine Stunde bei 30 °C inkubiert.

Da im anaeroben Bakterium *Sporomusa ovata* H1 vermutlich stärker reduzierte Bedingungen vorliegen, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich 1 mM Dithiothreitol als Reduktionsmittel zugesetzt. Bei einem pH-Wert von 8,0 konnte unter diesen reduzierten Bedingungen ein Produkt mit einer Retentionszeit von 20 Minuten nachgewiesen werden (Abbildung 4.28).

Unter diesen Reaktionsbedingungen (pH 8,0; 1 mM Dithiothreitol) sollte nun ebenfalls die Umsetzung von p-Kresol und Nikotinsäure-Mononukleotid zum möglichen Reaktionsprodukt *p*-Kresolyl-Ribose-5'-Phosphat getestet werden. Die Reaktion wurde zum Vergleich mit und ohne Zugabe von CobT1 und CobT2 aus *Sporomusa ovata* H1 durchgeführt. Die Reaktionsansätze zur Untersuchung der Umsetzung von *p*-Kresol und Nikotinsäure-Mononukleotid durch die rekombinanten CobT-Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 wurden nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C durch C18-RP-HPLC analysiert (Abbildung 4.29). Die Reaktion ohne Zugabe von Enzymen lieferte ausschließlich die beiden Reaktionsedukte mit den Retentionszeiten 5 Minuten und 40 Minuten. Beim Reaktionsansatz, der die *Sporomusa*-CobT-Proteine enthielt, wurde mit einer Detektorwellenlänge von 280 nm ein zusätzliches Produkt bei einer Retentionszeit von 20 Minuten nachgewiesen.



(a) *p*-Kresol - pH 8,0 + DTT

(b) *p*-Kresol - pH 8,0 + DTT, ohne Enzym

Abbildung 4.29: HPLC-Analyse der Produkte des CobT-Enzymtests mit rekombinant hergestelltem CobT aus *Sporomusa ovata* H1. Für den Enzymtest wurden jeweils 25 pmol der gereinigten Proteine CobT1 und CobT2, 100 mM Nikotinat-Mononukleotid und 10 µM *p*-Kresol eingesetzt. Der Ansatz wurde in 50 µl Tris-HCl pH 8,0; 1 mM DTT für eine Stunde bei 30 °C inkubiert (a). Ein Ansatz wurde ohne Zugabe von Enzym inkubiert (b).

Die C18-RP-HPLC-Analysen der Enzymreaktion mit den rekombinant hergestellten CobT-Proteinen aus *Sporomusa ovata* H1 zeigten, dass bei einem pH-Optimum von pH 8,0 unter reduzierten Bedingungen (1 mM DTT) sowohl bei Zugabe von 5,6-Dimethylbenzimidazol als auch *p*-Kresol ein Reaktionsprodukt nachgewiesen wurde. Folglich wurden sowohl N- als auch O-glykosidische Corrinoid-Vorstufen durch CobT aus *Sporomusa ovata* H1 gebildet.

4.1.3.3 qRT-PCR Analyse der Genexpression in *Sporomusa ovata* H1.

Für die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) zur Expressionsanalyse von Corrinoid-Riboschalter regulierten Genen wurde *Sporomusa ovata* H1 auf verschiedenen Substraten gezüchtet. Zur Normalisierung dieser qRT-PCR Ergebnisse sind Referenzgene notwendig, deren Expressionsstärken unabhängig von unterschiedlichen Wachstumssubstraten sind und somit konstant bleiben. Aus diesem Grund habe ich die Nukleotidsequenzen möglicher Kandidaten solcher Referenzgene im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifiziert. Ihre Genprodukte sollten am Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt sein, da diese Enzyme wahrscheinlich substratunabhängig exprimiert werden. Drei dieser Gene, *rrnA*, *recA* und *rnpA* konnte ich im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifizieren. Die Nukleotidsequenzen sind im Anhang dieser Arbeit (Ka-

pitel 7) aufgeführt. Folgende Oligonukleotide wurden zur Identifizierung dieser drei Gene durch PCR mit chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 verwendet: Für *rrnA*:Sporo_recA_fw und Sporo_recA_rev, für *rrnA*: 27f und 1492r und für *rnpA*: rnasep_fw und rnasep_rev. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend nukleotidsequenziert und die Gensequenzen mit Hilfe einer Adapter-PCR vervollständigt. Ausgehend von einer Methanol-Kultur wurden Minimalnährmedien beimpft, welche unterschiedliche Kohlenstoff- und Energiequellen enthielten. Diese Substrate waren Betain, Methanol, Fructose oder Pyruvat. Ausserdem wurden weitere Medien beimpft, welche Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle sowie folgende Corrinoidvorstufen enthielten: *p*-Kresol, Cobinamid, L-Tyrosin oder 5,6-Dimethylbenzimidazol.

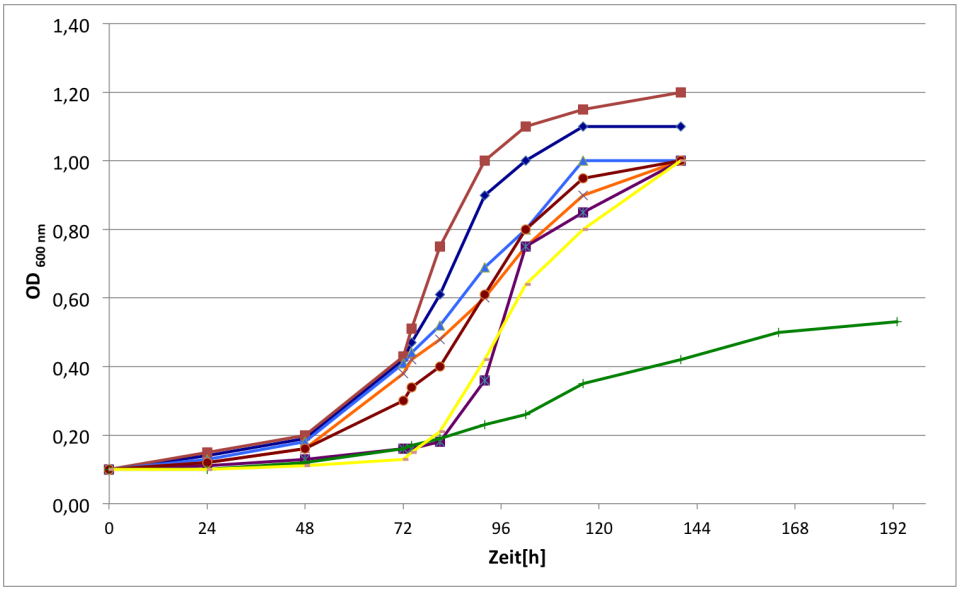


Abbildung 4.30: Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen. Ausserdem wurden dem Minimalnährmedium verschiedene Vorstufen der Corrinoidbiosynthese zugegeben.
Symbole: ■ Wachstum mit Betain; ♦ Wachstum mit Fructose; ▲ Wachstum mit Methanol und *p*-Kresol; ● Wachstum mit Methanol; X Wachstum mit Methanol und Cobinamid; ■ Wachstum mit Methanol und L-Tyrosin; ♦ Wachstum mit Pyruvat; I Wachstum mit Methanol und 5,6-Dimethylbenzimidazol.

Aus physiologischen Experimenten (Stupperich u. a., 1992) war bekannt, dass der Anteil des 40kDa, Corrinoid-haltigen Proteins McpA am cytoplasmatischen Protein, beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle im Vergleich zum Wachstum auf anderen Substraten zunahm. Die Expression des kodierenden Gens sollte deshalb ebenfalls induziert werden. Durch „geno-

mic walking“ habe ich die kodierende Gensequenz (*mcpA*, siehe Abbildung 4.9 und Tabelle 4.5) dieses Proteins identifiziert. Durch qRT-PCR Analysen wurde dann die Genexpression bei Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 auf den Substraten Methanol, Fructose, Pyruvat oder Betain analysiert. Zur Normalisierung sollten die zuvor identifizierten Referenzgene *rrnA* (kodiert für die 16S ribosomale RNA), *recA* (kodiert für die Rekombinase A) und *rnpA* (kodiert für die RNase P) verwendet werden, um so ihre Eignung für die Normalisierung der qRT-PCR Ergebnisse zu prüfen. Zur Durchführung der qRT-PCR wurden Kulturen bei einer optischen Dichte von 0,6 (bzw. einer optischen Dichte von 0,25 bei gehemmtem Wachstum mit 5,6-Dimethylbenzimidazol) abzentrifugiert, die Gesamt-RNA isoliert und diese einem DNase-Verdau unterzogen. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit jeweils 100 ng RNA unter Verwendung von Zufallshexameren, wobei die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die so hergestellten cDNA-Proben wurden jeweils für die Durchführung der qRT-PCR bei Verwendung unterschiedlicher Oligonukleotide zur Amplifikation von 300 Bp-Fragmenten der Referenzgene *rrnA* (16S_SO_qPCR_fw und 16S_SO_qPCR_rev300), *recA* (recA_SO_qPCR_fw und recA_SO_qPCR_rev300) und *rnpA* (rnpA_qrt300_fw und rnasep_U1) sowie des Zielgens *mcpA* (40kDa_RT300_fw und 40kDa_RT300_rev) verwendet. Die im Lightcycler ermittelten Schmelzkurven (1. Ableitung der Schmelzkurve) der Amplifikate sind in Abbildung 4.31 dargestellt. Die Schmelzkurven zeigen ein

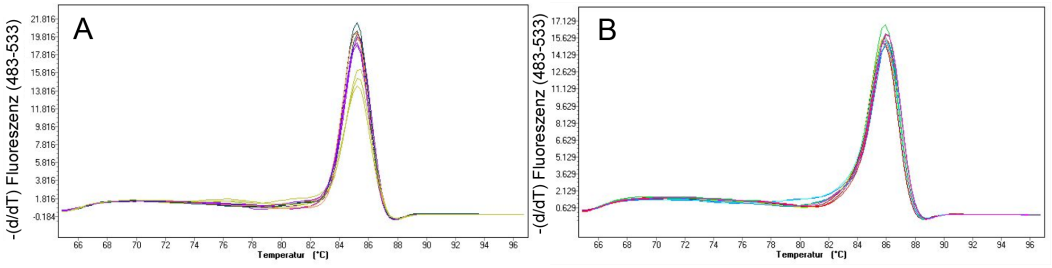


Abbildung 4.31: Schmelztemperatur (1. Ableitung der Schmelzkurve) der PCR-Amplifikate des *rrnA*-Referenzgens (A) und des untersuchten *mcpA*-Zielgens (B) aus *Sporomusa ovata* H1.

einheitliches Amplifikat für Ziel- und Referenzgen. Der Schmelzpunkt liegt für das *rrnA*-Amplifikat bei etwa 85 °C. Beim *mcpA*-Amplifikat liegt dieser bei etwa 86 °C. Die Auswertung und die Berechnung der Expressionsverhältnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode durchgeführt. Die Kultur, welche auf Fructose als Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen war, wurde dabei als Referenzsubstrat verwendet. Die berechneten Expressionsverhältnisse bei der Verwendung von drei Referenzgenen sind

in Tabelle 4.8 aufgeführt. Die graphische Darstellung dieser Expressionsverhältnisse ist in Abbildung 4.32 wiedergegeben.

Tabelle 4.8: Durch qRT-PCR Analyse ermittelte Expressionsverhältnisse zur substratabhängigen Expression des Gens *mcpA* aus *Sporomusa ovata* H1. Als Referenzsubstrat wurde Fructose verwendet. Die Expressionsverhältnisse wurden jeweils durch Normalisierung auf die Referenzgene *recA*, *rnpA* und *rrnA* mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode bestimmt.

Referenzgen	Expressionsverhältnis				PCR-Effizienz
	Pyruvat	Betain	Methanol	Fructose	
recA	2,37	4,20	16,34	1	1,92
rnpA	2,35	4,03	16,16	1	1,98
rrnA	2,72	2,96	16,44	1	1,87
Zielgen *mcpA*					2,01

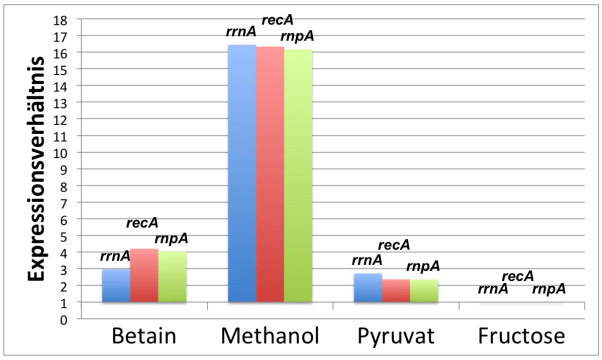


Abbildung 4.32: Grafische Darstellung der Expressionsverhältnisse (Siehe Tabelle 4.8) aus der qRT-PCR Analyse der substratabhängigen Expression des *mcpA*-Gens, welches für das Corrinoid-bindende Protein McpA aus *Sporomusa ovata* H1 kodiert. Die Expressionsverhältnisse wurden jeweils durch Normalisierung auf die Referenzgene *recA*(■), *rnpA* (■) und *rrnA* (■) mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode bestimmt.

Im Vergleich zur Fructose-Kultur ist die Expression des *mcpA*-Gens auf Methanol etwa 16-fach hochreguliert. Bei Wachstum auf Pyruvat und Betain zeigte sich eine geringere Steigerung der Expression gegenüber der Fructose-Kultur. Eine signifikante Aktivierung der Genexpression von *mcpA* war also bei Verwendung von Methanol nachweisbar, wodurch die vorhergesagte Methanol-Induktion der Genexpression bestätigt wurde. Die berechneten Expressionsverhältnisse waren bei allen getesteten Referenzgenen nach Normalisierung identisch, so dass sich alle drei der getesteten Referenzgene zur Analyse der Genexpression durch qRT-PCR in *Sporomusa ovata* H1 eignen. Sie wurden deshalb auch zur Analyse der Genexpression Corrinoid-Riboschalter regulierter Gene verwendet.

Analysiert wurde die Expression des Gens *luxR*, welches für einen transkriptionellen Regulator der LuxR-Familie kodiert. Ausserdem wurden die beiden Gene *crgA* und *crgB* analysiert, die jeweils durch einen Riboschalter reguliert werden und welche für bisher noch unbekannte Genprodukte kodieren. Durch qRT-PCR sollte die Rolle dieser Gene im Corrinoid-Stoffwechsel von *Sporomusa ovata* H1 untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Wachstumssubstrat-abhängige Expression dieser Gene kontrolliert. Die Expressionsanalyse erfolgte mit Gesamt-RNA, welche aus *Sporomusa*-Kulturen isoliert wurde. Als Substrate dienten Methanol, Betain, Pyruvat oder Fructose. Für die Normalisierung der Genexpression wurden die Referenzgene *recA* und *rrnA* verwendet. Durchführung und Auswertung verliefen analog zur Expressionsanalyse des Gens *mcpA*. Zur Amplifikation der Zielgene dienten genspezifische Oligonukleotide, welche Amplifikate von etwa 300 Bp Länge ergaben. Diese waren für *luxR*: luxRb_RT300_fw und luxRb_RT300_rev, für *crgA*: RS8a_RT300_fw und RS8a_RT300_rev und für *crgB*: RS8b_RT300_fw und RS8b_RT300_rev. Die Expressionsverhältnisse wurden durch die $\Delta\Delta c_p$-Methode bestimmt und in Tabelle 4.9 aufgeführt; deren graphische Darstellung zeigt Abbildung 4.33. Die dargestellten Werte beziehen sich jeweils auf cDNA aus Methanol-Kulturen als Referenzsubstrat.

Tabelle 4.9: Durch qRT-PCR-Analyse bestimmte Expressionsverhältnisse zur Untersuchung der substratabhängigen Expression Corrinoid-Riboschalter regulierter Gene. Analysiert wurde die Expression der Corrinoid-Riboschalter regulierten Gene *luxR*, *crgA* und *crgB* beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 auf verschiedenen Substraten. Fructose wurde als Referenzsubstrat verwendet. Die Expressionsverhältnisse wurden jeweils durch Normalisierung auf die Expression der beiden Referenzgene *recA* und *rrnA* mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode ermittelt.

Zielgen	Expressionsverhältnis *recA*				PCR-Effizienz
	Pyruvat	Betain	Methanol	Fructose	
luxR	0,48	0,19	1	0,44	2,18
crgA	0,49	0,11	1	0,24	2,04
crgB	0,65	0,11	1	0,30	2,02
Referenzgen *recA*	-	-	-	-	1,90
Zielgen	Expressionsverhältnis *rrnA*				PCR-Effizienz
luxR	0,70	0,71	1	0,53	2,18
crgA	0,71	0,41	1	0,29	2,04
crgB	0,94	0,40	1	0,37	2,02
Referenzgen *rrnA*	-	-	-	-	1,96

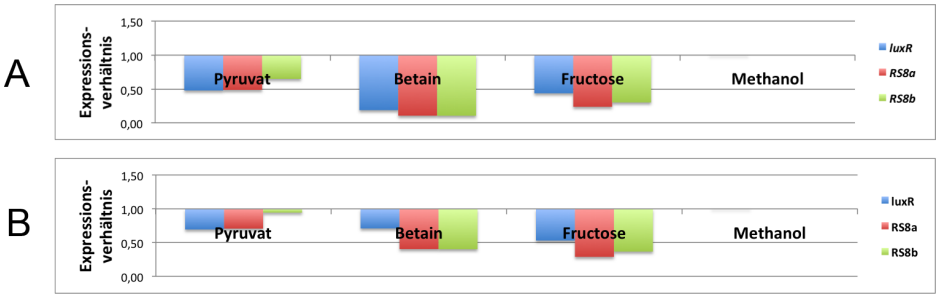


Abbildung 4.33: Graphische Darstellung der durch qRT-PCR ermittelten Expressionsverhältnisse zur Untersuchung der substratabhängigen Expression Corrinoid-Riboschalter regulierter Gene *luxR* (■), *crgA*(■) und *crgB* (■). Siehe Tabelle 4.9. Die Expressionsverhältnisse wurden jeweils durch Normalisierung auf die Expression der beiden Referenzgene *rnpA* (A) und *rrnA* (B) mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode ermittelt.

Die ermittelten Daten zeigen eine geringe Reprimierung der Transkripte von *luxR*, *crgA* und *crgB* bei Betain, Fructose oder Pyruvat bezogen auf das Referenzsubstrat Methanol. Die Genexpression der Corrinoid-Riboschalter regulierten Gene *luxR*, *crgA* und *crgB* wurden ebenfalls bei Zugabe verschiedener Corrinoid-Vorstufen zum Wachstumsmedium von *Sporomusa ovata* H1 analysiert um ihre mögliche Rolle im Corrinoid-Stoffwechsel des anaeroben Bakteriums zu zeigen. Als Corrinoid-Vorstufen wurden *p*-Kresol, Cobinamid und L-Tyrosin (siehe Abbildung 4.30) verwendet. Die Analyse der Genexpression durch qRT-PCR erfolgte analog zur Untersuchung der Substrat-abhängigen Expression dieser Gene. Als Referenzgene dienten hier die Gene *rnpA* und *rrnA*. Die durch $\Delta\Delta c_p$-Methode ermittelten Expressionsverhältnisse sind in Tabelle 4.10, ihre grafische Darstellung in Abbildung 4.34 dargestellt. Die gemessenen Werte beziehen sich jeweils auf die Messwerte einer Methanol-Kultur ohne Corrinoid-Intermediate.

Die ermittelten Expressionsverhältnisse bei Betain, Fructose oder Pyruvat zeigen auch bei Zugabe unterschiedlicher Corrinoid-Vorstufen nur geringe Abweichungen in der Genexpression von *luxR*, *crgA* und *crgB* bezogen auf das Referenzsubstrat Methanol. Die Zugabe von *p*-Kresol und Cobinamid hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene. Bei Zugabe von 5,6-Dimethylbenzimidazol als Vitamin B_{12}-Vorstufe und L-Tyrosin zeigte sich eine geringe Aktivierung der Genexpression.

Tabelle 4.10: Durch qRT-PCR-Analyse bestimmte Expressionsverhältnisse zur Untersuchung der Expression Corrinoid-Riboschalter regulierter Gene bei Zugabe unterschiedlicher Corrinoidvorstufen ins Wachstumsmedium von *Sporomusa ovata* H1. Analysiert wurde die Expression der Corrinoid-Riboschalter regulierten Gene *luxR*, *crgA* und *crgB* beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle. Diesen Kulturen wurden verschiedene Vorstufen der Corrinoidbiosynthese zugegeben. Als Referenzsubstrat diente eine Methanolkultur von *Sporomusa ovata* H1 ohne Zusätze. Die Expressionsverhältnisse wurden jeweils durch Normalisierung auf die Expression der beiden Referenzgene *rnpA* und *rrnA* mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode ermittelt.

Zielgen	Expressionsverhältnis *rnpA*					PCR-Effizienz
	Methanol	*p*-Kresol	L-Tyrosin	DMB	Cobinamid	
luxR	1	0,93	2,66	1,48	1,24	2,18
crgA	1	0,92	2,64	2,43	1,27	2,04
crgB	1	0,87	2,32	4,40	1,23	2,02
Referenzgen *rnpA*	-	-	-	-		1,95
Zielgen	Expressionsverhältnis *rrnA*					PCR-Effizienz
luxR	1	1,08	1,92	0,94	0,94	2,18
crgA	1	1,07	1,90	1,54	0,96	2,04
crgB	1	0,91	1,67	2,79	0,93	2,02
Referenzgen *rrnA*	-	-	-	-	-	1,96

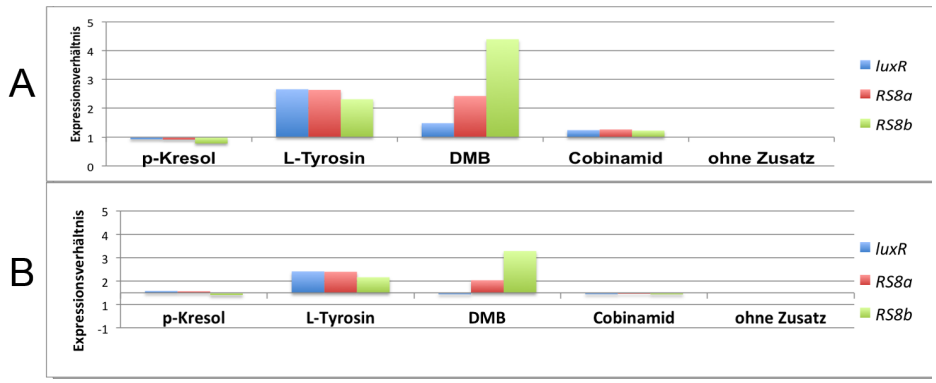


Abbildung 4.34: Graphische Darstellung der durch qRT-PCR ermittelten Expressionsverhältnisse zur Untersuchung der Expression Corrinoid-Riboschalter regulierter Gene *luxR* (■), *crgA*(■) und *crgB* (■) bei Zugabe unterschiedlicher Corrinoidvorstufen ins Wachstumsmedium von *Sporomusa ovata* H1. Siehe Tabelle 4.10.Die Expressionsverhältnisse wurden jeweils durch Normalisierung auf die Expression der beiden Referenzgene *rnpA* (A) und *rrnA* (B) mit Hilfe der $\Delta\Delta c_p$-Methode ermittelt.

4.2 Untersuchungen zur Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12}

In physiologischen Experimenten (Ibrahim, 1998) konnte gezeigt werden, dass durch Vorstufen der Vitamin B_{12}-Biosynthese das Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 gehemmt wird. Diesen Befund habe ich experimentell weitergehend untersucht. Dazu wurde *Sporomusa ovata* H1 in Minimalmedium mit Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet. Das Medium enthielt ausserdem jeweils verschiedene Imidazolderivate in unterschiedlichen Konzentrationen, welche als unterer Kobalt-Ligand in die *Sporomusa*-Corrinoide eingebaut werden sollten. 5,6-Dimethylbenzimidazol, welches als unterer Coα-Nukleotidligand in Vitamin B_{12} eingebaut wird, wurde dabei in den Endkonzentrationen von 10, 50, 100, 200, 500 und 1000 µM zugegeben. Die beiden N-Heterozyklen Benzimidazol und Imidazol wurden jeweils zu 500 und 1000 µM Endkonzentration ins Medium gegeben. Zur Kontrolle wurde eine Methanol-Kultur mitgeführt, der kein Imidazolderivat zugesetzt war. Die Bestimmung der erreichten optische Dichte der Kulturen erfolgte fünf Tage nach Inokulation. Diese Werte sind in Abbildung 4.35 abhängig von der Konzentration der Imidazolderivate dargestellt.

Beim Wachstum mit Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle zeigte sich für 5,6-Dimethylbenzimidazol eine biphasische Hemmung mit steigender Konzentration des N-Heterozyklus. Bei einer Konzentration von 1000 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol im Wachstumsmedium war kaum noch Wachstum zu beobachten. Halbmaximale Hemmung trat bei etwa 100 µM auf. Ausserdem konnte eine schwächere Hemmung des Wachstums beobachtet werden, wenn räumlich kleinere Imidazolderivate wie Benzimidazol eingesetzt wurden. Bei Zusatz von Imidazol war keine Wachstumshemmung mehr messbar. Dieses Ergebnis deutet auf einen sterischen Hemmeffekt an einem Corrinoid-abhängigen Protein / an Proteinen hin, da räumlich größere Liganden die Hemmung gegenüber kleineren Liganden verstärken. Dass die Hemmung tatsächlich durch eine Interaktion von Corrinoidligand mit einem Protein bedingt ist, bestätigt der Befund, nach dem die Hemmung durch 200 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol mit 200 µM *p*-Kresol vollständig rückgängig gemacht werden konnte. Welches Corrinoid-abhängige Protein davon betroffen sein könnte, zeigten Hemmversuche in Gegenwart von Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiesubstrat.

Die Hemmversuche wurden also mit *Sporomusa ovata* H1-Zellen durchgeführt, welche mit Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiequelle wuchsen. Die Imidazolderivate

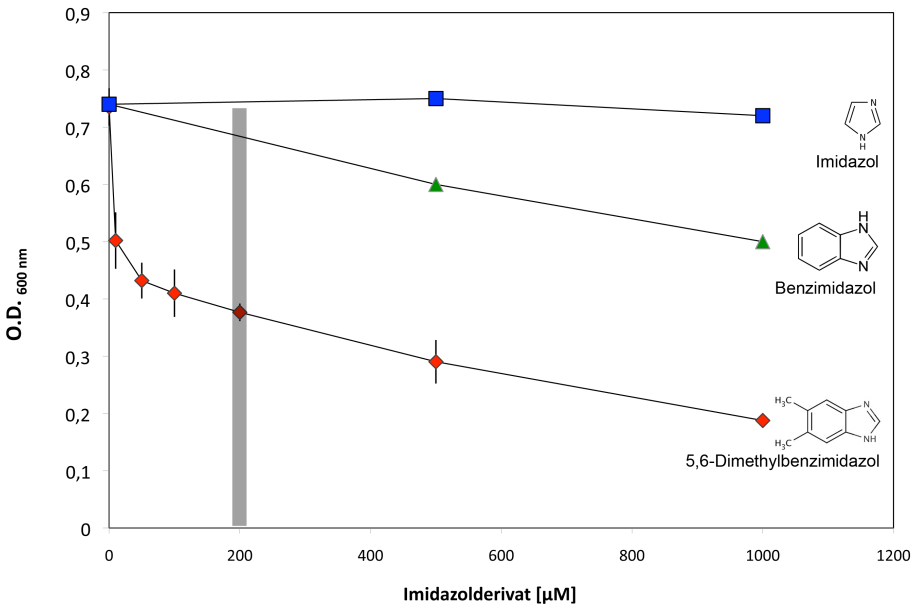


Abbildung 4.35: Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 mit Methanol als Kohlenstoffquelle nach Zugabe verschiedener Imidazolderivate ins Nährmedium.
Erreichte optische Dichte ($OD_{600\,nm}$) nach 96 Stunden Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit steigender Konzentration unterschiedlicher N-Heterozyklen im Minimalnährmedium. Als Kohlenstoffquellen wurde Methanol oder Pyruvat verwendet. Die dem Medium zugesetzten N-Heterozyklen waren Imidazol, Benzimidazol und 5,6-Dimethylbenzimidazol in den angegebenen Konzentrationen.
Symbole: ♦ Wachstum mit Methanol und 5,6-Dimethylbenzimidazol; ▲ Wachstum mit Methanol und Benzimidazol; ■ Wachstum mit Methanol und Imidazol; ■ Wachstum mit Methanol, 200 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol und 200 µM *p*-Kresol.

5,6-Dimethylbenzimidazol, Benzimidazol und Imidazol wurden jeweils in den Konzentrationen 500 und 1000 µM dem Medium zugesetzt und die optische Dichte (OD_{600nm}) der Bakterienkulturen nach 5 Tagen Wachstum gemessen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 4.36 dargestellt. Hierbei konnte auch bei einer Konzentration von 1000 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol noch keine Hemmung des Wachstums auf Pyruvat beobachtet werden. Auch die Imidazolderivate Benzimidazol und Imidazol hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 unter solchen Bedingungen. Damit ist ein indirekter Hemmeffekt dieser Verbindungen, z.B. über Komplexierung von Metallionen, ausgeschlossen.

Die Analyse des Wachstums von *Sporomusa ovata* H1 mit verschiedenen Imidazolderivaten als Vorstufen der Corrinoidbiosynthese zeigte also eine substratabhängige

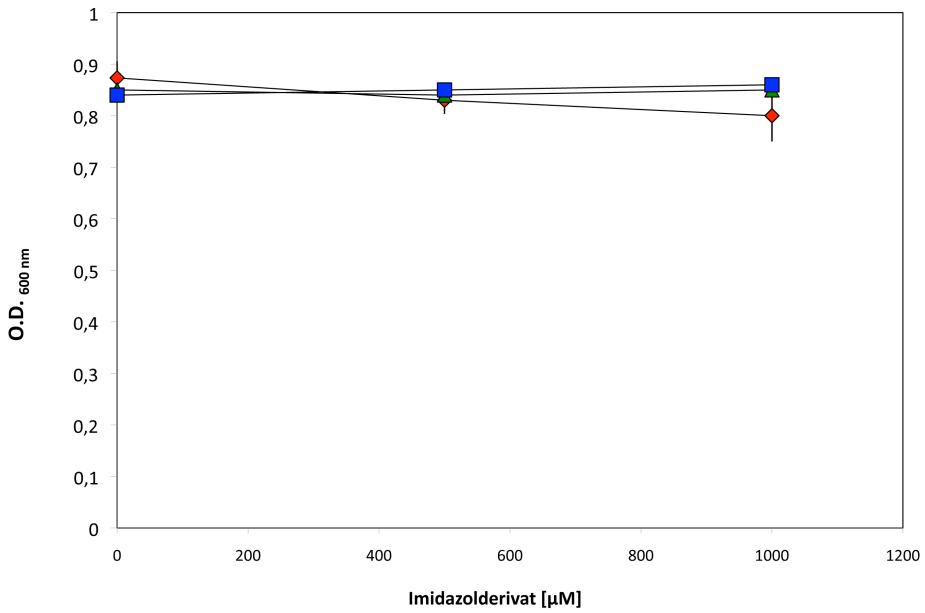


Abbildung 4.36: Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle nach Zugabe verschiedener Imidazolderivate ins Nährmedium.
Erreichte optische Dichte (OD_{600nm} nach 96 Stunden Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit steigender Konzentration unterschiedlicher N-Heterozyklen im Minimalnährmedium. Als Kohlenstoffquellen wurde Methanol oder Pyruvat verwendet. Die dem Medium zugesetzten N-Heterozyklen waren Imidazol, Benzimidazol und 5,6-Dimethylbenzimidazol in den angegebenen Konzentrationen.
Symbole: ♦ Wachstum mit Pyruvat und 5,6-Dimethylbenzimidazol; ▲ Wachstum mit Pyruvat und Benzimidazol; ■ Wachstum mit Pyruvat und Imidazol

Wachstumshemmung. Ausserdem zeigte sich ein sterischer Hemmeffekt bei Verwendung räumlich größerer N-Heterozyklen. Diese Effekte wirken sich sehr wahrscheinlich auf die Acetyl-CoA Synthase des acetogenen Bakteriums aus (siehe die nachfolgenden Kapitel).

4.3 Corrinoid-Verteilung in *Sporomusa ovata* H1

Um die Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12} besser zu verstehen, habe ich die Proteinbindung der Corrinoide bei Wachstum mit Methanol oder Pyruvat untersucht, wenn jeweils 100 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol dem Minimalnährmedium zugesetzt waren. Dazu wurde *Sporomusa ovata* H1 mit $[^{57}Co]Cl_2$

gezüchtet. Die Zellen wurden dann durch einen BugBuster-Aufschluss lysiert, die verschiedenen Proteinfraktionen durch Molekularsiebfiltration gewonnen und die Radioaktivität in ihnen quantifiziert (siehe Abbildung 4.11).

Tabelle 4.11: Corrinoid-Verteilung in *Sporomusa ovata* H1 beim Wachstum auf Methanol bzw. Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiequelle.

	[^{57}Co]-Verteilung [Bq]							
	Methanol + 100 µM Dimethylbenzimidazol				Pyruvat + 100 µM Dimethylbenzimidazol			
Fraktion [kDa]	Vitamin B_{12}	%	*p*-Kresolylcobamid	%	Vitamin B_{12}	%	*p*-Kresolylcobamid	%
>70 kDa	52618	75,5	3562	5,1	14548	46,0	361	1,1
50 - 70 kDa	8897	12,8	1325	1,9	6880	21,8	325	1,0
3 - 50 kDa	2361	3,4	171	0,3	3605	11,4	119	0,4
<3 kDa	707	1,0	8	<0,1	5733	18,1	45	0,1
Gesamt	**64581**	**92,7**	**5066**	**7,4**	**30766**	**97,3**	**850**	**2,6**

Über 92 % des Gesamtcorrinoids lag nach deren Extraktion aus *Sporomusa*-Zellen als Vitamin B_{12} vor, wobei bei Wachstum mit Methanol mehr als 91 % dieses Vitamins proteingebunden vorlag. Die Fraktion, die hochmolekulare Proteinkomplexe (>70 kDa) enthält, bindet in Methanol-Zellen mehr als 75 % des gesamten Vitamin B_{12}, wohingegen in Pyruvat-Zellen nur 46 % des Vitamin B_{12} in dieser Fraktion vorlag. In Zellen, die auf Methanol gewachsen waren, wurde nur ein sehr kleiner Corrinoid-Anteil isoliert, welcher als freies, nicht proteingebundenes Corrinoid in der Zelle vorkam. Der überwiegende Teil dieses freien Corrinoid-Pools bestand aus Vitamin B_{12}. Freies *p*-Kresolylcobamid konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war der freie Corrinoidpool in den Zellen, die mit Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren wesentlich größer (etwa 18 % des Gesamtcorrinoids).

Zusätzlich wurde untersucht, ob Vitamin B_{12} in der Zelle durch Austausch des unteren Corrinoidliganden zu *p*-Kresolylcobamid umgewandelt wird. Dazu wurden etwa 5.000 Bq [^{57}Co]-Vitamin B_{12} als einzige Kobaltquelle für *Sporomusa* in 250 ml Minimalnährmedium gegeben, welchem Methanol als Substrat zugegeben war. Fünf Tage nach der Inokulation mit Zellen von *Sporomusa ovata* H1 (5 % (v/v) Inokulum) wurden die Zellen geerntet, der Zellniederschlag mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und danach das Gesamtcorrinoid durch saure Cyanidextraktion aus dem Zellsediment isoliert. Dieser Corrinoidextrakt wurde durch C18-RP-HPLC im Methanolgradient getrennt und dann die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Das Chromatogramm der HPLC-Analyse sowie die gemessene Radioaktivität abhängig von der Retentionszeit sind in Abbildung 4.37 dargestellt.

Vitamin B_{12} wird unter den gewählten Trennbedingungen nach etwa 12 Minuten und

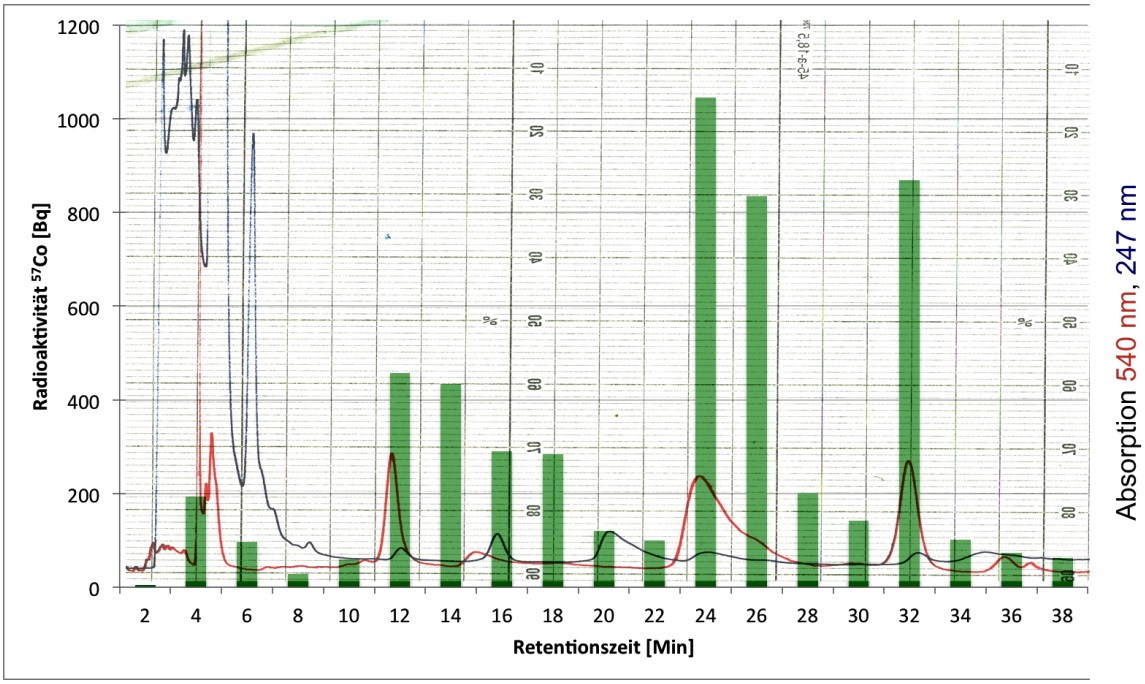


Abbildung 4.37: Radioaktivitätsverteilung nach Zugabe von radioaktivem [^{57}Co]-Vitamin B_{12} als einzige Kobalt-Quelle ins Medium von *Sporomusa ovata* H1. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde Methanol verwendet. Die Zellen wurden fünf Tage nach dem Inokulieren geerntet, das Gesamtcorrinoid aus den Zellen extrahiert und der Extrakt in einer HPLC mit C18-RP-Säule und Methanolgradienten aufgetrennt.

23 % Methanol von der HPLC-Säule eluiert, während die beiden lipophileren *p*-Kresolylcobamid-Isomere erst ab einer Methanolkonzentration von 40 % bei 24 bzw. 32 Minuten eluiert wurden. Die Fraktionen zwischen 12-18 Minuten (Vitamin B_{12}) und 24-32 Minuten (*p*-Kresolylcobamid) wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt und in 0,5 ml Wasser aufgenommen. Anschließend wurde ihre [^{57}Co]-Radioaktivität gemessen. Die gemessene Radioaktivität sowie der prozentuale Anteil von Vitamin B_{12} und *p*-Kresolylcobamid am Gesamtcorrinoid in den Zellen sind in Tabelle 4.12 aufgeführt. Die Wiederfindung in diesem Experiment betrug 91 % der in die *Sporomusa*-Zellen eingesetzten Radioaktivität.

Die Analyse der Corrinoidverteilung bei Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit [^{57}Co]-Vitamin B_{12} als einziger Kobaltquelle zeigt, dass ins Medium zugegebenes Vitamin B_{12} durch *Sporomusa ovata* zu 65 % zu *p*-Kresolylcobamid umgewandelt wurde. Die restlichen 30 % des zellulären Corrinoids liegen als Vitamin B_{12} in den Zellen vor.

Tabelle 4.12: Verteilung der Radioaktivität nach Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle und [^{57}Co]-Vitamin B_{12} als einziger Kobaltquelle

Radioaktivitätsverteilung in Corrinoiden [Bq]			
Vitamin B_{12}	[%]	*p*-Kresolylcobamid	[%]
1464	30	3091	65

4.4 Analyse Corrinoid-bindender Proteine aus *Sporomusa ovata* H1

Durch Fraktionierung der Proteinextrakte von *Sporomusa ovata* H1 durch Molekularsiebfiltration konnte bereits gezeigt werden (Kapitel 4.3), dass aus dem anaeroben Bakterium Proteine isoliert werden können, die einen Corrinoid-Kofaktor enthalten. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass der Hauptanteil der Corrinoide in hochmolekularen Proteinkomplexen (größer 70 kDa) vorliegen.

4.4.1 Analyse hochmolekularer, Corrinoid-haltiger Proteinkomplexe in *Sporomusa ovata* H1 durch „Blue Native“-Gelelektrophorese

Zu Isolierung Corrinoid-haltiger Proteine ist es notwendig, dass der Corrinoidkofaktor während der Analyse am Holoprotein gebunden bleibt. Der Nachweis der Corrinoide erfolgt durch Bestimmung der [^{57}Co]-Radioaktivitätsverteilung in den Proteinextrakten von *Sporomusa ovata* H1. Zur Trennung hochmolekularer Proteinkomplexe in nativer Form wurde deshalb eine „Blue Native“-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu war zuvor *Sporomusa ovata* H1 mit [^{57}Co]Cl_2 und mit Methanol bzw. Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet worden. Das Medium enthielt zusätzlich jeweils 100 µM 5,6-Dimethylbenzimidazol. Nach fünf Tagen Wachstum wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe der French Press aufgeschlossen.

