

**Die Veratrol-O-Demethylase aus *Acetobacterium dehalogenans*:
Reinigung, Charakterisierung und Aktivierung einzelner
Komponenten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena.**

Von Diplom-Biologin (technischer Orientierung) Tina Engelmann

Geboren am 6. August 1970 in Stuttgart-Bad Cannstatt

Gutachter für die Dissertation

1. Gutachter: Frau Prof. G. Diekert
2. Gutachter: Frau Prof. E. Kothe
3. Gutachter: Herr Prof. J. Andreesen

Herr Prof. Jan Andreesen
Universität Halle, Institut für Mikrobiologie
Weinbergweg 16A
06099 Halle-S

Promotionsprüfung: 12. September 2002

Öffentliche Verteidigung: 14. Oktober 2002

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	3
2 EINLEITUNG	5
3 MATERIAL UND METHODEN	10
3.1 Verwendetes Material	10
Organismen	10
Chemikalien	10
Biochemikalien	10
Gase	10
3.2 Kultivierung von <i>Acetobacterium dehalogenans</i>	11
3.3 Zellernte und Herstellung von Rohextrakt	13
3.4 Analytische Methoden	14
Bestimmung von Phenylmethylethern	14
Bestimmung der Proteinkonzentration	14
Bestimmung der O-Demethylase-Aktivität	14
Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	16
Metallanalyse der Methyltransferase MTI_{ver} und des Corrinoidproteins Cp_{ver}	16
Bestimmung der Masse des Cofaktors des Corrinoidproteins Cp_{ver}	16
3.5 2D-Gelelektrophorese	17
3.6 Spezielle Methoden	18
Anreicherung und Reinigung der Komponenten der Veratrol- O-Demethylase	18
Herstellung von Titan(III)citrat	19
Bestimmung der Methyltransferase I-Aktivität und der Methylierung der Corrinoidproteine Cp_{ver} und Cp_{van}	19
Extraktion und Charakterisierung des Cofaktors aus dem Corrinoidprotein Cp_{ver}	20
Charakterisierung des Corrinoid-Cofaktors des Proteins Cp_{ver}	21
Redox Titration der Corrinoidproteine	22
Reduktion des Corrinoidproteins Cp_{ver}	23
3.7 Molekularbiologische Methoden	24
Amplifizierung und Sequenzierung des Gens $odmA_{ver}$	24
Amplifizierung und Sequenzierung des Gens $odmB_{ver}$ mittels Genome walking	24
Amplifizierung und Sequenzierung von $odmD_{ver}$, $odmD_{van}$ und $odmD_x$	25

INHALTSVERZEICHNIS

4	ERGEBNISSE	28
4.1	Reinigung und Eigenschaften von Komponenten der Veratrol- <i>O</i> -Demethylase	29
4.2	Charakterisierung der Methyltransferase I_{veratrol}	34
	Methylierung des Corrinoideproteins Cp_{van} durch MTI_{ver}	35
	Methylierung des Corrinoideproteins Cp_{ver} durch MTI_{ver}	37
4.3	Charakterisierung des Corrinoideproteins Cp_{ver}	39
	Absorptionsspektrum des Corrinoideproteins Cp_{ver}	39
	Extraktion und Charakterisierung des Cofaktors aus dem Corrinoideprotein Cp_{ver}	40
	Bestimmung des Redoxpotentials der Corrinoideproteine Cp_{van} und Cp_{ver}	44
4.4	Aktivierung des Corrinoideproteins Cp_{ver}	46
	ATP-abhängige Aktivierung	46
	MTI_{ver} -abhängige Aktivierung	49
4.5	Genorganisation der <i>O</i> -Demethylasen	53
	Amplifizierung und Analyse des Gens $odmA_{\text{ver}}$	53
	Amplifizierung und Analyse des Gens $odmB_{\text{ver}}$	54
	Amplifizierung und Analyse der Gene $odmD_{\text{ver}}$, $odmD_{\text{van}}$ und $odmD_x$	57
5	DISKUSSION	62
	LITERATURVERZEICHNIS	67
Anhang 1:	Gencluster mit den offenen Leserahmen $odmD_{\text{ver}}$, $odmA_{\text{ver}}$, $odmB_{\text{ver}}$ und $ctax$.	74
Anhang 2:	Gencluster mit den offenen Leserahmen $odmD_{\text{van}}$ und $odmA_{\text{van}}$	77
Anhang 3:	Gencluster mit den offenen Leserahmen $odmD_x$ und $odmA_x$.	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP/ATP	Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-Benzol-Sulfofluorid Hydrochlorid
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
CoA	Coenzym A
d	Schichtdicke
2D-Gelelektrophorese	2-dimensionale Gelelektrophorese
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E	Potential unter angegebenen Bedingungen
E ⁰	Potential unter Standardbedingungen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
FH ₄	Tetrahydrofolat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
K	Dehalogenierungsgeschwindigkeit
kat	Katal (mol/s)
Da	Dalton
ESI-MS	Elektrospray Massenspektrometrie
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form)
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei 578 nm
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