Nach Ultrazentrifugation (90 min, 150000 g, 4 °C) zur Abtrennung der Membranfraktion wurde der cytoplasmatische Proteinextrakt durch Molekularsiebfiltration mit den Ausschlussgrößen 300 kDa und 100 kDa in drei Fraktionen getrennt. Die Fraktionen 100-300 kDa und >300 kDa wurden auf ein „Blue Native“-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die jeweiligen Spuren mit dem Skalpell in etwa 1,5 mm

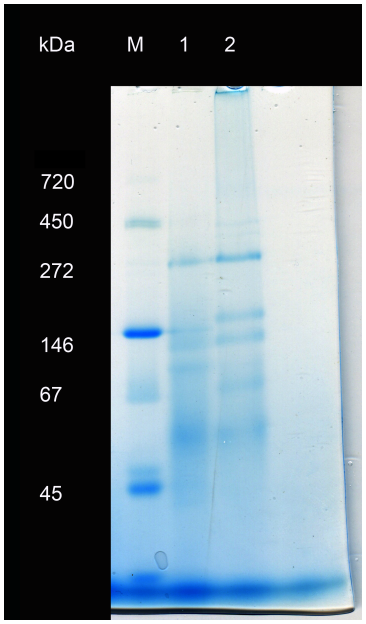
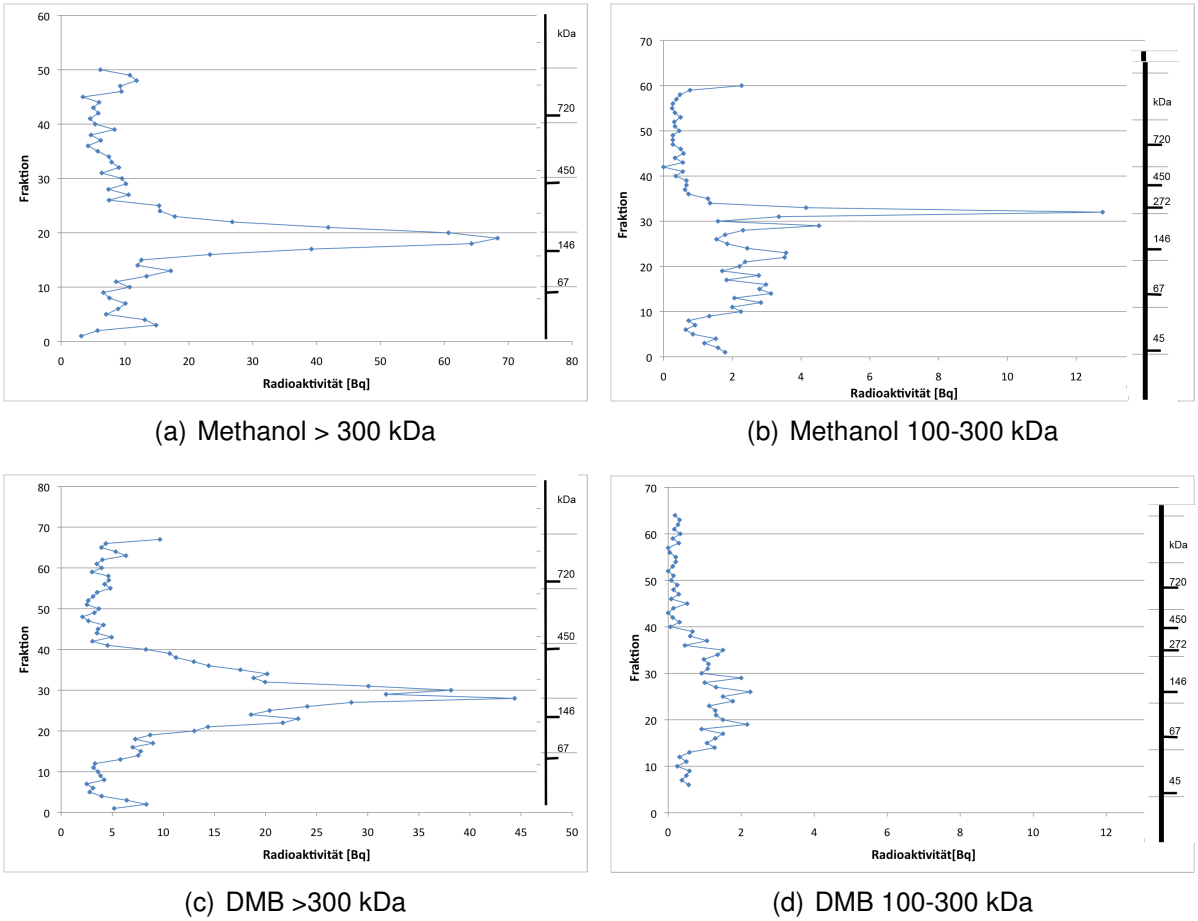


Abbildung 4.38: Blue Native Gelelektrophorese der Protein-Fraktionen 100-300 kDa
M: Native Marker (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg); Spur 1: 100-300 kDa Proteinfraktion der auf Methanol gewachsenen Zellen mit 5,6-Dimethylbenzimidazol im Medium; Spur 2: 100-300 kDa Proteinfraktion der auf Methanol gewachsenen Zellen

große Gelstücke geschnitten und im Gammazähler deren [^{57}Co]-Radioaktivität bestimmt.

Abbildung 4.38 zeigt, dass durch Blue Native Gelelektrophorese größere Proteinkomplexe voneinander getrennt werden können. In der Abbildung 4.39 (a-f) ist die Verteilung der Radioaktivität verschiedener Fraktionen im „Blue Native“-Gel dokumentiert.

Durch Verwendung der Blue Native Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die Corrinoid-Kofaktoren während der Trennung am Holoprotein gebunden bleiben. Es konnten mindestens 5 Fraktionen identifiziert werden, welche eine erhöhte Radioaktivität gegenüber dem Hintergrund und damit proteingebundenes Corrinoid enthalten. Bei Wachstum auf Pyruvat konnte in der Proteinfraktion 100-300 kDa keine proteingebundene [^{57}Co]-Radioaktivität gemessen werden. Ausserdem zeigte sich eine unterschiedliche Radioaktivitätsverteilung der Proteinfraktion 100-300 kDa im Blue Native Gel, wenn *Sporomusa ovata* H1 mit der Vitamin B_{12}-Vorstufe 5,6-Dimethylbenzimidazol gezüchtet wurde.



(a) Methanol > 300 kDa

(b) Methanol 100-300 kDa

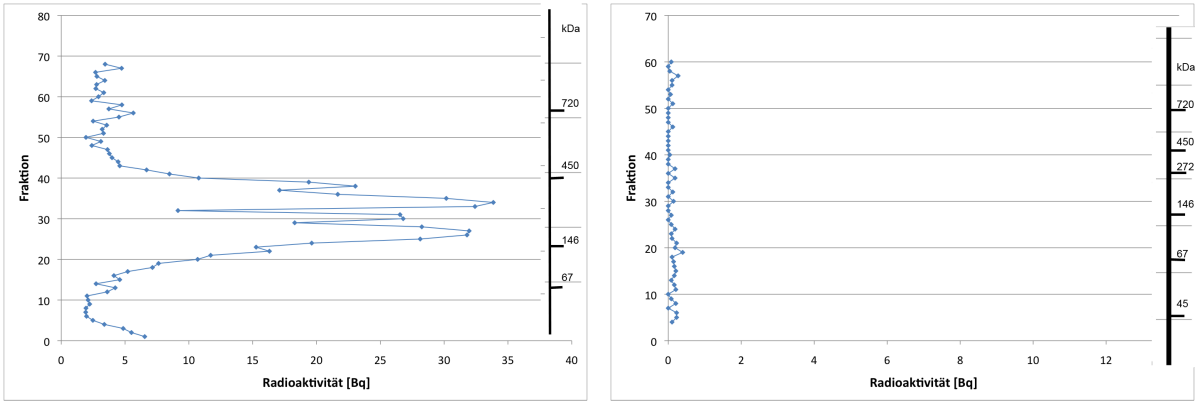
(c) DMB >300 kDa

(d) DMB 100-300 kDa

Abbildung 4.39: [^{57}Co]-Radioaktivitätsverteilung in „Blue Native“-Gelen (1). Fortsetzung auf der nächsten Seite

4.4.2 Identifizierung des Acetyl-CoA-Synthase Operons in *Sporomusa ovata* H1

Die Experimente zur Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12}, sowie die Proteinanalysen zur Corrinoidverteilung in dem homoacetogenen Bakterium zeigten deutliche Änderungen in den hochmolekularen Proteinfraktionen. Da beim Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit Pyruvat als Kohlenstoff- und Energiequelle diese Hemmung nicht auftritt, ist die Acetyl-CoA-Synthase, das zentrale Enzym im Energie- und Baustoffwechel des Bakteriums, als Ursache für die Wachstumshemmung wahrscheinlich. Deshalb habe ich mit Hilfe der Adapter-PCR das Acetyl-CoA-Synthase-Operon in *Sporomusa ovata* H1 vollständig identifiziert. Die nachgewiesene



(e) Pyruvat >300 kDa

(f) Pyruvat 100-300 kDa

Abbildung 4.39: Messung der [^{57}Co]-Radioaktivitätsverteilung in „Blue Native“-Gelen (2).

Operonstruktur ist in Abbildung 4.40 dargestellt. Seine Nukleotidsequenz ist 13.155 Bp lang.

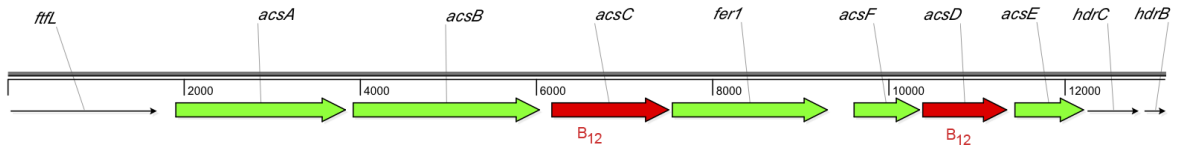


Abbildung 4.40: Identifizierte offene Leserahmen aus dem Acetyl-CoA-Synthase-Operon aus *Sporomusa ovata* H1. Die Nukleotidsequenzen waren zuvor durch „genomic walking“ identifiziert worden.

Die identifizierten offenen Leserahmen des Acetyl-CoA-Synthase-Operons in *Sporomusa ovata* H1 wurden mit Hilfe des ORF-Finders überprüft und die Leserahmen durch BLASTp-Analyse mit Einträgen in der NCBI-Datenbank abgeglichen. Die vorhergesagten Genprodukte sind in Tabelle 4.13 aufgelistet.

Das Acetyl-CoA-Synthase-Operon in *Sporomusa ovata* H1 enthält die α- und β-Untereinheit sowie die Untereinheiten γ und δ. Letztere bilden im momentan am besten biochemisch untersuchten Acetyl-CoA-Synthase-System von *Moorella thermoacetica* das sogenannte Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein. Die ähnliche Organisation der Untereinheiten in *Sporomusa ovata* H1 lassen daher die Vermutung zu, dass diese beiden Untereinheiten auch in *Sporomusa* die Corrinoid-haltige Untereinheit der Acetyl-CoA-Synthase bilden. Ein Corrinoid-Bindemotiv (siehe Kapitel 4.4.3) ist in der Aminosäuresequenz jedoch nicht enthalten. Ausserdem enthält das Operon ein

Tabelle 4.13: Acetyl-CoA Synthase Operon in *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
ftfL	74	557	*Pelotomaculum thermopropionicum*	Formiat:THF Ligase	6.3.4.3
acsA	52	657	*Moorella thermoacetica*	Acetyl-CoA Synthase,α-Untereinheit	1.2.99.2
acsB	66	708	*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1	Acetyl-CoA Synthase, β-Untereinheit	1.2.99.2
acsC	54	407	*Desulfitobacterium hafniense* Y51	Acetyl-CoA Synthase, γ-Untereinheit	1.2.99.2
fer1	51	590	*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1	Ferredoxin	1.2.7.4
acsF	62	251	*Desulfitobacterium hafniense* Y51	Acetyl-CoA Synthase, Reifungsfaktor	1.2.99.2
acsD	63	322	*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1	Acetyl-CoA Synthase,δ-Untereinheit	1.2.99.2
acsE	61	263	*Desulfitobacterium hafniense* Y51	Methyl-THF:Corrinoid-Eisen/Schwefel Protein Methyltransferase	1.2.99.2
hdrC	38	197	*Desulfovibrio salexigens*	Heterodisulfid Reduktase, γ-Untereinheit	1.12.99.2

Ferredoxin-kodierendes Gen und ein weiteres, welches für ein Methyl-THF:Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein Methyltransferaseprotein kodiert, die die Übertragung einer Methylgruppe auf das Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein bewerkstelligen sollte. Zur Untersuchung der Corrinoid-Bindung an das Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein in *Sporomusa ovata* H1 war es deshalb notwendig, diese Untereinheiten des Acetyl-CoA-Synthase-Komplexes in *Escherichia coli* heterolog herzustellen. Hierfür wurden die Gene *acsC* und *acsD* in den Expressionsvektor pRSF-Duet-1 kloniert. Die Vektorsequenz enthält Nukleotidsequenzen, welche für einen N-terminalen His-Tag am ersten und für einen C-terminalen S-Tag am zweiten Protein kodieren.

Die heterolog hergestellten Proteine liegen also als His-Tag-, bzw. als S-Tag-Fusionsprotein vor. Diese Tags können für eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie genutzt werden. Ausserdem können sie ebenfalls zur Detektion der Proteine durch immunologischen Nachweis verwendet werden. Zur heterologen Herstellung wurden die beiden Gene, welche für die Untereinheiten des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins kodieren zunächst durch PCR aus chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 amplifiziert. Als Oligonukleotide dienten für *acsC* „AcsC_pRSFDuet_fw“ und „AcsC_pRSFDuet_rev“. An die 5’-Enden der Oligonukleotide waren zuvor die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI beziehungsweise *Hind*III synthetisiert worden. Zur PCR-Amplifikation des *acsD*-Gens wurden die Oligonukleotide „AcsD_pRSFDuet_fw“ und „AcsD_pRSFDuet_rev“ benutzt. An die 5’-Enden dieser Oligonukleotide waren zuvor die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II beziehungsweise *Kpn*I synthetisiert worden. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese auf einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel eluiert. Die Plasmid-DNA von pRSF-Duet-1 wurde dann mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Die geschnittene Vektor-DNA und die PCR-Amplifikate wurden nach dem Restriktionsverdau erneut durch eine Agarosegelelektrophorese

von den Restriktionsendonukleasen getrennt und wieder aus dem Gel eluiert. Dann wurde zunächst das *acsC*-Amplifikat mit der Vektor-DNA ligiert, in *Escherichia coli* XL1 Blue-Zellen transformiert und auf kanamycinhaltige (50 µg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert. Die Insertion des PCR-Amplifikats wurde für mehrere Klone durch Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA mit *Bam*HI und *Hind*III durchgeführt und durch Agarosegelelektrophorese (0,8 % (w/v)) kontrolliert. Die Klonierung des *acsD*-Gens erfolgte analog zur Klonierung des *acsC*-Gens. Die Plasmid-DNA des Klons, welcher die beiden Gene *acsC* und *acsD* enthielt wurde in *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) transformiert und diese Zellen zur heterologen Koexpression beider Gene verwendet.

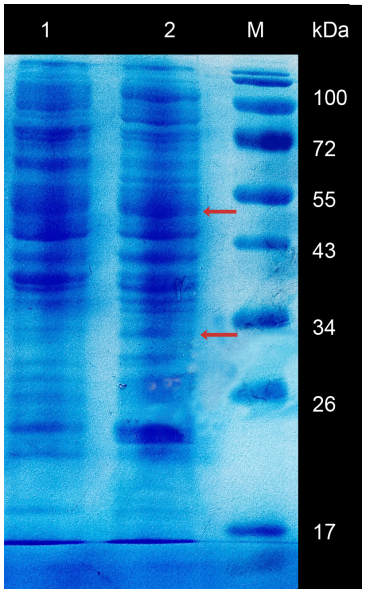


Abbildung 4.41: Coomassie-gefärbtes, 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit Proteinextrakten aus *Escherichia coli* Rosetta(DE3)/pRSF-Duet-1/AcsCD des Corrinoid Eisen/Schwefel-Proteins aus *Sporomusa ovata* H1. Die Proteinextrakte wurden durch Aufschluss der Zellen mit Hilfe der French Press gewonnen. Durch Zentrifugation wurde der cytoplasmatische Überstand und die unlösliche Proteinfraktion (enthält Einschlusskörperchen) getrennt. Die unlösliche Fraktion wurde mit 8 M Harnstoff behandelt. Anschließend wurden beide Fraktionen mit Laemmlipuffer versetzt und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen
Spur 1: 20 µg Proteinextrakt der cytoplasmatischen Fraktion
Spur 2: 20 µg Proteinextrakt der unlöslichen Fraktion (Einschlusskörperchen)
M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

Nach der gleichzeitigen Expression beider Proteine wurden die Zellen durch die French Press aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand enthält die

lösliche Proteinfraktion, während unlösliche Proteine (Einschlusskörperchen) sedimentieren. Jeweils 20 µg der unlöslichen und löslichen Proteinfraktion wurden durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert und Proteinbanden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Die berechnete molekulare Masse der heterolog hergestelten Untereinheiten beträgt 49 kDa für AcsC und 32 kDa für AcsD.

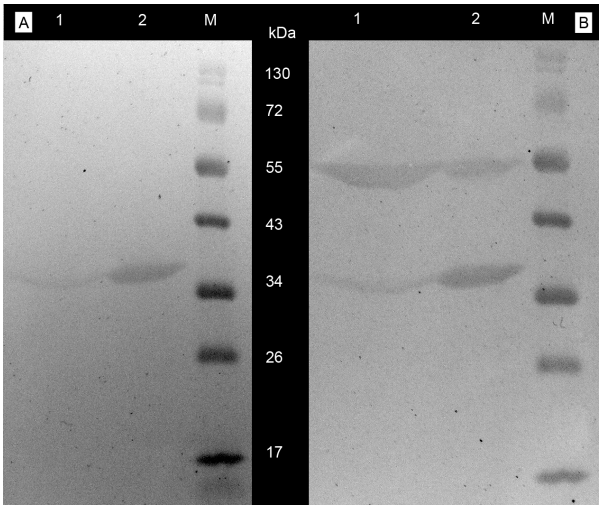


Abbildung 4.42: Western-Blot Hybridisierung der cytoplasmatischen und der unlöslichen Proteinfraktion aus *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3)/pRSF-Duet-1/AcsCD zur Koexpression der Acetyl-CoA-Untereinheiten AcsC und AcsD (aus Abbildung 4.41) mit 1:3000 verdünnten monoklonalen Anti-S-Tag-Antikörpern (A) und anschließender Hybridisierung mit 1:3000 verdünnten Anti-His-Antikörpern (B). Der Antigen:Antikörper-Komplex wurde mit Hilfe einer Antikörper-gekoppelten Meerrettichperoxidase nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte colorimetrisch durch 3,3'-Diaminobenzidin.
Spur A1: Cytoplasmatische Proteinfraktion aus *Escherichia coli*/Rosetta/pRSF-Duet-1/AcsCD, Nachweis mit Anti-S-Tag-Antikörpern; Spur A2: Unlösliche Proteinfraktion (Einschlusskörperchen) aus *Escherichia coli*/Rosetta/pRSF-Duet-1/AcsCD, Nachweis mit Anti-S-Tag-Antikörpern; Spur B1: Cytoplasmatische Proteinfraktion aus *Escherichia coli*/Rosetta/pRSF-Duet-1/AcsCD, Nachweis mit Anti-S-Tag- und Anti-His-Tag-Antikörpern; Spur B2: Unlösliche Proteinfraktion (Einschlusskörperchen) aus *Escherichia coli*/Rosetta/pRSF-Duet-1/AcsCD, Nachweis mit Anti-S-Tag- und Anti-His-Tag-Antikörpern; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

Die Expression der beiden Untereinheiten des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins aus *Sporomusa ovata* H1 wurde durch eine Western-Blot-Hybridisierung auf Proteinextrakte der löslichen und unlöslichen Proteinfraktion (Abbildung 4.41) überprüft. Die Analyse erfolgte mit monoklonalen His-Tag- und S-Tag-spezifischen Antikörpern in 1:3000 Verdünnung. An die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten

Zweitantikörper (Anti-Maus), schloss sich ein colorimetrischer Nachweis der Peroxidasereaktion durch 3,3'-Diaminobenzidin an. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse ist in Abbildung 4.42 dargestellt.

Die Western-Blot Analyse zeigt die Bildung der beiden Acetyl-CoA-Untereinheiten AcsC und AcsD des Corrinoid:Eisen/Schwefel-Proteins in *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) teilweise in löslicher Form. Diese lösliche Proteinfraktion wurde verwendet, um durch Nickel-Affinitätschromatographie den Proteinkomplex aufzureinigen. Da nur eines der beiden Proteine als His-Tag-Fusionsprotein vorlag, sollte bei einer solchen Aufreinigung das S-Tag markierte Protein AcsD nur isoliert werden können, wenn es als Komplex mit dem Protein AcsC vorliegt. Die einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und die Proteinbanden nach der elektrophoretischen Trennung durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in Abbildung 4.43 dargestellt.

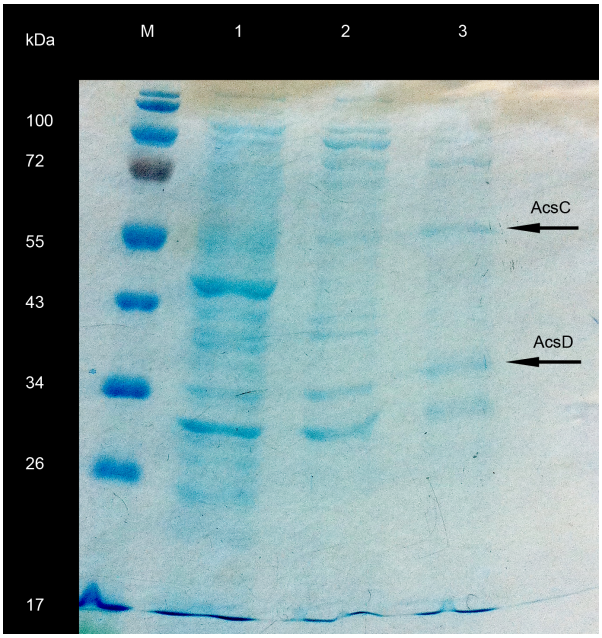


Abbildung 4.43: Isolierung der in *Escherichia coli* Rosetta(DE3)/pRSF-Duet-1/AcsCD heterolog koexprimierten Untereinheiten des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins aus dem Acetyl-CoA-Synthase-Operon von *Sporomusa ovata* H1 durch Nickel-Affinitätschromatographie.
M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas; Spur 1: 10 µl der 1. Fraktion (1,5 ml), Waschschritt mit 40 mM Imidazol, 250 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; Spur 2: 10 µl der 1. Fraktion (1,5 ml), Elutionsschritt mit 500 mM Imidazol, 250 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; Spur 3: 10 µl der 2. Fraktion (1,5 ml), Elutionsschritt mit 500 mM Imidazol, 250 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0

Die Nickel-Affinitätsaufreinigung der exprimierten Proteine AcsC und AcsD zeigten beide Proteinbanden mit den erwarteten molekularen Massen. Dies war für AcsC 49 kDa und für AcsD 32 kDa. Die beiden hier heterolog hergestellten Proteine kommen also wahrscheinlich auch als Komplex in den Zellen von *Sporomusa ovata* H1 vor.

4.4.3 Molekularbiologische Identifizierung Corrinoid-bindender Proteine über ein mögliches Vitamin B_{12}-Proteinbindemotiv

Aus Untersuchungen zu Vitamin B_{12}-abhängigen Proteinen wie der Methionin Synthase (EC 2.1.1.13) aus *Escherichia coli* (Ludwig und Matthews, 1997) wurde ein Vitamin B_{12}-Bindemotiv postuliert. Dieses Motiv findet sich ebenfalls in anderen Vitamin B_{12}-abhängigen Protein wie der Methylmalonyl-CoA Mutase (EC 5.4.99.2) und der Glutamat Mutase (EC 5.4.99.1). An der Vitamin B_{12}-Bindung ans Apoprotein sind die konservierten Aminosäuren **Asp-X-His-X-X-Gly-(41)-Ser-X-Leu-(26-28)-Gly-Gly** beteiligt. Basierend auf den Proteinsequenzen vorhergesagter Vitamin B_{12}-abhängiger Methyltransferasen aus dem Phylum der Firmicutes habe ich das konservierte Aminosäuremotiv RDVHDIGKNI gefunden, welches das bereits bekannte B_{12}-Bindemotiv D-X-H-XX-G enthält. Ausgehend von diesem Motiv habe ich ein degeneriertes Oligonukleotid (B12Motif_fw) abgeleitet. Durch Verwendung dieses Oligonukleotids in einer Adapter-PCR sollte untersucht werden, ob auch in *Sporomusa ovata* H1 ein ähnliches Bindemotiv existiert, welches für die Bindung von *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid an Proteine verantwortlich sein könnte. Die Adapter-PCR wurde auf *Eco*RV oder *Sma*I vollständig verdaute chromosomale DNA von *Sporomusa ovata* H1 mit den Oligonukleotiden B12Motif_fw und A_Primer2 durchgeführt. Das Reaktionsprodukte der Adapter-PCR wurden auf einem 0,8 %igen (w/v) Agarosegel analysiert; dessen Ergebnis ist in Abbildung 4.44 dargestellt.

Alle im Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) unter UV-Anregung (312 nm) sichtbaren PCR-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt und anschließend in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert. Der Ligationsansatz wurde dann in *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' transformiert. Einzelne Klone wurden durch Restriktionsverdau der isolierten Plasmide auf Vorhandensein eines Inserts der richtigen Größe analysiert und die Nukleotidsequenzen positiver Klone mit Hilfe des Sequenzierprimers pJET1.2-forward bestimmt. Die Nukleotidsequenzen wurden mit dem ORF-Finder (Tabelle 6.1) auf offene Leserahmen untersucht und mit dem BLASTp-Algo-

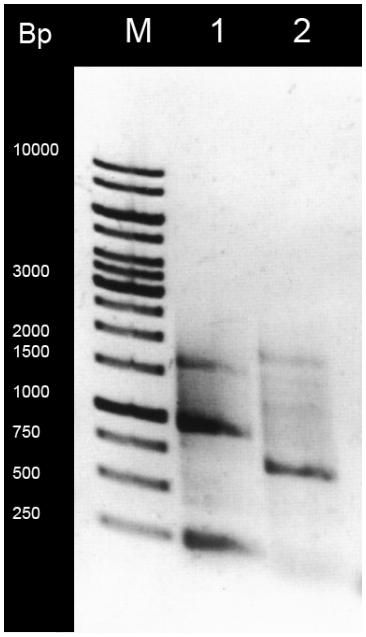


Abbildung 4.44: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel (0,8 % (w/v)) der Adapter-PCR zur Identifizierung von potenziellen Corrinoid-bindenden Proteinen in *Sporomusa ovata* H1. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden B12Motif_fw und A_Primer2 auf vollständig verdaute chromosomale DNA von *Sporomusa ovata* H1 durchgeführt. An die DNA-Enden wurden vor der PCR Oligonukleotidadapter ligiert. M: Gene Ruler^{TM} 1 kBp DNA-Längenstandard; Spur 1: *Eco*RV, Spur 2: *Sma*I

rithmus mit Proteinen in der NCBI-Datenbank verglichen. Bei diesem Vorgehen wurden zwei offene Leserahmen gefunden, deren Genprodukt eine 68- beziehungsweise 69 %ige Identität zu Corrinoid-bindenden Proteinen der Bakterien *Thermincola sp.* JR und *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 zeigten. Durch Adapter-PCR wurden die stromaufwärts und stromabwärts liegenden Nukleotidsequenzen identifiziert („genomic walking“) und mit Hilfe des ORF-Finders auf offene Leserahmen untersucht. Die Organisation der offenen Leserahmen ist in den Abbildungen 4.45 und 4.46 dargestellt. Die identifizierten offenen Leserahmen sind in den Tabellen 4.14 bzw. 4.15 zusammengefasst. Diese umfassen einen Nukleotidsequenzbereich von 4.201 Bp bzw. 6.010 Bp.

Die offenen Leserahmen stromauf- und stromabwärts des ersten identifizierten Proteins mit Corrinoid-Bindemotiv konnten nach Datenbankabgleich einer Monomethylamin Methyltransferase zugeordnet werden.

Die offenen Leserahmen stromauf- und stromabwärts des zweiten identifizierten Pro-

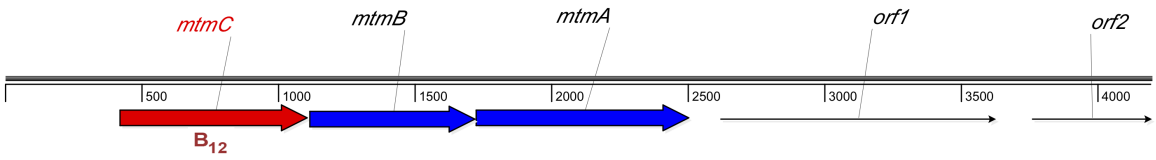


Abbildung 4.45: Operon der Corrinoid-abhängigen Methyltransferasen aus *Sporomusa ovata* H1

Tabelle 4.14: Identifizierte Offene Leserahmen über ein Vitamin B_{12}-Proteinbindemotiv aus *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
mtmC	69	219	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Protein mit **Cobalamin Bindedomäne**	2.1.1.-
mtmB	79	202	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Monomethylamin Methyltransferase MtmB	2.1.1.-
mtmA	93	241	*Thermincola sp.* JR	Monomethylamin Methyltransferase MtmA	2.1.1.-
orf1	56	319	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Ferredoxin	
orf2	69	148	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Ferredoxin	

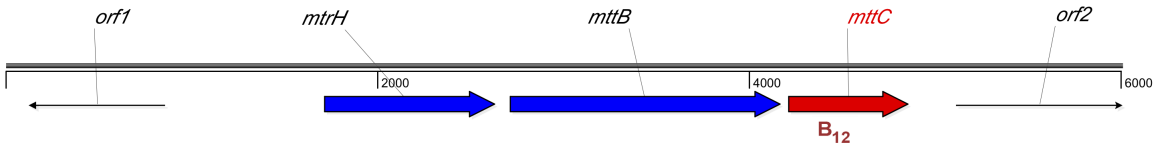


Abbildung 4.46: Operon der Corrinoid-abhängigen Methyltransferasen aus *Sporomusa ovata* H1

Tabelle 4.15: Identifizierte Offene Leserahmen zu einem weiteren Vitamin B_{12}-Proteinbindemotiv aus *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	38	246	*Thermincola sp.* JR	PAS abhängiger, Sigma54-spezifischer transkriptioneller Regulator	
mtrH	81	306	*Thermincola sp.* JR	Tetrahydromethanopterin S-Methyltransferase	2.1.1.86
mttB	79	476	*Thermincola sp.* JR	Trimethylamin Methyltransferase	2.1.1.-
mttC	68	215	*Thermincola sp.* JR	Protein mit **Cobalamin Bindedomäne**	2.1.1.-
orf2	55	274	*Dorea formicigenerans*	Nitrat/Sulfonat/Bicarbonat ABC-Transport, ATP-bindende Untereinheit	3.6.3.-

teins mit Corrinoid-Bindemotiv konnten nach Datenbankabgleich einer Trimethylamin Methyltransferase zugeordnet werden.

Die Amiosäuresequenzen der beiden möglichen Corrinoid-bindenden Proteine MtmC und MttC aus *Sporomusa ovata* H1 wurden mit Hilfe der Software MacVector miteinander verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 4.47 dargestellt.

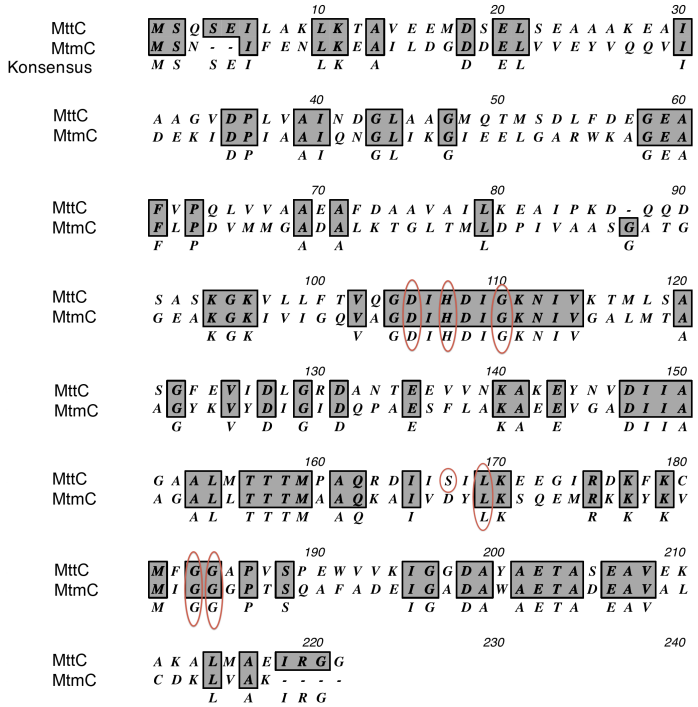


Abbildung 4.47: Vergleich der Corrinoid-abhängigen Methyltransferasen MtmC und MttC aus *Sporomusa ovata* H1. Rot markiert sind die Aminosäuren des putativen Corrinoid-Bindemotivs

Bei beiden Proteinen konnten die konservierten Aminosäuren eines Corrinoid-Bindemotivs nachgewiesen werden. Dieses konservierte Motiv besteht bei dem Protein MttC aus **Asp-X-His-X-X-Gly-(56)-Ser-X-Leu-(13)-Gly-Gly** und beim Protein MtmC aus **Asp-X-His-X-X-Gly-(56)-Asp-X-Leu-(13)-Gly-Gly**.

Ebenfalls habe ich die kodierende Gensequenz für das Protein McpA identifiziert (Tabelle 4.5 und Abbildung 4.9). Von diesem Protein ist bekannt, dass es *p*-Kresolylcobamid enthält (Stupperich u. a., 1992). Die Aminosäuresequenz dieses Proteins beinhaltet ebenfalls ein mögliches Corrinoid-Bindemotiv **Asp-X-His-X-X-X-Gly-(76)-Ser-X-Leu-(55)-Gly-Gly** beziehungsweise **Asp-X-His-X-X-X-Gly-(34)-Ser-X-Leu-(26)-Gly-Gly** (siehe Abbildung 4.48).

STLACGVINAAYNQGIVSTVNTLGARGVPKVTYIDVAGTHETISGDPRVLGYKYNNA
NYAMVAAYTYTTLGTPGTARVALFSIDSSGNWTQLVQKPSAEWGFSNPYGLVVIDSN
LYVQDYDSGAITVVNLSTYATSTLYTMPSVTSGGTIYLPHGNGLDYHADYGLVAIYS
FLPSGSYSNYYASKLAIVPTDGSTADVVSGLNNNVVSVTVDSSGIAYVTSIGGAQQA
GGNSASKIETVNLSTLALGTTPVTISALPAGQQKGDFVDVAFWDSAAYVLRANYDTN
YSEYSYQLFKTDGTSLQGGTLGTNTTGPLTATPADATWLLAPAVDALWFVSGSAANI
VASGNLSSTSVTKKADHTQYSSANQGIGDENCHSHLNTASVVINIADQAARDAGADA
AVAATRTKVAFKFVRPEELEEQAKAQTAAAKQE

Abbildung 4.48: Aminosäuresequenz des Corrinoid-haltigen Proteins McpA aus *Sporomusa ovata* H1. Rot markiert sind die Aminosäuren des putativen Corrinoid-Bindemotivs. Blau hervorgehoben sind die N-terminalen Aminosäuren, welche bereits durch N-terminale Proteinsequenzierung bekannt waren.

4.4.4 Heterologe Produktion möglicher Corrinoid-bindender/transportierender Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 und ihre biochemische Analyse

Durch die Identifizierung von Corrinoid-Riboschaltern und der stromabwärts liegenden Nukleotidsequenzen konnte ich mehrere Gene identifizieren, welche für mögliche Corrinoid-Transportproteine in *Sporomusa ovata* H1 kodieren. Dass *Sporomusa ovata* Vitamin B_{12} transportiert, habe ich im physiologischen Experiment in Kapitel 4.3 gezeigt. Ausserdem habe ich die Gensequenz identifiziert, welche für das Corrinoid-haltige, cytoplasmatische Protein McpA aus *Sporomusa ovata* H1 kodiert. Diese Proteine sollten auf ihre Vitamin B_{12}-Bindefähigkeit untersucht werden. Die Proteinsequenzen der möglichen Vitamin B_{12}-Transportproteine BtuB1, BtuB4, BtuB5 und BtuB6, deren Expression durch einen Corrinoid-Riboschalter reguliert werden, ist vergleichend zum gut untersuchten *Escherichia coli*-Transportprotein in Abbildung 4.49 dargestellt.

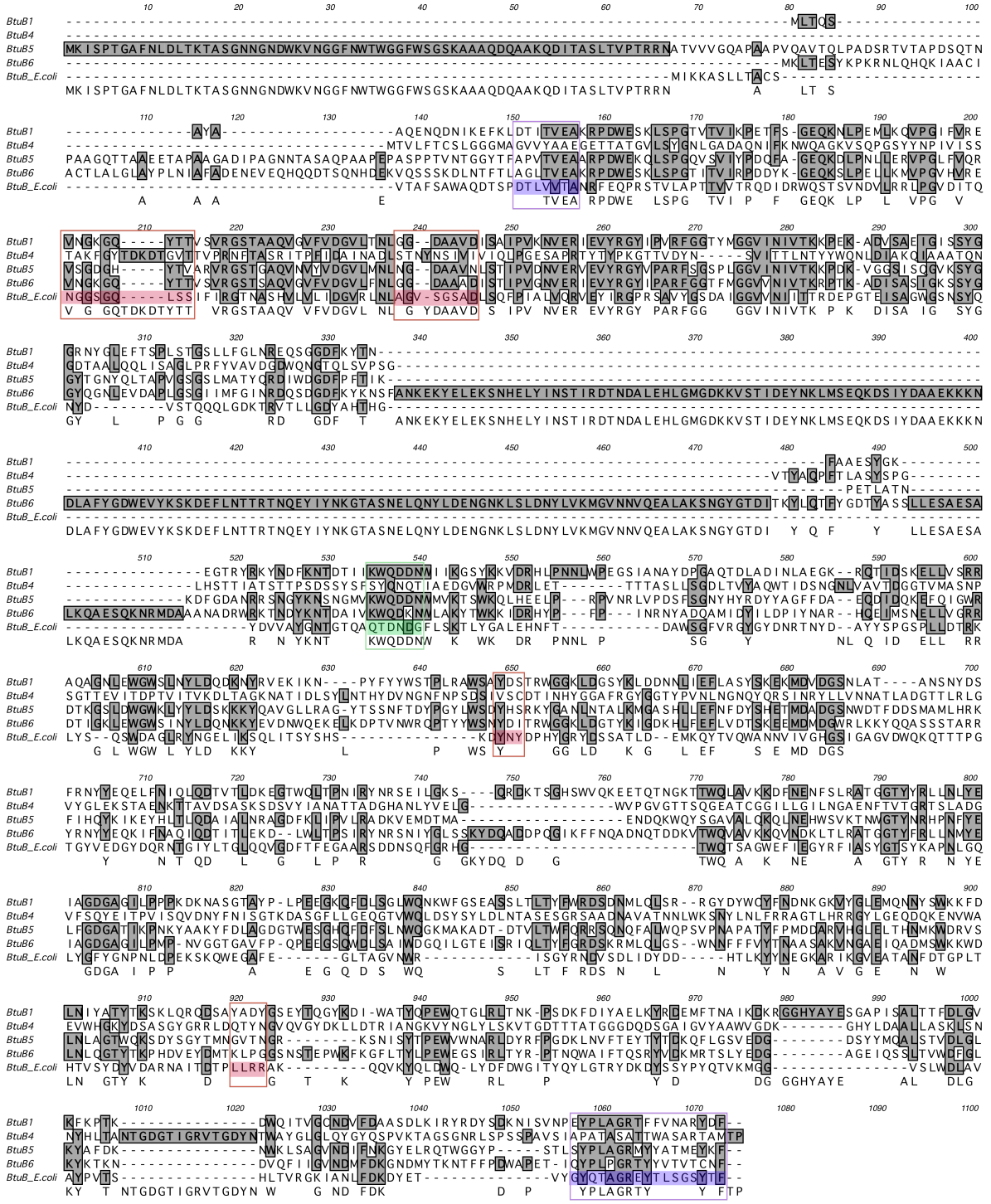


Abbildung 4.49: Proteinsequenzvergleich der identifizierten Corrinoid-Transporter aus *Sporomusa ovata* H1 mit der Proteinsequenz von BtuB aus *Escherichia coli* K12. Blau markiert sind die Aminosäuren in BtuB von *Escherichia coli*, die für die TonB-Bindung (TonB-Box), rot hinterlegt sind die Aminosäuresequenzmotive, die für die Corrinoid-Bindung verantwortlich sind. Grün ist eine Bindestelle für Calcium dargestellt. Die Angaben zum Vitamin B_{12}-Transporter BtuB aus *Escherichia coli* basieren auf der Publikation von Chimento u. a. (2003).

Die BtuB-Transportproteine aus *Sporomusa ovata* H1 zeigen gegenüber BtuB aus *Escherichia coli* deutliche Unterschiede in ihrer Proteinsequenz. Die bei BtuB aus *Escherichia coli* bekannten, bei der Corrinoid-Bindung beteiligten Aminosäuresequenzmotive sind bei den postulierten Corrinoid-Transportproteinen aus *Sporomusa ovata* H1 nicht eindeutig zuzuordnen. Um die Bindung von Vitamin B_{12} an diese Transportproteine funktionell zu testen, wurde das von (Becker u. a., 2005; Bischof, 2010) entwickelte System adaptiert. Durch dieses System ist es möglich, Proteine auf der Zelloberfläche von *Escherichia coli* zu präsentieren. Die BtuB-Proteine werden als Fusionsproteine mit der EsteraseA (pEST100) beziehungsweise Intimin (pASKInt110) in *Escherichia coli* hergestellt. Diese Fusionsproteine werden dann über das Periplasma zur äusseren Zellmembran des Gram-negativen Bakteriums transportiert und dort inseriert. Nach Induktion der Genexpression des Fusionskonstrukts sollten die BtuB-Proteine nach aussen in Richtung Wachstumsmedium präsentiert auf der Zelloberfläche vorliegen.

Zur Klonierung der *btub*-Gene aus *Sporomusa ovata* H1 wurden diese durch PCR mit chromosomaler DNA von *Sporomusa ovata* H1 und den Oligonukleotiden aus Tabelle 3.14 amplifiziert. Ausserdem wurde das Gen *mcpA* zum späteren Test der Vitamin B_{12}-Bindung des Proteins McpA mit Hilfe der Oligonukleotide 40kDa_pEST/ASK_fw und 40kDa_pASK_rev amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert und in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' transformiert. Die Oligonukleotide enthielten *Sfi*I-Schnittstellen. Dadurch konnten die inserierten PCR-Amplifikate durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I aus positiven Klonen herausgeschnitten und anschließend in die ebenfalls *Sfi*I-geschnittenen Vektoren pEST100 und pASKInt110 in-frame kloniert werden. Dann erfolgte die Transformation dieser Konstrukte in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'. Positive Klone wurden anschließend zur Expression von BtuB-Proteinen und des Corrinoid-haltigen Proteins McpA aus *Sporomusa ovata* H1 auf der Zelloberfläche von *Escherichia coli* verwendet. Als Positivkontrolle zur Vitamin B_{12}-Bindung an die Zelloberfläche dienten *Escherichia coli* BL1-Blue MRF'-Zellen, die das BtuB-Transportprotein aus *Escherichia coli* K12 präsentieren (Bischof, 2010). Die Negativkontrolle, welche kein Vitamin B_{12} binden sollte, waren *Escherichia coli* XL-Blue MRF'-Zellen, die mit dem Leervektor pEST100 transformiert waren. Nach Wachstum der Zellen und Induktion der Expression der Fusionsproteine (siehe Kapitel 3.5.15) wurden jeweils 3 $\cdot 10^9$ Zellen abzentrifugiert und der Zellniederschlag für den B_{12}-Bindungstest verwendet. Das Ergebnis der Bindung von ^{57}Kobalt-markiertem Vitamin B_{12} an *Escherichia coli*-Klonen,

welche mögliche Corrinoid-bindende Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 auf der Zelloberfläche enthalten, zeigt Abbildung 4.50.

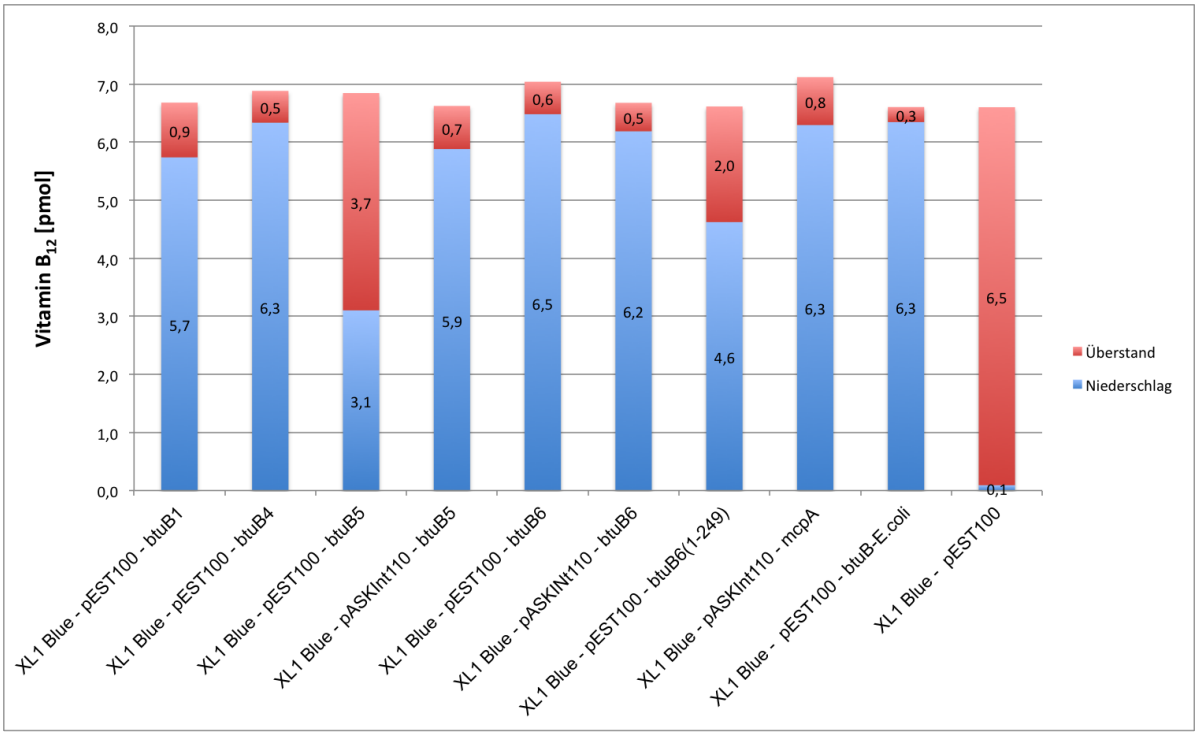


Abbildung 4.50: Bindung von radioaktivem Vitamin B_{12} (Spezifische Radioaktivität: 5,8 Bq/pmol) an Oberflächen von *Escherichia coli*-Klonen, welche mögliche Corrinoid-bindende Proteine aus *Sporomusa ovata* H1 auf der Zelloberfläche enthalten. Die Zellen wurden für 30-60 sec mit [^{57}Co]-Vitamin B_{12} inkubiert und dann durch Zentrifugieren (5 min, 6000 g) in die gebundene (Zellniederschlag) und die nicht gebundene (überstand) Fraktion getrennt.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (*Escherichia coli XL1 Blue MRF'-pEST100*) konnte auf die Zelloberfläche der rekombinanten *Escherichia coli*-Stämme ein Vielfaches an Vitamin B_{12} gebunden werden. Die Positivkontrolle zeigte mit 6,3 pmol gebundenem Vitamin B_{12} eine 63-fach erhöhte Bindung des Corrinoids verglichen mit Zellen, die den Vektor ohne Gen für ein postuliertes Vitamin B_{12}-Transportprotein enthalten. Auch die Corrinoid-Bindung an das McpA-Protein aus *Sporomusa ovata* H1 konnte durch diesen Test bestätigt werden. Die Vitamin B_{12}-Bindung war für den Klon, welcher dieses Corrinoid-haltige, cytoplasmatische Protein auf der Zelloberfläche von *Escherichia coli* präsentierte, vergleichbar mit der Positivkontrolle. Alle getesteten Klone, welche verschiedene BtuB-Transportproteine aus *Sporomusa ovata* H1 exprimierten, zeigten eine ähnlich gute Bindung von Vitamin B_{12}, was die Ergebnisse mei-

ner physiologischen Transportversuche in Kapitel 4.3 bestätigt. Beim Transportprotein BtuB5 war die Vitamin B_{12}-Bindung bei Verwendung des Vektors pEST100 deutlich schlechter, was möglicherweise durch eine sterische Behinderung der Vitamin B_{12}-Bindung durch das Fusionsprotein erklärt werden kann. Ebenfalls eine schwächere Bindung konnte für das Protein BtuB6(1-249) gemessen werden. Hier wurden nur 4,6 pmol Vitamin B_{12} gebunden. Dieses Transportprotein stellt eine verkürzte Version des BtuB6-Proteins dar, welches nur die ersten 249 Aminosäuren enthielt. Das Ergebnis zeigt, dass das Proteinteilfragment trotzdem in der Lage ist, Vitamin B_{12} zu binden. Eine Abschwächung der Bindung könnte durch eine Änderung der Sekundärstruktur in der Corrinoid-Bindestelle hervorgerufen werden.

5 Diskussion

Die Ergebnisse meiner Arbeit liefern neue Erkenntnisse zum Corrinoid-Stoffwechsel und dessen Regulation in *Sporomusa ovata* H1. Diese Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Das Verfahren, Oligonukleotide von B_{12}-Riboschalter-Sequenzen nah verwandter Bakterien (siehe Abbildung 5.1) abzuleiten, erwies sich als zielführend. So wurden in dieser Arbeit zwölf B_{12}-Riboschalter im Genom von *Sporomusa ovata* H1 identifiziert (RS01-RS12). Diese nachgewiesenen Nukleotidsequenzbereiche zeigen untereinander eine hohe Identität und Übereinstimmung in der vorhergesagten Sekundärstruktur mit bekannten B_{12}-Riboschaltern (siehe Abbildung 5.2). Alle Riboschalter-Sequenzen und die Nukleotidsequenzen der heterolog in *Escherichia coli* exprimierten Gene wurden doppelsträngig sequenziert.

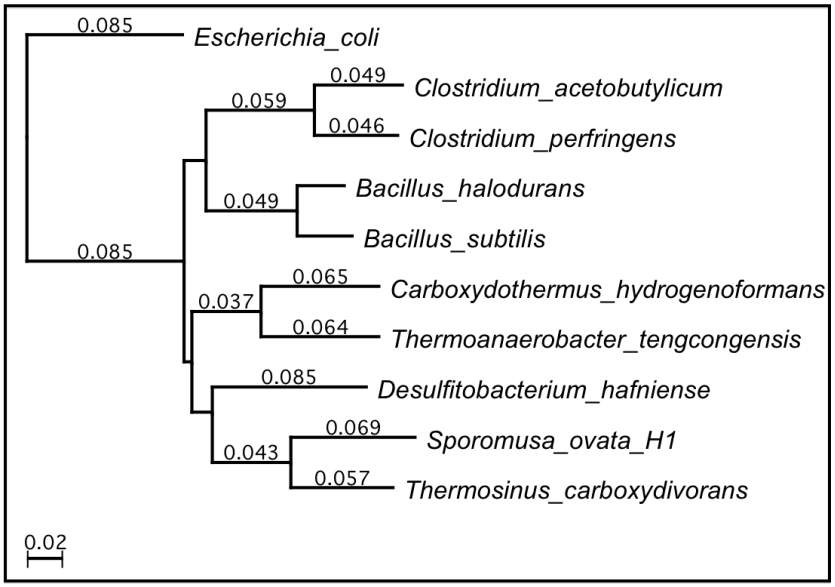


Abbildung 5.1: Phylogenetische Verwandtschaft von *Sporomusa ovata* H1 zu Organismen aus der Gruppe der Firmicutes im Vergleich zu *Escherichia coli* (Ribosomal Database, Tabelle 6.1).

Die Anzahl von mindestens zwölf B_{12}-Riboschaltern in *Sporomusa ovata* H1 ist im Vergleich zu anderen bakteriellen Genomen sehr hoch (Rodionov u. a., 2003). So liegt die Anzahl der vorhergesagten B_{12}-Riboschalter bei Bakterien des Phylums Firmicutes bei etwa zwei (z.B. *Clostridium acetobutylicum*) bis fünf (z.B. *Bacillus halodurans*). Nur für die Genome der phototrophen Bakterien *Rhodobacter capsulatus* (13) und *Rhodopseudomonas palustris* (9) werden ähnlich viele dieser Regulationselemente postuliert, wie sie im heterotrophen *Sporomusa ovata* H1 vorkommen.

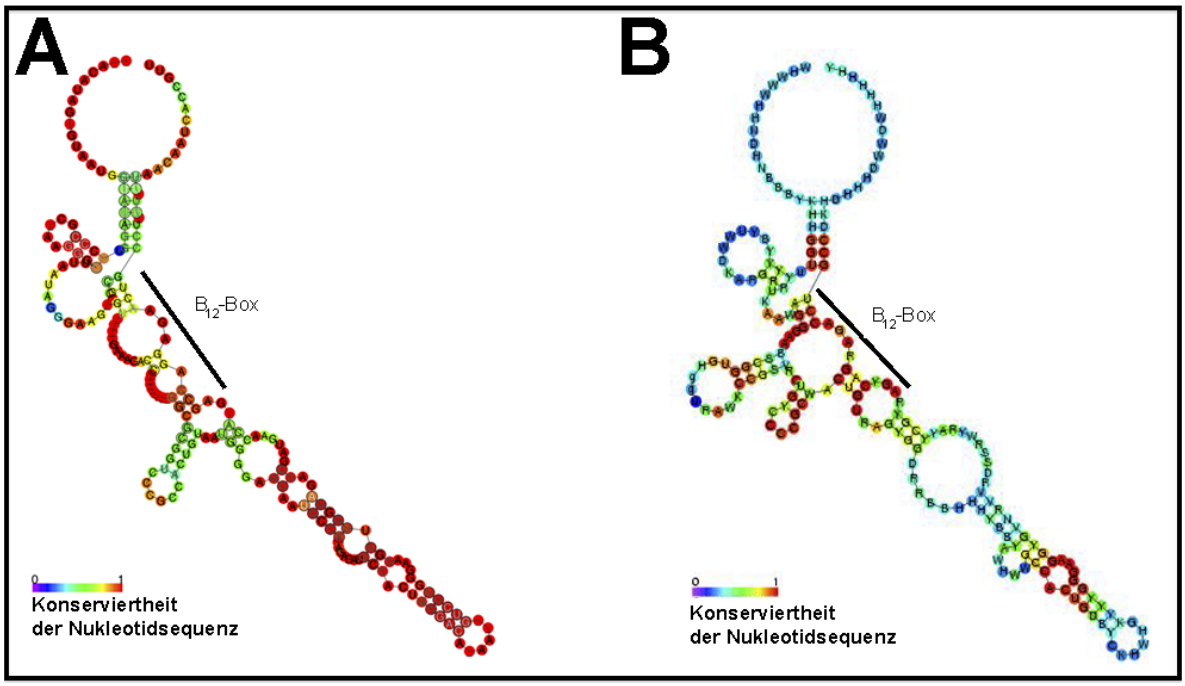


Abbildung 5.2: Vergleich der vorhergesagten mRNA-Struktur der B_{12}-Riboschalter aus *Sporomusa ovata* H1 (A) mit B_{12}-Riboschaltern aus 431 komplett sequenzierten Genomen (B). Die Konsensus-Struktur der B_{12}-Riboschalter basiert auf den Riboschalter-Sequenzen der rfam-Datenbank (RF00174). Die Konsensus-Struktur der zwölf *Sporomusa*-B_{12}-Riboschalter wurde mit RNAalifold (Tabelle 6.1) erstellt.

Die unterschiedlichen unteren Coα-Nukleotidliganden von Vitamin B_{12} und *p*-Kresolylcobamid könnten auch für *Sporomusa ovata* H1 eine unterschiedliche Spezifität der Bindung an die genregulatorischen B_{12}-Riboschalter bedeuten. Die Nukleotidsequenzen der B_{12}-Riboschalter umfassen etwa 200 Basen. Die Bindung des Vitamin B_{12}-Moleküls an die hoch konservierte Sekundärstruktur der B_{12}-Riboschalter ist bisher nur durch die Methode des „in-line probing“ untersucht (Regulski und Breaker, 2008). Dabei wird davon ausgegangen, dass im *in vitro*-Experiment die mRNA bei einem alkalischen pH-Wert (pH 8,3) durch einen nicht enzymatisch katalysierten internen nukleophilen Angriff des 2'-Sauerstoffs auf die benachbarte Phosphodiesterbindung gespalten wird. Dieser Angriff ist nur in einzelsträngigen mRNA-Bereichen möglich. Die mRNA ist also durch die Vitamin B_{12}-Bindung und die dadurch induzierten Strukturänderungen im doppelsträngigen Bereich geschützt. Basierend auf dieser Vitamin B_{12}-abhängigen Strukturänderung kann auf die Dissoziationskonstante (K_d-Wert) des mRNA-Vitamin B_{12}-Komplexes geschlossen werden. Die mRNA-Struktur

der B_{12}-Riboschalter ist derzeit weder durch NMR-Spektroskopie noch durch Kristallisation/Röntgenstrukturanalyse aufzuklären.

Solche Analysen zum B_{12}-Riboschalter des *btuB*-Gens aus *Escherichia coli* mit Vitamin B_{12}-Derivaten zeigten, dass hauptsächlich der Corrinring entscheidend für die Strukturänderung und das Auslösen des Regulationsmechanismus dieses Riboschalters ist (Gallo u. a., 2008). Die Daten wurden durch Experimente bestätigt, in denen chemische Änderungen an den Säureamidgruppen des Corrinrings einen deutlichen Einfluss auf die Sekundärstruktur des B_{12}-Riboschalters des *btuB*-Gens zeigten (Gallo u. a., 2011). Bei unterschiedlichen Coα- und Coβ-Liganden wurden jedoch Veränderungen in der Metabolit-Riboschalter-Bindung gemessen (Gallo u. a., 2008). So wurden Dissoziationskonstanten von 90 nM für Adenosylcobalamin (Koenzym B_{12}), 300 µM für Cyanocobalamin (Vitamin B_{12}) und 800 µM für Coα-Nukleotidligandfreies Adenosylcobinamid bestimmt. Daher ist anzunehmen, dass die identifizierten Corrinoid-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1 wegen der unterschiedlichen Coα-Nukleotidliganden auch unterschiedliche Dissoziationskonstanten für Vitamin B_{12} bzw. *p*-Kresolylcobamid aufweisen.

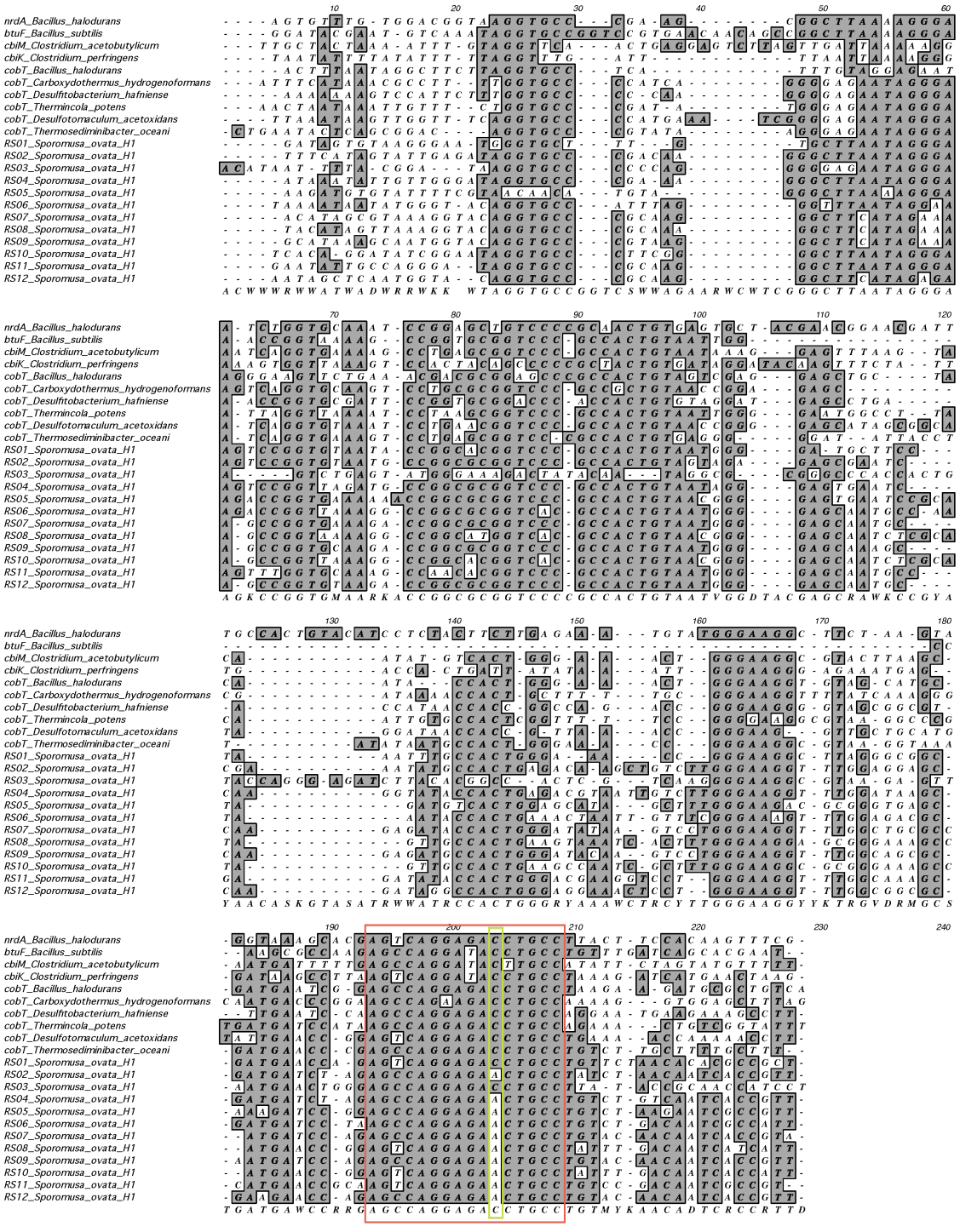


Abbildung 5.3: Nukleotidsequenzvergleich der identifizierten B_{12}-Riboschalter aus *Sporomusa ovata* H1 mit B_{12}-Riboschaltern aus dem Phylum der Firmicutes. Rot markiert sind die konservierten Nukleotidsequenzen des B_{12}-Box-Motivs.

Ein Nukleotidsequenzvergleich (Abbildung 5.3) der identifizierten B_{12}-Riboschalter aus *Sporomusa ovata* H1 mit den Regulationselementen aus vollständig sequenzierten Genomen aus dem Phylum der Firmicutes bestätigt auch in *Sporomusa* diese hoch konservierten Nukleotidsequenzbereiche. Das besonders hoch konservierte B_{12}-Box-Motiv (Vitreschak u. a., 2003) befindet sich am 3'-Ende der B_{12}-Riboschalter (Basenpaare 190-210). Auffällig ist, dass in dieser B_{12}-Box in *Sporomusa* ein Cytosin (C_{203}) gegen Adenin (A_{203}) ausgetauscht ist. Ausnahmen stellen die beiden Riboschalter RS01 und RS03 dar, die jeweils Gene der Corrinoidbiosynthese regulieren. Die Basenpaare 50-53 unterscheiden sich ebenfalls in den B_{12}-Riboschaltern aus *Sporomusa* (CTT) von den bekannten Sequenzen der Firmicutes (GAG). Auch hier stellt der Riboschalter RS03 (B_{12}-Riboschalter des *cobT*-Operons) eine Ausnahme dar, deren biochemische Bedeutung offen bleibt.

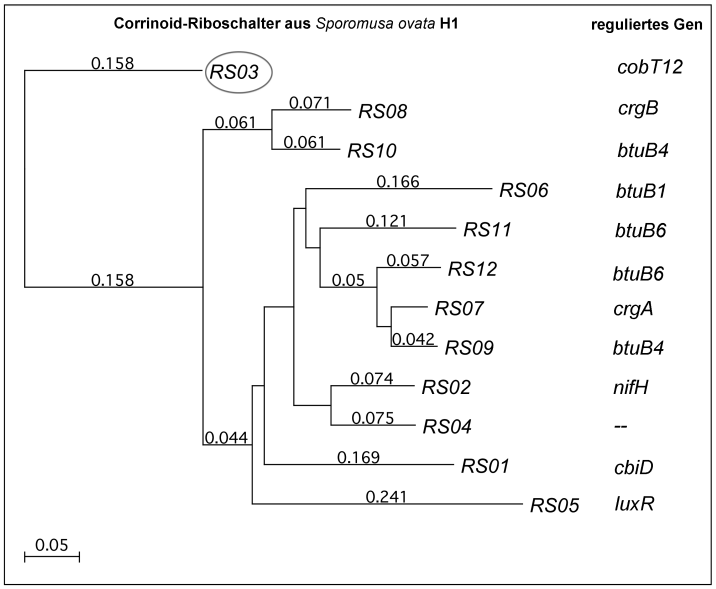


Abbildung 5.4: Phylogenetischer Vergleich der identifizierten B_{12}-Riboschalter aus *Sporomusa ovata* H1.

Der B_{12}-Riboschalter RS03 reguliert die Expression der Gene *cobT1* und *cobT2*, die für Enzyme der unteren Kobalt-Nukleotidliganden-Biosynthese (Coα-Ligand) kodieren. Möglicherweise bewirkt dieser Sequenzunterschied eine geänderte Bindungsaffinität für komplette (*p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid) gegenüber nicht vollständigen Corrinoiden, z.B. das Biosynthese-Intermediat Cobinamid. Für diese These spricht auch, dass die Biosynthese des unteren Coα-Liganden in einem separaten B_{12}-Riboschalter-reguliertem Gencluster organisiert ist. In den Experimenten zur

Wachstumshemmung von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12} wurde gezeigt, dass das in die Zellen aufgenommene Vitamin B_{12} teilweise durch Austausch des unteren Kobalt-Liganden in *p*-Kresolylcobamid umgewandelt wird (siehe Abbildung 4.37). Hierfür ist eine Expression der *cobT*-Gene zur Synthese des unteren Nukleotidliganden zwingend erforderlich.

Die identifizierten B_{12}-Riboschalter RS09 und RS10 (Abstand: 136 Basen) beziehungsweise RS11 und RS12 (Abstand: 248 Basen) in *Sporomusa ovata* H1 folgen jeweils stromabwärts direkt aufeinander (siehe Abbildung 4.9 und 4.10). Es handelt sich bei diesen Riboschaltern wahrscheinlich um sogenannte Tandem-Riboschalter (Sudarsan u. a., 2006). Ein solcher Tandem-Riboschalter, bei dem zwei B_{12}-Riboschalter-Sequenzen direkt hintereinander (Abstand: 84 Basen) folgen, ist bisher nur aus *Desulfitobacterium hafniense* Y51 bekannt. Seine Funktionsweise ist jedoch nicht geprüft. Diese Riboschalter befinden sich in *Desulfitobacterium* im 5'-untranslatierten Bereich der DSY1435-mRNA, welche für einen putativen Nickel-Transporter kodiert. Solchen Tandem-Riboschaltern wird eine Rolle der Feinregulation der Genexpression zugesprochen (Sudarsan u. a., 2006). In *Sporomusa* kodieren die Tandem-Riboschalter-regulierten Gene für den Corrinoid-Transport. Die B_{12}-Riboschalter RS04 und RS05 in *Sporomusa ovata* H1 folgen ebenfalls direkt in einem Abstand von 562 Basen aufeinander; sie befinden sich im 5'-untranslatierten Bereich der *luxR*-kodierenden mRNA (siehe Abbildung 4.8). Da in diesem 562 Basen langem Nukleotidsequenzbereich keine offenen Leserahmen identifizierbar sind, bieten sich hier zwei Möglichkeiten an. Es könnte sich (I.) um einen weiteren Tandem-B_{12}-Riboschalter aus RS04 und RS05 handeln, der die Expression des transkriptionellen Regulators LuxR reguliert. (II.) Wegen des großen Abstands der beiden B_{12}-Riboschalter könnte dieser Nukleotidsequenzbereich am 3'-Ende von RS04 eine nicht-kodierende RNA bilden. Ein solcher Regulationsmodus für B_{12}-Riboschalter ist in der Literatur noch nicht beschrieben.

Anschließend wurden in mehreren Schritten die stromabwärts von Corrinoid-Riboschaltern liegenden Nukleotidsequenzen über die Adapter-PCR Technik in Form eines „genomic walkings" aufgeklärt. Nach Abschluss meiner experimentellen Arbeiten war eine vorläufige Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 am Labor für Genomanalyse der Universität Göttingen verfügbar. Ein Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Nukleotidsequenzen mit dieser Genomsequenz zeigte, dass meine doppelsträngig sequenzierten Gen- und Riboschaltersequenzen zu 100 % mit denen in der

Genomsequenz übereinstimmen.

Wie aus bioinformatorischen Analysen komplett sequenzierter Genome und Analyse verschiedener metagenomischer Sequenzen bekannt war, sollten ausschließlich die Biosynthese des Corrinrings und des unteren Nukleotidliganden von Corrinoiden sowie der Vitamin B_{12}- und Kobalt-Transport durch B_{12}-Riboschalter reguliert werden (siehe Abbildung 2.2). Durch die Adapter-PCR-Technik konnte ich tatsächlich die Gene der Corrinoidbiosynthese identifizieren. Durch „genomic walking“ wurden so im Genom von *Sporomusa ovata* H1 19 Gene identifiziert, die für Enzyme der Corrinoid-Biosynthese kodieren (siehe Tabellen 4.1 bis 4.3). Der Vitamin B_{12}-Biosyntheseweg ist im fakultativ anaeroben *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Typhimurium LT2 sehr gut untersucht (Roth u. a., 1993). Dieser Biosyntheseweg enthält ausgehend von der Vorstufe Uroporphyrinogen III einen aeroben und einen anaeroben Weg zur *de novo*-Synthese von Vitamin B_{12} in diesem Gamma-Proteobakterium (siehe Abbildung 5.5). Die identifizierten Homologe der Corrinring-Biosynthese im strikt anaeroben *Sporomusa ovata* H1 entsprechen erwartungsgemäß dem anaeroben Biosyntheseweg aus *Salmonella*. Die in *Sporomusa* gefundenen Gene sind im B_{12}-Biosyntheseweg aus *Salmonella* in Abbildung 5.5 hervorgehoben. Die drei in *Sporomusa ovata* H1 nicht identifizierten Gene des Stoffwechselweges kodieren für eine Precorrin-2 C20-Methyltransferase (CbiL, EC 2.1.1.130), eine Cob(II)yrsäure a,c-Diamid Reduktase (EC 1.16.8.1) und eine ATP-Corrinoid Adenosyltransferase (CobA, EC 2.5.1.17). Diese drei Gene sind nicht in den zwei identifizierten Riboschalter-regulierten Genclustern der *Sporomusa*-Corrinoidbiosynthese vorhanden. Eine Analyse der vorläufigen Genomsequenzen von *Sporomusa ovata* H1 (Labor für Genomanalyse, Universität Göttingen) zeigte, dass die in dieser Arbeit nicht identifizierten Gene der Corrinoidbiosynthese verstreut im Genom dieses Bakteriums vorkommen. Die Nukleotidsequenzbereiche stromaufwärts dieser vorhergesagten Gene enthalten keine konservierten Bereiche von Corrinoid-Riboschaltern. Daher waren sie auch nicht durch meinen methodischen Ansatz zu identifizieren. Auch in anderen bakteriellen Genomen sind nicht alle Gene der Corrinoid-Biosynthese in Operonstrukturen organisiert (Raux u. a., 2000). Dieser Befund ist daher nicht ungewöhnlich.

Der Vergleich der konservierten Nukleotidsequenzbereiche der in dieser Arbeit identifizierten Corrinoid-Riboschalter mit der vorläufigen Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 (Labor für Genomanalyse, Universität Göttingen) ergab, dass 17 weitere Nukleotidsequenzabschnitte hohe Identitäten mit B_{12}-Riboschaltern zeigten. Diese Gensequenzen liegen stromaufwärts weiterer potentieller B_{12}-Riboschalter-regulierter Gene, von denen zehn für weitere potentielle Vitamin B_{12}-Transporter, sechs für vorhergesagte Kobaltchelatasen kodieren; ein weiteres Gen kodiert für einen Nickel-Transporter. Damit kommen insgesamt 29 Corrinoid-Riboschalter im Genom von *Sporomusa ovata* H1 vor. Eine solch hohe Zahl an B_{12}-Riboschaltern in einem einzelnen Genom kommt bisher in keinem anderen Bakterium vor. Dies gilt insbesondere für die physiologische Funktion der ungewöhnlichen vielen Corrinoid-Transporter in *Sporomusa*.

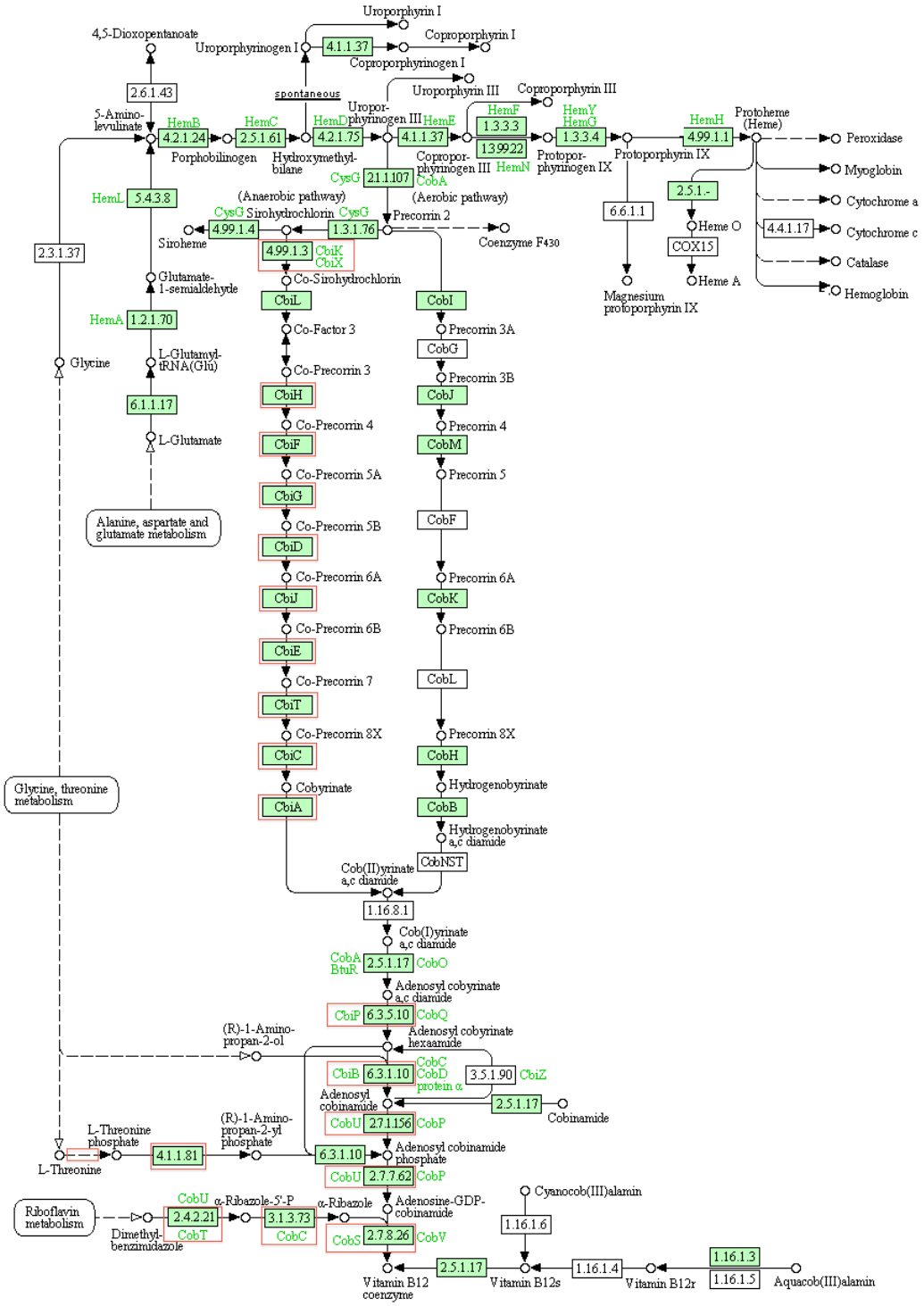


Abbildung 5.5: Vitamin B_{12}-Biosyntheseweg aus *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Typhimurium LT2 aus der KEGG-Datenbank (siehe Tabelle 6.1). Rot markiert sind die Enzyme, deren Homologe in dieser Arbeit auch in *Sporomusa ovata* H1 identifiziert wurden.

Am 3'-Ende des B_{12}-Riboschalters RS02 aus *Sporomusa ovata* H1 wurden durch Adapter-PCR offene Leserahmen gefunden, die für Komponenten eines Nitrogenase-Komplexes kodieren (siehe Abbildung 4.6 und Tabelle 4.2). Der Nitrogenase-Komplex katalysiert die MgATP-abhängige Reduktion von molekularem Stickstoff (N_2) zu zwei Ammonium-Molekülen (Peters u. a., 1995):

$N_2 + 8\ e^- + 8\ H^+ + 16\ MgATP \longrightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ MgADP + 16\ P_i$

Diese Reduktion von molekularem Stickstoff ist ein äusserst energieaufwändiger Prozess. Bisher sind vier Nitrogenase-Typen bekannt, die sich jeweils durch unterschiedliche Metall-Kofaktoren unterscheiden. Der am besten untersuchte Nitrogenase-Typ ist die Molybdän-haltige Nitrogenase (Seefeldt u. a., 2009). Dieser Nitrogenase-Enzymkomplex besteht aus zwei Protein-Komponenten. Die Komponente I wird als Eisen-Molybdän-Protein, Komponente II als Eisen-Protein bezeichnet. Die identifizierten offenen Leserahmen (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.6) in *Sporomusa ovata* H1 kodieren für beide Komponenten I und II und für die Biosynthese des Eisen-Molybdän-Kofaktors (FeMoCo). Die Regulation der Nitrogenase-Genexpression durch einen B_{12}-Riboschalter ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Eine Rolle von Corrinoiden bei der Stickstofffixierung ebenfalls unbekannt. Die Reduktion von molekularem Stickstoff durch den Nitrogenase-Komplex verbraucht acht Elektronen. Diese Redoxreaktion hat damit auch Einfluss auf das Redoxpotential der Zelle. Ein verändertes Redoxpotential in den *Sporomusa*-Zellen könnte damit auch Einfluss auf den radikalischen Reaktionsmechanismus der L-Tyrosin-Spaltung zu Phenol oder *p*-Kresol haben. Allerdings wurde *Sporomusa ovata* H1 immer mit Ammonium als N-Quelle gezüchtet, das Nitrogenasen hemmt (Klassen u. a., 2005). Möglicherweise wird diese Redoxreaktion in *Sporomusa* daher keine Rolle spielen.

Überraschenderweise konnte ich im *Sporomusa ovata* H1-Genom jedoch auch B_{12}-Riboschalter-regulierte Gene identifiziert, welche für Proteine mit ungewöhnlicher bzw. unbekannter Funktion kodieren. So wurde überraschend stromabwärts eines B_{12}-Riboschalters ein Gen gefunden, welches für einen transkriptionellen, LuxR-ähnlichen Regulator kodiert. Eine derartige Regulation der Genexpression eines Transkriptionsfaktors durch einen Riboschalter ist in der Literatur bisher nicht veröffentlicht. Bisher hatten bioinformatorische Untersuchungen von komplett sequenzierten Genomen und metagenomische Analysen gezeigt, dass B_{12}-Riboschalter ausschließlich den Vitamin B_{12}- und Kobalt-Transport, die Corrinoidbiosynthese sowie die Gene Corrinoid-**un**abhängiger Proteine regulieren, wenn gleichzeitig ein entsprechendes

kodierendes Gen für ein corrinoidabhängiges Isozym im Genom vorhanden ist. Meine Transkript-Analyse des *luxR*-Gens zeigte, dass das *luxR*-Transkript in allen untersuchten Wachstumssubstraten ähnlich stark gebildet wird (Abbildung 4.11). Dies spricht für eine zentrale Rolle dieses LuxR-Regulators am Corrinoid-Stoffwechsel in *Sporomusa ovata* H1. Die Experimente meiner Arbeit zeigten auch, dass das LuxR-Regulatorprotein an eine palindromische Nukleotidsequenz stromaufwärts eines Kobaltchelatase-Gens (*cbiK*) bindet. Eine solche palindromische Nukleotidsequenz ist typisch für eine DNA-Bindung eines Helix-Turn-Helix Regulatorproteins (Pabo und Sauer, 1984; Steitz u. a., 1982). LuxR reguliert damit den ersten Schritt der anaeroben Corrinring-Biosynthese. In diesem Schritt wird der Einbau von Kobalt in den Uroporphyrinring katalysiert. Der B_{12}-Riboschalter sollte also die Expression der Kobaltchelatase abschalten, wenn ausreichend Corrinoid gebildet wurde. Möglicherweise wird durch die Regulation über das Regulatorprotein eine 1:1-Stöchiometrie des Corrinrings zum unteren Kobalt-Liganden synchronisiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen zur Expressionsstärke des *luxR*-Gens lieferten jedoch keinen Hinweis auf ein Abschalten der Genexpression in Anwesenheit von Cobinamid im Minimalnährmedium. Dieses Ergebnis spricht für einen möglichen translationalen Regulationsmechanismus des *luxR*-Riboschalters. Es ist auch denkbar, dass zusätzlich durch LuxR weitere corrinoidabhängige Reaktionswege oder die Vorstufenbiosynthese des unteren Coα-Nukleotidliganden reguliert werden. Dieser Punkt wird weiter unten in diesem Kapitel diskutiert. Das Schema zur Regulation des Corrinoid-Stoffwechsels in *Sporomusa ovata* H1 durch B_{12}-Riboschalter unter Berücksichtigung des transkriptionellen Regulators LuxR ist in Abbildung 5.6 zusammengefasst.

Die Identifizierung der gesuchten Gensequenzen, die für die postulierte Nikotinatmononukleotid:*p*-Kresolyl Phosphoribosyltransferase (Homologie zu EC 2.4.2.21) zeigte, dass im Genom von *Sporomusa ovata* H1 zwei offene Leserahmen für ein solches Enzym vorkommen (siehe Abbildung 4.7). Auf Proteinebene zeigen diese beiden Enzyme eine hohe Homologie zu einer Nikotinatmononukleotid:5,6-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (CobT, E.C. 2.4.2.21). Da *Sporomusa ovata* H1 unter physiologischen Wachstumsbedingungen kein Vitamin B_{12} synthetisiert, sollte durch diese CobT-Homologe die hochinteressante O-Glykosidsynthese des unteren Nukleotidliganden der *Sporomusa*-Corrinoide katalysiert werden. *Sporomusa ovata* H1 ist auch in der Lage, Vitamin B_{12} zu synthetisieren. Deshalb könnte durch CobT der Einbau der Vitamin B_{12}-Vorstufe 5,6-Dimethylbenzimidazol in die *Sporomusa*-Corrinoide

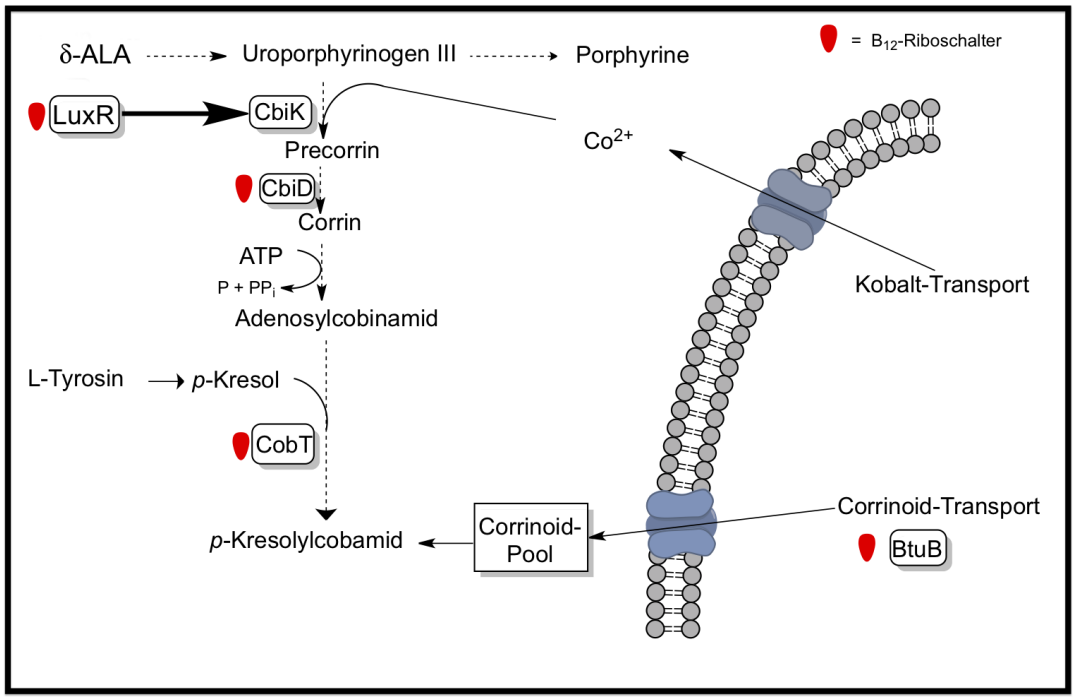


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der nachgewiesenen Regulation der Corrinoid-Biosynthese in *Sporomusa ovata* H1.

katalysiert werden. Wegen seiner bedeutenden Stellung im Corrinoid-Stoffwechsel von *Sporomusa ovata* H1, habe ich den Transkriptionsstart dieses Operons durch eine 5'-RACE identifiziert (Abbildung 4.17) und seine Expression mit Hilfe von Northern Blot (Abbildung 4.19) und RT-PCR Analysen (Abbildung 4.16) analysiert. Dabei zeigte sich, dass die beiden offenen Leserahmen gemeinsam abgelesen werden.

Das identifizierte Operon enthält somit **zwei** offene Leserahmen mit unterschiedlicher Identität zu einer Nikotinatmononukleotid:5,6-Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase (CobT). Die bisher gut untersuchten CobT-Proteine aus *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* sind hingegen in **einem** offenen Leserahmen kodiert (Trzebiatowski u. a., 1994). In den *Salmonella*- und *Escherichia coli*-Zellen liegt das CobT-Protein als Homodimer, in *Sporomusa* vermutlich als Heterodimer vor. Die Proteinsequenzen verschiedener CobT-Proteine aus dem Phylum der Firmicutes und aus den Gammaproteobakterien *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* sind in der Abbildung 5.7 vergleichend dargestellt.