pl	Isoelektrischer Punkt
ppm	Parts per million
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Aminosäuren wurden mit dem Ein-Buchstaben-Code abgekürzt, wobei X für eine Position mit beliebiger Aminosäure verwendet wurde.

Themenspezifische Abkürzungen:

Odm/ <i>odm</i>	O-Demethylase Protein/ <i>Gen</i>
MTI/ <i>odmB</i>	Methyltransferase I
MTII/ <i>odmD</i>	Methyltransferase II
Cp/ <i>odmA</i>	Corrinoidprotein
AE	Aktivierendes Enzym
Index: van/ <i>ver/x</i>	Der jeweilige Index kennzeichnet die jeweilige Komponente als Bestandteil der Vanillat-/Veratrol-/ O-Demethylase oder der mutmaßlichen O-Demethylase X

1 ZUSAMMENFASSUNG

Acetobacterium dehalogenans ist ein obligat anaerobes, homoacetogenes Bakterium, das in der Lage ist, die Methylgruppen von Phenylmethylethern im Energiestoffwechsel zu Acetat umzusetzen. Die Etherspaltung an der Methoxygruppe und die Übertragung der Methylgruppe auf Tetrahydrofolat wird durch das Enzymsystem O-Demethylase katalysiert. Bereits publizierte Arbeiten zur O-Demethylierung von Vanillat zeigten, daß die Vanillat-O-Demethylase ein Enzymsystem mit vier verschiedenen Komponenten war. Bei der Verwendung von verschiedenen Phenylmethylethern als Kohlenstoff- und Energiequelle zeigte sich, daß es unterschiedliche induzierbare O-Demethylasen in *A. dehalogenans* gibt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reinigung und Charakterisierung von Komponenten einer induzierbaren O-Demethylase. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Durch das Wachstum auf 3-Methoxyphenol wurde eine O-Demethylase induziert, die als Veratrol-O-Demethylase bezeichnet wurde, aufgrund ihrer Fähigkeit das Substrat Veratrol (1,2-Dimethoxybenzol) besonders schnell umsetzen zu können. Die Komponenten dieser O-Demethylase konnten teilweise gereinigt werden, darunter eine Veratrol:Corrinoidprotein Methyltransferase I (MTI_{ver}) und ein Corrinoidprotein (Cp_{ver}). Anhand von Vergleichsanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese wurde gezeigt, daß es sich um induzierbare Proteine handelte. Außerdem wurde ein aktivierendes Enzym angereichert. Genetische Untersuchungen erbrachten Hinweise auf das Vorhandensein einer mutmaßlichen Methyltransferase II der Veratrol-O-Demethylase. Die Daten lassen den Schluß zu, daß es sich bei der Veratrol-O-Demethylase ebenfalls um ein vier-Komponenten-System handelt.
2. Die apparente molekulare Masse der gereinigten Methyltransferase MTI_{ver} betrug 32 kDa. MTI_{ver} unterschied sich von der Vanillat:Corrinoidprotein Methyltransferase I (MTI_{van}) hinsichtlich der N-terminalen Aminosäuresequenz. Die Metallanalyse ergab einen Metallgehalt von 1 Mol Zink pro Mol Protein. MTI_{ver} katalysierte die Übertragung der Methylgruppen von Veratrol (1,2-Dimethoxybenzol), 3,4-Dimethoxybenzoat, 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol auf das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase (OdmA, im folgenden bezeichnet als Cp_{van}). Vanillat diente nicht als Methylgruppendonator. Damit konnte gezeigt werden, daß sich das Substratspektrum der MTI_{ver} von dem der Vanillat-O-Demethylase unterscheidet.
3. Die N-terminale Aminosäuresequenz des induzierbaren Corrinoidproteins Cp_{ver} unterschied sich von der des Corrinoidproteins der Vanillat-O-Demethylase (Cp_{van}); die apparente molekulare Masse betrug 22 kDa. Aus dem Absorptionsspektrum und aus der Metallanalyse ergab sich ein Cofaktor-Gehalt von 1 Mol B_{12} pro Mol Protein. Cp_{ver} konnte durch MTI_{ver} methyliert werden. Veratrol und 3-Methoxyphenol dienten dabei als Methylgruppendonoren, jedoch nicht 2-Methoxyphenol und Vanillat. Veratrol wurde nur bis zur Stufe des 2-Methoxyphenol demethyliert. Die Methylgruppe von 2-Methoxyphenol konnte von MTI_{ver} auf