Dieser Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenzen der CobT-Proteine aus *Sporomusa* mit CobT-Proteinen anderer Bakterien zeigt, dass in allen Proteinen kon-

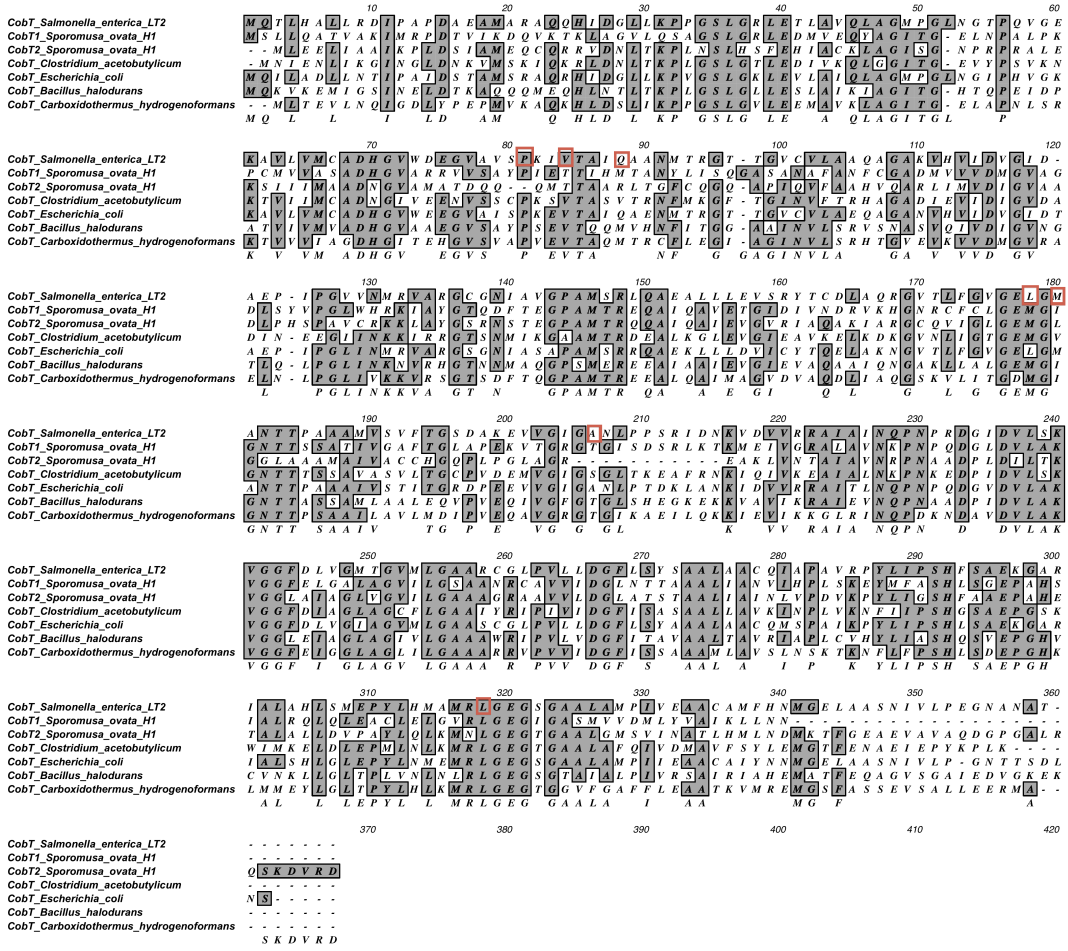


Abbildung 5.7: Aminosäuresequenzvergleich verschiedener CobT-Proteinsequenzen. Rot markiert sind die Aminosäuren, die bei CobT aus *Salmonella enterica* die hydrophobe Bindetasche für 5,6-Dimethylbenzimidazol bilden (Cheong u. a., 2001).

servierte Bereiche vorhanden sind. Für *Salmonella* und *Escherichia* ist gezeigt, dass Vitamin B_{12} als Koenzym synthetisiert wird (Roth u. a., 1996). Die Übereinstimmung vieler konservierter Aminosäuremotive dieser Proteine spricht für die Tatsache, dass CobT aus *Sporomusa ovata* auch in der Lage ist, die N-Heterozyklen 5,6-Dimethylbenzimidazol, Benzimidazol und Imidazol N-glykosidisch mit Ribose zu verknüpfen. Für die Aromaten Phenol und *p*-Kresol ist eine nicht-kovalent Bindung durch π-π-Wechselwirkung mit der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin denkbar (Boehr u. a., 2002). Mögliche Kandidaten hierfür sind die Tyrosin-Reste an Position 83 und 84 der CobT-Proteine in *Sporomusa ovata* H1. Hier ist die Aminosäure Valin der CobT-Proteine aus anderen Bakterien gegen Tyrosin in *Sporomusa* ausgetauscht. Diese

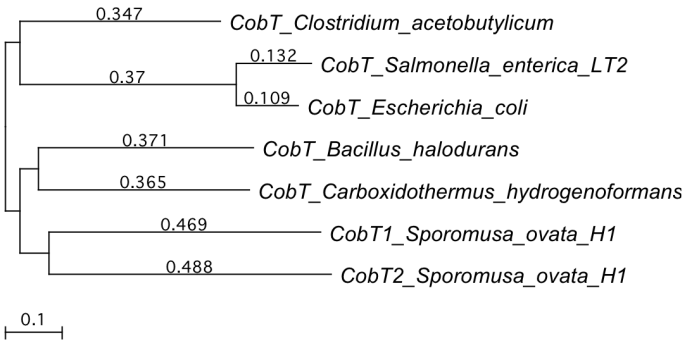


Abbildung 5.8: Phylogenetischer Vergleich der Proteinsequenzen von CobT1 und CobT2 aus *Sporomusa ovata H1* mit Proteinsequenzen anderer Bakterien.

These sollte durch gezielten Aminosäureaustausch zu klären sein. Die dafür erforderliche heterologe Herstellung beider CobT-Proteine aus *Sporomusa* in *Escherichia coli* konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt und durch MALDI-TOF-Analysen bestätigt werden. Da diese heterologen CobT-Proteine auch funktionell aktiv waren, sollte der Einfluss solcher Aminosäureaustausche auf ihre Enzymaktivitäten leicht zu messen sein.

Im durchgeführten *in vitro*-Enzymtest wurde nur bei Zugabe beider CobT-Proteine in den Reaktionsansatz ein Reaktionsprodukt erhalten. Dieses Ergebnis spricht für die Bildung eines funktionellen Heterodimers aus CobT1 und CobT2 in *Sporomusa*. Der Test zeigte ausserdem, dass die CobT-Enzymaktivität aus *Sporomusa ovata* H1 im *in vitro*-Ansatz signifikant andere Versuchbedingungen als das *Salmonella*-Enzym benötigt (Abbildung 4.28). Dies trifft sowohl für die Umsetzung von 5,6-Dimethylbenzimidazol als auch für die Umsetzung von *p*-Kresol zu. Das CobT-Protein aus *Sporomusa ovata* H1 sollte also sowohl N- als auch O-Glykoside bilden können. Leider konnten diese phosphorylierten Reaktionsprodukte im Gegensatz zu Corrinoid-Derivaten nicht mit der MALDI-TOF-Massenspektroskopie analysiert werden.

Mit Hilfe dieser CobT-Enzymaktivität sollte es nun möglich sein, verschiedene Vitamin B_{12}-Derivate *in vitro* herzustellen. Mit solchen neuartigen Corrinoidverbindungen könnten anschließend *in vitro*-Bindungsstudien mit rekombinantem Protein des menschlichen Vitamin B_{12}-Aufnahmesystems („intrinsic factor“) durchgeführt werden. Dadurch könnten in Zukunft synthetische Corrinoide hergestellt werden, die das eukaryotische Vitamin B_{12}-Aufnahmesystem hemmen. Der Einsatz solcher Vitamin B_{12}-Derivate sollte im Tierexperiment einen künstlichen Vitamin B_{12}-Mangel erzeugen.

Dadurch könnten die physiologisch-biochemischen Folgen eines Vitamin B_{12}-Mangels deutlich besser untersucht werden als bisher.

Die **Aromaten *p*-Kresol und Phenol** der *Sporomusa*-Corrinoide werden aus der Aminosäure L-Tyrosin durch einen radikalischen Mechanismus gebildet (Feustel, 2000). Bisher konnte ich die Gene, welche für den Tyrosin-Abbau kodieren, in *Sporomusa ovata* H1 nicht stromabwärts von B_{12}-Riboschaltern nachweisen. Für diesen Befund könnte es zwei Erklärungen geben:

1. Eines der nicht identifizierbaren B_{12}-Riboschalter-regulierten Genprodukte *crgA* und *crgB* katalysiert den radikalischen Tyrosin-Abbau.
2. Das transkriptionelle LuxR-ähnliche Regulatorprotein bindet an mehr als die eine identifizierte Bindestelle im *Sporomusa*-Genom.

Wegen der Zytotoxizität von *p*-Kresol und Phenol (Hugo und Bloomfield, 1971) erscheint eine strikte Regulation des Tyrosin-Abbaus unerlässlich, um eine Konzentrierung dieser bioziden Aromaten in der Zelle zu verhindern. Meine Experimente zeigten, dass ein freier Pool an *p*-Kresol in *Sporomusa ovata* H1 zur Biosynthese der Corrinoide vorhanden sein muss, da durch die Zugabe von *p*-Kresol in das Minimalnährmedium die Wachstumshemmung durch Vitamin B_{12} aufgehoben wurde (siehe Abbildung 4.35). Physiologische Experimente unterstützen diesen Befund, da [^{14}C]-Phenol ausschließlich in *Sporomusa*-Corrinoide eingebaut wird (Katsoulidis, 1998). Dies bedeutet, dass entweder eines der bisher nicht funktionell zuzuordnenden, B_{12}-Riboschalter-regulierten Gene für diese L-Tyrosin-abbauende Enzymaktivität kodiert, oder dass diese Aromatensynthese auf andere Weise reguliert wird. Möglicherweise spielt dabei ebenfalls das Regulatorprotein LuxR eine Rolle. Für *Corynebacterium glutamicum* ist bekannt, dass ein transkriptioneller Regulator der LuxR-Familie an der Regulation von Abbauwegen aromatischer Verbindungen beteiligt ist (Brinkrolf u. a., 2006). Analog könnte in *Sporomusa ovata* H1 der Abbau von L-Tyrosin zu den aromatischen Verbindungen *p*-Kresol und Phenol durch den in dieser Arbeit identifizierten transkriptionellen Regulator LuxR reguliert werden.

Bisher sind drei enzymatische Reaktionen bekannt, in denen *p*-Kresol als Produkt gebildet wird. Die *p*-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase (EC 4.1.1.83) aus *Clostridium difficile* (Selmer und Andrei, 2001) decarboxyliert mit 4-Hydroxyphenylacetat in einem radikalischen Mechanismus ein Zwischenprodukt des Tyrosin-Abbaus zu *p*-Kresol.

Ein homologes Gen konnte in *Sporomusa ovata* H1 molekularbiologisch bisher nicht nachgewiesen werden. Ein weiteres Beispiel ist das Enzym der [FeFe]-Hydrogenase HydG (Pilet u. a., 2009), welches drei CO- und zwei CN-Liganden am Eisenzentrum enthält. Seine Aminosäuresequenz zeigt eine hohe Homologie zu ThiH, einem Enzym, welches ein S-Adenosylmethionin-Radikal bildet, wodurch die Spaltung von Tyrosin zu *p*-Kresol und Dehydroglycin katalysiert wird. Ein weiteres bekanntes Enzym des L-Tyrosin-Abbaus ist die Tyrosin:Phenol-Lyase (Challand u. a., 2010). Dieses Enzym (EC 4.1.99.2) ist aus mehreren Bakterien, wie zum Beispiel *Citrobacter freundii* bekannt. Diese Tyrosin:Phenol-Lyase enthält ein Glycyl-Radial, welches die radikalische Spaltung von L-Tyrosin zu Phenol und Pyruvat und NH_3 induziert. Ein Gen, welches für eine Tyrosin:Phenol-Lyase kodiert, wurde in *Sporomusa sphaeroides*, nicht aber in *Sporomusa ovata* H1 annotiert. Die Analyse der Nukleotidsequenz stromaufwärts des Tyrosin:Phenol-Lyase-Gens in *Sporomusa sphaeroides* zeigte, dass das Gen in diesem Bakterium nicht durch einen B_{12}-Riboschalter reguliert wird und ebenfalls keine potentielle LuxR-Bindestelle enthält. Die Analyse der vorläufigen Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 (Labor für Genomanalyse, Universität Göttingen) ergab ebenfalls keinen Hinweis auf die oben besprochenen Gensequenzen zum L-Tyrosin-Abbau.

Die **Rolle von *luxR* und der Gene *crgA* und *crgB*** im Corrinoid-Metabolismus wurde daher durch qRT-PCR-Analysen ihrer Expressionsstärken bei Wachstum mit unterschiedlichen Corrinoid-Vorstufen genauer untersucht. Es waren keine signifikanten Änderungen in deren Genexpression zu messen. Die Expression der kodierenden mRNA für *crgA*, *crgB* und *luxR* wird also neben der Regulation durch die B_{12}-Riboschalter nicht zusätzlich substratabhängig transkriptionell reguliert. Diese Befunde sprechen für eine essentielle Rolle dieser kodierten Proteine im Corrinoidstoffwechsel von *Sporomusa ovata* H1. Die leichte Verstärkung der Genexpression von *crgA* (2,6-fach), *crgB* (2,3-fach) und *luxR* (2,7-fach) bei der Zugabe von L-Tyrosin (siehe Abbildung 4.34) ins Mineralnährmedium könnte eine mögliche Rolle dieser Gene beim Abbau von L-Tyrosin bedeuten. Bei Zugabe von 5,6-Dimethylbenzimidazol ins Methanol-haltige Wachstumsmedium wird die Expression von *crgB* um das 4,4-fache verstärkt. Möglicherweise induziert Vitamin B_{12} an diesem Corrinoid-Riboschalter (RS-08) eine andere Sekundärstruktur und dadurch eine schwächere Reprimierung der *crgB*-Expression als die physiologischen *Sporomusa*-Corrinoide *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid.

Außerdem wurde die **Wachstumshemmung** von *Sporomusa ovata* H1 durch Vitamin B_{12} untersucht. Durch Zusatz von 5,6-Dimethylbenzimidazol in das Minimalnährmedium bildet das Bakterium Vitamin B_{12}, welches überraschend das Wachstum des Bakteriums hemmt (Ibrahim, 1998). Ich habe zunächst die Wachstumshemmung abhängig von der vorgelegten Kohlenstoffquelle (Pyruvat, Methanol) untersucht. Außerdem habe ich die Hemmung bei Einsatz weiterer N-Heterozyklen als potentielle Corrinoidvorstufen untersucht (Abbildungen 4.35 und 4.36). Beim Wachstums auf Pyruvat wurde kein Hemmeffekt durch Vitamin B_{12} auf *Sporomusa* beobachtet. Beim Wachstum auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde eine umso stärkere Wachstumshemmung beobachtet, je größer die Base des unteren Nukleotidliganden war. Diese Ergebnisse sprechen für einen sterischen Hemmeffekt an einem Enzym oder genregulatorischem Element.

Da die Vitamin B_{12}-bedingte Hemmung in *Sporomusa*-Zellen durch Zugabe von *p*-Kresol vollständig aufgehoben wurde (siehe Abbildung 4.35), ist vermutlich die Biosynthese des unteren Corrinoid-Liganden für diese Hemmung entscheidend. Der Einbau von *p*-Kresol in den unteren Nukleotidliganden erfolgt also bevorzugt gegenüber 5,6-Dimethylbenzimidazol.

Bei der Vorlage von [^{57}Kobalt]-Vitamin B_{12} als einzige Kobalt-Quelle wird das Vitamin in die *Sporomusa*-Zellen aufgenommen. Dafür besitzt *Sporomusa* mehrere Corrinoid-Transporter, wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Das aufgenommene Vitamin B_{12} wird anschließend teilweise zu *p*-Kresolylcobamid konvertiert (siehe Tabelle 4.12). Dieses Ergebnis zeigt, dass der untere Coα-Ligand vom Corrinring abgespalten wird. Diese Abspaltungsreaktion könnte in einer Rückreaktion der Adenosylcobinamid-GDP-Ribazoltransferase (EC 2.7.8.26, CobS) katalysiert werden. Damit ergibt sich ein Gleichgewicht zwischen α-Ribosyl-5,6-Dimethylbenzimidazol und α-Ribosyl-*p*-Kresol, das die Zusammensetzung des Corrinoidpools in der Zelle aus Vitamin B_{12} und *p*-Kresolylcobamid bestimmt. Für die Adenosylcobinamid-GDP-Ribazoltransferase wurden K_m-Werte ihrer Substrate im niedrigen µM-Bereich gemessen (Cameron u. a., 1991).

Die Analyse der Corrinoid-Verteilung in der Proteinfraktion gehemmter *Sporomusa*-Zellen (Tabelle 4.11) ergab für das Wachstum auf Pyruvat gegenüber Methanol einen signifikant niedrigeren Anteil von [^{57}Kobalt]-Vitamin B_{12} in der hochmolekularen Proteinfraktion (größer 70 kDa). Dieses Ergebnis spricht für die Hemmung an einem Enzymkomplex dieser hochmolekularen Proteinfraktion. Eine Fehlregulation der B_{12}-

Riboschalter durch Vitamin B_{12} als Ursache der Wachstumshemmung ist unwahrscheinlich. Bei der Reversion der Vitamin B_{12}-bedingten Wachstumshemmung durch Pyruvat wurde nämlich ein signifikant höherer freier Vitamin B_{12}-Pool gemessen, der offensichtlich zu keiner Wachstumshemmung führt.

Ebenso habe ich die hochmolekulare Proteinfraktion (größer 100 kDa) durch „Blue Native"-Gelelektrophorese beim Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Dabei wurden Unterschiede in der Zusammensetzung dieser hochmolekularen Proteinfraktion (100 - 300 kDa) zwischen Methanol- und Pyruvat als Wachstumssubstrat ersichtlich. Während bei Wachstum auf Methanol mindestens fünf Corrinoid-haltige Proteine nachgewiesen werden konnten, waren bei Wachstum auf Pyruvat nur drei nachweisbar. Bei Wachstumshemmung auf Methanol und 5,6-Dimethylbenzimidazol wurden vier Corrinoid-haltige Proteine nachgewiesen. Folglich ist die Analysentechnik der „Blue Native"-Gelelektrophorese zur Trennung und Isolierung Corrinoid-bindender Proteine gut geeignet.

Bekannte **Vitamin B_{12}-abhängige hochmolekulare Enzymkomplexe** aus anderen Bakterien sind die Vitamin B_{12}-abhängige Methioninsynthase (EC 2.1.1.13), die in *Escherichia coli* eine molekulare Masse von etwa 200 kDa hat. Ausserdem die Ribonukleotidreduktase (EC 1.17.4.2), die ebenfalls in *Escherichia coli* eine molekulare Masse von 240 kDa aufweist. Zusätzlich ist die Acetyl-CoA-Synthase (EC 1.2.99.2) aus *Moorella thermoacetica* als Corrinoid-haltiges Enzym gut untersucht. Dieser Enzymkomplex hat in *Moorella* eine molekulare Masse von etwa 300 kDa. Diese drei Enzymkomaktivitäten kommen auch in dem homoacetogenen Bakterium *Sporomusa ovata* H1 vor. Die Analyse der vorläufigen Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 (Labor für Genomanalyse der Universität Göttingen) zeigte, dass die berechneten molekularen Massen der abgeleiteten Proteine in ihrer monomeren Form 83 kDa für die Methioninsynthase und 72 kDa für die Ribonukleotidreduktase betragen. Da die Methioninsynthase und die Ribonukleotidreduktase unabhängig von den Wachstumssubstraten Methanol und Pyruvat gebildet werden sollten, ist eine bevorzugte Hemmung dieser beiden Enzymkomplexe durch die Vitamin B_{12}-Bildung in *Sporomusa* unwahrscheinlich. Meine Experimente belegen die Hemmung der Acetyl-CoA-Synthase, deren Corrinoid-haltige Untereinheit identifiziert und heterolog exprimiert wurde. Die heterologe Herstellung der beiden Untereinheiten AcsC und AcsD des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins in löslicher Form konnte nur durch Koexpression erreicht werden. Dieser Befund spricht für eine native Form als Proteinkomplex in

Sporomusa ovata H1, möglicherweise als Heterodimer aus AcsC und AcsD. Die am besten untersuchte Acetyl-CoA-Synthase ist der Enzymkomplex aus *Moorella thermoacetica* (Morton u. a., 1991), mit einer molekularen Masse von 300 kDa. Unter der Annahme einer 1:1-Stöchiometrie aller Untereinheiten der Acetyl-CoA-Synthase aus *Sporomusa ovata* H1 ergibt sich eine gesamte molekulare Masse von 227 kDa für dessen Enzymkomplex.

Die Proteinsequenz dieser Acetyl-CoA-Synthase aus *Sporomusa ovata* H1 zeigt, dass ein Vitamin B_{12}-Bindemotiv in den beiden Corrinoid-bindenden Untereinheiten fehlt. Analysen des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins aus *Carboxydothermus hydrogenoformans* ergaben, dass auch in diesem Bakterium Vitamin B_{12} nicht Histidin koordiniert, also in „his-off"-Form gebunden wird (Svetlitchnaia u. a., 2006). Die Bindung des Corrinoids an das Apoprotein könnte durch hydrophobe Wechselwirkung einer Bindetasche des Proteins mit dem unteren Corrinoidliganden erfolgen. *p*-Kresolylcobamid kommt nur als „base-off"-Form, also in nicht Kobalt-koordinierter Form vor, während Vitamin B_{12} auch in der „base-on"-Form vorkommen kann. In dieser Form ist die N-heterozyklische Base 5,6-Dimethylbenzimidazol über Stickstoff mit dem Kobalt-Zentralatom koordiniert. Dadurch könnte ein sterischer Hemmeffekt der Acetyl-CoA-Synthase durch ineffiziente Bindung des Kofaktors gegeben sein, wie er bei der Untersuchung der Wachstumshemmung auftrat. Unterstützt wird diese These durch den Hemmeffekt, der von der Größe des unteren Kobaltliganden abhängig war (siehe Abbildung 5.9).

In einem weiteren Ansatz habe ich deshalb Corrinoid-haltige Proteine über ein **Vitamin B_{12}-Bindemotiv** identifiziert. Ausgehend von einem konservierten B_{12}-Bindemotiv habe ich PCR-Oligodesoxynukleotide entworfen, die zur erfolgreichen Identifizierung von zwei Genen führten, deren Genprodukte dieses Vitamin B_{12}-Bindemotiv enthalten. Dadurch konnte ich zum ersten Mal nachweisen, dass auch in *Sporomusa ovata* dieses konservierte Corrinoid-Bindemotiv vorkommt, trotz der Biosynthese der Vitamin B_{12}-Derivate *p*-Kresolylcobamid und Phenolylcobamid. Eine Bindung von *p*-Kresolylcobamid an Proteine über die Aminosäure Histidin konnte bereits früher durch EPR-spektroskopische Analysen an ganzen, Methanol-gezüchteten Zellen nachgewiesen werden (Stupperich u. a., 1990). Es ist also wahrscheinlich, dass die koordinative Bindung an das Kobalt-Zentralatom des Corrinrings über den Imidazolrest des Histidins aus diesem hier nachgewiesenen Aminosäuremotiv erfolgt (siehe Abbildung 5.9, A).

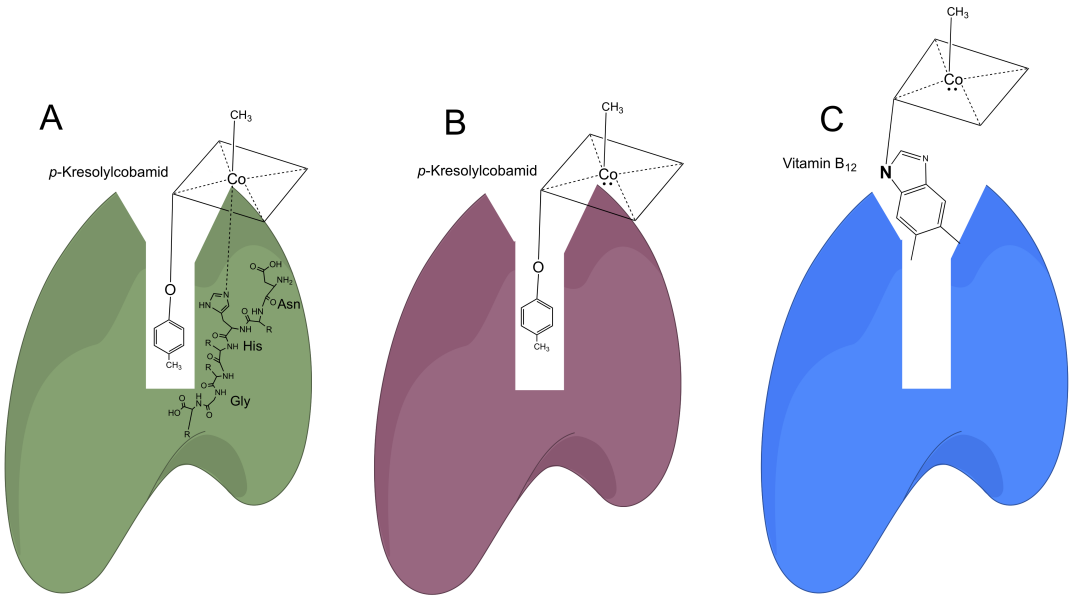


Abbildung 5.9: Bindung der Corrinoid-Kofaktoren an Corrinoid-haltige Proteine aus *Sporomusa ovata* H1. **A**: Koordinative Bindung von *p*-Kresolylcobamid an Histidin als Kobalt-α-Ligand bei Proteinen mit Corrinoid-Bindemotiv; **B**: Konstitutive „base off"-Form des *p*-Kresolylcobamids ohne koordinative Bindung in Abwesenheit eines Corrinoid-Bindemotivs; Fixierung des Kofaktors über hydrophobe Interaktion zwischen Protein und aromatischer Seitengruppe des Corrinoids; **C**: Sterische Hinderung der funktionellen Bildung eines Holoenzyms durch modifizierte Benzimidazolderivate.

Die durch „genomic walking" identifizierten Nukleotidsequenzen stromauf- und abärts der Gene *mttC* und *mtmC* und die Untersuchung der offenen Leserahmen (Tabelle 4.14 und 4.15) zeigten eine hohe Identität der vorhergesagten Genprodukte mit einer Monomethylamin- und einer Trimethylamin-Methyltransferase. Ein Wachstum von *Sporomusa ovata* H1 mit Trimethylamin als Kohlenstoff- und Energiequelle konnte nicht gezeigt werden (Möller u. a., 1985). Möglicherweise wird durch die Trimethylamin-Methyltransferase die strukturell ähnliche tertiäre Ammoniumverbinung Betain (N,N,N-Trimethylglycin) oder eine andere quartäre Ammoniumverbindung demethyliert. Eine N-terminale Aminosäuresequenz einer Betain-Methyltransferase aus *Sporomusa ovata* H1 ist bereits durch Edmann-Abbau bekannt (Lehle, 1994). Diese Aminosäuresequenz stimmt mit dem vorhergesagten N-Terminus der Trimethylamin-Methyltransferase (MttB) zu 100 % überein. Die Demethylierung von Betain führt zum Produkt Dimethylglycin. Bei erneuter Demethylierung wird Sarcosin gebildet. Das Substrat der nachgewiesenen Monomethylamin-Methyltransferase (MtmB) ist bisher unbekannt. Möglicherweise wird jedoch einer dieser Betain-Demethylierungsschritte durch das

Enzym MtmB katalysiert.

Andere Vitamin B_{12}-abhängige Methyltransferasen setzen sich aus drei Komponenten zusammen (Ragsdale, 2008). Die Komponente B katalysiert die Übertragung der Methylgruppe aus dem Stubstrat auf die Corrinoid-haltige Komponente C. Die Komponente A katalysiert weiter die Übertragung der Methylgruppe aus diesem proteingebundenen Methylcobalamin auf Tetrahydrofolat. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen offenen Leserahmen dieser Methyltransferasen kodieren ebenfalls für alle drei dieser Komponenten. Daher wird Tetrahydrofolat vermutlich der Methylgruppenakzeptor der katalysierten Demethylierungsreaktionen sein.

Die Aminosäuresequenz des Methanol-induzierten Proteins McpA enthielt ebenfalls das Corrinoid-Bindemotiv (Abbildung 4.48). Der Abgleich seiner Aminosäuresequenz mit der UniProt-Datenbank lieferte keine Homologe für dieses Protein. Durch die Methanol-Induktion und das Vorhandenseins eines Corrinoid-Bindemotivs kodiert dieses Gen möglicherweise für eine Methanol-Methyltransferase (Hagemeier u. a., 2006). Die Analyse der vorläufigen Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 auf weitere B_{12}-Bindemotive ergab, dass dessen Methioninsynthase ebenfalls diese konservierten Aminosäuren (DIHDLG-(38)-IGL-(29)-GG) enthält.

In *Sporomusa ovata* H1 konnte ich mehrere Gene nachweisen, die für mögliche **Vitamin B_{12}-Transporter** kodieren. Physiologische Experimente mit radioaktiv markiertem Vitamin B_{12} haben gezeigt, dass *Sporomusa ovata* H1 dieses Corrinoid aufnehmen kann. Der Vitamin B_{12}-Transport erfolgt in Gram-negativen Bakterien durch ein TonB-abhängiges Transportsystem. Derartige Transportsysteme können auch für den Transport von Eisen-Siderophoren (Gumbart u. a., 2007), Metall-Chelaten (Nickel, Kobalt, Kupfer), Kohlenhydraten (Saccharose, Maltodextrin) oder Thiamin verantwortlich sein (Schauer u. a., 2008). In den meisten vollständig sequenzierten Bakterien ist jedoch nur **ein** TonB-abhängiges Vitamin B_{12}-Transportsystem vorhanden, dessen Expression durch einen B_{12}-Riboschalter reguliert wird. In *Sporomusa ovata* H1 konnte ich **vier** dieser B_{12}-Riboschalter-regulierten Gene identifizieren, die für mögliche Corrinoid-Transportproteine kodieren. Des weiteren konnten in der vorläufigen Genomsequenz von *Sporomusa ovata* H1 zehn weitere Gene gefunden werden, die für potentielle TonB-abhängige Corrinoid-Transporter kodieren. Eine solch hohe Zahl von Corrinoid-Transportsystemen in einem Bakterium ist derzeit physiologisch schwer zu begründen.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier in dieser Arbeit identifizierten pos-

tulierten Vitamin B_{12}-Transportproteine aus *Sporomusa ovata* H1 mit dem gut untersuchten BtuB aus *Escherichia coli* (PDB-Datenbank 1NQH) zeigt deutliche Unterschiede (Abbildung 4.49). Somit spricht derzeit als einziges Indiz für eine Vitamin B_{12}-Transportaktivität dieser Proteine die Bindung von radioaktivem Vitamin B_{12} an ihre rekombinanten Fusionsproteine auf der Zelloberfläche von *Escherichia coli*. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um eine andere Art von Vitamin B_{12}-Transportproteinen handelt, die abweichende Strukturmerkmale zu den homologen Proteinen aus Gammaproteobakterien aufweisen. Unterschiede im Bindeverhalten dieser vier postulierten Vitamin B_{12}-Transporter können durch die N- bzw. C-terminale Präsentation als Fusionsprotein und einen ungünstigen Codongebrauch im *Escherichia coli*-Expressionsstamm erklärt werden.

Durch die Bindung von Vitamin B_{12} an die Zelloberflächen-präsentierten Vitamin B_{12}-Transportproteine aus *Sporomusa* ist deren physiologische Funktion bestätigt. Es sollten also in *Sporomusa ovata* H1 mindestens vier Vitamin B_{12}-Transportsysteme vorkommen. Damit stehen nun einige Kandidaten für vergleichende biochemische Untersuchungen solcher rekombinanten Oberflächenstrukturen zur Verfügung. Solche rekombinanten Oberflächensysteme sollten für eine Isolierung von Vitamin B_{12} aus Vitamin B_{12}-haltigen Lösungen geeignet sein.

6 Literaturverzeichnis

[Banerjee 2006] BANERJEE, Ruma: B12 trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. In: *ACS Chem Biol* 1 (2006), Apr, Nr. 3, S. 149–59

[Banerjee und Ragsdale 2003] BANERJEE, Ruma ; RAGSDALE, Stephen W.: The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. In: *Annu Rev Biochem* 72 (2003), S. 209–47

[Becker u. a. 2005] BECKER, Stefan ; THEILE, Sebastian ; HEPPELER, Nele ; MICHALCZYK, Anja ; WENTZEL, Alexander ; WILHELM, Susanne ; JAEGER, Karl-Erich ; KOLMAR, Harald: A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. In: *FEBS Lett* 579 (2005), Nr. 5, S. 1177–82

[Berlyn 1998] BERLYN, M K.: Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (1998), Nr. 3, S. 814–984

[Bischof 2010] BISCHOF, D: Vitamin B12-Transporter in aeroben Bakterien. In: *Bachelorarbeit, Universität Ulm* (2010)

[Boehr u. a. 2002] BOEHR, David D. ; FARLEY, Adam R. ; WRIGHT, Gerard D. ; COX, James R.: Analysis of the pi-pi stacking interactions between the aminoglycoside antibiotic kinase APH(3')-IIIa and its nucleotide ligands. In: *Chem Biol* 9 (2002), Nr. 11, S. 1209–17

[Brinkrolf u. a. 2006] BRINKROLF, K ; BRUNE, I ; TAUCH, A: Transcriptional regulation of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Genet Mol Res* 5 (2006), Nr. 4, S. 773–89

[Cadieux u. a. 2007] CADIEUX, Nathalie ; BAREKZI, Nazir ; BRADBEER, Clive: Observations on the calcium dependence and reversibility of cobalamin transport across the outer membrane of *Escherichia coli*. In: *J. Biol. Chem.* 282 (2007), Nov, Nr. 48, S. 34921–8

[Cameron u. a. 1991] CAMERON, B ; BLANCHE, F ; ROUYEZ, M C. ; BISCH, D ; FAMECHON, A ; COUDER, M ; CAUCHOIS, L ; THIBAUT, D ; DEBUSSCHE, L ; CROUZET, J: Genetic analysis, nucleotide sequence, and products of two Pseudomonas denitrificans cob genes encoding nicotinate-nucleotide: dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase and cobalamin (5'-phosphate) synthase. In: *J Bacteriol* 173 (1991), Oct, Nr. 19, S. 6066–73

[Carmel 1997] CARMEL, R: Cobalamin, the stomach, and aging. In: *Am J Clin Nutr* 66 (1997), Nr. 4, S. 750–9

[Challand u. a. 2010] CHALLAND, Martin R. ; MARTINS, Filipa T. ; ROACH, Peter L.: Catalytic activity of the anaerobic tyrosine lyase required for thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 285 (2010), Feb, Nr. 8, S. 5240–8

[Cheong u. a. 2001] CHEONG, C G. ; ESCALANTE-SEMERENA, J C. ; RAYMENT, I: Structural investigation of the biosynthesis of alternative lower ligands for cobamides by nicotinate mononucleotide: 5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase from *Salmonella enterica*. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 40, S. 37612–20

[Chimento u. a. 2003] CHIMENTO, David P. ; KADNER, Robert J. ; WIENER, Michael C.: The *Escherichia coli* outer membrane cobalamin transporter BtuB: structural analysis of calcium and substrate binding, and identification of orthologous transporters by sequence/structure conservation. In: *J Mol Biol* 332 (2003), Nr. 5, S. 999–1014

[Cole und Prchal 1984] COLE, M G. ; PRCHAL, J F.: Low serum vitamin B12 in Alzheimer-type dementia. In: *Age and ageing* 13 (1984), Nr. 2, S. 101–5

[Djordjevic 2007] DJORDJEVIC, Marko: SELEX experiments: new prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. In: *Biomol Eng* 24 (2007), Nr. 2, S. 179–89

[Eschenmoser 1994] ESCHENMOSER, A: B12: reminiscences and afterthoughts. In: *Ciba Found Symp* 180 (1994), S. 309–29; discussion 329–32

[Feustel 2000] FEUSTEL, L: Mikrobiologische Untersuchungen an einem Enzym der Corrinoisbiosynthese in *Sporomusa ovata*. In: *Diplomarbeit, Universität Ulm* (2000)

[Gallinger 2009] GALLINGER, C: Identifizierung S-Adenosylmethionin- abhängiger Riboswitches und ihrer regulierten Gene im homoacetogenen Bakterium *Sporomusa ovata*. In: *Diplomarbeit, Universität Ulm* (2009)

[Gallo u. a. 2008] GALLO, S ; OBERHUBER, M ; SIGEL, R ; KRÄUTLER, B: The Corrin Moiety of Coenzyme B(12) is the Determinant for Switching the btuB Riboswitch of *E. coli*. In: *Chembiochem* (2008), May

[Gallo u. a. 2011] GALLO, Sofia ; MUNDWILER, Stefan ; ALBERTO, Roger ; SIGEL, Roland K O.: The change of corrin-amides to carboxylates leads to altered structures of the B12-responding btuB riboswitch. In: *Chem Commun (Camb)* 47 (2011), Jan, Nr. 1, S. 403–5

[Gochard u. a. 2009] GOCHARD, A ; MONDON, K ; DE TOFFOL, B ; AUTRET, A: Vitamin B12 deficiency and neurological disorders: a case report and literature review. In: *Rev Neurol (Paris)* 165 (2009), Dec, Nr. 12, S. 1095–8

[Gumbart u. a. 2007] GUMBART, James ; WIENER, Michael C. ; TAJKHORSHID, Emad: Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. In: *Biophys J* 93 (2007), Jul, Nr. 2, S. 496–504

[Hagemeier u. a. 2006] HAGEMEIER, Christoph H. ; KRER, Markus ; THAUER, Rudolf K. ; WARKENTIN, Eberhard ; ERMLER, Ulrich: Insight into the mechanism of biological methanol activation based on the crystal structure of the methanol-cobalamin methyltransferase complex. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Dec, Nr. 50, S. 18917–22

[Hanahan 1983] HANAHAN, D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J Mol Biol* 166 (1983), Nr. 4, S. 557–80

[Hiergeist 2006] HIERGEIST, A: Corrinoid Riboswitches in *Sporomusa ovata*. In: *Diplomarbeit, Universität Ulm* (2006)

[Hugo und Bloomfield 1971] HUGO, W B. ; BLOOMFIELD, S F.: Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. I. The adsorption of fentichlor by the bacterial cell and its antibacterial activity. In: *J Appl Bacteriol* 34 (1971), Nr. 3, S. 557–67

[Ibrahim 1998] IBRAHIM, NS: Hinweise auf eine neuartige Aktivierungsreaktion für phenolische Verbindungen in *Sporomusa ovata*. Diplomarbeit, Universität Ulm. In: *Diplomarbeit, Universität Ulm* (1998)

[Katsoulidis 1998] KATSOULIDIS, E: Nachweis der homolytischen Spaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung beim anaeroben Tyrosinabbau zu p-Cresol und Untersuchungen zur Biosynthese eines ungewöhnlichen Cresolylribosids aus *Sporomusa ovata*. In: *Diplomarbeit, Universität Ulm* (1998)

[Kazanov u. a. 2007] KAZANOV, MD ; VITRESCHAK, AG ; GELFAND, MS: Abundance and functional diversity of riboswitches in microbial communities. In: *BMC Genomics* 8 (2007), Nr. 1, S. 347

[Kinoshita u. a. 1983] KINOSHITA, Tatsuo ; OGUCHI, Yutaka ; MARUHASHI, Kenji ; KOJIMA, Ichiro ; ENDOH, Noboru ; SATOH, Tetsuo: Process for purifying and separating vitamin B12. In: *United States Patent 4383110* (1983)

[Kirby 1956] KIRBY, K S.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. In: *Biochem J* 64 (1956), Nr. 3, S. 405–8

[Klassen u. a. 2005] KLASSEN, Giseli ; SOUZA, Emanuel M. ; YATES, M G. ; RIGO, Liu U. ; COSTA, Roberta M. ; INABA, Juliana ; PEDROSA, Fábio O: Nitrogenase switch-off by ammonium ions in Azospirillum brasilense requires the GlnB nitrogen signal-transducing protein. In: *Appl Environ Microbiol* 71 (2005), Sep, Nr. 9, S. 5637–41

[Langan und Zawistoski 2011] LANGAN, Robert C. ; ZAWISTOSKI, Kimberly J.: Update on vitamin B12 deficiency. In: *Am Fam Physician* 83 (2011), Jun, Nr. 12, S. 1425–30

[Lehle 1994] LEHLE, M: Reinigung und Charakterisierung der Betain-Demethylase aus dem homoacetogenen Bakterium *Sporomusa ovata*. In: *Diplomarbeit, Universität Ulm* (1994)

[Ludwig und Matthews 1997] LUDWIG, M L. ; MATTHEWS, R G.: Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. In: *Annu Rev Biochem* 66 (1997), S. 269–313

[Martens u. a. 2002] MARTENS, J H. ; BARG, H ; WARREN, M J. ; JAHN, D: Microbial production of vitamin B12. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 58 (2002), Nr. 3, S. 275–85

[McGettrick und Worrall 2004] MCGETTRICK, Anne F. ; WORRALL, D M.: Extraction of recombinant protein from bacteria. In: *Methods Mol Biol* 244 (2004), S. 29–35

[Möller u. a. 1985] MÖLLER, Bernhard ; OSSMER, Rolf ; HOWARD, Bernard H. ; GOTTSEHALK, Gerhard ; HIPPE, Hans: *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides spec. nov.* and *Sporomusa ovata spec. nov.* In: *Arch. Microbiol.* (1985), S. 9

[Morton u. a. 1991] MORTON, T A. ; RUNQUIST, J A. ; RAGSDALE, S W. ; SHANMUGASUNDARAM, T ; WOOD, H G. ; LJUNGDAHL, L G.: The primary structure of the subunits of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase from Clostridium thermoaceticum. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Dec, Nr. 35, S. 23824–8

[Pabo und Sauer 1984] PABO, C O. ; SAUER, R T.: Protein-DNA recognition. In: *Annu Rev Biochem* 53 (1984), S. 293–321

[Peters u. a. 1995] PETERS, J W. ; FISHER, K ; DEAN, D R.: Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. In: *Annu Rev Microbiol* 49 (1995), S. 335–66

[Pfaffl 2001] PFAFFL, M W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), Nr. 9, S. e45

[Pilet u. a. 2009] PILET, Eric ; NICOLET, Yvain ; MATHEVON, Carole ; DOUKI, Thierry ; FONTECILLA-CAMPS, Juan C. ; FONTECAVE, Marc: The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly. In: *FEBS Lett* 583 (2009), Feb, Nr. 3, S. 506–11

[Ragsdale 2007] RAGSDALE, Stephen W.: Nickel and the carbon cycle. In: *J Inorg Biochem* 101 (2007), Nov, Nr. 11-12, S. 1657–66

[Ragsdale 2008] RAGSDALE, Stephen W.: Catalysis of methyl group transfers involving tetrahydrofolate and B(12). In: *Vitam Horm* 79 (2008), Jan, S. 293–324

[Raux u. a. 2000] RAUX, E ; SCHUBERT, H L. ; WARREN, M J.: Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. In: *Cell Mol Life Sci* 57 (2000), Nr. 13-14, S. 1880–93

[Regulski und Breaker 2008] REGULSKI, Elizabeth E. ; BREAKER, Ronald R.: In-line probing analysis of riboswitches. In: *Methods Mol Biol* 419 (2008), Jan, S. 53–67

[Rodionov u. a. 2003] RODIONOV, Dmitry A. ; VITRESCHAK, Alexey G. ; MIRONOV, Andrey A. ; GELFAND, Mikhail S.: Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), Nr. 42, S. 41148–59

[Roth u. a. 1996] ROTH, J R. ; LAWRENCE, J G. ; BOBIK, T A.: Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. In: *Annu Rev Microbiol* 50 (1996), S. 137–81

[Roth u. a. 1993] ROTH, J R. ; LAWRENCE, J G. ; RUBENFIELD, M ; KIEFFER-HIGGINS, S ; CHURCH, G M.: Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. In: *J. Bacteriol.* 175 (1993), Nr. 11, S. 3303–16

[Schägger und von Jagow 1991] SCHÄGGER, H ; JAGOW, G von: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. In: *Anal Biochem* 199 (1991), Nr. 2, S. 223–31

[Schauer u. a. 2008] SCHAUER, Kristine ; RODIONOV, Dmitry A. ; REUSE, Hilde de: New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? In: *Trends Biochem Sci* 33 (2008), Jul, Nr. 7, S. 330–8

[Seefeldt u. a. 2009] SEEFELDT, Lance C. ; HOFFMAN, Brian M. ; DEAN, Dennis R.: Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. In: *Annu Rev Biochem* 78 (2009), S. 701–22

[Selmer und Andrei 2001] SELMER, T ; ANDREI, P I.: p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. In: *Eur. J. Biochem.* 268 (2001), Nr. 5, S. 1363–72

[Steitz u. a. 1982] STEITZ, T A. ; OHLENDORF, D H. ; MCKAY, D B. ; ANDERSON, W F. ; MATTHEWS, B W.: Structural similarity in the DNA-binding domains of catabolite gene activator and cro repressor proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982), Nr. 10, S. 3097–100

[Stupperich u. a. 1992] STUPPERICH, E ; AULKEMEYER, P ; ECKERSKORN, C: Purification and characterization of a methanol-induced cobamide-containing protein from *Sporomusa ovata*. In: *Arch. Microbiol.* 158 (1992), Nr. 5, S. 370–3

[Stupperich u. a. 1990] STUPPERICH, E ; EISINGER, H J. ; ALBRACHT, S P.: Evidence for a super-reduced cobamide as the major corrinoid fraction in vivo and a histidine residue as a cobalt ligand of the p-cresolyl cobamide in the acetogenic bacterium *Sporomusa ovata*. In: *Eur. J. Biochem.* 193 (1990), Nr. 1, S. 105–9

[Stupperich u. a. 1988] STUPPERICH, E ; EISINGER, H J. ; KRÄUTLER, B: Diversity of corrinoids in acetogenic bacteria. P-cresolylcobamide from *Sporomusa ovata*, 5-methoxy-6-methylbenzimidazolylcobamide from *Clostridium formicoaceticum* and vitamin B12 from *Acetobacterium woodii*. In: *Eur. J. Biochem.* 172 (1988), Nr. 2, S. 459–64

[Stupperich und Konle 1993] STUPPERICH, E ; KONLE, R: Corrinoid-Dependent Methyl Transfer Reactions Are Involved in Methanol and 3,4-Dimethoxybenzoate Metabolism by *Sporomusa ovata*. In: *Microbiol Immunol* 59 (1993), Nr. 9, S. 3110–3116

[Stupperich u. a. 1996] STUPPERICH, E ; KONLE, R ; ECKERSKORN, C: Anaerobic O-demethylations of methoxynaphthols, methoxyfuran, and fluoroanisols by *Sporomusa ovata*. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223 (1996), Nr. 3, S. 770–7

[Stupperich und Nexø 1991] STUPPERICH, E ; NEXØ, E: Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B12 binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. In: *Eur. J. Biochem.* 199 (1991), Nr. 2, S. 299–303

[Stupperich u. a. 1986] STUPPERICH, E ; STEINER, I ; RÜHLEMANN, M: Isolation and analysis of bacterial cobamides by high-performance liquid chromatography. In: *Anal Biochem* 155 (1986), Nr. 2, S. 365–70

[Sudarsan u. a. 2006] SUDARSAN, Narasimhan ; HAMMOND, Ming C. ; BLOCK, Kirsten F. ; WELZ, Rüdiger ; BARRICK, Jeffrey E. ; ROTH, Adam ; BREAKER, Ronald R.: Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. In: *Science* 314 (2006), Nr. 5797, S. 300–4

[Svetlitchnaia u. a. 2006] SVETLITCHNAIA, Tatiana ; SVETLITCHNYI, Vitali ; MEYER, Ortwin ; DOBBEK, Holger: Structural insights into methyltransfer reactions of a corrinoid iron-sulfur protein involved in acetyl-CoA synthesis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006), Nr. 39, S. 14331–6

[Thomas 1980] THOMAS, P S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980), Nr. 9, S. 5201–5

[Trzebiatowski u. a. 1994] TRZEBIATOWSKI, J R. ; O'TOOLE, G A. ; ESCALANTE-SEMERENA, J C.: The cobT gene of *Salmonella typhimurium* encodes the NaMN:

5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase responsible for the synthesis of N1-(5-phospho-alpha-D-ribosyl)-5,6-dimethylbenzimidazole, an intermediate in the synthesis of the nucleotide loop of cobalamin. In: *J. Bacteriol.* 176 (1994), Nr. 12, S. 3568–75

[Vitreschak u. a. 2003] VITRESCHAK, Alexey G. ; RODIONOV, Dmitry A. ; MIRONOV, Andrey A. ; GELFAND, Mikhail S.: Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. In: *Nucleic Acids Res* 9 (2003), Nr. 9, S. 1084–97

[Wallace 1987] WALLACE, D M.: Precipitation of nucleic acids. In: *Methods Enzymol* 152 (1987), S. 41–8

Tabelle 6.1: In dieser Arbeit verwendete Software und Internetadressen

Software	Herkunft	Beschreibung
ARNold	http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/	Vorhersage von transkriptionellen Terminationsstrukturen
Bacmap	http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/	Datenbank bakterieller Genome
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/	Datenbankabgleich zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen
BOXSHADE	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	Grafische Darstellung von Alignment-Daten
BPROM	http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb	Vorhersage Bakterieller Promotoren
BRENDA	http://www.brenda-enzymes.info/	Enzym Datenbank
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Vergleich mehrerer DNA- und Proteinsequenzen
DNA Merger	http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=merger	Zusammenfügen überlappender DNA-Sequenzen
DSMZ-Datenbank	http://www.dsmz.de/microorganisms/html/	Internetseite der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
Graphical Codon Usage Analyser	http://gcua.schoedl.de/	Analyse des Codongebrauchs verschiedener Bakterien
KEGG-Datenbank	http://www.genome.jp/kegg/	Datenbank für Gensequenzen und Stoffwechselwege
LGC Genomics	http://www.agowa.de	Nukleotidsequenzierung
Lasergene	DNASTAR Lasergene® Version 7.1	Softwarepaket zur Analyse und grafischen Darstellung von Nukleotidsequenzen
Lightcycler 480	Lightcycler®480 Version 1.5	
MacVector	Accelrys MacVector 11.1	Softwarepaket zur Sequenzanalyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen
Mmass	Mmass 3.8	Analyse massenspektrometrischer Daten
NEBCutter	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	Analyse von Nukleotidsequenzen auf Restriktionsschnittstellen
NPS-HTH	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hth.html	Untersuchung von Proteinsequenzen auf Helix-Turn-Helix Motive
OligoCalculator	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	Analyse der Eigenschaften von Oligonukleotiden
ORF-Finder	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/	Analyse von Nukleotidsequenzen auf offene Leserahmen
Palindrome	http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome	Analyse von Nukleotidsequenzen auf palindromische Sequenzmotive
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/	Auswahl von Oligonukleotiden (Primern) anhand einer DNA Sequenz
rfam-Datenbank	http://rfam.sanger.ac.uk/	Datenbank für RNA-Familien (z.B. B_{12}-Riboschalter)
Ribosomal Database	http://rdp.cme.msu.edu/	Vergleich von Organismen anhand der Phylogenie
RNAalifold	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/alifold.cgi	Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen
UniProt	http://www.uniprot.org/	Datenbank für Proteinsequenzen

7 Anhang

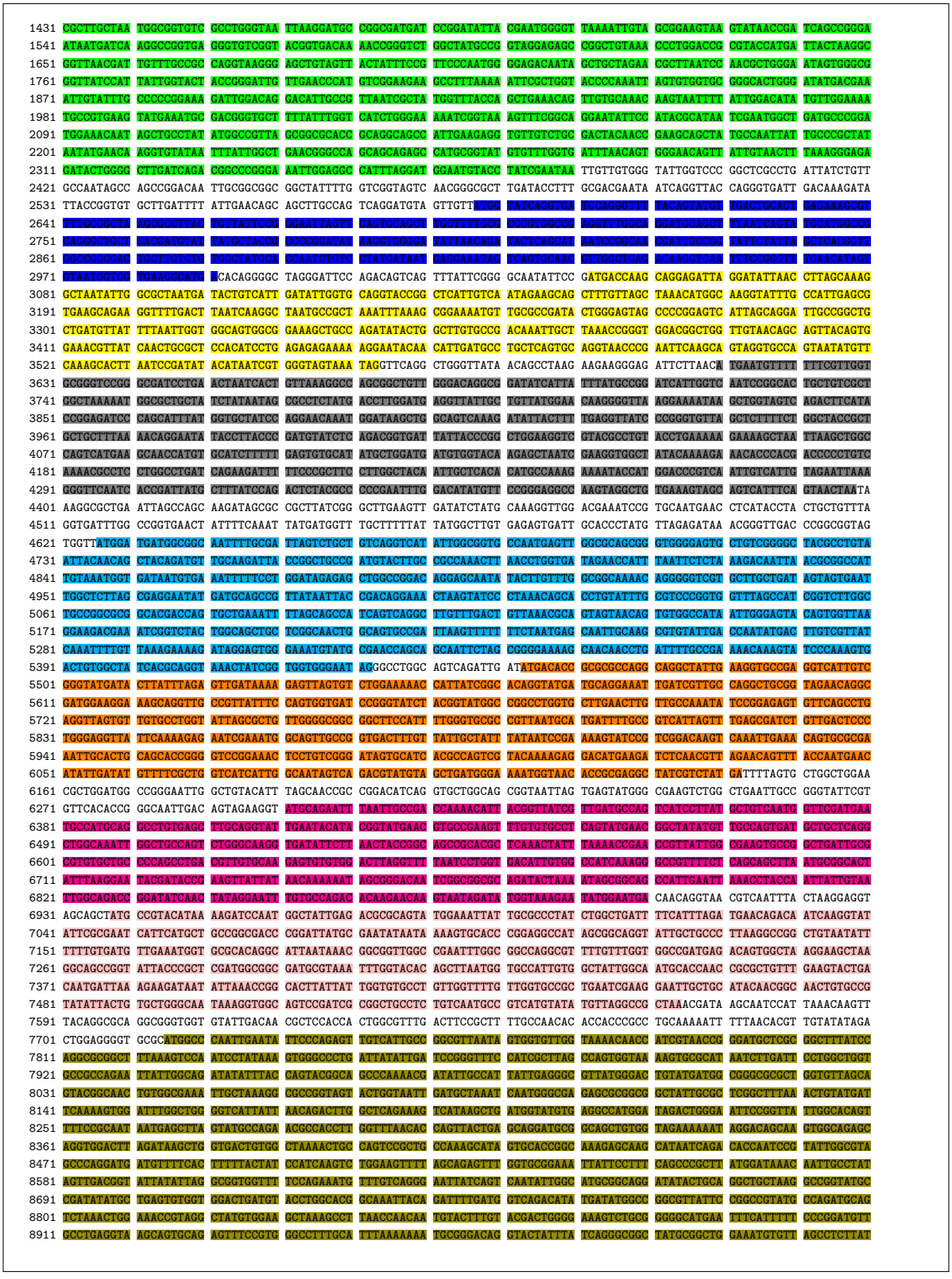
7.1 Nukleotidsequenzen stromauf- und abwärts der identifizierten B_{12}-Riboschalter in *Sporomusa ovata* H1.

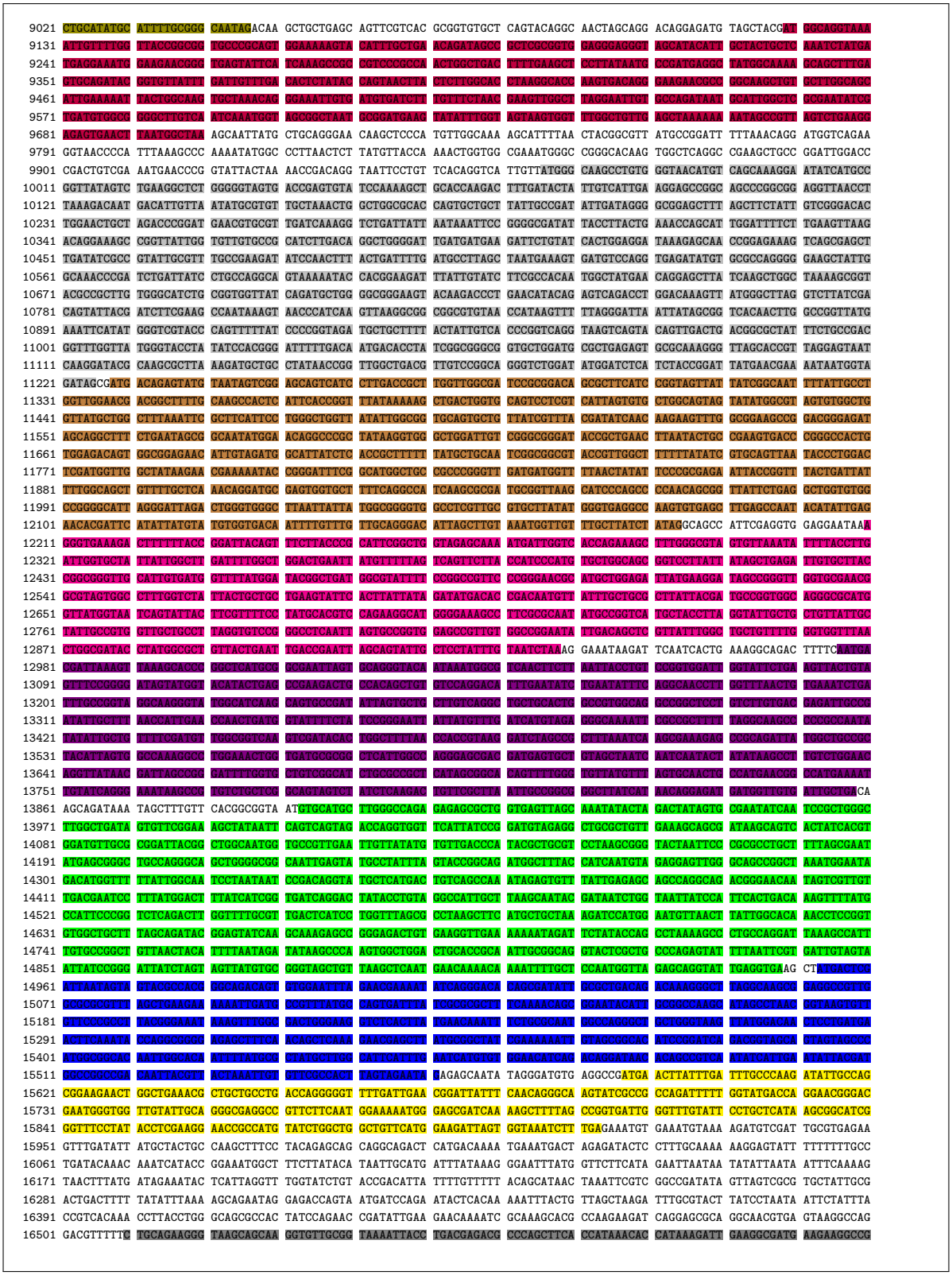
In folgendem Abschnitt sind die Nukleotidsequenzen stromauf- und abwärts der identifizierten B_{12}-Riboschalter im Genom von *Sporomusa ovata* H1 dargestellt. B_{12}-Riboschalter sind rot hervorgehoben. Die nachgewiesenen offenen Leserahmen sind farbig markiert. Die entsprechenden Farbmarkierungen sind aus den angegebenen Tabellen ersichtlich.

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts des B_{12}-Riboschalters RS01 in *Sporomusa ovata* H1: Corrinring-Biosynthese

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt			
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion
orf1	44	287	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Protein der YdjC Familie
cbiD	70	387	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobalamin Biosynthese Protein CbiD
cbiE	61	210	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-6y C5, 15-Methyltransferase, CbiE-Untereinheit
cbiT	64	191	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-6y C5, 15-Methyltransferase, CbiT-Untereinheit
cbiF	76	262	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-4 C11-Methyltransferase
cbiG	64	296	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobalamin Biosynthese, CbiG Protein
cbiH	69	274	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-3B C17-Methyltransferase
cbiJ	58	253	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Precorrin-6x Reductase
cbiC	71	208	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	cbiC, Precorrin 8x Methylmutase
cbiA	62	443	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobyrinsäure a,c Diamid Synthase
cobU	68	193	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	CobU, Adenosylcobinamiphosphat Guanylyltransferase
cbiP	84	417	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	CobQ, Cobyrsäure Synthase
cbiB	65	318	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	CobD/CbiB Adenosylcobinamid Phosphat Synthase
cobS	58	243	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Cobalamin-5'-Phosphat Synthase, CobS
pduX	58	294	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	L-Threonin Kinase
cobD	57	369	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	L-Threonin-O-3-Phosphat Decarboxylase
cobC	55	200	*Mitsuokella multacida*	Alpha-Ribazol-5'-Phosphat Phosphatase
orf2	56	108	*Anaerobaculum hydrogeniformans*	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase Untereinheit
orf3	49	141	*Burkholderia dolosa* AUO158	Hämolysin Aktivatorprotein, äußere Membran
orf4	48	191	*Herbaspirillum seropedicae* SmR1	Hämolysin Aktivatorprotein

```
   1 CAATAGCAAT TTATAGTTAA ATCCCAGTTG AGGTTAAATA ATGAAACAGT TAATTGTGAA TGCCGATGAT TTTGGCTTAC ATGAAAATAT TAATCTTGGC ATTATCGAGG
 111 GGCATATCCG AGGCTGTATT ACGAGTACTT CGCTTATGGC CGGTGGATCT GCATTTAATC ATGCGGCAGC GTTAGCTGCC GACCATCCGC AATTGGGGAT TGGCGCTCAT
 221 CTTACACTTG TGGGTGGAAT GCCGGTAACT GATCCGGGGT CTATTCCTTC CTTAGTTGAT AGTGAGGGGA TGTTGTGTAC CAGTTATCCG GCATTTTTGA AAAAATTTTG
 331 TTTGGCAGGT ATTTGCCTTG ACGATGTGCA CCGGGAACTG ACGGCACAGG TTAACAAAAT ATTGTCGGCT GGCATTACGC TTACTCATCT TGACAGCCAT CAGCACCTGC
 441 ATGTGGTGCC GGGGATTCTT AATATTGTGC TAAGTATTGC CAAAGAATTT AATATCAGGG CTATGCGGAT ACCGGCTGAA TCGCTGGTGT TCTTAGGTGG TTTTAAACCG
 551 GGAGCAGGCA GGATAATTGG CCGCTCCGGT CTTAGTATTT TGGCTGGTAT GGCTCGTTTT AAGGCGCGAC AGGCTGGTTT AGCGGCACCG GATCATTTCT ATGGAATGGT
 661 AGCGGGCGGC AGTATGGAGG AAAAGTTACT ACTTACTATT ATTGATAATC TGTCTGAGGG CATAACCGAA GTTATGGTTC ATCCTGGCTT AGATGAGGTT GCTCTCAATC
 771 GCGTATTTAA CTGGCAATAC CATTGGCAGC AGGAACTCAG TGCAGTTACT AGCTGCCGGG TTGTTCAGCG TTTGGAACAA GAGAATATTC AACTCGTGTC ATTTGCTGGG
 881 ATGAATAACA GTAAAGGGTG ATTGCTATAA TTTAAATAAA ATATTTAATT TTGATAATTA TCGTCTTGCT AGCAGGAAAA AAGCCAATTA TATGGAATAA TACCACTAAC
 991 ATAATTTGAT AGTGTAAGGG AATGGGTGCT TTGTGCTTAA TAGGGAAGTG CGGTGTAATA CCGGCACGGT CCCGCCACTG TAATGGGGAT GCTTCCTAAA TTTGCCACTG
1101 CGAAACCGGG AAGGCTTAGG GCGGCGATGA ACCAGAGTCA GCAGACCTGC CTGTTCTAAC ACACGCCGCT AGGACCTACG GAAGATAGGC AGGTGTGGGT ACAATAATCA
1211 GGCAAAATGC ATATATTGTT TGGTGTTATA CCCCCTGCTA AGGGGGTTTT TCTATTGTCT GATATACCAA TACCAATGCG CAAAGGAATA ACTACCGGGA CTTGTGCGGC
1321 CGCAGCGGCC AAAGCGGCAG TACTGGCCTG GCAAGGTCAG CCGGCTACCG TCGTTGAAGT AATTTCACCG CAGGGCATAA CACTGACAGC GCCGATAGCT GCCAGTCATG
```





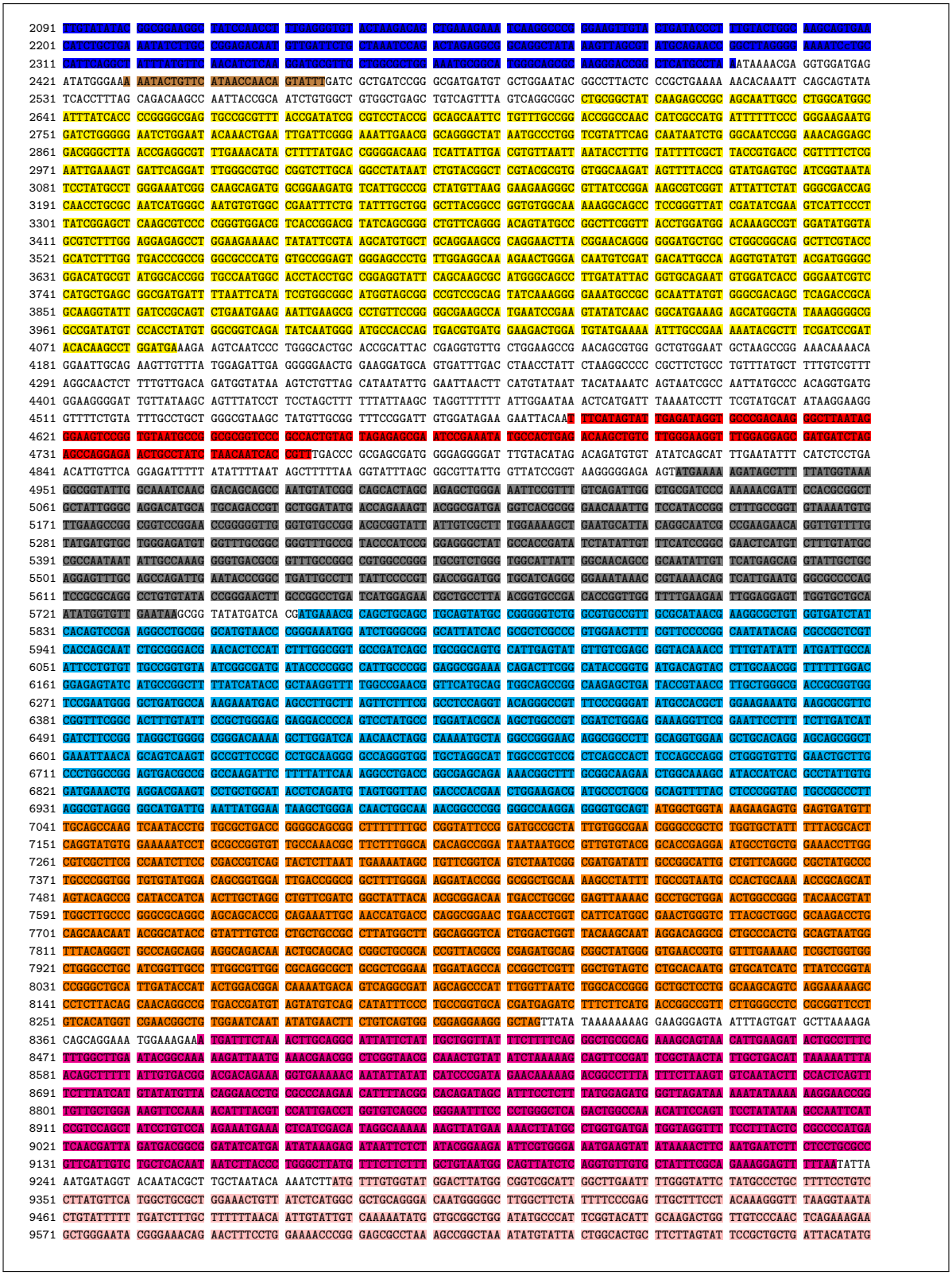
```
16611 GTTTCCCTGG ATATATGAAC TGACCAAAAA GTATCAAGGT CAAAAGATCG GCTGGCAAGG GATAAACATC ATTGTAAAAG TACTTACCAA CGCCTTTATC GACCGCGGCT
16721 ATGTAACGAC AAGAGTACTC ATCCCCCAGC AAGACATAGC AACAGGTGTC CTTACCCTGC AAGTGGTTCC CGGGACGATT AAAGACTTTA AACTATCAGA CCCCGCCATT
16831 AGAGCAGATT GGAAAAGTGC CTTCCCCACA AGACCGGGAG ATATTCTGAA CTTGCGCGAC CTGGAGCAGG GACTGGAGCA AATGAAGCGT GTCCCATCCC AGGATGCTGA
16941 AATGCAACTG CTGCCGGGGG ACAAGCCTGG CGAATCAATA GTACAAATTA CTGTCAAACA GAAGAAGCCT TGGAAAGTAG TGCTCTCGTT AGATGACTCA GGCAGCAAAG
17051 CTACTGGCAA GCTGCAAGAA TCGGAAACTT TTTCACTTGA CAACCTATTT GGCATCAATG ACCTGTTCAA CATCTCCTTT AATAGTGATG CCGAAAGAAA AGGCGATCAA
17161 TATGGCACAA AAGGAGACAG CTTCAGCTAC TCATTTCCTC AGGGTTACTG GACGTATTCC CTATCAAGTT CAGTATATAA ATACCACCAG ACAATTGAAA ACTTGGGAAC
17271 CTCCTTCGTG CCATCCGGGC ATACCAGAAA CCTCGAATTA AAAGCAGAGA AACTCGTGTA TCGTGACCAG ACCCGGAAAA CCAGCCTGGC TTTTAGCCTG ATAAGATCCC
17381 GCAGTAAATC CTATATTGAC GACACCGAAA TCGAAATACA GCGACGCAAA ACTACTGCGG CCAAACTGGC TCTTAATCAA AGGGAGCAAC GGGACGGTTC TATTGCTTCT
17491 TATTTGATCG TAAAATGAAG GAAAAAGATA ATGGAGTGAA AATTGATGCC AAGGATAGTC AACGAGCACA AACTCAGGAA TTTAAAGAAA AATATAAAAA GCGTGCAAGC
17601 TATGAATGCA TGAATGGAAA AACGGTGAGA TGAAGCACTT CCATGGATTA GACCGTGCCC GAGGGTATGG TCTTAAAAGC ATGAGTATGC AAGCCAAGTT AACAGCTTTG
17711 GCTGTCAATT TAAAAAGGAT AGCCGCGCTG GTATCCTTAT GTCTTGCCTA TTTTAAACAA ATTTTACTTA GCATAAAGAA TTCATCAAAA ATTATGATTA AAAAAGCTGA
17821 TTATGTTGCT TAAAAAAGAG GCTTTTTCAG TAGTTTCTAC CTGTCCCCGC GTCCCCCTAC TATAAAAAAT GCAATGGAGT TGCAGCAATT TGATTGCAAA ACAAGAAATA
17931 CCCCGCGTCC CCTTGACATT CCAGAGCCTT GTACTTAAAA TATAGGAGCG AAAGAACCGT CCCTGTGCTC TCACTGTGCT TCCGCACGCC CTCTCCCCTT GACACGCCAT
18041 TATTTGGCAT GTTTTTCAGG AATCAAAATA AACCCTCCCT CATATACTGT AAATGTTCTT GtTTTTAAAG GGAGGGA
```

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts des B_{12}-Riboschalters RS02 in *Sporomusa ovata* H1.

Braun markiert ist die palindromische Nukleotidsequenz, die als LuxR-Bindemotiv identifiziert wurde.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	28	334	*Frankia sp.* EUN1f	Aminoglykosid Phosphotransferase	1.2.7.95
cbiK1	43	281	*Clostridium carboxidivorans* P7	Anaerobe Kobaltchelatase CbiK	1.4.99.1.3
cbiK2	57	261	*Selenomonas sp.*	Kobaltchelatase CbiK	1.4.99.1.3
nifH	68	268	*Dialister invisus*	Nitrogenase Eisen Protein	1.18.6.1
nifE	43	432	*Selenomonas noxia*	Nitrogenase Eisen/Molybdän-Kofaktor Biosyntheseprotein	1.18.6.1
nifD	42	434	*Selenomonas noxia*	Oxidoreduktase/Nitrogenase, Komponente I	1.18.6.1
orf2	32	284	*Pelobacter propionicus*	Hypothetisches Protein	
orf3	51	315	*Pelobacter propionicus*	4Fe-4S Ferredoxin, Protein mit Eisen-Schwefel Bindedomäne	1.19.6.1
orf4	45	142	*Pelobacter propionicus*	2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase, Komponente D	4.2.1.-

```
   1 GGGCTGGTAT CAAACTTTGG GCAGATTTCC CACACTATGA AGTGCGCCGG GCCTTTGCTT CCCATACCCT GATAGAAGAA CTGGCGGAAC GCGATGGTAT TCAGGCTGAT
 111 GACGAGAGAC AGGCATTAGA GCGCCTGCAA GAAGAAGGGT TTACCGAGAT TATCGTGCAG CCCTTTCAGA TCGCTGCAGG GGAAGAGTAC GAAAAAGTCA GGGATGTTGT
 221 TCAGGATTAT GCCGAGCGGA ACGAGTTTGA CAAGATTATG ACCCTTCCGT GTGTGACCGT CTGGGCCAAA CCGATAAGAT TTACTATTCA CTGATCATCA GCAAATTATA
 331 TACGGCTAAC CAGCTAGTTT CCGGAAATAT CTCCTAGAGC CGAGGTGCTT AAAATGATAA CGAAGTTAAT GAATTTGTGT GAACTACCAT ACCATATTAT TCAAACTGAT
 441 CTGAATCTAA GTCAATTCAG CCTGGTTGGT ATTGTCAATG GTATTTCAAA AAAGGTGTAC TTAGTGACCG ATGGCAATAA CCACAAAACC ATCCTGTATA TCTGGCAAAA
 551 ACCTATTCTA GGACTAACAA AAGCGCATAC TGACGGTTTA CATTATTTAT ATGCCGAAGG ATTTGAATAT TTTTGCCATA ACACCAGATT ATTGACTGAT CTGGGCATCA
 661 GAGTTCCCCG GATAATAAAA ACAGGGCATT TTTCCGCAGA AAAGACCTTT GATTATGCCT ATGTGGAGTG CTTTGACGGG ATTAGTTTAC AGGAGTATCT GCAGCACGGC
 771 AATATTGCGA ACATTACTGA TCCGTTGAAT GCAGAACTTA ATAAATTCTA TACCTGCAGC CGGGATTATT TTGGATTTCC TATGCTTACC AACAGATATG CTAAATCTTG
 881 TCAGTGTTTA TGTTATGAAC ATGCTGTTGA GGAACTGGAA ATAGCGTGTA GTTTAGACAG CACTGTAAAA AGAATGAAGC ATTTGGTTTT GCAGCAGTTG GACAACTACA
 991 TAACTATCTT TGTCGGTCAA TTAAAGCCGG TCAGCTATGC ACTTATACAT GGAGAACCAA CACCGCCGCA TGTCTGGTTG TTGACTGACG GCACAATTGG GTTTATCGAC
1101 ATCGAAGGCA TCAAATATTT CGACATTGAA TTTGAATATG CTCTCCTGGA TATGTTGTAT AATTTTTTAT CCACCAGTAA GCCTAAAAGA TATGACCGAA ATAAGCTGTT
1211 ATTTTATAAG CTGTATCACC GGATATGCTG GTTATTGGTT TCTGTAAATT ATTTGCGGAA TATTGATGCA AGCAATAAAT TTTTCATAAA ACTGAGGCAT ACAGTGATTC
1321 GTGATCTGTA TGAACGTGAC AGGGAATGTA TTTGACAACC ATAGCAGTAG ATGATATTCT AAATATGAAA TATTGAATAA TGACTAATCG CCAATTATGC CCACGGGTGA
1431 TGGGAAGGGG ATTGTTAGGT TTATTCATGG GAATAAACTA TTTTCTGGAA CCTTCCTCTT TATATGAGGA AGGTTTTTGA TTTATAGAAG TGTTTGACTA AATTAAAATA
1541 TACAAGGAGG ATTTATGAGC AAAAAAAGCC GTTCTGGTAC TAAGTTTTGC CAGAATTGAT ATTGAAGTTT TGAAAAAATC CATTGAGACG CCGGAAAAAA GTTTTAAAGT
1651 TGCTTTTCCC CAATATGATC TACATCGTGC CTTTACATCC CAAGAGGTTA TTAAAAAATT CGCTGAACAT TCCGAGCTCC AAGTCGACGC CGTAGGCGAT GCCGTCAAAA
1761 AGCTAGCTGC CGCAGGGTAT ACCGAAGTAC ATATTCAACG CTTATCGATT GTGTCTGACT AAACATATAC GCATAGTAAA GAATATATCA CCAGCCTTAT CCGCAGTAAG
1871 GAGAAGAAAT TTAAGAAGAT GACGGTTGGG CGTCCGTTAT CGCTGTCGCT AGGCCTTAAG CGCCATCCGC ATGATTATCA TATTGCTATT CAAGCGATGT AAACACAGCT
1981 GCGTGAGGTT CGCACTGAAA ATGCTGTCGT TTTTATGTGC GATGGCAGCA ATCAGGTGCA TTACGGGACC TTACAACTGA AACTGGCTCA CGCAGGAATT AAAATGCTTT
```



```
 9681 CAGGACTACA TAGCGATTTT TACTTATTCT TCTGTCAGAT TTGCCCGGCA AAACCGATTA TGCCTCTTTT TGTTGGGGAT ACGCGAAATT TCGCGCTGGA TTTTACGAAC
 9791 ACAATCACCC TGACCTTTTC CGTAATTTCC GTAATGATTG CAGCTGGTAC GCTGATAGGA AGTTTTTTCA AAGACCGATT TTTTTGTCTA TTTTGCCCGA TGCTGCCCTT
 9901 GATTCAAATG TATAAAAAAA TCAGTTTTAT CCGGTTTGAA AAATCGGTGC ATACCTGTTC GGGCTGTGGT AATTGCCAAA GAATGTGTCC TATGGATATT AGGGATGTTC
10011 ATCTAGAAAA GACGGAAAAA AATGTAATGA GTGAAGACTG TATGCTTTGT ATGAGATGTA TTGAGGCTTG TCCTGAAGAC AATACATTGA CTGCAAAATT TCTTAAGTAC
10121 AACATATTTT CTTCGTCACG AAAATATGTT GCCCAAAATT ATCAACAGGG GAAATCATTG GATGAATAAA ATTGTGCAAA CAGAGGAAGA ACGCCGCATA AAACAGCGAA
10231 CAAAAGTTTA CGAAAAAACT TGTGAAGAAT ATTGTCATGA AATTAACGTA TTGAAAGAAA GAACTGACTA TACCCCGGAA TTTGACTATT TTTTAGATTT ATTAGCATGT
10341 CCTTTACAGC CTGACCAACT ACGGAAAAGA GTAGGCCGTC CGCTAATCGG GCTTTTTTGC ATCCAAGCGG CATTTGAGCT GTTTCATGCT TTTGGGGTTG ATCCGATAAA
10451 ACTATGCAGC GGTTCCTATT CAGCGCAGCG ACTATCCGCA GCATATCTGC CTGTGCTTAT GTGTCCCATG CTCAAAGC
```

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts des B_{12}-Riboschalters RS03 in *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	82	344	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Extrazelluläres Rezeptorprotein	
cobT1	54	346	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	nikotinat-Mononukleotid–Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase	2.4.2.21
cobT2	45	350	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	nikotinat-Mononukleotid–Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase	2.4.2.21
orf2	25	292	*Bacillus pseudomycoides* DSM 12442	hypothetisches Protein bpmyx0001-2490	
orf3	45	183	*Brevibacillus brevis* NBRC 100599	hypothetisches Protein BBR47-18120	
orf4	77	211	*Syntrophus aciditrophicus* SB	Glutamat Synthase	1.4.1.13