das Corrinoidprotein Cp_{van} übertragen werden. Das Ergebnis des veränderten Substratspektrums bei der Verwendung von Cp_{ver} anstelle von Cp_{van} als Methylgruppenakzeptor deutet darauf hin, daß das Corrinoidprotein Einfluß auf die Substratspezifität nimmt.

4. Das Redoxpotential der Corrinoidproteine Cp_{van} und Cp_{ver} wurde bestimmt. Für den Übergang von Cob(II)/Cob(I)alamin wurde für Cp_{van} ein Redoxpotential von -413 mV gemessen. Bei Cp_{ver} zeigte sich, daß Titan(III)citrat, das zur Bestimmung des Redoxpotentials als Reduktionsmittel eingesetzt wurde, nicht zur Reduktion dieses Corrinoidproteins bis zur Cob(I)alamins Stufe ausreichte. Es wurde geschätzt, daß das Redoxpotential negativer als -490 mV war. Das Corrinoidprotein kann jedoch nur mit superreduziertem Cob(I)alamin als Cofaktor Methylgruppen akzeptieren. Daher muß Co(II)alamin zunächst reduziert und damit aktiviert werden. Zur Reduktion von Cp_{ver} wurden zwei Möglichkeiten gefunden: (a) Das Corrinoidprotein wurde durch Zugabe von Rohextrakt, ATP und Titan(III)citrat zu Cob(I)alamin reduziert. (b) Cob(I)alamin entstand nach Zugabe von Methylviologen, MTI_{ver} und Titan(III)citrat. Im zuletzt genannten Fall war sowohl die Konzentration von Methylviologen als auch die von MTI_{ver} limitierend für die Bildung von Cob(I)alamin.
5. Die Nukleotidsequenz eines Genclusters odm_{ver} , das die Leserahmen der als $odmD_{ver}$, $odmA_{ver}$ und $odmB_{ver}$ bezeichneten Gene enthielt, wurde ermittelt. $odmD_{ver}$ codiert vermutlich für eine Methyltransferase II, $odmA_{ver}$ und $odmB_{ver}$ mit großer Wahrscheinlichkeit für das Corrinoidprotein und die Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase. Außerdem wurde die Sequenz einer mutmaßlichen Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase ermittelt. Der Leserahmen des zuletzt genannten Gens wurde mit $odmD_{van}$ bezeichnet. Die Sequenz eines weiteren Genclusters odm_x mit den Leserahmen $odmD_x$ und $odmA_x$ wurde ermittelt. Diese Leserahmen könnten ebenfalls für eine mutmaßliche Methyltransferase II und ein Corrinoidprotein einer bisher nicht charakterisierten O-Demethylase aus *A. dehalogenans* codieren. Die Homologie zu $odmD_{ver}$ und $odmA_{ver}$, betrug 74 % und 78 %.
6. Die drei beschriebenen Gencluster odm_{van} , odm_{ver} und odm_x enthielten die Gene der Vanillat- und der Veratrol-O-Demethylase sowie einer mutmaßlichen O-Demethylase. Die Gene $odmA$, $odmD$ und $odmB$ waren in allen drei Genclustern in der gleichen Weise angeordnet. Vor dem ATG-Startcodon des jeweiligen Leserahmens befand sich immer im Abstand von 5-8 Nukleotiden eine mögliche Ribosomenbindungsstelle. Zwischen den Leserahmen konnten keine Promotorregionen oder Terminationsregionen identifiziert werden. Das deutet darauf hin, daß die Gene jeweils zusammen transkribiert werden könnten.