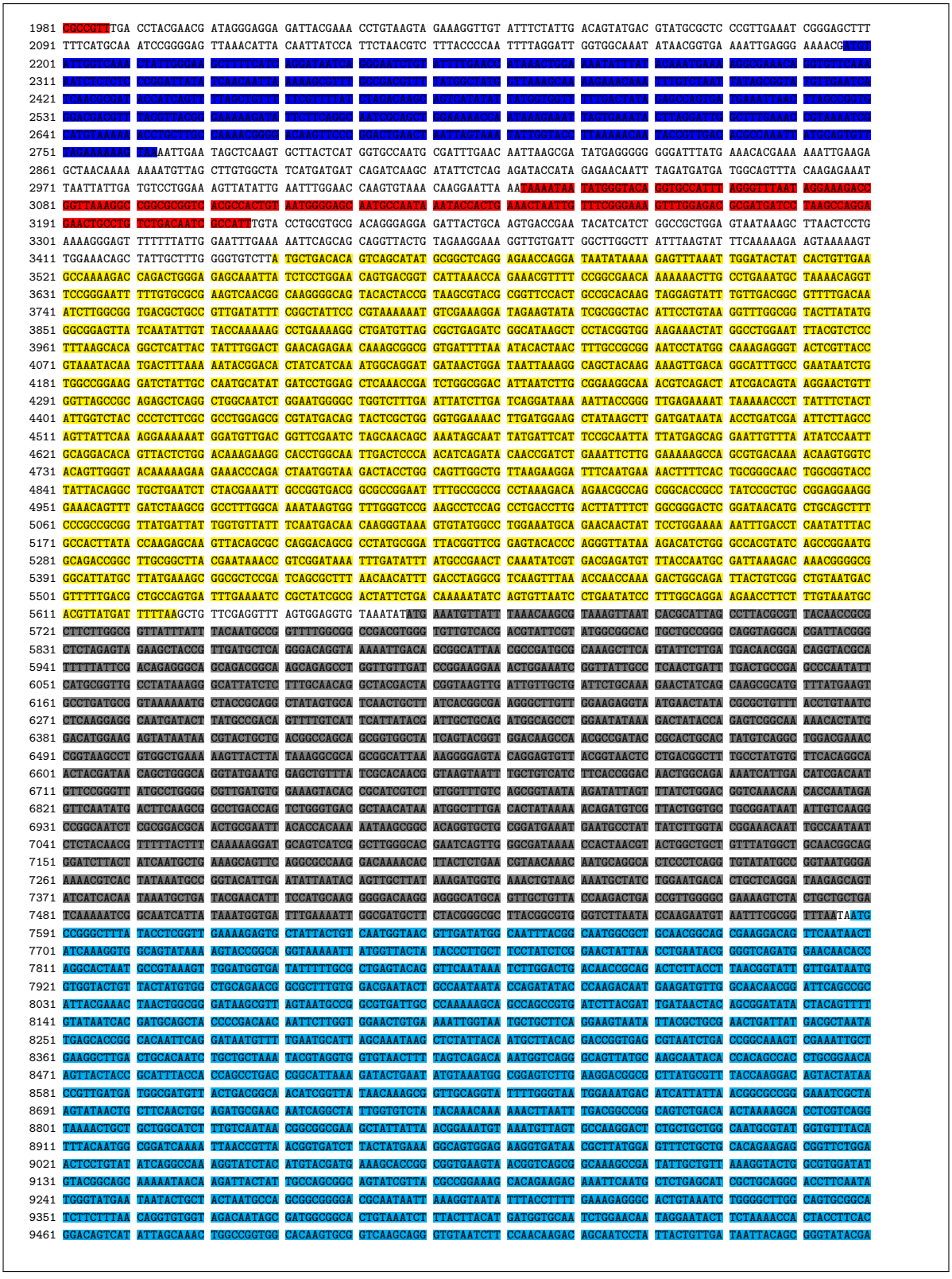
```
   1 TTAAATGAAA TGACTGGTGG TAATGCCACC ATGGGCACCT CGTCAGCCAA TGGTGCCAAG ATGGCGATTA AAGAAGCCAA TGCCAAAGGC GGTGTACTTG GCAAACAGAT
 111 TAAAGCGATT GTTGCTGATA ACAAAAGTGA GCCCTCAGAG GCTGCCAATG CGATGACTAA ACTGGCAACC CAGGATAAAG TTGTCGCTAT TACCGGGATG TTTGCCAGCT
 221 CAAATGCGAT TGCTGCTTCC AGTGTAGCTG AAGCAACCAA AATTCCTTTT CTGGCAGTAG GTGCCACTAA CCCCAAGGTA ACTGTTGATG AAAAAACTAA TAAAGTAAAA
 331 GACTATACCT TCCGGGTATG TTTCATTGAT CCCTTCCAGG GCACTGTTGG TGCTAACTTT GTACTTAATA CCTTACAACT CAAAAAGGCT GTAATCTTAG TTGATAACAG
 441 CAGCGATTAC AGCAAAGGCT TAGCTGCCTT CTTCAAGGAT GCCTTTACAA AAGGCGGCGG TACAGTACTT GCCGAAGAAG CCTATCTGCA AAAAGACCAG GATTTCAAAA
 551 CCATTTTGAC CAAGGTCAAA GCACTCAATG CTGACATTCT GTATGTACCG GGATATTATG AAGAAGTAGG TAAAATTGTT AAACAAGCCC GCGAAATGGG GATTACTGTT
 661 CCCATGGTTG GCGGCGACGG CTGGGATTCA CCGAAATTAG TAGAAATCGG TACTGCTGCG GCCTTAGATA ATACCTATTT TACTAATCAC TATTCTGTAG ATGACACCAG
 771 CGCTGAATCA AAAGCCTTTG TTGAGGCCTA TAAAAAAGAA TATGGCCAGG CACCTGACGC CTTGGCAGTA CTTGGTTATG ATGCCGCTAA TGTGTTAATT GATGCCATTA
 881 AACGTGCCAA CAGCACTGAC CCGGCTAAAA TTCGCGAAGC GTTAGCTGCG ACTAAGGATT TTATGACCGT AACCGGCTCG ACCACCTTAA ATGCCACCCA TGATGCTGTT
 991 AAAAATGCCG TCATTATTGA AATGAAAGAT GGCAAGCAAA TGTATAAAGG CACTGTAAAA CCGTAAACGG TTAATTATAT AATAAGCAGT CACTTAGTTT GAGTGACTGC
1101 TTATTTTTTA TAAGTTTATT GACGGTAGTA ACGCCGTCTG TTATAATGAG CATAAAATTG CACATAATTT TACGGATAAG GTGCCCCCCA GGGGGAGAAT AGGGAAGTCT
1211 GAGTATGGGA AAGACTATAC AATAGGCGCG GGCCCACCAG TGTACCAGGC AGATCTTACA CGGCCACTCG TCAAGGGGAA GGCGTAAGAG TTAATGAACT GGGAGCCAGG
1321 AGACCTGCCT TATACCGCAA CCATCCTTCA TGGACAAGAA GGCTTTTTTG GGCTTAACCA AAAAAGCCTT TTATTTTTAT CCAGATGGAA AGTGGATAAA AACAAAAGAC
1431 TTCTTTTAAG TATACTAGTA ATGGAGGTTA TTATGAGTTT ACTGCAAGCA ACAGTAGCGA AAATTATGAA CCCGGATACA GTAATTAAAG ATCAGGTAAA CACTAAACTG
1541 CGAGGTGTCT TACAGTCAGC AGGCAGCGTG CGGCGATTGG TAGATATGGT TGAGCAGTAT CGGGGAATAA CAGGCGAAGT GAATGCGGCA TTGCGTAAGC GTTGTATGGT
1651 TGTAGCTTCA GCTGACCATC GGGTGGGCAG TCGAGTGGTC AGTGGCTATC CGATAGAAAC TACAATTCAT ATGACAGCTA ATTATCTTAT CTCCCAAGGT CCAAGTGCCA
1761 ATGGCTTTGC GAACTTCTGC GGGGCTGATA TGGTTCTGGT TGATATGGGC GTGGGTGGCC ATTTGTCTTT TGTTCCGGGA CTGTGGCATC TCAAGATTGC CTATGGCAGA
1871 CAGGATTTTA GCGAAGGCCG GCAATGACGC GCTGAGCAGC GCATCGAAGC GCTGGAAACA GGCATTGATT TTGTTAATGA CCGGGTGAAG CACGGCAATC GCTGTTTTTG
1981 TCTGGGAGAT ATGGGCATTG GTAATACCAG TTCCAGCGGC ACCATTGTTG GGGCATTCAG CGGTCTCGGT CCGGAGAAAG TTACCGGGCG CGGCACCGGC ATATCAGACA
2091 GCGCTGTTAA AACGAAGATG GAGATTGTCG TTCGGGCGTT AGCTGTGAAT AAACCGAATG CTCAGGATGC ATTAGATGTT CTGGCCAAGG TGGGTCGATT TGAACTACGT
2201 GCATTAGCCG CGGTAATTCT TGGCTCAGCC GCCAACCGGT CGGCTGTCGT TATTGATGGC GTTAACACGT CGGCGGCGGG TTTAATCGCC TATGTCATTG ATCCTCTGAC
2311 CAAAGAGTAT TTGTTTGGGT CGCACCTGTG CGGTGAACCA GCTCATAGTT TTGCGTTGCC TCAGCTTCAT TTAGAAGCTT CTCTGGAGCT GCGAGTCCCG CTGGGACAGG
2421 TTATCGGGGC TTCTATGGTT GTCGATATGC TCTATGTGGC GATTAAGCTG CTAAATAATA GGGAGGTAA AGCCAATGCT TGAAGAACTA ATTGCAGCCA TAAAACCACT
2531 TGATAGTATA GCGATGGAAC AGTGTCAGCG GCGAGTCGAT AATCTGACCA AACCGTTAAA CAGTCTGCAT TCCTTTGAAc ACATTGCCTG TAAGCTGGCA GGAATTAGCG
2641 GCAATCCCCG GCCACGGGCG CTGGAAAAAA GCATCATTAT TATGGCCGCT GATAATGGCG TAGCAATGGC AACTGACCAA CAGCAGATGA CAACAGCAGC CCGACTGACC
2751 GGCTTCTGCC AGGGGCAGGC GCCCATCCAG GTGTTTGCCG CCCATGTTCA GGCCAGGCTG ATTATGGTGG ATATTGGTGT TGCTGCCGAC CTGCCGCATT CTCCGGCAGT
2861 ATGCCGGAAA AAGCTGGCTT ATGGCAGTCG CAATAGTACC GAAGGTCCGG CTATGACCCG CCAACAAGCG ATACAAGCCA TTGAAGTGGG AGTAAGAATA GCACAAGCAG
2971 AGATTGCGCG CGGCTGCCAG GTGATCGGCT TGGGCGAAAT GGGGCTGGGC GGTTTGGCTG CCGCTATGGC AATTGTCGCC TGCTGCCATG GTCAGCCACT ACCCGGCTTA
3081 GCCGGACGGG AGGCAGAACT TGTCAATACA GCTATCGCAG TCAACCGCCC GAATGCTGCT GATCCACTGG ATATTCTGAC TAAGGTAGGT GGTTTGGCTA TCGCCGGGTT
3191 AGTTGGCGTT ATTCTGGGGG CTGCGGCCGG GCGGGCGGCC GTGGTGTTAG ACGGTTTAGC CACAAGTACG GCCGCCCTGA TTGCTATAAA CCTGGTTCCA GACGTTAAGC
3301 CTTATTTGAT AGGCTCCCAC TTTGCTGCCG AGCCAGCCCA TGAGACAGCC TTGGCATTGC TTGACGTACC GGCCTATCTC CAACTTAAAA TGAACCTGGG AGAAGGGACA
3411 GGTGCAGCAC TCGGGATGTC AGTAATTAAC GCCACGCTGC ATATGCTAAA TGACATGAAA ACCTTTGGTG AGGCCGAAGT CGCTGTGGCG CAGGATGGAC CAGGTGCTCT
3521 GCGGCAAAGC AAGGATGTTA GAGATTAGCA AGCTATAGGT TTACGTGTAG CAAATCTGAA ACCAGGCAAA GACAGTATAA TACTATCTTT TGCCTGGTTT CGAATTTCTG
3631 GCAGTTTTTA GAAATCGGAT GGTGTGTTGG CAAAAGCGGA AGTCAAACGG TAGTGGTGGA GCGTTGTCAA TACACCTCTG TCTGTTAGGT TTGTAAAATC ACAAAGGACA
```

```
3741 CAAAGAGCGC AAAGGGATAA GAAAGGTAGA TTGTTCACCA AATTCTGGCG TGCCCAGAAC TAACCGCTAC CTTTACAAGG GGTCCGTCTC CCTGACCACT GTGTCCTTGA
3851 AAGGAGTTGG TACCATGCAG CTGATAACCG GCCTTCGGCA AATCAACATC TACTTTGCCT GATAATGCCA TAGCCTCTAC CCTAAATGGC GTAGAGACAG CCCCGACATG
3961 GATTGCTAAA TATCCTGATT CACTTTGAAA TACCGCATCA TTAACAAGTT CATTGAGACT GACCTCAACA TGTCCGGAGC TGCTTTCGAC AGTAAGCTTA CCAGTGGTAT
4071 TTTTAAGTTC AACATGACCA GATGAAGCTA TTACGGATAT TTCGTCGGCT TTACAGTTTC CCATTTCAAG CCTTCCTGAG CTCATAGTTA CTTTTAATAG TCCTGTCCCC
4181 AGGGAATCTA TCACCAAACT GCCTGAACTT AGGTGTAAAG TTAGTGCATC ATACTCTTGG GGCGGCAAAA GCAATTCAAA ACTAATTTTT GGCCCTTTGC CCCAAAAGGG
4291 AAATAGCAAA GAATCGAGCC ATTTCTTTTG GTTACCGATT TTAAGATACA AAATGTCTCC CCGCATTTCT TCTTGCACCA GGTCTTCGGT TTGCAAATTA CCAGCAGGCG
4401 ACCAGCCAGA AATTCGAATA GTAGGATAAG CTACATCAGA ACGCAGCACG CGAACATCGC CGGAACTAAT AGCTATTTCC AAGTTTTTGG CGGCTGATGA TTTAACCATA
4511 TACGTATCTG ATATTCTGGT TTGACCGGCA GCCATATAAG TACCATTCCG CTGACCAAAC ATAAATAAGG CGGCATTGCC GCTAAGGCCA ATCATCAAAA CAACAGCCGC
4621 AATGATTGAA ATTTTTTTTA GCACTCTGTC CATCCTTATT TCCCCCTAAT AATCTGCACA TTAAACTGTA AATATTTTAT AAATACCTTG CCAGCCCAGC GAGTTACCAG
4731 CAGCATACCC AAGCCGAGCA GTGTACCAGT CCCCACTGTC ATCATGGATG TAAAAAGCCA CGATAAAATA GCGCCTAAAC CGCTCGGAAA GCCAGCCCTT AGCGGCAGCA
4841 GCGCAGGAAT CAAAATCAAG ACAATAGCGA CAACATAACA AGCAACGAGT ACGCCAACAA CGCCAATAAG CGGTCCTAAT ATGAACACCA GATTTAAAAA GCCTAAACTA
4951 ACCGTAGCAA GTACAGCCCG GACAATAGTA GTAATGGAGA TATTCTCTAC CGCTTGCGTG ACATGATAAT CAGCAAGGAT TTCTTTAGCA ATTGCCTCTG GATTTCCGAG
5061 AGCAGTGGCA ATTTCAGACT CACTTTTACC GTTGGCAACG CCGCTGATAA AATGTTCCTC ATAATCGTAA AGAATATCTT GCCGTTCCTG TGCCGGGATA TTTTTTAGAG
5171 CCATTTCTAA CTTTCCCAAA AAATCCTGTT TGGTCATTCT CCCACTTCCT CTGCAATAAT ACGGTCAACC CCATTGCAAA ATTCACGCCA TTCTTTAATT ATTTCTTGCA
5281 TGTACATACG GCCTGTAGCT GTCAGTCGAT AATACTTTCG CGGTGGTCCC TCTGATGATT CGATGAGATA GGTCTCAAAA TATGCTTCCT GCGTCATTCT GCGCAATAGT
5391 GGATAAATGG TTCCCTCAGC AATCTGAAAA TTTTCCGAGA TTTTATGCGC TAACTCATAA CCATAAGTAT CCTGCTTGGC AGCCAACACA AGCACACACA TTTCCAGCGC
5501 ACCTTTCTTA AACTGAGCAT TAATAAATAT CACTTCCTTT TATACCCATT TACTATATGG TAACACTCAC TATGTAACAA TGCAAGGTAC TAAGCATAAA TTATTATAAA
5611 AATACAAAAC AGTATGGATA GAGAGCAAGA AAACATAATT TTTGGCGGCT GTTCATCATT TAGATGGGCT TGTTTAATTG TTGTTGCTGA AGTTAAGTTG CATTATATAT
5721 GTCATTTATT TATTTTTTCC AGCAAATCCT CTTTGTGGCA AAGTATACAA AATACATCAC AAAAGTGTAC TAGACAGAGA TTAAAAGTAT GTGTATATTA TACAATAGTT
5831 ACAAATTTTA GTTAAGGAGA GGATGGAAGT GAGAAAAGAT AACGATGTAT TAGGAACGAT AAACAGGGGT AATCCTGTTG AATCAGGCTT GTGCACATTA TGCAGGGCAG
5941 ATTGTCACGG CAAATGTGAA ACTTGGCTGT CAAGTATTAG GGGCAGGAAG TTATTATATC CTCGTGACTT TGGTACGATA ACTGCAGGCA GCGGCAATAC CACTCATGTA
6051 GGCGTGTCTT ACAACTCTTT ACGTGTTCAG GGTTATAACT ATGGTGCTCA GGGTTTGCCA AATGGCCTGT CAAACTCACA AGACGATTGT ATATTCCCGA ATGTCAGTAC
6161 CGAGTGCGAA TTTGGTAATG AAATTAAAAC TAAGTCCAGA ATGCCTTTGA TGACCGGTGC TCTGGGTTCA ACGTTTATCG CCGCAAAGTA TTGGGAATCA TTTGCTGTCG
6271 GCGCTGCACT TGTAGGGATT CCCATTGTTA TTGGTGAGAA TGTAGTTGGT GTTGATAAGG CTTCGGTCAT GGGCAATGGC AAAATAACTG CAGCACCGGA GCTTGATCGG
6381 CGGATTGACT GCTATTTACG TTACTATGAC GGTTATGGCG CGATCATTGT GCAGATGAAT GTTGAAGACA CTAGAAATGG TGTGGCTGAA TATATCATCA ATAAATATGG
6491 CGATAAAGT
```

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts der B_{12}-Riboschalter RS04, RS05 und RS06 in *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
orf1	36	265	*Photorhabdus luminescens subsp. laumondii* TTO1	Hypothetisches Protein plu2216	
luxR	29	144	*Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01	Transkriptioneller Regulator der LuxR-Familie	
btuB1	42	539	*Dialister invisus* DSM 15470	TonB-abhängiger Rezeptor	1.B.14.3.1
btuB2	33	642	*Selenomonas noxia* DSM 15470	Hypothetisches Protein	
btuB3	45	367	*Selenomonas noxia* DSM 15470	Hypothetisches Protein	

```
   1 GCTATGCCAT AACTATTCCT TTAATTACTA TTTCTATTAA AAGTCTAAAA ACGCTAGTAA CTTCTTCCGC CAAACATGCT CAAGAAGACC GCACTGCTAT GATGCAATCA
 111 TTATTACCAG CCTGGGACTC AATTTTAATT GGCAATCAAT TAAATATACA TTTATGGAAA AATTATTTTA TTGATAAATA TAAAAATGCA AAAAAGTCAG CTTTGAAATC
 221 TGTACTTTTT AGTGAACTGA CAACCATAAT TTCAATGTTT CTTAACTTAT TTCCGGTAAT TGGTACTTTG GTGTGGTTAA TCTACCAAAA TATAGGCAAT GAAGTATTCC
 331 TAAGTATGCT TATTGTTACA TTTCCACGAC AAATTACAAC ATTTCAATGT ATGAATTTTA TTGTATCTTA TGCAACGCAT TGGAATAGTT TAAAAACGCG CCTTGAGGGA
 441 TTAAAATCAG CCTTAATTAT TACAGAACCC ATAAATGTTG GCACTATTTC ATGGAATCGG ATTAAGGCTG AAAAAGACAA TACGATTATT ACTATTGATT CTATTAATTC
 551 CATACAAGAT ATCACTCAAG ACTATAGTCC GGGAAGAATT ACTTTACGAG GAGATAATGG TACAGGAAAA TCGTCACTTC TTGCTCTAAT AAAGGAAAAG TTAAGCGAAA
 661 AAGCTTTCCT TTTGCCACCT CATTCTGATA TGTTTTTTGA ATTCAGTTCT AATAAAAGCT TATCCACTGG CGAAAAAATC ATAGAATCAT TAGATGAGAT AAAAAAAAGC
 771 GGTAAGCTTC AACTACTATT GTTAGATGAG TGGGATGCAA ATTTAGATAA AAATCACATT GTTAATATAT CAGAAAAATT AAATGAACTC GCAAAAGAAA TATGTATTAT
 881 AGAAGTACGT CATCGAAGTT AGACAAATTA AAGACTCCTG TCTAGGCAGG AGTTTTTTAA TTATATTGGT GATATGGAGA GGGATGACTA ACCCATCCCA ACTGTGTCCC
 991 AAATTTGGAA AATTATTTTA CAAAGTTAAC AAATATTGAT ATAATCAAAT CATAAACTAA ATAGTAAATA AATATTGTTG GGATAGGTGC CCGAAAGGGG TTAATAGGGA
1101 AGTCCGGTTA GATGCCGGCG CGGTCCCGCC ACTGTAATAG GGAGTGAATC CAAGGTATAC CACTGAGACG TAATTGTCTT GGGAAGGTTT GGATAAGCGA TGATCTAGAG
1211 CCAGGAGAAC TGCCTGTCTG TCAATCACCG TTTTCACCC ACGAGCGATG GGGAGGGGAT TACTGGATTA ATCTAACCTT CCGGCTATTT ATTATGCCGG GATTTTTATC
1321 TTAGTACGCG AGTCAAGACT CCCGCTGCTA CTGGCGCGCT GGTTCAGATG GAGTAGATTC TCCACCTGAA TTTCCGATGT TTCAGCTTTG CTGAAATGAG TTCACTTAGA
1431 TAAATCTAGA ATACAACCCT CCCTTGTAAG CTTACAGGGA GGGTTGTATT TTTTTCTTAA AATGCACAGA GAAGCTTTTA GGAGAGGAGA ATCAGAATTT TGCTAAGAGT
1541 AAGAAGGGAG TTGAGGCTAA TGTGAAACCG GGATGGTCGA CGGCCCGGGC TGGTAAATGA TTAAGAAATT TCACAAAATA CCCTCAGTTG AGGGATTTAC GTTCCAAACT
1651 AAATAGTCTA ATCTAAAAAA AGGAACTGCG TAGTGTGTAT GCTTAAAAGC AATTAATCTC CTAACACTAG AAAATAATGC AGTAACTCCA AACAAAAAGA AAATATTGCT
1761 GGGATAGGTG CCTGACGAGA GGTTGCTGAA AATATTCAGA CGCAAAGATG TGTATTTTCG TAACAACATG TAGGGCTTAA AAGGGAAGAC CGGTGAAAAA ACCGGCGCGG
1871 TCCCGCCACT GTAACGGGGA GTGAATCCGC ATAGATGTCA CTGGAGCATA GCTTTGGGAA GACGCGGGTG AGCAAAGATC CGGAGCCAGG AGAACTGCCT GTCTAAGAAT
```



```
9571 CTATACTATA CAGCCATGAC GCCACTACGC CAACAACGAT TATCGGCGGC GACGTGAAGA TTACTAGTGC GGCAACAGGA AGTAATATTA CGTTGCGTAC CGATAACACC
9681 GGTTTGAATA CTTCTTCAAC CTTGGCTGCG GATAAGAATT TGGTCAGCAC CAGCCCGGGC CGTCGACC
```

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts der B_{12}-Riboschalter RS07, RS08, RS09 und RS10 in *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
orf1	48	154	*Dialister invisus* DSM 15470	putativer Autotransporter	1.B.12
crgA	35	232	Petunia Vein Clearing Virus (PVCV)	ORF I Polyprotein	
crgB	29	177	*Dialister invisus* DSM 15470	konserviertes hypothetisches Protein	
btuB4	32	741	*Fusobacterium mortiferum* ATCC 9817	Autotransporter Beta-Domäne	1.B.12
btuB5	55	831	*Selenomonas noxia* ATCC 43541	TonB-abhängiger Rezeptor	1.B.14.3.1
mcpA	96	433	*Sporomusa ovata* H1	Methanol-induziertes, Cobamid-haltiges Protein	
orf4	35	134	*Coraliomargarita akajimensis* DSM 45221	Valyl-tRNA Synthetase	6.1.1.9

```
   1 CTGGCTGGGA GAAAAAGGCC ACTATGCTGA TGTTATTCTG CGCGGCAGTA AAGTGAAAGC CGATTATACA GTATATAATG ATTACGGCTA CAAGCTTAAC GGTGATTATG
 111 ATACAACAGG AATGGCAGTA AGTGCTGAAT ATGGACGACG TATTAAGACT GGCAGCAAAG GCTTCTATTA TGAGCCGCAG GTTGAATTTA CCTACAGCCG GCTGGGAAGC
 221 GACAGTTATG ACGCCCACAG TGATTATTTG GGAGGCACTG ATCTGCATGT AGTGCAGGAT AGTTTTGACA GCCTGATCGG GCGCATTGGG ATTGGCGCTG GAGTTCAGAA
 331 CGAACGCAGC AGCGCCTTTG TCAAGGTATC GTTGCTGCAT GAGTTCCTGG GAGACTTTGC CACCAGCTAT TCGGCCTCCG GCGAGCAGTC TAAAAGCACA AGCGCGGACT
 441 TTGGTGGTAC CTGGGTCAAT CTGCAACTTG GCGGTACAGC TAAGCTCAGT AATAACAGTT TTGCTTACGC TAATGTTGAA AAATCATTTG GCGGCGATGT CAAGATGGAC
 551 TGGCGTGCTG ATGTAGGCTT TCGGTTCACC TTTTAAACACA CTGTGAATAT GATTAGAGTT GTTGAAATAA AAAATGTCGA AATAAGCAGA ATGAAATTCC GTGACAATTA
 661 TAACCATTAG TGCTAGAATT AAACAATAGA ATGAAATATA AGACAAATAC ATAGCGTAAA GGTACAGGTG CCCGCAAGGG CTTCATAGAA AAGCCGGTGA AAGACCGGCG
 771 CGGTCCCGCG ACTGTAATGC GGAGCAATGC CAAGAGATAG CACTGGGATA TAAGTCCTGG GAAGGTTTGG CTGCGCCATG ATCCAGAGCC AGGAGAACTG CCTGTACAAC
 881 AATCACCGTA GACCTGCGAG AGATGGGGAG GGGATTTGAT GAACAAGCAA CTCCCTTTGG TCGTCACAGG GGGTTGCTTG TTTTAGTTGC AATAGGCTTA AAGGAGGTAT
 991 GCCTATGATT AAAGTAGCAA ATATTGATTT CGTTCAGCTC CACACGGCGC CTGCCAGTGA CGGGCAAGCC CGCGATCAAA AAAATCGTAC TATGGGGGGC AGAGGTGTTA
1101 GCGGAAGTGC TAAAAAACCG GATGAGCTTA GCGAAGACCT TTTAAACCGG TATTTGTATG TGATAACAAT TTTCAGTCTG TTTTTGCCCA TTGTCGCCAA TCCCCTCGAT
1211 TTTAATCAGT ATTTTCTTTT TATTTTCTGG TATTCGTTAT TTAATGCCAT ACATGTTGAC TCACAACAAC CGCGGGTCAT AAAATTTACC TCCGAAGATT TATATGCCGT
1321 CTTGATACTG TTCTTCAAAA AATATTTTAC TAACAATCAC TATCGGCTGC CGAATTAGTT TAAACTAATT CGAAATCTGA ATGATAGCAA TGCATTTACC CAACAATTTA
1431 AGGAACAATG CCAGGAAGAA CGCAAAAAGC TGGATTATTA TCGCGGTAATA GAATACCTCA ACGAGAAAAT ACTTGGTAGAA TTGGTTCCTC CGATACCATC AATCAAAGTA
1541 CATCCTAAGA AGCTAACAAC CATCTTATAT AAACTTTGTC ATTTAATCAC GCAAAGCAGT CACAACACAA AAATGCAAAA TGACGTGGCC GCCGGTGAGT CTGGTCTACA
1651 CGGAAAGTGC TTTGAACCTG CCGTCCAGCC GCTATACCAA TAGGAAATAT AAGACAGATA CATAGTTAAA GGTACAGGTG CCCGCAAAGG CTTCATAGAA AAGCCGGTAA
1761 AAGGCCGGCA TGGTCACGCC ACTGTAACGG GGAGCAATCT CGCATAGTTG CCACTGAAGT AAATCACTTT GGGAAGGAGC GGGAAAGCCA TGAACCGGAG TCAGGAGAAC
1871 TGCCTATTTG ACAATCATCA TTTTACCTGC GAGTGACAGG GAGGGGATTG TATGCGGATT ATTTGAAAAG GAGCGGAGAA TGGGAAAAAA AATAATCGTA TTTTTTAGTG
1981 CTTTTCAGTA TAGTGCCATT TTTGTCTGTT TATGCTGCCG CAAAAGCTGA AGAACCTGCA AGGGGAAGCT GGGAGATGAA GATTTCACGT GAGAAGAAAC TAACACCGGA
2091 GGAGGAAGAA AGAGAGCGCT GGGTAGGAGT ATTTGCCAAT GATATAGGTA TATATATGTT TGATTGCAAA TCTCTGGCAA TGGTTGAAAA TGAGAAAAAT AGTGTCAATG
2201 TTCTTGTGAG AACGATATTC ACCAACTCCA AGGTTGTTAC TCAATTGAAT GAACAATACA AAGCAAAACT CAATGCCGAT GATAAGGTAG GCTTCAGCGA AATGCTGATG
2311 ACCTTTAAAG TCGATAAAAG AAAGTATGTT GTTAAGGAAA CCAAAGTTTG CAGTGCGCAA GGTGTTTTAC TGGAAGAAAT AAAAGCAAAA GAAGCAGTTT TCAAGGAGGT
2421 ACCGGTCAAA ACATTTGCTG ATTCTATGTA TGAAGTAGCA AAGGCTTTTT CGCGGAACCA GTAATGAACG GATTTTGTTG AGGGTAAGAA CCTAATTTAT CATTAATGTA
2531 AAAAACAATT ATTAAAGGGG CTTAGCGAAA GAAAATAAAT CGGTATTTGT ATGTGATACT AACAATACGT GTCGTGAGAA AAAACAGAAA AAATGTCGAA ATAAGCAGAA
2641 TGAATTTGCG TGACAATGAT AACCATAAGT GCTAAAATTA ATTAAAGAAG GAAATATAAG ACAAATGCAT AAAGCAATGG TACAGGTGCC CGTAAGGGCT TCATAGAAAA
2751 GCCGGTGCAA GACCGGCGCG GTCCCGCCAC TGTAATGGGG AGCAAAGCCA AGAGATGCCA CTGGGATACA AGTCCTGGGA AGGTTTGGCA GCGCAATGAT CCAGAGCCAC
2861 GAGAACTGCC TGTACAACAA TCACCGTTGA CCTGCGAAGA TGGGGAGGGG ATTTAATGAA TAACCAGCAG TAACCCCCTA TGACATACAA GGGGGGTTAT TTTATTTATT
2971 GCTTGTTACC AGGTGGGACA AGCAATCGAC TTACCAACAA CAGCATAGCA GATATCACAG GATATCGGAA TAGGTGCCCT TCGGGGCTTA ATAGGGAAGC CGGTTAAAGG
3081 CCGGCACGGT CACGCCACTG TAACGGGGAG CAATCTCGCA TAGTTGCCAC TGAAGCCAAT CGCTTTGGGA AGGCGCGGGA AAGCCATGAA CCGGAGTCAG GAGAACTGCC
3191 TATTTGACAA TCACCATTTT ACCTGCGAGT GACAGGGAGG GGATTACGTA AGGTTACCAG CCCTAAAGGA GCTGGCAGCT TAGCGTAAGC ACTCCCAATA TGGGAGTTTT
3301 TTTATTTTTC TCGATGACAC CAACGTCAAA GACCTGCCGC CAACAGCCAA AAGAGCCTAC AGCGCTAGTT AACCAAGCGG CACTGTTCCC TTGGGGAGCA GCGACCGAAT
3411 GTACTGAAAG ATTTGCTATC CAGGGATGAA GAGCAAGAAC AAAGGAGTGT TCTGTTTTGA ACCATATTTA CAAAGTCATT TGGAACCGGA CCCGTGCCTG CTGGCAGGTG
3521 GTATCCGAAC TGGCCAAAAG CCATGGCAAA ACCCAATCCA GCCGCCGGCG GCGGCGCCTG GCCGGCGCAC TCCGGCAGGC CGCCTGCACA ACCGGGCACA ATCTCCGGGA
3631 TTTTCCGGCC GGCCAGACTA GGTCCTGCCG GAAACTGGCG GCAGTCATGA CCGTGCTGTT CACCTGCTCG CTGGGCGGAG GGATGGCCGG CGTGGTATAC GCCGCCGAAG
3741 GGGAAACCAC TGCTACCGGG GTTCTGAGCT ATGGAAACCT TGGCGCTGAT GCTCAAAATA TTTTTAAAAA TTGGCAGGCC GGGAAGGTAA GCCAGCCTGG AAGCTATTAT
3851 AATCCCATAG TTATTAGTAG TACTGCAAAA TTTGGTTATA CCGACAAGGA CACTGGCGTA ACTACTGTAC CAAGAAACTT TACTGCAAGC CGCATAACTC CGTTTATAGA
3961 TGCTATTAAT GCCGATTTGT CAACGAATTA TAACAGTATT GTCATTGTCA TCCAATTGCC GGGCGAGTCT GCACCAAGAA CATACACCTA TCCAAAAGGT ACTACCGTTG
4071 ACTATAACTC AGTAATTACG ACACTTAATA CTTATTATTG GCAAAACTTA GATATTGCTA AACAAATTGC GGCAGCAACA CAAAACGGCG ATACCGCTGC GCTGCAGCAA
4181 CTAATCAGCG CTGGACTTCG GCGCTTCTAT GTAGCCGTAG ACGGCGATTG GCAAAATGGA ACCCAGTTAA GTGTGCCGTC TGGTGTTACT TATGCTCAGC CGTTTACCTT
4291 GGCCAGCTAT TCTCCTGGTC TACATAGTAC CACCATAGCG ACTTCCACCA CGCCTTCGGA TTCAAGTTAT TCTTTTTCTT ATCAAAACCA GACCATCGCC GAAGACGGCG
```

```
4401 TTTGGCGCCC AATGGATCGT CTGGAAACAA CAACCACCGC CTCCCTGCTG TCTGGCGATC TTACGGTTTA TGCCCAGTGG ACAATTGACA GTAACGGGAA CCTAGTTGCC
4511 GTTACTGACG GCGGCACGGT CATGGCTTCC AATCCCAGCG GCACGACAGA GGTGATAACC GATCCCACTG TCATCACTGT TAAAGACCTG ACAGCCGGTA AAAACGCTAC
4621 CATCGACCTG TCGTATTTGA ATACCCATTA CGATGTGAAC GGCAATTTTA ACCCCTCCGA CTCGATCGTG AGCTGCGATA CCATCAATCA CTACGGTGGC GCTTTCCGCG
4731 GTTACGGCGG CACCTATCCG GTCAACCTCA ATGGCAATCA ATATCAGCGG TCCATCAACC GATACTTGCT GGTTAATAAG GCCACTCTCG CCGACGGCAC CACCTTACGT
4841 CTCGGGCGTT ATGGATTAGA AAAATCCACT GCCGAGAACA AGACCACCGC CGTGGATAGC GCATCTAAGA GTGATTCGGT TTATATCGCC AACGCCACCA CCGCGGACGG
4951 CCATGCTAAC CTGTACGTCG AGCTGGGTTG GGTGCCAGGG GTCGGTACCA CCAGCCAGGG CGAAGCAACT TGTGGTGGTA TACTGCTTGG CATCCTGAAC GGCGCGGAAA
5061 ACTTTACCGT GACCGGCCGA ACCTCCCTGG CTGACGGGGT CTTCAGCCAG TATGAGATCA CCCCGGTCAT CAGCCAAGTG GACAACTATT TCAATATTAG CGGCACAAAG
5171 GATGCTAGCG GTTTCTTGCT CGGAGAACAA GGCACCGTCT GGCAGTTGGA CAGCTACAGC TACCTGGACC TTAATACCGC TTCGGAGTCC GGCCGGTCGG CGGCCGATAA
5281 TGCGGTGGCC ACCAACAACC TGTGGAAAAG CAACTATCTC AATTTGTTCC GCCGGGCAGG CACTCTCCAG CGCCGCGGCT ATTTGGGGGA ACAGGACCAG AAGGAAAACG
5391 TCTGGGCCGA GGTCTGGCAC GGCAAATACG ACAGTGCCTC CGGCTACGGC CGCCGGCTGG ACCAGACCTA CAACGGTGTC CAGGTGGGCT ATGACAAGCT GCTGGACACC
5501 CGCATCGCCA ACGGCAAAGT CTATAACGGC TTGTATCTGA GCAAAGTGAC AGGGGACACC ACCACCGCCA CCGGCGGCGG TGACCAGGAC AGCGGCGCCA TCGGCGTGTA
5611 CGCCGCCTGG GTGGGCGACA AGGGCCACTA CCTGGATGCG GCCTTGCTGG CCTCCAAACT CAGCAATAAC TACCACCTGA CTGCCAACAC CGGCGACGGC ACCATTGGCC
5721 GGGTCACCGG CGACTATAAG ACCTGGGCCT ATGGCTTGGG CCTGCAGTAC GGCTATCAGA GCCCGGTGAA AAACGGCTGG TTCTGGGAAC CGTCTGTCGC CCTCTTCGCC
5831 GGCCGTGTCA ATAGCGCCAG CTACAGCCTC AGCAACAACC TGGGGATCCG CCAGGACAGC TATGACACCG TGACCGGCCG GCTGGGACTG TCGGTCGGCA AAGAGCTGGC
5941 AGCAGGCAAG GGCAATCTCT ACGCCGGCAT TGCCGCTTTG CATGAATTCG CCGGCAGCAG CTCCATCAAC TCCTTTTACG GCACCCAGCA GCGGCCGCTT GATACGGCCG
6051 GCGGCAAGGA CACCTGGTGG GAATTCAGCC TGGGCGGCAA TATGAAGATC TCGCCCACCG GCGCCTTCAA TCTGGACCTC ACTAAGACCG CCAGCGGCAA TAACGGCAAT
6161 GACTGGAAGG TGAACGGCGG CTTCAACTGG ACCTGGGGCG GCTTCTGGAG CGGCAGTAAG GCCGCCGCCC AAGACCAGGC CGCTAAGCAG GACATTACCG CGTCCCTCAC
6271 CGTCCCAACG CGCCGTAACG CCACCGTCGT CGTCGGACAA GCGCCGGCAG CGCCGGTGCA GGCAGTAACG CAGCTACCGG CTGACAGCCG GACAGTAACC GCACCGGACA
6381 GTCAAACCAA TCCGGCCGCC GGCCAAACAA CAGCGGCAGA GGAAACCGCG CCAGCAGCCG GAGCCGATAT ACCGGCCGGC AATAACACAG CCTCAGCCCA GCCGGCCGCG
6491 CCGGAACCTG CCTCACCGCC CACCGTGAAC ACCGGCGGCT ACACCTTTGG GCCGGTCACC GTCGAGGCCG CCCGTCCCGA CTGGGAAAAA CAGCTTTCCC CCGGTCAGGT
6601 CAGTGTTATC TATCCGGATC AATTTGCCGG CGAGCAAAAA GACCTGCCCA ACCTCTTAGA GCGGGTGCCG GGGCTGTTTG TCCAGCGCGT CAGTGGTGAC GGCCACTATA
6711 CCGTCGCCCG CGTGCGCGGC TCCACCGGCG CCCAGGTCAA CGTCTATGTC GACGGCGTCC TGATGAACCT CAACGGCGAC GCCGCCGTTA ACCTCTCCAC CATCCCGGTC
6821 GATAACGTCG AGCGGGTGGA AGTCTACCGC GGCTATGTCC CGGCTCGTTT CAGCGGCTCG CCCTTAGGCG GCGTTATCAA CATCGTCACC AAAAAACCGG ACAAAGTCGG
6931 CGGCAGCATC AGCCAGGGCG TCAAATCCTA TGGCGGCTAC ACCGGCAACT ATCAACTGAC CGCGCCGGTG GGCAGCGGCA GTCTCATGGC CACCTACCAG CGTGACATCT
7041 GGGACGGCGA CTTCCCGTTC ACCATAAAGC CCGAAACCCT TGCGACCAAT AAAGATTTCG GCGATGCAAA CCGCCGCTCT AACGGCTACA AGAACAGTAA CGGCATGGTC
7151 AAATGGCAGG ACGACAACTG GATGGTCAAA ACCTCCTGGA AGCAGCTGCA CGAAGAACTC CCACGCCCGG TTAATAGATT GGTTCCGGAT AGTTTTTCTG GCAATTATCA
7261 TTATAGGGAC TATTATGCAG GGTTTTTTGA TGCCGAGCAG GATATTGACC AGAAGGAATT CCAGATCGGC TGGCCGGGATA CCAAGGGTAG CCTGGATTGG GGCTGGAAGC
7371 TATATTACCT GGACAGCAAG AAAAAATACC AGGCAGTCGG CCTGTTGCGG GCCGGCTACA CATCCAGCAA CTTTACCGAT TATCCGGGCT ACTTATGGAG CGATTACCAT
7481 TCCAGGAAAT ACGGCGCCAA TCTTAACACA GCCCTGAAAA TGGGCGCCAG CCATCTGCTG GAATTCAACT TCGACTACAG CCATGAAACC ATGGATGCTG ACGGCAGCAA
7591 CTGGGATACC TTTGACGACA GCATGGCTAT GCTGCACCGG AAGTTTATCC ACCAGTACAA GATCAAGGAA TACCACCTGA CGCTGCAGGA TGCCATCGCC CTCAACCGGG
7701 CGGGCGACTT CAAGCTGATC CCGGTACTGC GCGCCGACAA GGTGGAAATG GACACCATGG CGGAGAATGA TCAGAAATGG CAGTATTCCG GCGCGGTTGC CCTGCAAAAA
7811 CAGCTCAATG AGCACTGGAG TGTCAAGACC AACTGGGGCA CCTACAACCG CCACCCCAAT TTCTATGAAC TGTTCGGCGA CGGCGCGACC ATCAAACCCA ATAAATATGC
7921 GGCTAAATAC TTCGACCTCG CCGGGCACGG CACCTGGGAA AGCGGCCACC AGTTCGATTT CAGCCTTAAC TGGCAGGGCA AAATGGCTAA AGCCGATACC GATACCGTCC
8031 TGACTTGGTT CCAGCGGCGC TCGCAAAACC AGTTCGCCCT TTGGCAGCCT AGTGTCCCCA ATGCGCCGGC CACCTATTTT CCGATGGACG ACGCCCGCGT GCACGGCCTT
8141 GAGCTGACGC ACAATATGAA GTGGGATCGT GTTAGCCTCA ACCTGGCCGG GACCTGGCAG AAATCCGATT ACTCCGGTTA TACCATGAAT GGCGTTACCA ATGGCAGGAA
8251 ATCAAATATC TCGTACACGC CGGAATGGGT CTGGAACGCC CGGCTGGATT ACCGTTTCCC TGGTGACAAA CTGAACGTCT TTACCGAATA TACCTACACT GACAAACAGT
8361 TCCTTGGCTC AGTTGAAGAC GGTGATAGTT ATTATATGCA AGCGTTGTCC ACCGTTGATC TGGGACTAAA ATATGCTTTT GATAAAAACT GGAAATTGTC TGCCGGTGTC
8471 AATGATATCT TCAACAAAGG ATACGAACTC AGGCAAACTT GGGGTGGTTA TCCTTCCACT CTTTCCTACC CGCTGGCCGG TCGTATGTAC TATGCGACCA TGGAGTACAA
8581 ATTCTAAGCG GTGCAAACTT CTGCCTTGCC GGGAAGCAGT GCAAGCGCAG GGCAAGAGTT TTCCATAAAA AAACGGTAAG GAGGTGAGGC CATTACAAGT AGCCGGAAAG
8691 ACAGGGTGAC AGGCTTGAAT TTTCAGTAAT TGGGTAACAC AAAATTTATG GATGAGGTGA TTTTTATGTC AACACTTGCT TGCGGCGTAA TTAATGCTGC TTATAATCAG
8801 GGGATTGTCA GCACGGTAAA TACTTTGGGG GCTCGCGGCG TGCCGAAAGT TACGTATATT GATGTTGCAG GTACTCATGA GACTATATCA GGCGATCCGC GTGTACTGGG
8911 ATATAAATAC AACAATGCCA ATTACGCTAT GGTTGCCGCC TATACTTACA CTACGCTGGG AACGCCGGGG ACAGCGCGTG TCGCGCTGTT CAGCATTGAC TCCTCCGGCA
9021 ATTGGACACA GCTTGTCCAG AAACCCAGCG CCGAATGGGG CTTCAGCAAT CCGTACGGGT CTGGTGATAT CGATAGCAAT CTGTATGTGC AGGACTATGA TTCCGGCGCC
9131 ATCACCGTCG TCAACCTATC CACCTATGCA ACTTCCACGG TGTATACCAT GCCTTCGGTA ACCAGCGGCG GAACCATCTA TCTTCCCCAC GGCAACGGCC TGGATTATCA
9241 TGCAGATTAC GGTTTGGTTG CCATTTACAG CTTTTTGCCG TCAGGCAGCT ATAGTAACTA TTATGCTTCC AAACTGGCTA TTGTGCCAAC CGACGGCAGC ACTGCGGATG
9351 TGGTTTCCGG TTTGAACAAT AACGTCGTTT CTGTAACGGT GGATAGCAGT GGTATTGCTT ATGTCACCTC CATCGGCGGC GCGCAGCAGG CCGGCGGCAA TTCGGCTTCC
9461 AAGATCGAAA CAGTAAATCT TAGTACGCTT GCGTTAGGAA CCACACCGGT GACGATCTCC GCACTTCCTG CGGGTCAACA AAAAGGCGAT TTCGTGGATG TTGCTTTCTG
9571 GGACAGCGCA GCCTATGTGC TGCGGGCAAA TTATGATACT AATTATTCAG AGTATTCTTA TCAACTGTTC AAAACAGATG GCACCAGCCT GCAGGGAGGA ACCCTTGGAA
9681 CCAATACCAC AGGTCCATTG ACGGCAACTC CGGCCGACGG CACCTGGCTG CTGGCTCCGG CTGTTGATGC GCTCTGGTTT GTCAGCGGCA GTGCCGCCAA TATTGTCGCA
9791 AGCGGTAACT TGAGTTCCAC TTCTGTCACG AAGAAAGCCG ATCACACGCA GTATAGTTCC GCCAATCAGG GTATTGGCGA TGAGAATTGC CATAGTCATC TGAACACCGC
9901 TTCTGTGGTT ATTAATATTG CCGATCAGGC GGCCAGAGAC GCAGGCGCAG ACGCCGGTGT AGCTGCCACC CGCACCAAGG TGGCCTTCAA GTTCGTACGT CCGGAAGAAC
10011 TCGAAGAACA GGCCAAGGCT CAGACTGCAG CTGCCAAACA AGAATAGCGC CTGAACAACT GCTTGGTATT CCCTTGGTTC GGCCTGGACG CAGCGTCCAG GCCGAACTAT
10121 TCTCTAGTAC CCTGCTTCCG GACTAATATC GAGAGCAAAT ATAGGGAGGA TGCGTATGAC CCAGATTGAT GAACTGCAAC AAAACCTCCA GCAAAAAAAA GCCGCGCTGA
10231 CGCAGCTAAA GAGCGACAAG GCTCAGGTGC TGCAGCGGTT ATCCGAACAT ACTCAGCTTA TCGGCAGCAC CGTCCAGGAC GGGCCGCTGC AGCTGACAGC AATGGCCGCC
10341 GCTGCCGGGA AGGCAGCAGA CACTGAACCG GCTGTGGAAA CCGCCAGGAA ACACGTCAGG CACAACGCGG CCAGGGCCAT CGACCTAGTG GCAACCATTG GCAAACTGGA
10451 AGCGGAAATC GCCGGACTGG AACAGCAGCT TGACACGGTC GGGCTGCCGG AGAAAAAGAA AAGCGTTCCC AAAAAGAAAC CGGCGGCACC AGCCCGGGCC GTCGACCACG
10561 CGTGCCCTAT AGTGA
```

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts der B_{12}-Riboschalter RS11 und RS12 in *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
ompH	36	158	*Acidaminococcus fermentans* DSM 20731	Chaperon Skp, äußere Membran (OmpH)	
btuB6	54	951	*Fusobacterium sp.* D12	Vitamin B_{12}-Transportprotein BtuB	1.B.14.3.1
orf1	38	123	*Dialister invisus* DSM 15470	konserviertes hypothetisches Protein	

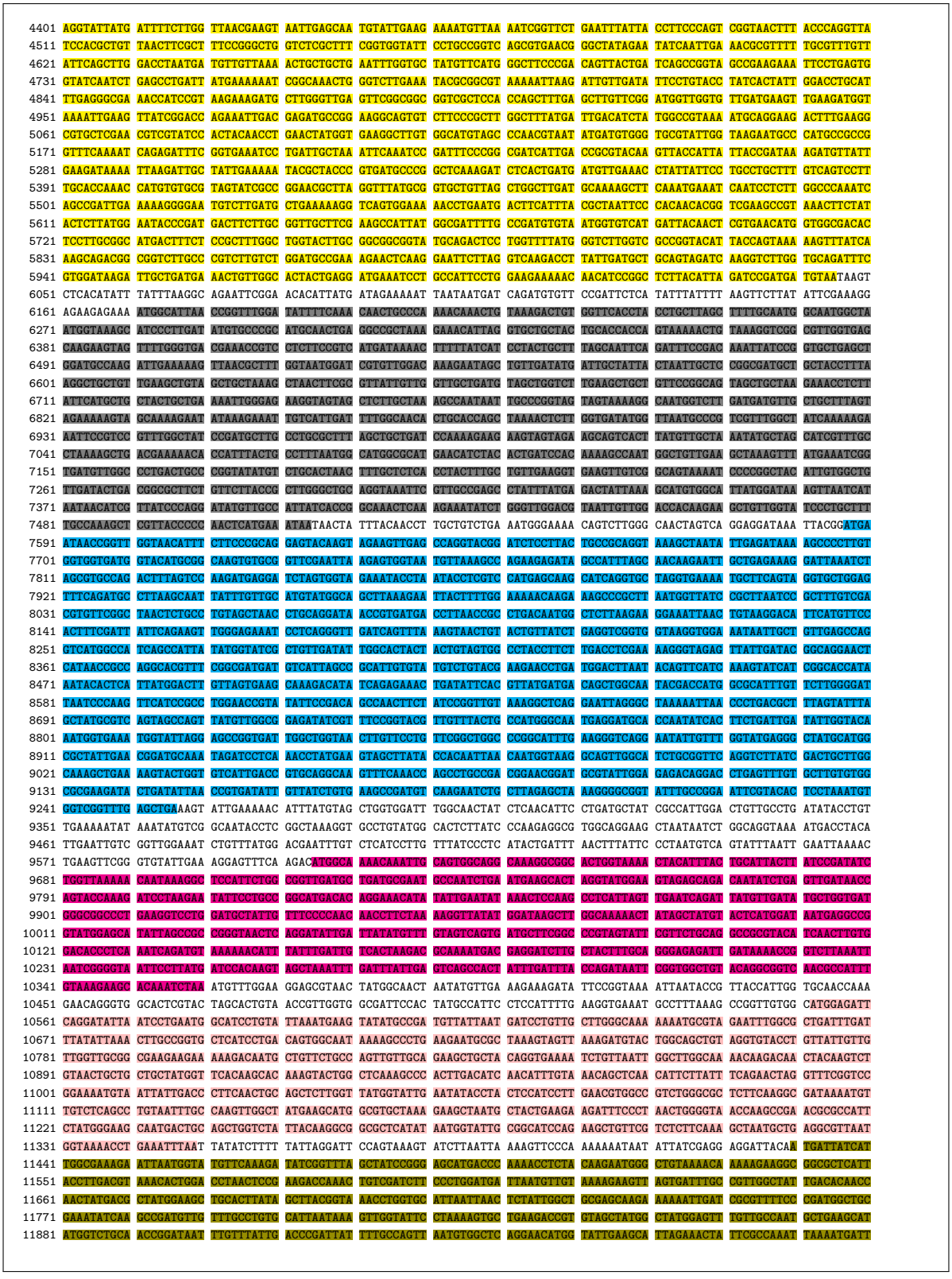
```
   1 GAATAGTTGC TTCAATGAAA ATTATTTTTG ACGAAAATTT GCGCCAGGTG CTCCTTTTCG GTTCTTATGC TCGCGGTGAT CAGGAAGAAT ACTCCGACAT GGATGTAATG
 111 GTACTAGTTA ATCTACCGAC GAGGAAGTAA AAAATATAA TGATGCAATT ATTGATCTGA TGTCAGACAT ATTGTTAAAA TATGGAGTAT TGCCGACTAT TATAGGTAAA
 221 AATTACGACC ATTTTTACCA TTGGGTTCCT TATCTGCCGT TCTACCGAAA TGTACGAGCC GGGGGGATTG AATACTATGC AAGCTGAAAT GCTGGAGTTA TCCAGATAGG
 331 GGAAGACTCA CGGGGACGGT ATTATTAAGT CTGGAATTGC AGATCAATTT CCAAAAGTAA AACCCCTCTC CTTGTATTTC ATCTTAGTAC GCGAGTCAAG ACTCTCGCCT
 441 CTACAGGCGG CGTTAATTCA TGTGGAGTAG ACTCTCCACA TGAATCCCCA ATGTTTCAGC TATGCTGAAA CGAGTTCACT GACTCAACGT AAGACAATGG ACCGTGTTAG
 551 CGGTTTATCT TAAGGTGTGA GCAAAAGGGA AGCAAAAATG ATAGATGCGC CTGGTGCTGC TTGATCTGCA GTATCGTAAT TTCCGGCAGC GGCTGATAGG TGTCATGAAA
 661 AAAAGCAGGG GGAAAATGTC GAAAAAAATA GGAAAAAGAC GAAAGGAAAT GCACGACAAG AAAAAACATT TGTGGTAGAA TTTAGACAAA CAAAGAAAAT TCAAAGAAAA
 771 AAATTAACGA AATTCAAAGN AATAGCTCAA TGGTACAGGT GCCCGCAAGG GCTTCATAGA GAAGCCGGTG TAAGACCGGC GCGGTCCCGC CACTGTAATG GGGAGCAATG
 881 CCAAGATAGG CCACTGGGAG GAAACTCCTG GGAAGGTTTG GCGGGCGCAA GAACCAGAGC CAGGAGAACT GCCTGTACAA CAATCACCGT TGACCTGCGA CGAAGGGGAG
 991 GGGATTTAAT GTGTAGTTTA CACCGGCAGT GTTGCCGCAT AAACGCCGAA GCCTCTCTGG ATGATGATCG CAGAGGGGCT TCTTTTGTTT ACTATGGCTG GTAGCCGGTA
1101 ACGCCGGACG GGTTGCCTGA TGGCCAGGGA GCGCCAGTAA ATGCCTGGGA AGATACTCTG ATCAGGGTAT CCATTCACAT TTTATTGTGT CAAAAAGCAA CAATTATAGA
1211 AACAACAACT GAATATTGCC AGGGATAGGT GCCCGCAAGG GCTTAATAGG GAAGTTTGGT GCAAAGCCAA CACGGTCCCG CCACTGTAAT GGGGAGCAAT GCCGAGATAT
1321 ACCACTGGGA CGAAGGTCCT GGGAAGGTTT GGCAAAGCCA TGAACCGCAA GTCAGGAGAA CTGCCTGTCG GACAATCGCC GTTTTTCACC CACGAGGTAT GGGGAGGGGA
1431 TTATGTAACG TTGCCGGAAA CATCCCGGTA GCTTAGCGTA ACCACACTCC CGGTCAGGGA GTTTTTTATT TGCCCGCAGA CGATGCGCGA TAGACAGGCC AAAGAAAAAT
1541 GATAGGAGTA TACCATACAA TGAAAAAATT ACAAAACAAA CTGGCAGCGC TGATCGCAAT TGCATTTTTC GTATCCGGCA TTTTCGGACT GTTAGCGCCG ACCCAGACGC
1651 TGGCCGCCAA GGCCAACAGC AAGCAAACGG TCGGCTATGT TAACCGACAA CAAGTTTTCG CCAGTTATCC CGGCATACAG GACCTAGTGA ATCGTATCCA GACACTGCGG
1761 GACGAGGCAC AAAAAGACTT CGACACCAAT GCCAAAGATC TGCCGGCAGC GGACAAGCAA GCCTACAGCG ATAAATTGGC CCGGCAGGAA GCCCAGCGGG AAGATGAATT
1871 GATGAAGCCG GTGGGAGATA AAATCGAGGC GTCCATTAAG GCCGTCGCCG GGAAAAAAGG GCTGACAGCA GTCGTCGACG CGGCAGCCGT GGTCTATGGC GGCAACGACA
1981 TTACCGCCGA CGTCATCGCC AGGGTAAAGC AGTAAGACGA AGCCCAATCC GCCTGGCTGC GCATGCTGAC GCTGCCCGGC CGGGCTGTTA TAGGAATTTT GGCAAGGAGG
2091 TGAGGCGTTT TTCCCTGGTT AGCAAGGAAA CGGCCTCAGC AGCCCGCAGG GTACATAAAC AACAAGGAGA GCGACCACGT TTTTAAAATG GAATGCATAT TCCGGCATAT
2201 CCGGACACTT TGTCAATTGA TTTGATAAAT TGGGGATGAT CCTGTCCATG ATGGCGTCAT CGACAAGTTG TCCGGATGCG ACCGAAATAC GCAAATGGAG GAGAATTTCN
2311 NGAAATTAAG NGAATGTTAG AAACGAAAGA GAAATTTGGA CGAGCAAAAA ATTGGAGGAN NTATTGGCTN NACATTGGCA TTGGGGTTAG CTTATCGAGT AAATATTGTT
2421 TTTGCTGATG AAAATGAAGT GCAACAACAT CAGCAAGATA CTAGTCAAAA TCATGATGAA AAGTCGAAT CATCAACTAA AGATTAAAAC AGATTACAC TAGCGGCTCT
2531 AACAGTAGAT CGAAAACGTC GTGATTGGCA ATCAAAATTA TCGCCAGGTA CAATAACTGT GATTGGTCCT GATGATTATA AAGGTGAGCA AAAATCGTTC CCTGAACTTT
2641 TAAAAATGGT CCCAGGGGTC CATCTACGCG AAGTGAATGG TAAAGGACAG TATACGACGG CTAGTGTGCG CGGGTCAACA TCAGCACAGG CAGGCGTATT TGTCGATGGT
2751 TTGCTATTTT ATCTGGGTGC CGATGCTGCA CCCGATATAT CAACGATTCG TGTAGGTAAT GTTGAACGTT TTGAAGTTTA TCGTGGTTAT ATTCCAGCCC GTTTTGGAGG
2861 TACCTTTATC CGTGGCGTTC TCAATATCGT AACAAAACGA CGAACAAAAG GTGATATAAG TGCATCAATT CGAAAAGTTT GTTATGGCGC CTATCAAGGA AATTTGGAGG
2971 TAGATGCTCC GCTTGGTTCA GCTACTATTA TGTTCCGAAT AAACGCCGAA CAAAGTCAAC CAGATTTAAT ATATAAAAAC TCTTTTGCGA ATAAACAAAT ATATCAATTA
3081 GAAAAAAGTA AGCATGAATT ATATATAAAT AGTAGCATTC TTGATACAAA TGATGCATTA CAGGATTTGC GCATGGTGCA CAAAAAAGTA TCGACAATTC ACGAATATAA
3191 TAAATTAATG AGTGAACAAA AAGATACTAT CTATGATGCG GCTGAAAAGA ACAAAAATGA GTTAGCGTTC GATGGTGATT GCGAAGTATA CAAATCTAAA GATGAGTTTT
3301 TAAATACAAC GAGAACAAAT CAAGAATATA TTTATAATAT AGGTACAGCA AGTAATGAAT TACAAAATTT TCTAGATGAA AATGGCAATA TATTATCTTT GGATAATTAT
3411 TTACTAAAAT CGGGTGTCAA CAATCTACAA GAAGCTTTAC CTAAATCTAA TCGTTACGCA AGTGATATAT CAAACTATTT ACAAACTTTT TATGGTGATA GCTATGCTAC
3521 TTCATTATTA GAATCTGCTC AATCTGCACT TAAACAAGCA GAATCACAAA AAAATCGTAT CGACGCTGCT GCCAATGCTG ATAGATGGAG AAAAACGAAT GATTATAAAA
3631 ATTACCGATG AATAGTAAAT TGGCAAGATA AGAATTGGTT CGCTAAATAT ACATGGAAAA AGATAGACAA GCATTATCCA TTCCGGATAA ATCGCAATTT TGCTGATCAA
3741 CGAATGATTG ATTATATACT AGACCGTATT TATAATGCTA GACATCAAGA GATTATCAGC AATGAATTAG TCGTAGGACG ACGCGATACA ATAGGTAAAG AGGAATGGGG
3851 TTGGAGTATT AATTACCTTC ATCAAAATAA TAAATATCAT GTTGATAATT GCAGGAAAA CGAATTAAAT CACCGGACTG TGAACTGGCG TCAGCCAACT TATTATTGGA
3961 GTAACTATGT TATTACGCGT TGGGGTGGTA AATTAGACGG TACTTATAAA ATCGGAGATA AGCATTTGTT TGAATTCTTA GTAGATACAT AAAAAGAAGA GATGGATATG
4071 AATGGTTGGC GATTGAAAAA ATATCAGCAA GCATCTAGTT CAACGGCCAG AAGATATCGT AATTATTACC AACAGAAAAT ATTCAATGCC CAAATCCAAC ATACCATTAC
4181 ATTGGAAAAT GATTGTGGC TCACGCCTAG TATTCGCTAT AATAGATCTA ATATTTATGC TTTAAGTAGT AAATATGACG AAGCGGATCA TCCACAAGGT ATTAAATTTT
4291 CTAAGCAAGC AGATTATCAA ACAGATGATA AAGTAAGATG GCAAGTAGCT GTGAAGAAAC AGGTAAAGCA TAAATTAACG GTTAGAGCTA GTGGAGGAAC GTATTTCCGC
4401 TTACTAAATA TGTATGAGAT TGCTGGAGAT GCAGCAGGTA TTTTACCAAT GCCTAATGTT CGTGGAACAT CGGCAGTATT CCGGCAACCT CAAGAAGGCT CGCAATGGGA
4511 TTTATCGGCT TTTTGGGATC GTCAAATTTT AGCTACTGAT TTAAGTCGCA TACAATTAAC ATACTTTGGC AGAGATTCTA AAAGAATGCT ACAATTAGGT TCATGGAATA
4621 ATTTCTTCTT GCTTTATACT AATGAGCAAT CAGCAAAGCT AAATCGTGCT CAAATTCAAC CAGATATGTC ATGCAAAAAA TGGCATTTAA ATTTACAGGC TACATATACA
4731 AAACCTCATT ATGTAGAGTA TGATATGACT AAACTGCCAC CTGGAAGTAA TACTACTGAT CCTTGCAAAT CTAAAGGATT GTTAACGTAT CTGCCTGAGT CGGAAGGAAG
4841 TATTAGATTT ACATATAGAC CAACTAATCA GTGGCAATTA GTAGCTATGT TGACAAAATT AGAACAAGTT AATATGAGCA TGGTGCGGGA CAAATTCAAT
4951 GATCACTTAC TGTATTGGGAT TTTGGACTAA TATATAAAAC CAAAAATGAT GTTCAATTTA TAATAGTGTT TAATGATATC TTCGATAAAG GTAATGATAT GTATACAAAA
5061 AATACTTTGT GTCCGGATTG GGCACCAGAG AGCATACAAT GTCCATTACC TGGTAGGACA TATTATGTAT GTGTGACATC CAATTTCTAA TGAAAAAGT AGTCAGTAGC
5171 TTCTTGCTTA TTTTAGTTTA TACCAATATC GCATTGTCAA TATGCAGTGC TGAGGAGAAT TACAAAGCGG AAAAAGAATC TCCATTAGAA TGGAGATTAG GTATAAAACC
5281 AGAATATTCA GCAGAAGAAT TAGAAAATAT GCAATGGACG AATGTTTTTG GAAACGAAAT GGCACAATAT TATTTTAACT CTAAATCATT AACAAAAGAT GAAAAACAAA
5391 ATGACTATGT TTATGTAATA GTTAAAGCAG TTTATCGAGA TCAGGCCATT ATTAATCAAT TAAATGATAA ATATAAATCT CAACTAAATG AAAAAGATTT TATATCATAT
5501 AGTGAAATGA TGATGAGTTT T
```

7.2 Nukleotidsequenzen stromauf- und abwärts von Genen in *Sporomusa ovata* H1, die für Corrinoid-haltige Proteine kodieren.

Nukleotidsequenz des Acetyl-CoA-Synthase-Operons aus *Sporomusa ovata* H1

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
ftfL	74	557	*Pelotomaculum thermopropionicum*	Formiat:THF Ligase	6.3.4.3
acsA	52	657	*Moorella thermoacetica*	Acetyl-CoA Synthase,α-Untereinheit	1.2.99.2
acsB	66	708	*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1	Acetyl-CoA Synthase, β-Untereinheit	1.2.99.2
acsC	54	407	*Desulfitobacterium hafniense* Y51	Acetyl-CoA Synthase, γ-Untereinheit	1.2.99.2
fer1	51	590	*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1	Ferredoxin	1.2.7.4
acsF	62	251	*Desulfitobacterium hafniense* Y51	Acetyl-CoA Synthase, Reifungsfaktor	1.2.99.2
acsD	63	322	*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1	Acetyl-CoA Synthase,δ-Untereinheit	1.2.99.2
acsE	61	263	*Desulfitobacterium hafniense* Y51	Methyl-THF:Corrinoid-Eisen/Schwefel Protein Methyltransferase	1.2.99.2
hdrC	38	197	*Desulfovibrio salexigens*	Heterodisulfid Reduktase, γ-Untereinheit	1.12.99.2

```
   1 ATATCCCTTC TACCGAGAAG TATCAGGAAA TGATGGGTCT GCAAAAAGAT GAAATCATTC CTTACGGGAA AACCCCGAAG ATTGACTTCT TGAAGGTAAT TGACCGCCTG
 111 AAGAATAAAC CTGATGGTAA ATATATTGAG GTAACAGCCA TTACTCCTAC CCCGCTTGGT GAAGGTAAAT CAACGACATC AATTGGTATT ATGGAAGGTC TTGGAAAACG
 221 CGGTGTGAAT GTTGGTGGTG CATTGCGGCA GCCTTCCGGC GGCCCGACCA TGAACGTTAA AGGCACTGCT GCCGGCGGCG GTAATGCTCT ACTTATTCCA ATGACTGAGT
 331 TCTCCTTAGG GTTAACTGGT GATATCAATG ATATTATGAA TGCCCATAAC CTGGCTATGG TTGCCTTGAA TGCCAGAATG CAGCATGAAG CAAATTACAC TGATGATGAA
 441 TTGGCTAAAA GAAACCTGAA AAGACTTGAT ATTGATCCGA AGAATATTGA AATGGGCTGG ATCATTGACT TTGCCGCTCA AGGTCTCCGT AATATTATTA TGGGTCTTGG
 551 TGGCAAAAAA GATGGTTTTA TGATGCATTC CAAATTCGGT ATTGCTGTTG GTTCTGAGCT AATGGCTATC TTGGCTGTAG CTAAAGATTT GGCCGATATG CGTGAACGTT
 661 TCAAACATAT TGTAGTTGGT TACAACAAAC AAGGTAACCC GGTTACCACC GGTGATCTTG AAGTTGACGG TGCGATGACT GCTTGGATGC GTAATACCAT CAATCCAACA
 771 CTCTGCGCTA CTGTTGAAGG TCAACCTTGC TTCGTTCATG CTGGTCCATT TGCTAATATT GCTATTGGTC AGTCGTCGAT TATTGCCGAC CGCATTGGTC TGAAATGCTT
 881 TGATTACCAT GTTACCGAGT CTGGATTTGC TGCAGATATC GGATTCGAAA AATTCTGGAA CGTTAAATGC CGCCTGAGTG GACTGACTCC GAACGTGTCT ATCTTGGTAG
 991 CAACTGTTCG CGCCCTCAAA ATGCATGGTG GCGGACCTAC CGTTATCCCA GGTCGTCCGT TGCCTGATGA GTATACTAAA GAAAACCTTG GTCTGCTTGA AAAAGGTTGC
1101 GAAAATATGG TACATTTGAT CAACATGATC AAAAAATCTG GCATTAAGCG AGTTGTTTGC ATCAATGCAT TCTATACTGA TACTCCTGCT GAACATGCTT TGGTTAAGAG
1211 AATTGCCGAA CAGGCCGGCG CTCGCGCTGC TGTTTCTCAG CATTGGATGA GCGGTGGCGA CGGTGCTCTT GATTTGGCCG ACGCAGTTAT GGATGCTTGC AAAGAAAAAG
1321 TTGATTTCAA ATTCCTGTAT CCGTTGGAAA TGCCATTACG TCAGCGTGTT GAGAGGATTG CCAAAGAAGT ATATGGCGCT GATGGCGTTG ATTGGGCTCC TCTGGCTCAG
1431 GAAAAAGCTG AGAGATTTGA GTCTGATCCT AAGTATGCCG ACTTCTGCAC CATGATGGTT AAGAGTCACC TGTCCTTGTC ACATGAACCT ACCTGGAAAG GTGTACCAAA
1541 AGGCTGGAGA TTGCCGATCC GTGACATCCT TGTTTATGGC GGCGCCAAAT TCCTCTGCCC AATGGCTGGT GCAATCAGCT TGATGCCAGG AACTAGCTCC GACCCTGCCT
1651 ATCGTCGCAT TGATGTTGAC GTTAAAACCG GCAAGGTTAG CGGCTTGTTC TAATCAAATA TAAAACCCCA AAAAAAAATT GATTACTGTG TAAAATATTT TTTAAGCTTG
1761 CAGGTATTCG TCCACCTAAG GGCGAATACC TGCATATAGA GTTTGTGAAA AAATCCTCAA AAGATCACAT GCTCTGGTAG CTAAGCTCCT GGTAAGTGGA CTCAACTGAA
1871 AAACATCTAT GATGAACATA GGGAGGAAAA GAAGATTGTG CGAATAGAAG ACAATCGATC TGGCAAGCAA CCAAATGCTC GGCAAAGGCA AAGAAATTGC CTTTTATGCA
1981 ACATTTGACC GTGCCAAAGC ACAAGAGCCT GGCTGTACCT TCGGCAATAC TGGTATTTGT TGCCCGATTC GTTTGGCAGC TCCTTGCCCT ATACTGCCTT ACGAACCTGC
2091 TGGCAACAAA CGTATCTGTC GTGGCGCTGA CTACACTATC CTAGCCGGTA ATACGGTTCG TTATATTGCC CGCGGTGCTG GTGCTGACTC CGACCATGGC CGCGAAATTG
2201 CAGAAGCTTT GTTACATCTT GCTGAAGCCA AAGTAAAGA TTATAAGATC ACGGATGGTG ATAAACTCAT GCGGGTTGCC AAACACATTG CGGTTGAAAC TGAAGGCGCC
2311 TATGTAATGC CAATTGCTAT AGACGTTGCT GTGCTTGCGC TGCAAGAGTT TGCTGAGGTA GATGAATCTT ACGAACTTAC CTGGATCGCT TAGTACTCTT ATGAAACCAG
2421 AAATCAAAAG GTCCGTGATA CCGGTATTAT GCCTGCAGGT GTCAATCTTA GCTTAGCCAA ATTGTTACAC CAAACTCATA TTGGTTGTGG TGCTGACCCG CTTAATATTA
2531 TTTTTGGCGC ACTCAAGGCT GCACTTAGTG AGGTAGCGCG TGAACATCTT GCTACGCATC TATCAGATAT TATGTTCGGC ACTGGGTTTC CGGTTCTTAC TGAAGCCAAT
2641 CTAGGTGGTT CTAAAGGTGA TAAAGTAAAT TTTGCTCTTC ATGGTCATAA TCCACTCTTA TGCCAAATGC CTGTTAATGG TGCTAAGGAG CTGCAGGAAC TAGCTAAAGC
2751 TGCCGGCGCT AAAGGCATTA ACTTGGTTGG TATCTGGTGT ACTGGTAAGC AAGTGGTTAT TGGTGAAGGC GTTCCTATCG ACACTAAGTA TGCTACGCAA GAATTAGCTA
2861 TCATGACAGC CGCTATGGAT GCAATGGTCG TTGACGTTCC ATTCATTATC CCAAGTATTC CTACAGCTGC TCAATGCTAC CATACTAACA TTGTTACTAC CATGCCAATT
2971 ATGAAGATTC CTGGTTCTTT TCATATTGCA TTTGATGAAT TGCATGCGAT GGATAGTGCC AAAGAAATTA TTCGTCTGGC AATTGATGCT TATAAACAAT CTGATGCAGC
3081 CAAAGTTTGC ATTCCTGAAA TTAAAAATAC TGTCGTTGCT GGCTTCAGTA TGGAGGCCAT CTATAACATT TTTAGAAAAA TCAACGCTCA AATTCCAATC AGTGTTGTAA
3191 TAGACGCTAT CGCCGCCGGT GAGATTAAAG CTGTTGCCGC TCTTATTGCT TGTAACAAGC TCAAAGGCAT CGATGAGCTG AACGATACTA CTATGGCTCA CGAACTGGCA
3301 AAAAATGACG TGTTATTCGT TGGTACGGGT TGTTGTGCCG AAGCGCATGC TTTAGCTGGC TTGATCAATT GCGAGGCTGT GAAAAAATAT CGCGGCGAAT GTCTGAAAAA
3411 ATTCTATGCA CGCTTAAATC CTGCAGCAGG TTAACTGCC CAATTACCAT TGATGTTCCA GATGGGCTGT TGTGTTGATA ACAGCCGTCT TCAGGATTTC CTTACCGCTA
3521 CGGCTAACGT AATGGGTGTC GATAACGCTG ATCTTCGCTT TGTTCTTAGT GCGCCGGAAG CTATGTCTGA AAAGGCTGTC GCTATCGGTC CCTGGAACGT TGCTTATGGT
3631 AATCGCACTC ATGTTGGTGT TATTGCTCCA ACTGTTGGCT GCGAACTTGT TAATGATGTT CTTACTAAAT TTGCTGAAGA TGTATTTGAC CGCTATTTCT TCTGGGAACC
3741 AGATGCGAAT AAAGCTTCAG CTAAAATAAT TGATATTCTG CACGAACGTA ACTGGAAGAA TGCTATGCGT AAAAAAGCGC GTGATGCAAG AGAGGCTAAA TAATCATAAA
3851 TTAGGATTAT GGTATTACTA CTCAATAGAT AATGAGAATT GACTCTATGA AGGAGGACGA AAAACAATAT GTCTATGGAG CTTTTTAAAG GCGCCTATGA AGGTGCTGTC
3961 ACAGCTACCA GCTATGCAGA AATTCTTCTG GCTAAAGCGA TTAAGGTACA CGGTGCTGAT TGCCCGGTTA AATATCCTGA TACTGCCTAC CGACTGCCTG TAATCACTGC
4071 TCTGAGCGGT GAAGAAGTAA ATACCATTGG TGATCTCGCA CCAATTCTTA ATAGAATTCG TACCACCAAT ATCAGGGAAG AACTGACCTT GGAAAATGCT AAACTTAATG
4181 GTGAAGCCAC TCTTTATGCG GCAGAAATTA TTGAAGCTTT GCGCTATATT AATGGTGCAA AACCTGATGT ATATCCGTAT TGCGGCTTCG TTACTGACCC GATTCTCCGT
4291 AAATTCGGCG TACCTTTGGT TGACCAGACA ATTCCTGGTG TTGCCGTTAT TGTTGGTAAA GGTAAAGACA GCAAATCAAC TGCCAAACTG GTAAAAGAAC TTCAGTCCAA
```

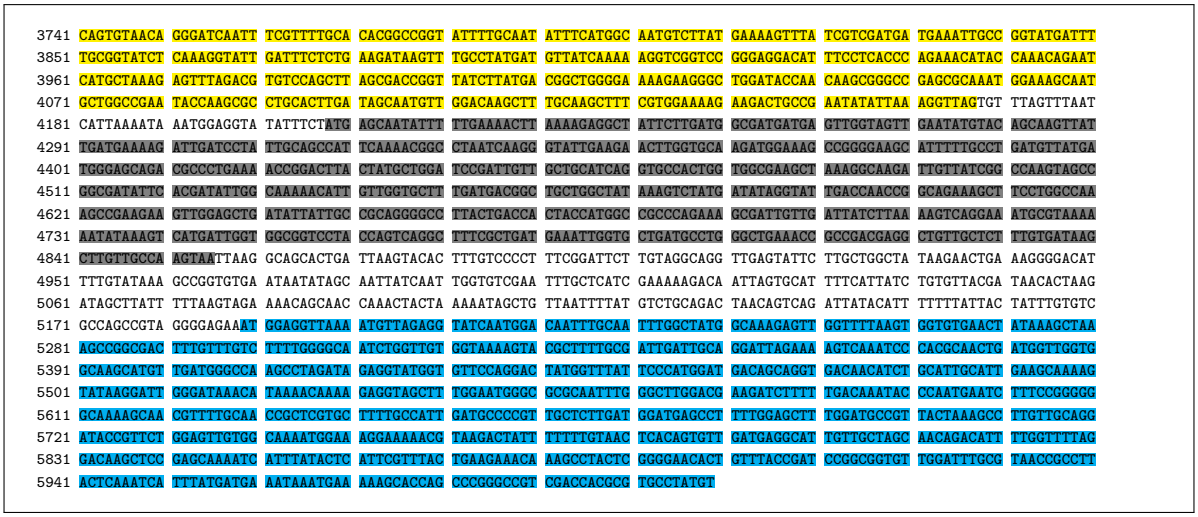

4401 AGGTATTATG ATTTTCTTGG TTAACGAAGT AATTGAGCAA TGTATTGAAG AAAATGTTAA AATCGGTTCT GAATTTATTA CCTTCCCAGT CGGTAACTTT ACCCAGGTTA
4511 TCCACGCTGT TAACTTCGCT TTCCGGGCTG GTCTCGCTTT CGGTGGTATT CCTGCCGGTC AGCGTGAACG GGCTATAGAA TATCAATTGA AACGCGTTTT TGCGTTTGTT
4621 ATTCAGCTTG GACCTAATGA TGTTGTTAAA ACTGCTGCTG AATTTGGTGC TATGTTCATG GGCTTCCCGA CAGTTACTGA TCAGCCGGTA GCCGAAGAAA TTCCTGAGTG
4731 GTATCAATCT GAGCCTGATT ATGAAAAAAT CGGCAAACTG GGTCTTGAAA TACGCGGCGT AAAAATTAAG ATTGTTGATA TTCCTGTACC TATCACTATT GGACCTGCAT
4841 TTGAGGGCGA AACCATCCGT AAGAAAGATG CTTGGGTTGA GTTCGGCGGC GGTCGCTCCA CCAGCTTTGA GCTTGTTCGG ATGGTTGGTG TTGATGAAGT TGAAGATGGT
4951 AAAATTGAAG TTATCGGACC AGAAATTGAC GAGATGCCGG AAGGCAGTGT CTTCCCGCTT GGCTTTATGA TTGACATCTA TGGCCGTAAA ATGCAGGAAG ACTTTGAAGG
5061 CGTGCTCGAA CGTCGTATCC ACTACAACCT GAACTATGGT GAAGGCTTGT GGCATGTAGC CCAACGTAAT ATGATGTGGG TGCGTATTGG TAAGAATGCC CATGCCGCCG
5171 GTTTCAAAAT CAGAGATTTC GGTGAAATCC TGATTGCTAA ATTCAAATCC GATTTCCCGG CGATCATTGA CCGCGTACAA GTTACCATTA TTACCGATAA AGATGTTATT
5281 GAAGATAAAA TTAAGATTGC TATTGAAAAA TACGCTACCC GTGATGCCCG GCTCAAAGAT CTCACTGATG ATGTTGAAAC CTATTATTCC TGCCTGCTTT GTCAGTCCTT
5391 TGCACCAAAC CATGTGTGCG TAGTATCGCC GGAACGCTTA GGTTTATGCG GTGCTGTTAG CTGGCTTGAT GCAAAAGCTT CAAATGAAAT CAATCCTCTT GGCCCAAATC
5501 AGCCGATTGA AAAAGGGGAA TGTCTTGATG CTGAAAAAGG TCAGTGGAAA AACCTGAATG ACTTCATTTA CGCTAATTCC CACAACACGG TCGAAGCCGT AAACTTCTAT
5611 ACTCTTATGG AATACCCGAT GACTTCTTGC GGTTGCTTCG AAGCCATTAT GGCGATTTTG CCGATGTGTA ATGGTGTCAT GATTACAACT CGTGAACATG GTGGCGACAC
5721 TCCTTGCGGC ATGACTTTCT CCGCTTTGGC TGGTACTTGC GGCGGCGGTA TGCAGACTCC TGGTTTTATG GGTCTTGGTC GCCGGTACAT TACCAGTAAA AAGTTTATCA
5831 AAGCAGACGG CGGTCTTGCC CGTCTTGTCT GGATGCCGAA AGAACTCAAG GAATTCTTAG GTCAAGACCT TATTGATGCT GCAGTAGATC AAGGTCTTGG TGCAGATTTC
5941 GTGGATAAGA TTGCTGATGA AACTGTTGGC ACTACTGAGG ATGAAATCCT GCCATTCCTG GAAGAAAAAC AACATCCGGC TCTTACATTA GATCCGATGA TGTAATAAGT
6051 CTCACATATT TATTTAAGGC AGAATTCGGA ACACATTATG ATAGAAAAAT TAATAATGAT CAGATGTGTT CCGATTCTCA TATTTATTTT AAGTTCTTAT ATTCGAAAGG
6161 AGAAGAGAAA ATGGCATTAA CCGGTTTGGA TATTTTCAAA CAACTGCCCA AAACAAACTG TAAAGACTGT GGTTCACCTA CCTGCTTAGC TTTTGCAATG GCAATGGCTA
6271 ATGGTAAAGC ATCCCTTGAT ATGTGCCCGC ATGCAACTGA GGCCGCTAAA GAAACATTAG GTGCTGCTAC TGCACCACCA GTAAAAACTG TAAAGGTCGG CGTTGGTGAG
6381 CAAGAAGTAG TTTTGGGTGA CGAAACCGTC CTCTTCCGTC ATGATAAAAG TTTTTATCAT CCTACTGCTT TAGCAATTCA GATTTCCGAC AAATTATCCG GTGCTGAGCT
6491 GGATGCCAAG ATTGAAAAAG TTAACGCTTT GGTAATGGAT CGTGTTGGAG AAAGAATAGC TGTTGATATG ATTGCTATTA CTAATTGCTC CGGCGATGCT GCTACCTTTA
6601 AGGCTGCTGT TGAAGCTGTA GCTGCTAAAG CTAACTTCGC GTTATTGTTG GTTGCTGATG TAGCTGGTCT TGAAGCTGCT GTTCCGGCAG TAGCTGCTAA GAAACCTCTT
6711 ATTCATGCTG CTACTGCTGA AAATTGGGAG AAGGTAGTAG CTCTTGCTAA AGCCAATAAT TGCCCGGTAG TAGTAAAAGG CAATGGTCTT GATGATGTTG CTGCTTTAGT
6821 AGAAAAAGTA GCAAAAGAAT ATAAAGAAAT TGTCATTGAT TTTGGCAACA CTGCACCAGC TAAAACTCTT GGTGATATGG TTAATGCCCG TCGTTTGGCT ATCAAAAAGA
6931 AATTCCGTCC GTTTGGCTAT CCGATGCTTG CCTGCGCTTT AGCTGCTGAT CCAAAAGAAG AAGTAGTAGA AGCAGTCACT TATGTTGCTA AATATGCTAG CATCGTTTGC
7041 CTAAAAGCTG ACGAAAAACA CCATTTACTG CCTTTAATGG CATGGCGCAT GAACATCTAC ACTGATCCAC AAAAGCCAAT GGCTGTTGAA GCTAAAGTTT ATGAAATCGG
7151 TGATGTTGGC CCTGACTGCC CGGTATATGT CTGCACTAAC TTTGCTCTCA CCTACTTTGC TGTTGAAGGT GAAGTTGTCG GCAGTAAAAT CCCCGGCTAC ATTGTGGCTG
7261 TTGATACTGA CGGCGCTTCT GTTCTTACCG CTTGGGCTGC AGGTAAATTC GTTGCCGAGC CTATTTATGA GACTATTAAA GCATGTGGCA TTATGGATAA AGTTAATCAT
7371 AATAACATCG TTATCCCAGG ATATGTTGCC ATTATCACCG GCAAACTCAA AGAAATATCT GGGTTGGACG TAATTGTTGG ACCACAAGAA GCTGTTGGTA TCCCTGCTTT
7481 TGCCAAAGCT CGTTACCCCG AACTCATGAA ATAATAACTA TTTACAACCT TGCTGTCTGA AATGGGAAAA CAGTCTTGGG CAACTAGTCA GGAGGATAAA TTACGGATGA
7591 ATAACCGGTT GGTAACATTT CTTCCCGCAG GAGTACAAGT AGAAGTTGAG CCAGGTACGG ATCTCCTTAC TGCCGCAGGT AAAGCTAATA TTGAGATAAA AGCCCCTTGT
7701 GGTGGTGATG GTACATGCGG CAAGTGTGCG GTTCGAATTA AGAGTGGTAA TGTTAAAGCC AGAAGAGATA GCCATTTAGC AACAAGAATT GCTGAGAAAG GATTAAATCT
7811 AGCGTGCCAG ACTTTAGTCC AAGATGAGGA TCTAGTGGTA GAAATACCTA ATACCTCGTC CATGAGCAAG CATCAGGTGC TAGGTGAAAA TGCTTCAGTA GGTGCTGGAG
7921 TTTCAGATGC CTTAAGCAAT TATTTGTTGC ATGTATGGCA GCTTAAAGAA TTACTTTTGG AAAAACAAGA AAGCCCGCTT AATGGTTATC CGCTTAATCC GCTTTGTCGA
8031 CGTGTTCGGC TAACTCTGCC TGTAGCTAAC CTGCAGGATA ACCGTGATGA CCTTAACCGC CTGACAATGG CTCTTAAGAA GGAAATTAAC TGTAAGGACA TTCATGTTCC
8141 ACTTTCGATT ATTCAGAAGT TGGGAGAAAT CCTCAGGGTT GATCAGTTTA AAGTAACTGT ACTGTTATCT GAGGTCGGTG GTAAGGTGGA AATAATTGCT GTTGAGCCAG
8251 GTCATGGCCA TCAGCCATTA TATGGTATCG CTGTTGATAT TGGCACTACT ACTGTAGTGG CCTACCTTCT TGACCTCGAA AAGGGTAGAG TTATTGATAC GGCAGGAACT
8361 CATAACCGCC AGGCACGTTT CGGCGATGAT GTCATTAGCC GCATTGTGTA TGTCTGTACG AAGAACCTGA TGGACTTAAT ACAGTTCATC AAAGTATCAT CGGCACCATA
8471 AATACACTCA TTATGGACTT GTTAGTGAAG CAAAGACATA TCAGAGAAAC TGATATTCAC GTTATGATGA CAGCTGGCAA TACGACCATG GCGCATTTGT TCTTGGGGAT
8581 TAATCCCAAG TTCATCCGCC TGGAACCGTA TATTCCGACA GCCAACTTCT ATCCGGTTGT AAAGGCTCAG GAATTAGGGC TAAAAATTAA CCCTGACGCT TTAGTATTTA
8691 GCTATGCGTC AGTAGCCAGT TATGTTGGCG GAGATATCGT TTCCGGTACG TTGTTTACTG CCATGGGCAA TGAGGATGCA CCAATATCAC TTCTGATTGA TATTGGTACA
8801 AATGGTGAAA TGGTATTAGG AGCCGGTGAT TGGCTGGTAA CTTGTTCCTG TTCGGCTGGC CCGGCATTTG AAGGGTCAGG AATATTGTTT GGTATGAGGG CTATGCATGG
8911 CGCTATTGAA CGGATGCAAA TAGATCCTCA AACCTATGAA GTAGCTTATA CCACAATTAA CAATGGTAAG GCAGTTGGCA TCTGCGGTTC AGGTCTTATC GACTGCTTGG
9021 CAAAGCTGAA AAGTACTGGT GTCATTGACC GTGCAGGCAA GTTTCAAACC AGCCTGCCGA CGGAACGGAT GCGTATTGGA GAGACAGGAC CTGAGTTTGT GCTTGTGTGG
9131 CGCGAAGATA CTGATATTAA CCGTGATATT GTTATCTGTG AAGCCGATGT CAAGAATCTG CTTAGAGCTA AAGGGGCGGT ATTTGCCGGA ATTCGTACAC TCCTAAATGT
9241 GGTCGGTTTG AGCTGAAAGT ATTGAAAAAC ATTTATGTAG CTGGTGGATT TGGCAACTAT CTCAACATTC CTGATGCTAT CGCCATTGGA CTGTTGCCTG ATATACCTGT
9351 TGAAAAATAT AAATATGTCG GCAATACCTC GGCTAAAGGT GCCTGTATGG CACTCTTATC CCAAGAGGCG TGGCAGGAAG CTAATAATCT GGCAGGTAAA ATGACCTACA
9461 TTGAATTGTC GGTTGGAAAT CTGTTTATGG ACGAATTTGT CTCATCCTTG TTTATCCCTC ATACTGATTT AACTTTATTC CCTAATGTCA GTATTTAATT GAATTAAAAC
9571 TGAAGTTCGG GTGTATTGAA AGGAGTTTCA AGACATGGCA AAACAAATTG CAGTGGCAGG CAAAGGCGGC ACTGGTAAAA CTACATTTAC TGCATTACTT ATCCGATATC
9681 TGGTTAAAAA CAATAAAGGC TCCATTCTGG CGGTTGATGC TGATGCGAAT GCCAATCTGA ATGAAGCACT AGGTATGGAA GTAGAGCAGA CAATATCTGA GTTGATAACC
9791 AGTACCAAAG ATCCTAAGAA TATTCCTGCC GGCATGACAG AGGAAACATA TATTGAATAT AAACTCCAAG CCTCATTAGT TGAATCAGAT TATGTTGATA TGCTGGTGAT
9901 GGGCGGCCCT GAAGGTCGTG GATGCTATTG TTTCCCCAAG AACCTTCTAA AAGGTTATAT GGATAAGCTT GGCAAAAACT ATAGCTATGT ACTCATGGAT AATGAGGCCG
10011 GTATGGAGCA TATTAGCCGC CGGGTAACTC AGGATATTGA TTATATGTTT GTAGTCAGTG ATGCTTCGGC CCGTAGTATT CGTTCTGCAG GCCGCGTACA TCAACTTGTG
10121 GACACCCTCA AATCAGATGT AAAAAACATT TATTTGATTG TCACTAAGAC GCAAAATGAC GAGGATCTTG CTACTTTGCA GGGAGAGATT GATAAAACCG GTCTTAAATT
10231 AATCGGGGTA ATTCGTTATG ATCCACAAGT AGCTAAATTT GATTTATTGA GTCAGCCACT ATTTGATTTA CCAGATAATT CGGTGGCTGT ACAGGCGGTC AACGCCATTT
10341 GTAAAGAAGG ACAAATCTAA ATGTTTGGAA GGAGCGTAAC TATGGCAACT AATATGTTGA AAGAAAGATA TTCCGGTAAA ATTAATACCG TTACCATTGG TGCAACCAAA
10451 GAACAGGGTG GCACTCGTAC TAGCACTGTA ACCGTTGGTG GCGATTCCAC TATGCCATTC CTCCATTTTG AAGGTGAAAT GCCTTTAAAG CCGGTTGTGG CATGGAGATT
10561 CAGGATATTA ATCCTGAATG GCATCCTGTA TTAAATGAAG TATATGCCGA TGTTATTAAT GATCCTGTTG CTTGGGCAAA AAAATGCGTA GAATTTGGCG CTGATTTGAT
10671 TTATATTAAA CTTGCCGGTG CTCATCCTGA CAGTGGCAAT AAAAGCCCTG AAGAATGCGC TAAAGTAGTT AAAGATGTAC TGGCAGCTGT AGGTGTACCT GTTATTGTTG
10781 TTGGTTGCGG CGAAGAAGAA AAAGACAATG CTGTTCTGCC AGTTGTTGCA GAAGCTGCTA CAGGTGAAAA TCTGTTAATT GGCTTGGCAA AACAAGACAA CTACAAGTCT
10891 GTAACTGCTG CTGCTATGGT TCACAAGCAC AAAGTACTGG CTCAAAGCCC ACTTGACATC AACATTTGTA AACAGCTCAA CATTCTTATT TCAGAACTAG GTTTCGGTCC
11001 GGAAAATGTA ATTATTGACC CTTCAACTGC AGCTCTTGGT TATGGTATTG AATATACCTA CTCCATCCTT GAACGTGGCC GTCTGGGCGC TCTTCAAGGC GATAAAATGT
11111 TGTCTCAGCC TGTAATTTGC CAAGTTGGCT ATGAAGCATG GCGTGCTAAA GAAGCTAATG CTACTGAAGA AGATTTCCCT AACTGGGGTA ACCAAGCCGA ACGCGCCATT
11221 CTATGGGAAG CAATGACTGC AGCTGGTCTA TTACAAGGCG GCGCTCATAT AATGGTATTG CGGCATCCAG AAGCTGTTCG TCTCTTCAAA GCTAATGCTG AGGCGTTAAT
11331 GGTAAAACCT GAAATTTAAT TATATCTTTT TATTAGGATT CCAGTAAAGT ATCTTAATTA AAAGTTCCCA AAAAAATAAT ATTATCGAGG AGGATTACAA TGATTATCAT
11441 TGGCGAAAGA ATTAATGGTA TGTTCAAAGA TATCGGTTTA GCTATCCGGG AGCATGACCC AAAACCTCTA CAAGAATGGG CTGTAAAACA AAAAGAAGGC GGCGCTCATT
11551 ACCTTGACGT AAACACTGGA CCTAACTCCG AAGACCAAAC TGTCGATCTT CCCTGGATGA TTAATGTTGT AAAAGAAGTT AGTGATTTGC CGTTGGCTAT TGACACAACC
11661 AACTATGACG CTATGGAAGC TGCACTTATA GCTTACGGTA AACCTGGTGC ATTAATTAAC TCTATTGGCT GCGAGCAAGA AAAAATTGAT CGCGTTTTCC CGATGGCTGC
11771 GAAATATCAA GCCGATGTTG TTTGCCTGTG CATTAATAAA GTTGGTATTC CTAAAAGTGC TGAAGACCGT GTAGCTATGG CTATGGAGTT TGTTGCCAAT GCTGAAGCAT
11881 ATGGTCTGCA ACCGGATAAT TTGTTTATTG ACCCGATTAT TTTGCCAGTT AATGTGGCTC AGGAACATGG TATTGAAGCA TTAGAAACTA TTCGCCAAAT TAAAATGATT

```
11991 TCCAATCCTC CTCCGAAAAC CACTGTTGGA CTTTCCAATA TTTCACAAAA AAGTCCGCAT CGTCCGCTTA TTAACCGCAC CTTTGCTATA ATGGCTATGA CTGCTGGTTT
12101 AGATTCAGCT ATTTGCGATG CTAATGACGA AGCTTTAGTT GATGCTATTG CTACTGCACG TTTAATTCTT AATCAAGATA TTTACTGCGA CTCCTATGCT AAGGTGTTCA
12211 GACAGCGGTA ATATCGCTGG GTTTACGCCA GGAAAGGAGG TCAATGATGT CAACAGTGAA CCAACCTACT AAAGGGAAAC CTTCTTTCTG TCAGGAGATT GAGGAAAAAT
12321 CGCATCAACC GATCAGTTCA TGCTATCATT GCATGAAATG TGCTGGTGGC TGCCCAATAA ACTTTGCTAT GGATCAAAAC AATTACGAGA TATTGCGGAT GATTCAGTTG
12431 GGAGAAAAGG ATAAAGTCTA TAAATCCAAT ACTCCCTGGC TTTGTGTTGC TTGTAAAACT TGCGCCGTAA GGTGTCCGAA CGGCATTGAC ACTTCTAAAG TTATGGAAGC
12541 CATAAAAATG GAAACCATTG CTGAAGATAA AATTCCGGCC AGTCACTACA ATATCAAATT ATTCTACGAA TTGTTTCTTG ATTCCATGAA AGGGTTTCCA ATAATCGGCC
12651 GCGAAGGCCG CGGTTATGAA CTTGGCCTCA TGGGACTGTA CAAATTCTGC ACTGGGGACT TTTTGCGGA TATGGATCTT GGCAAGGAAA TGACAAAACG CGGCAAGATG
12761 CCATTTTTGG CTCATAATGC CCTTAAGCGG CGGAAGGGTG AAATCAAGAA AATATTCCAG AGAGCAAAGG AGAAAAAAGC GCCATGAAAT TAGGCTATTA TCCGGGATGT
12871 TCACTTCATT CGACTGCGGC AGAATATAAT ATGGCCACTG AGGCTGTATT TGATGCCTTA GATATTGAAT TAGCTGAACT TCCAGAATGG AATTGCTGTG GAGCTTCCGC
12981 AGGTCACTCC ACGGATCATT TTCTTGCGCT TGCTTTGCCG CTCAGAAACC TTGTCATCGC TGAAGTTGAA CAGCAAAAGG AATTAGTTTT GCCTTGTGCT GCTTGCTATA
13091 ACCTTGTGAA GGCTGCTGAC CATTATGTGC GTGAGGTACT CCGGAAGCTA AAGATGCTAA CGG
```

Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts der vorhergesagten Methyltransferase-Gens *mttC* in *Sporomusa ovata* H1.