2 EINLEITUNG

Acetobacterium dehalogenans ist ein strikt anaerobes, homoacetogenes Bakterium. Charakteristisch für die meisten Homoacetogenen ist die Fähigkeit, chemolithoautotroph mit CO_2 und Wasserstoff zu wachsen. Dabei werden zwei CO_2 über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg (Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Weg) zu Acetat reduziert. Ein CO_2 wird dabei zur gebundenen Methylgruppe reduziert, ein weiteres CO_2 wird, katalysiert durch die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, zu enzymgebundenem Kohlenmonoxid reduziert (Diekert et al. 1984). Schließlich wird die Methylgruppe zusammen mit Kohlenmonoxid und Coenzym A zu Acetyl-CoA umgesetzt (Hu et al. 1982). Dieses kann im Energiestoffwechsel, unter Entstehung von ATP, zu Acetat umgesetzt oder im Baustoffwechsel für die Zellbausteinsynthese genutzt werden.

Normalerweise haben homoacetogene Bakterien, wie auch *A. dehalogenans*, ein breites Substratspektrum, so daß neben CO_2 und Wasserstoff auch Zucker, Zuckeralkohole und Kohlenmonoxid verwertet werden können. Einige Homoacetogene sind auch in der Lage, auf Substraten zu wachsen, die ausschließlich als Methylgruppendonoren dienen (Diekert & Wohlfarth 1994). Dazu zählen z. B. Methanol (Genthner et al. 1981), Methoxyethanol oder Methoxyacetat (Tanaka & Pfennig 1988; Schuppert & Schink 1990), Methylchlorid (Traunecker et al. 1991) oder Phenylmethylether (Bache & Pfennig 1981). *A. dehalogenans* wurde mit Methylchlorid als Substrat isoliert (Traunecker et al. 1991).