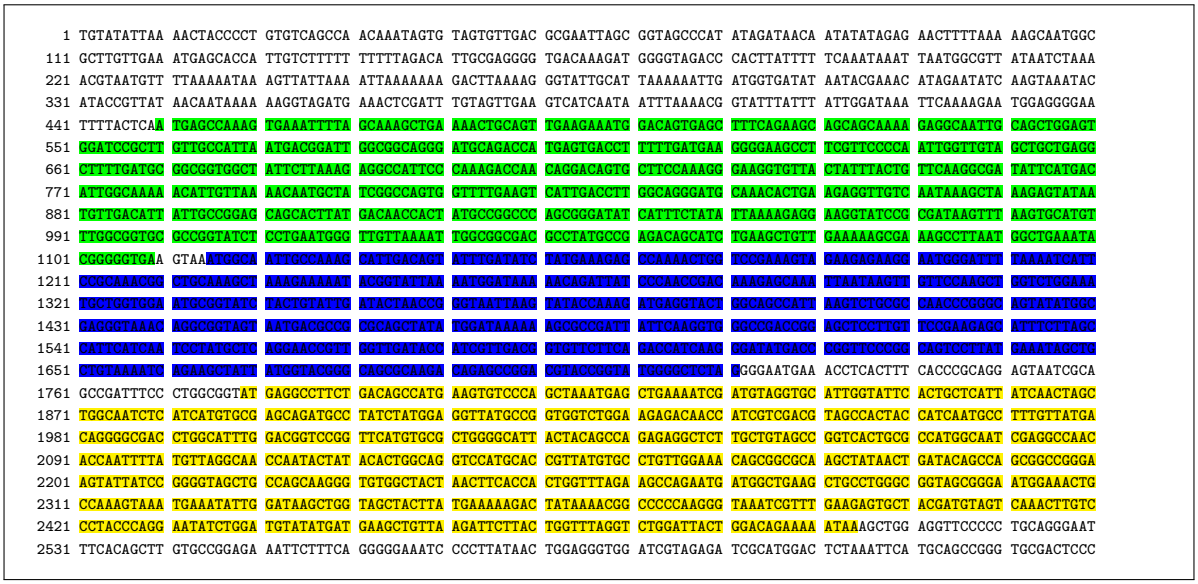
ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
orf1	38	246	*Thermincola sp.* JR	PAS abhängiger, Sigma54-spezifischer transkriptioneller Regulator	
mtrH	81	306	*Thermincola sp.* JR	Tetrahydromethanopterin S-Methyltransferase	2.1.1.86
mttB	79	476	*Thermincola sp.* JR	Trimethylamin Methyltransferase	2.1.1.-
mttC	68	215	*Thermincola sp.* JR	Protein mit **Cobalamin Bindedomäne**	2.1.1.-
orf2	55	274	*Dorea formicigenerans*	Nitrat/Sulfonat/Bicarbonat ABC-Transport, ATP-bindende Untereinheit	3.6.3.-

```
   1 TTTTTTATCG CCGAGACGTC GCACCATCTT ATCTTGTAGT AATCTGAGCA GCTTGGCCTG CAAGGGCAGG CTTAATGAAT TGATTTCATC CAGAAACAGA GTGCCGTTTT
 111 CGGCCTGTTC AAACAAACCG GGAGAATCTA TGGCACCGGA GAAAGCTCCT TTTACTGTTC CCATAAGCAA GCTTTCCATT AAGTTTTCAG GTAATGCAGC GCAGTTGACG
 221 GCGATGAAAG GACGTGAGCT ATAACAGCTT GCGTTATGGA TTCCCTGGGC AAAGAGTTCT TTACCAGTAC CGGTTTCCCC ATAAATCATA ACAGTTGATG GCATTGGTGC
 331 AATTTTCCTG GCTCGTTTAA GTGCCTGTTT AATGAGCGGA CTGCTGCCAA TAATGTCATC AAGGCTATAG ATAGTGCCGT TTAACCGGTT TTTCGATTTA TTACGCCCAA
 441 AACATTTTAC TACATTGGTC AGTAACTCAT TTATGGTTGG GAGATCCCTG TTAATAGAAT ATACTGCAGT TAGTTCCCCA TTCTCGAAAA AGGGGTAAGA ATTGTAAACA
 551 ATATCAACCT TTTTTCCGGT ATATAGTTGG TATGTCATAT ATTGTTCTAA TATCGGCTTT TTGCTTTGCA GCACTGCTAT GCGCTGGAGG TTTGACAGAG GGGCCACGGA
 661 ATACACATCT GTATCCTTTT TTCCAAGCAT AGTATGACGA TCAGTGGCCT CAATTCTTTC AAAAGCCCGG TTATAAATTA GTATGGTTCC ATCCTTATCT GCGGCATATA
 771 CACCTTCTGA TATAGCATCG ATAATTTCAT GTAATAACTG ATTTTCCCTA ATTAAGTCTT CCAGACTTTT TTGTGACTTT TCAATCATCT AATGTCCCAT CCTTTGCATA
 881 TCGTACTTAA AGAAAAGGAT TTTTTCACTG AAAAAATCCT TTTCTTTTAT TTGTGAGTCC AGTGTATACA AACACTTTAG GCTGGCAGGT GAAAAAAAGT TTTTCGTTAG
 991 CAAATGAATT TCATGTCAAA ATCATGGTAA GACTATTGTC AATAAATGAG TGACTTTTGG CAAGAGTCGT ACTATTTGGC CGATTTTTGC ATAATGTGTG TGATGATGGC
1101 ATGATAATTG CAAATATTTA TAAGGCGTAT CGATTTTCTT AATAATAAGG AAGGGGGGCT TATGAGAGTT ACTTATACCA TTTTTATGAT ATTTGACAAC AATACCATGG
1211 ACTTATAAGC CAGAGGAATT CTAAATCTTG CTGAAATTAC CAAGACGCAA GGCGTTCCCC GTGCCATTGT GGAGATATTT GCAACTCTGC CCTTCAGTTC AGTCATTTTG
1321 CCGAATACTA GTCCTACTAT TCATTTCCAC AGTCACTGTT ATTAATAGTA TAGCATATCC TCCCGCTATG GTAACTACTG AAAATAAAAA CCGGCGAGGA ACCAGCAAAA
1431 TGGAACCGGC TATTCTGGGA CTTAGTGCTT AGGGGCCTTT CGCTTACCTT AATATTCCTA GGGGGATGAA ACCGCTTTAA GCTGCGGCGG TTGCAGAGTC TTTCCCAACC
1541 ATGTTTATCA TGGGGATCAT ACTGTATGGT TTCATTAAAA AGGCGGGCAA AGATTGGGGA GCACCAGTTG AAATAAGTCT TGATACAACA GAGCAAGGGC TAGTTAACAA
1651 TGAGGCAGGT TTTCCAAAAG TAGTAAAGAT TAAATTCCAA ATTATTAGGA GTGTGAGGCA ATGTTCAGGT TAAGTGCAGA ACAAGAGGTC TATGACATTA TTGGTGTAAA
1761 CGTTGGGGGC CAGCGGGGAC AATTTCCGAC TGTGCTGATT CGGAGCATGT TTTATCGGGC TCACAAAATT CTACTTGATT CAGGCAAGGC CATTTCAAAC CAAGCTGAGC
1871 CTAAAGCCTT TCTTGACGTC GAAGCAGAAA TGAGTGCCGT CACAGGTAAA CCGCGGATAA TCGATGTTTT GGGGGATACC CCGGAGGCGT TGGCCCGTCA TCTGGAGTTC
1981 ATTCTTAAAC ATACTTCAGC CCCGTTTCTG CTTGAAGTTC TAAGTCCGGA AATTCGGACA CGTGCCTTAT AACTGGTTGC CAAGGATTGC ECAATCATTA ATCGCTTAT
2091 CTACAATTGT CTAGAAGAAA ACTACACTGA GCATGAACTT AGCGTTATAA AAGAATTCGC TGTTAAAAGT CGGGTAATTC TGGGTTTTAG TAAAAAGCAT CTTAAGCGTA
2201 GCAGCCGTCT AAAGTTGCTC ACGGGAGAGC GAAAAAGCGT AGTCTCAATT GCTGCCGCAA CACGCGGTGC TATTGAGCAC TTTTTGGTTC ATCCCGGTGT ACTTGATGTT
2311 TGCAGCAATC CTTGGACTAC GAAGCCATC TATGAAGTAT AAGAACAGCT GGGGTATCCC CGAGGCTGCC CTCCTTCCAA TGCTTTATAT GTGTGGAAAT ACATGCGTTC
2421 CAAAGGGTCC CCCTACTTTC AAGCAGCAGG CACTGCTCTC CTTACCTATC CTGTGACGCA AGGGGCTCAC TTGCTTCTTT ATGGCCCGAT AATGAAGCCT CCCTGGCTAT
2531 ATAGAGGAAT CGCTACTACG GATGCAATGA TGGGCTATAC AACAAAGCTA ACTGGTACTA AACTAGGAAC GACTGAGGAT CCGCTGCTAA AATTATTGTT CCCTAAGCT
2641 TGTAACAAAA AGACGTTTTT GTGGCTAGAG AAGGATGTAA CTGAGGAGCA TGCTTCCCAG TAAACATAGA ACAATAGTAA GGGAGAAGTG TTGACAATGA TACCCAAATT
2751 TAATGTATTA ACACCTGATC AAGTACAGCA AGTCCATGAT CAGAGTATGA GAATTTTGGA AGAAATCGGA GTGGAATTTT CCTATCAACC TGCGCTTGAT GTTCTGAAAG
2861 CTAAAGGCCA AAGAGTTGAG GGACAGCGAG TTTACTTTCA GAGAAAATTT GTGGAAGAGC AAGTAGCTAA GGCTCCTGCC GAGTTTACTC TCCATGCACG TAACCCGGAA
2971 AACAACCTGG TAGTTGGTGG TGAGAATATC ATCTTTATGC CTGGCTATGG CTCACCATTT ATCCATGAAG CAGACGGAAC GCGGCGTAAC ACAAATATGG CAGACTATGA
3081 CAACTTCGTA AAGTTAGCCC ATATGAGCAC CAACCTGCAT ATGACTGGTG GTAATGCAGC CGAACCAAAC GAGGTTCCCG ACTCAATTAG ACATCTGAAA ATGACTTATA
3191 GTTCCATAAC ACTTTCCGAT AAATGCTTTA TGGGCAGTGC GTCTGGCTAT GACAAAGCAC AGGACAATAT TGAAATGGCA GCTATTTTGT TTGGCGGCAG GGACGTTATC
3301 AAAGAAAAGC CAGCCTTGAT TTGCCTCATT AACTCGGTTA CCCCGCTAAA ATATGATGAC CGTATGTTAG GTGCTTTGAT GGCCTATGCA CAATCAGGTC AGGCCATGGT
3411 AGTTGCCTCC CTGGTAATGG CCGGATCAAC AGGACCGGCA ACAATGGCCG GTGCGTTAGC CCTCCAGAAC GCTGAAGTAT TAGCCGGTAT TGCATTAATA CAAAGTATTA
3521 ACCCTGGTAA CCCCGTAGTG TATGGTTCAA CCTCTGCTAT CACTGATATG CAGACCGGAT CACTATCTAT CGGTAACCCT GAAGGAGCTT TCTTCACTTC TGCCAGTGCT
3631 CAACTGGCAA GATTCTATCG GGTTCCAAGC CGGGGAGGCG GCGGCTTGAG CGACTCTAAA ATTGTCGATG CCCAGGCCGG TTATGAATCA ATGATGACAT TGATGGCTGC
```



Nukleotidsequenz stromauf- und abwärts der vorhergesagten Methyltransferase-Gens *mtmC* in *Sporomusa ovata* H1.

ORF	Vorhergesagtes Genprodukt				
	Identität [%]	Länge [AS]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC-Nummer
mtmC	69	219	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Protein mit **Cobalamin Bindedomäne**	2.1.1.-
mtmB	79	202	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Monomethylamin Methyltransferase MtmB	2.1.1.-
mtmA	93	241	*Thermincola sp.* JR	Monomethylamin Methyltransferase MtmB	2.1.1.-
orf1	56	319	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Ferredoxin	
orf2	69	148	*Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771	Ferredoxin	



```
2641 GGACTCTCCG CCATTTATGG AGTGAAATTA TGAAAAGTAC AGTTGTTTTT CAACCGGCAG GCTGCCGGGG AATGATTTCT TGTGGGAATA GTGTGCTTAC TGCCGCCAGA
2751 GAATTAGGGG TAGCTATGGA AGCGCCCTGT GGTGGCGGCG CGGTCTGTGG CAAATGTAAA GTAATAATTA ATGAGATGTC AAATGTATCG CCGGTAACTG AGAAAGAGAA
2861 AAAAACTCTC AGTGCTGAGG AATTGACAAA TAACTATCGC CTGGCATGCA GTACGCAAAT CTACGGCGAT GTTTTGGTAA TTGTACCACC GGAAAGCAGT TTGCTTAACC
2971 AAGTGGTGCT GGAAACTGGA ACAGTACGGC CCTTTAGTAT AAACCCGGCG GTAAAAAAGT ATTATGTGGA ACTGCATAAG CCGACTTTAG CTGATTGCCG GGATGATTTT
3081 TCCCGTTTGA AAGCGGCCAT GGAAAGTCGG TTTATTCAGC TTGACAAACA AATAACAATT GACTATCAGG TTCTTGGCAG TTTACCTGAT GTCTTGCGGC AAAGTGACTG
3191 GAAGGTTACG GTTACGTTAT GGCAGGACAG TGAGATTGTT GCTGTTGAGC CAGGAAAGGT TGCGAAGTCG TATGGCATTG CCGTTGATGT TGGCACAACA ACCATAGCCG
3301 CGTATTTGTG TGAGCTTACT ACAGGCATGA CGATAGCCCA GGCATCGTGC ATGAACAGCC AGGTTGGTTA TGGCGATGAT GTACTGTCGC GAATTTCCTA TTGCGTAACT
3411 AATGAGGATG GTCTTGCTAA ATTACAGCAA TTAATTATTG CTGACATTAA CACCCTTGTC AGCAATTTAA GTGACAAGGC AACGATTAAC CCGGAAGATA TTTTGGAAAT
3521 TGTACTTGTT TTTAATACGG TCATGCACCA TATTGCATTA CATATTAATC CCCAATATAT TGGGAGTGCC CCCTTTGCCG CTGTTATTAA GGAGGCTGTA AATGTTAAAG
3631 CCCGCGAATT GGGGATAAAA ATTGCCGCAA GCGGATATAT TCATTGTTTG CCGCTGGAAG CCGGTTTTGT TGGTGCTGAC AATGTGGCGG TACTTATCGC TGAGCAGCCA
3741 CATCGTCAAA GTAAGATGAG CCTAATTGTA GATATTGGGA CAAATGGCGA GATTAACTTT GGTAATAGCG AGGGTGTGTT ATCTGCCTCC TGTGCCACTG GCCCGGCGCT
3851 CGAAGGCGCT CAAATCAAAT TTGGTATGCG GGCGGCACCA GGAGCTATTG CTAACATCAG CATCGACCGT AAAACCAAAG AACCTGAGAT TGAGGTTATT GAGTCACTTG
3961 TAGATAATAA AACTTGTTTG CCTCGTGCCA GGGGAATATG TGGTTCAGGA ATAATTGACG CTGTGGCCGA GTTATTTAAA GCAGGCATTA TCAGAAAGGA TGGCAGTTTC
4071 AATAAAGATA TTCAGTGTTC CCGCTTGCGC AAAGGGGCTA CAGGCAAATT CGAATATGTG CTGGCATGGG CGGCTGAAAC TGCCATTGAC CAGGATACCA GCCCGGGCCG
4181 TCGACCACGC GTGCCCTATA
```

7.3 Nukleotidsequenzen der identifizierten Referenzgene zur qRT-PCR-Analyse in *Sporomusa ovata* H1.

Im folgenden Abschnitt sind die Nukleotidsequenzen der identifizierten Referenzgene für qRT-PCR Analysen dargestellt: Blau hervorgehoben sind die Oligonukleotide, welche zur Expressionsanalyse verwendet wurden.

Nukleotidsequenz des *rrnA*-Gens (kodiert für die 16S-ribosomale RNA) aus *Sporomusa ovata* H1.

```
   1 GAGTTTGATC CTGGCTCAGG ACGAACGCTG GCGGCGTGCC TAACACATGC AAGTCGAACG GGGAGTTACT TGTAACTCCT AGTGGCGAAC GGGTGAGTAA CGCGTAGACA
 111 ACCTGCCTCT AAATTGGGGA CAACACCGCG AAAGTGGTGC TAATACCGAA TGTGGTATCT TGGTCGCATG ACTGAGATAA GAAAGGTGGC CTCTGAATAT GCTACCGCTT
 221 AGAGATGGGT CTGCGTCTGA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTCACCA AGGCTGCGAT CAGTAGCCGG TCTGAGAGGA TGAACGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC
 331 CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATCTTCCGCA ATGGACGAAA GTCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG AAGGTCTTCG GATTGTAAAG CTCTGTCGTT
 441 TGGGACGAAC GTATTCTATG TAAATAATGT AGAGTAATGA CGGTACCAAA GGAGGAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT
 551 GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGCGTGT AGGTGGATGT TTAAGTCGTG TGTCTAAGTG CGGGGCTCAA CCCCGTATAG GCGCAGGAAA CTGGAGATCT TGAGTGCAGG
 661 AGAGGAAAGT GGAATTCCCA GTGTAGGGGT GAAATGCGTA GATATTGGGA GGAACACCAG TGGCGAAGGC GACTTTCTGG ACTGTGTCTG ACACTGAGGC GCGAAAGCCA
 771 GGGGAGCGAA CGGGATTAGA TACCCCGGTA GTCCTGGCCG TAAACGATGG GTACTAGGTG TAGAGGGTAT CGACCCCTTC TGTGCCGGAG TTAACGCAAT AAGTACCCCG
 881 CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGTTGAAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGTATG TGGTTTAATT CGACGCAACG CGAAGAACCT TACCAGGACT
 991 TGACATTGAG TGAAAGCTTA AGAGATTAGT TCCTTTCTTC GGAGACACGA AAACAGGTGG TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA
1101 ACGAGCGCAA CCCTTATCCT TTGTTGCCAG CACGTAATGG TGGGAACTCA AGGGAGACTG CCGCAGACAA TGCGGAGGAA GGCGGGGATG ACGTCAAGTC ATCATGCCCC
1211 TTATGTCCTG GGCTACACAC GTACTACAAT GGGCTTAAAC AAAGCGAAGC AAGCCCGCGA GGGTAAGCCA AACGCATAAA CAAGCTCTCA GTTCGGATCG GAGGCTGCAA
1321 CTCGCCTCCG TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGCAGGTC AGCATACTGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCACGAAAG TTGACAACAC
1431 CCGAAGCCGG TGGGGTAACC CGCCCGTCAC ACCACGAAAG TTGACAACAC CCGAAGCCGG TGGGGTAACC
```

Nukleotidsequenz des *recA*-Gens (kodiert für eine Rekombinase A) aus *Sporomusa ovata* H1.

Grün markiert ist der offene Leserahmen, der für die Rekombinase A kodiert.

```
   1 CCATTGCCAG AGGCAGTTTG ATGTGTACAG CGGCATCGTT GCCGATTTAG CAACAGACTA TGATCCAATT GATCTTGCTG CGGCGGCACT AAAACTCTTT CAGGAAGGTT
 111 ATAAAGAACA AGCTGTTATT GAAAAAGCTC AGTTTGGTAA TACTGGTGCC GAACCAGGCA TGGTACGCCT GTTTATTAAT GCCGGACGAG CTCAAAGAAT TCAGCCCCAG
 221 GATATTGTTC GTACCATTGC AGAAGAGGCA GATATTGAAG GCAGCATTAT TGGGGTCATA AATATTTATG ACAAATTTAC CTTTGTAGAA GTTCCGGAAA GTGTTGCTGA
 331 ACGGGTATTG TCGGTCATGA ATAAGAACAC GATCAAAGGC TATCGCATTA ATATTGAGCC GGCAAAAGGA CGCTAAAATA GAGGAAAATT ATAGACTTAA CCGCGATATT
 441 GTCATTGACA AAACGAACAA ACGTTTGTAT AATGTGCTTA GAGTTGTCGG GGGAGGTTTA TAGTACTATG GATAAGGCCA AAGATTTTGA AAAGAATCTG GAAATGGATA
 551 AAGTTAAAGC GCTTGAAAAT GCCATGCGTC AAATAGAAAA AGATTTTGGC AAAGGTGCAA TAATGAAGCT TGGCGAAGCG GCTGCTAAAA TGAATATTGA GGTTATTCCC
 661 ACAGGGTCGT TGCCGCTTGA TATTGCTCTT GGGGTCGGCG GAGTGCCGCG GGGACGGGTT ATTGAGATAT TTGGGCCTGA ATCATCAGGA AAAACGACAG TAGCGTTACA
 771 CGTTATTGCT CAGGCTCAAA AAATGGACGG AATTGCCGCC TTTATTGATG CCGAACATGC ACTTGATCCT TCTTATGCCA AAAAACTGGG TGTTGATATT GATAATCTTT
 881 TAATATCGCA GCCTGATAAT GGTGAACAAG CGCTGGAGAT TACGGAAGCA CTTGTGCGTA GTGCGGCTAT TGATGTCGTT GTTGTTGACT CGGTAGCGGC CTTGGTGGCT
 991 AAAAATGAGA TTGACGGTGA TATGGGTGAT TCCCATGTCG GTCTGCATGC CCGTCTAATG TCCCAGGCGC TTCGTAAACT AACAGGTGTT ATTAGTAAAT CACGAACCAC
1101 CGTTATTTTT ATTAATCAAA TCCGCGAAAA AGTGGGCGTT ATGTTTGGTA ATCCGGAGAC AACTACTGGT GGCAGGGCCG TGAAATTCTA TGCTTCAATC CGTTTGGATG
1211 TTCGCAAAGC AGAGACTTTG AAACAGGGAA ATGATGTCGT AGGCAGCCGG ACCAAGGTTA AGGTGGTTAA AAATAAAGTG GCACCGGCAT TTAAACTGGC AGAATTTGAT
1321 ATAATGTATG GCGAAGGTAT TTCCCGCGAA GGGAGTATCG TTGATATGGG TGTTAATCTT GAGATCATAA ATAAAAGCGG TGCCTGGTTT TCTTATAATG GACAACGGCT
1431 GGGGCAAGGC AGAGAAAATG TTAAAGAGTA TTTTAAAGAA AACCCGGGCA TTGCTGACGA AATTGAGCAA AAGGTCCGCG AAAATTTACT TGCCGGCGAT ACTAAGCTTG
1541 AGCAGGTAGT TAGTGCTGGC GATGAGCCAT TTGAGGATAA TGATGAGGGT TTCGAAGCCT AATGAATAAG AATGTATCCT GAAGCTGCTG TTAAGCTTTT AAAAATTAGA
1651 ACCTACAGCC AACAGGAATT GGAACAAAAG CTTCTAAAAC AAGGCTATGA TGAAGTGGTG GTCGGCGAGG CTATTGAATA TGTCACAAAG CGCGGTTATC TGAATGATGC
1761 CGCGCTTTGT GATATGCTTG TAGAGCGGTA TGCG
```

Nukleotidsequenz des *rnpA*-Gens (kodiert für RNaseP) aus *Sporomusa ovata* H1.

```
   1 TAATAATTCA GGCAAAGATG TATTTACGGC CTATTGACTT CTTTTGTCGT TAGTGTTATG ATTTAAATTC ATAATAATAT GGTTTCTGAG TACGAAAGAT GATCGCAGAT
 111 GTTTGAGGCA TCTGAGGAAA GTCCGAGCTC CATAGGGCAG GGTGCTGGAT AACGTCCAGC GAGGGCGACC TTAGGGATAG TGCCACAGAA ATGTAGACCG CCTGACGTTT
 221 TGTCAGGTAA GGATGAACGG TGCGGTAGAG CGCACCAGCA GTCAGGTATC TGGCTGGCTA CGTAAACCCC ACCTGGAGCA AGACCAAATA GGGAAGGGAT GAAGCGGCCC
 331 GCTGAACCTT CCGGGTGTGT CGCTAGAGTT GTCAGGTAAC TGGCAATCCA GATAAATGAT CGTCGCCGCC AAAAGCGGAA CAGAACTCGG CTTATTGACT ACTCAGAATT
 441 GAGCATAGTA AAACCCGCAG ACTTTTTTTA TTGTTTGCGG GTTTCGTATA TGGTGACACA CTTTTGCAGG AACAGTAGCT GATTAGCAGA GACTGTTACA AAATACCCTC
 551 TTTGCAGTTG AGCCTTTCAG CATAGAAACC GAGTATACCC TTGCTGTGCG ACTTCATGGC GTATAACACC GGGGTATTTT ATAACAGTTT ACCAGCCCGG GCCGTCGACC
 661 ACGGCCCG
```

7.4 Nukleotidsequenzen der SELEX-Analyse zur Identifizierung der LuxR-DNA-Bindestelle im Genom von *Sporomusa ovata* H1.

Im folgenden Abschnitt sind die Nukleotidsequenzen der aus der SELEX-Analyse dargestellt. Gelb hervorgehoben sind die bestimmten offenen Leserahmen. Die Zuordnung der einzelnen Banden im Agarosegel (siehe Abbildung 4.14) ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

Bande	Länge [Bp]	Vorhergesagtes Genprodukt			
		Identität [%]	Bakterium	Vorhergesagte Funktion	EC/TC-Nummer
1	865	68	*Clostridium ljungdahlii* DSM 13528	Uroporphyrinogen III Decarboxylase	4.1.1.37
2	830	74	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	Peptidketten Release Faktor 2	3.6.5.3
3	516	57	*Thermosinus carboxydivorans* Nor1	DNA-abhängige DNA-Polymerase	2.7.7.6
4	456	67	*Desulfitobacterium hafniense*	Protein mit Molydopterindinukleotid-Bindemotiv	
5	262	34	*Selenomonas sp.* F0430	TonB-abhängiges Rezeptorprotein	1.B.14.3.1
6	274	80	*Thermosinus carboxydivorans*	Thiaminmonophosphat Kinase	2.7.4.16
7	**268**	**55**	***Clostridium carboxidivorans* P7**	**Anaerobe Kobaltchelatase CbiK**	**1.4.99.1.3**

Bande 1:

```
  1 GTAAAACGAC GGCCAGTGCC AAGTAATTCT TCTATTAAAT CAGGGTGTCA AAGGTTCGGT CTAATAGAAC CATGTACGTT GGTGTTTGGT CGTATGGTAC CATAATATAA
111 ATATAATTTT GGAGGAGTAG ATTATGATAA AAACAGCACA ACAAGTACTT GCGGAACGTA CGGAAAGATT GAAAAAAACG ATTGCCTTTG AAGAAACTGA CCGTACACCG
221 GTTATACTTT CGGGAGATGC CGTTTTTGCC AGGCATGTTG GCATGAAGCT ATCAGAATTT GTCTCAAACA TGAAAGCCTC CCATCAAGCC ATTTTATCAT CATTTAAAGA
331 TTTAGGGGAT GTGGATGGAA CAGGCAGCAC TTATGCGACA GCCACAATTT TTCCGTTAAT TTTTTATTCG AAAGTCAAAT TACCTGGGCG TGAGCTTCCT GATGATACTC
441 CGTGGCAGCT TGATGAGCAG GAATTGATGA CAGTGGAAGA CTATGATACC ATTCTGAATA AAGGCTGGAA AGCTTTTAGC GAGGATTATT TAAAAAATAG GGTTGGCTTT
551 GATCTTGATT CGATCCGTGC CCAATTGGCA GATGTTCCGC AATTTATCAA AAATTTTGAG GAGGCCGGTT ATTTGGTATA TTCCCCCAAA GCATCCTCCA CAGTTAATGA
661 ATTTTTGGGC GGCGGGCGCT CATTTCCCAA ATTCATGAAA GATATGTTTA AAATACCTGA TAAGGTTGAG GCTGTTTTAG ATGTTATTCT TGAAGAAAAT TTAGCAGAGT
771 TACGCCAGCA AATACGAGTC ATTAAACCTT TAGTTGTCTT TATGTCACCG GCCCGGGGCG CTAGTGAATT ACTTGGCACT GGCCGTCGTT TTACTT
```

Bande 2:

```
  1 CTATAGGGCA CGCGTGGTGG CGAAGAAGGA GACGAACAGT CTCAGCCACT GGAACCAATT ATTAATACAG ATACAACGGG CCGTAATGAA TTATGTCCTT GCGGCAGTGG
111 TAAAAAATAC AAACGCTGTT GTGGCGCAAA ATAATAGGGA GTTGTGAAAG TGCTTTTGGA AGAATTGCGC GGGTCGATAG AGACCATGGC TAAACGGCTT GAAGAAATGA
221 GGGCCTCTCT TTGACGTTGA CGGTAAAAGG GAACGTATTG AAGAACTAGA AGATAGAATG AGTGATCCTA CCTTCTGGGA TGACTCTGAT GAGGCGCAAA AAATTGCCCA
331 AGAGGTTACA CGTATGAAGG ACAGTATCAG CCAGTACTAT CACTTGCTTA GCCGTCACAG TGATATGGCT ACTTTATGGC AATTGGGGCT GGAAGAGCAG GACGACAGTG
441 TTTATTCTGA AGTAACTGCC GGCCTTGCCA GCATAGAGCA GGAACTGGAT CATCTTGAAC TGACCCAGAT GCTTTCGGGT GAGTATGATC GTAATAACGC TATTTTGACA
551 CTGCATGCCG GGGCTGGTGG GACCGAAGCA CAGGATTGGG CGCAAATGCT GCTCAGAATG TATGTGCGTT GGGCTGAAAA GAACAGTTAC AAGGTTGAGA CCATGGACTT
661 TCAGGCCGGC GATGAGGCTG GCGTTAAAAG TGTGACATTG ATGATTAGTG GTACTAATGT CTATGGCTAT TTGAAAGCCG AAAAAGGGGT ACACCGCCTT GTTCGTATTT
771 CGCCCTTTGA TGCCAGTGGC CGGCACCAGC CCGGGCCGTC GACCACGCGT GCCCTATAGT
```

Bande 3:

```
  1 ACTATAGGGC ACGCGTGGTG CATGGCTAAG CATAGTTGCA GTTGCAACTA TTTGCGGGCG GTATTATAAT CGCAAGGTGC TATGGCTTTT ATTAATTCCG TTGGGTGCAC
111 TTTTTTGTCA GGATGCAGTA ATGGACCGAT TAATGTCGAT TTTTAATCCC ACAGATACTT CTTCAACCTT GAGAATAGCC TTATGGGAAA GCACGATGGC CATGATTTGG
221 GATAAGCCAC TGTTCGGAAT TGGCTGGGGA GCCTACTGGC TAGTGTATCC TGAGTATGAT TTTTTCCTAA ATAACCCTGC CGCCCGGATT GTTCATGCTC ACAATATGTA
331 CCTACATATT GCCGCTGAAA TTGGGATACC AGGATTGATT GTTTTTTTAA TTATTATTTA TGGACATACT GAGAAAGCAA TGGATATTTT AAGTCATACC AACAATCGCT
441 GGGTAACCGG GCTTATGCTT GGCATAGTGG CTGACCAGCC CGGGCCGTCG ACCACGCGTG CCCTATAGTA TCTTGC
```

Bande 4:

```
  1 ACTATAGGGC ACGCGTGGTG GAGATTATGA CAGTTAAAGG AGGTTTTCGG GTATGGATAA GAAAAAAACA GAGGGAACCC CAGGGATGCT GACTAATCCA AATTACAGTT
111 TAAGTGACTA TGCGACTAAA AATGTTAAGT GCCCTTCCTG CGGAATGTTT AATCCACCGG CCCTTGAAAA ATGCCGCCGG TGCGGGGCAG ACGTACCCAA AAAGGAACAA
221 TAGCAAACTC AACTAGCAAT ACAAACATTG TTATTGATAG CGGAGATCAA ATTTATAAGG AGGCAGGCAA TTTTATGGGT AGTGATAGTA AAAAAGTACA GTGGCAAGAA
331 GGCGATTTGA CTGTAACCCG TACCTGTTCA TGGACAGCGA CAGGTTGCCA TGATGGCTGC TCAGTCCTTT ATTATACTAA AGGAAATGAG ACCAGCCCGG GCCGTCGACC
441 ACGCGTGCCC TATAGT
```

Bande 5:

```
  1 ATTCGAATCA AGACTTTAGC GGTACCTATA AAAACAGAAC ACAAGGCTTT GCCTGCCAAA CAGACTGGCA ATTAGGTGAC CGTCATAAAG TGGTTACCGG TCTTGACTGG
111 GAAAAGGGTG AAGTCCTGGA AAATACATAT CACGATGAAT ATCATGATAC TGTAAACTAT AAAAATAAAT CGGTTACTAA TACGGCATTT TACTTACAAG ATATTTTTAC
221 GGTAACAGAC AAATGGACTG TGACACCACG CGTGCCCTAT AG
```

Bande 6:

```
  1 ACTATAGGGC ACGCGTGGTA CTTGGGATTG GCGATGATGC TGCCGTATTA CTGCCAACAC CCCGGCAATT GCTGCTGGTG ACTACTGTTA TGCTAGTTGA ATCTGTACAC
111 TTCAATTTAG CTACCACAAC TCCCTGGCAG CTTGGCTATA AAGCAATTGC TGTTAATTTA AGTGATATTG CCGCTATGGG CGGTGTACCC CGCCATGCTG TAGTATCGGT
221 GGCCTTGCCT CCGTCAACAT CGGCAGATTT TGTTGTAAAT CTATATCAGG GCAT
```

Bande 7:

(Braun hervorgehoben ist die Nukleotidsequenz des palindromischen LuxR-DNA-Bindemotivs)

```
  1 AGTTAGCGTA TGCAGAACCG GCTTAGGGGA AAATCcTGCC ATTCAGGCTA TTTATGTTCA ACATCTCAAG GATGCGTTGC TGGCGCTGGA AATGCGGCAT GGGCAGCGCA
111 AGGGACCGGC TCATGCCTAA ATAAAACGAG GTGGATGAGA TATGGGAAAA ATACTGTTCA TAACCAACAG TATTTGATCG CTGATCCGGG CGATGATGTG CTGGAATACG
221 GCCTTACTCC CGCTGAAAAA ACACAAATTC AGCAGTATAT CACCTTT
```

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Peter Dürre für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit an seinem Institut, der Anfertigung von Gutachten und der Unterstützung während meiner Promotion.

Ich danke Prof. Dr. Bernhard Eikmanns für die übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Erhard Stupperich danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die sehr lehrreichen Jahren und für die Durchsicht meiner Arbeit.

Der Carl-Zeiss-Stiftung danke ich für die Bewilligung des Stipendiums und die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Rolf Daniel und Frau Dr. Anja Poehlein vom Labor für Genomanalyse der Universität Göttingen danke ich für die Möglichkeit der Einsicht der Rohdaten der Genomsequenzierung von *Sporomusa* am Ende meiner Arbeit.

Der gesamten AG Stupperich danke ich für die sehr sehr angenehme Atmosphäre im Labor und die freundschaftliche Zusammenarbeit.
Naemi, Julia, Birgit und Karin gilt besonderer Dank. Natürlich möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Labors und allen Praktikanten bedanken.

Dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie mit allen Mitarbeitern möchte ich für die Aufnahme, Beantwortung von Fragen und Hilfestellung bei Problemen danken.
Allen voran Anne, Brigitte und Petra und Brigitte.

Ein großer Dank geht besonders an meine Eltern für die gesamte bisherige Unterstützung, vor allem während des Studiums.

Lebenslauf

8. Januar 1981	Geburt in Deggendorf
1987-1991	Besuch der Hans-Carossa Volksschule, Pilsting
1991-2000	Besuch des Gymnasiums Landau, Landau a.d. Isar
06.2000	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
08.2000-07.2001	Zivildienst in der Jugendbildungsstätte Windberg
09.2001	Immatrikulation an der Universität Ulm im Fach Biologie
08.2003-11.2003	Diplomvorprüfungen in den Fächern Zoologie, Botanik, Mikrobiologie, Chemie und Physik
12.2004-09.2005	Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Virologie, Zellbiologie und Informatik
12.2005-08.2006	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Ulm zum Thema: Untersuchungen zu „Corrinoid-Riboswitches“ als genregulatorische Elemente in *Sporomusa ovata*
09.2006	Beginn der Promotion am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Ulm zum Thema: Corrinoid-Metabolismus in *Sporomusa ovata* H1

Andreas Hiergeist

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben. Alle Zitate sind gekennzeichnet, und alle Abbildungen enthalten nur die originalen Daten und sind in keinem Fall inhaltsverändernder Bildarbeiten unterzogen worden. Alle existierenden Exemplare der vorliegenden Dissertation sind in Wort und Bild übereinstimmend.

Ulm, Juni 2011

Andreas Hiergeist