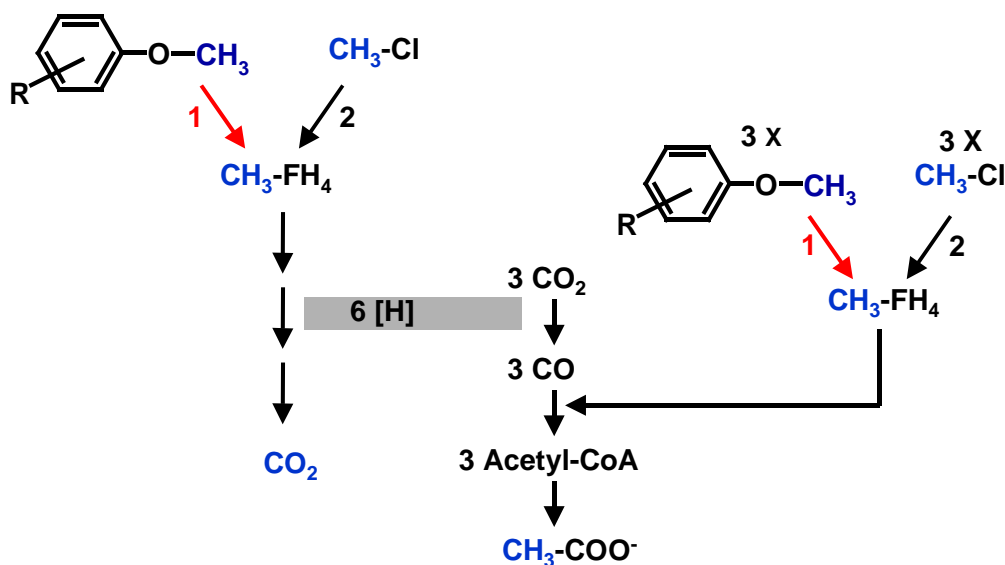


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Acetatbildung über den Acetyl-CoA-Weg beim Wachstum von *A. dehalogenans* mit Phenylmethylethern bzw. Methylchlorid. 1: Übertragung der Methylgruppe vom Phenylmethylether auf Tetrahydrofolat, katalysiert durch die O-Demethylase (Kaufmann et al. 1997). 2: Übertragung der Methylgruppe von Methylchlorid auf Tetrahydrofolat, katalysiert durch die Methylchlorid-Dehalogenase (Meißner et al. 1996). FH_4 : Tetrahydrofolat.

Beim Wachstum auf Methylsubstraten (Abb. 2-1) wird ein Teil der Methylgruppen auf Tetrahydrofolat übertragen und zu CO₂ oxidiert (Meßmer et al. 1993). Mit den dabei entstehenden Reduktionsäquivalenten wird Kohlendioxid zu enzymgebundenem Kohlenmonoxid reduziert. In einer Carbonylierungsreaktion wird aus dem enzymgebundenem Kohlenmonoxid, einer gebundenen Methylgruppe und Coenzym A Acetyl-CoA gebildet.

Die Schlüsselreaktion bei der Verwertung der Methylsubstrate ist die Abspaltung der Methylgruppe vom Substrat und ihre Übertragung auf Tetrahydrofolat. Bei *A. dehalogenans* konnten zwei induzierbare Enzymsysteme identifiziert werden, die diese Reaktion möglich machen. So wurde die für die Demethylierung von Methylchlorid verantwortliche Methylchlorid-Dehalogenase im Rohextrakt charakterisiert (Meßmer et al. 1996). Die O-Demethylierung von Phenylmethylethern wird durch das Enzymsystem O-Demethylase katalysiert.

Verschiedene methoxylierte aromatische Verbindungen, die beim Abbau von Lignin auftreten, werden von Homoacetogenen als Substrat verwendet (Frazer 1994). Lignin ist neben Cellulose und Hemicellulosen der mengenmäßig bedeutsamste Bestandteil der Pflanzen. Die Grundbausteine von Lignin sind Phenylpropanderivate, vor allem Coniferylalkohol. Diese Grundbausteine sind durch Ether- und C-C-Bindungen in vielfältiger Form vernetzt, wodurch eine chemisch sehr komplexe Struktur entsteht. Die genannten Bindungen sind enzymatisch schwer angreifbar (Schlegel 1992). Zum Abbau von Lignin sind einige Pilze durch radikalische Aufspaltung mit Hilfe von Peroxidasen befähigt. Dabei entstehen unterschiedlich substituierte Phenylmethylether. Diese werden weiter abgebaut, indem zunächst die Methylgruppen durch Etherspaltung abgespalten werden. Etherbindungen sind jedoch relativ stabil. Dies ist häufig die Ursache für die Persistenz von Natur- und Fremdstoffen mit Etherbindungen gegenüber mikrobiellem Abbau. Zur Spaltung der Etherbindung muß diese zunächst aktiviert werden. Dies ist unter aeroben Bedingungen durch Einführung eines Sauerstoffs an einem der beiden Kohlenstoffatome durch eine Oxygenase möglich (Bernhardt et al. 1988). Unter anoxischen Bedingungen ist die Spaltung der Etherbindung durch die O-Demethylasen aus homoacetogenen Bakterien möglich. Dabei wird die Etherbindung möglicherweise aktiviert, indem zunächst das Sauerstoffatom der Methoxygruppe durch enzymatische Protonierung positiviert wird und erst dann ein Angriff auf die Methylgruppe durch ein Enzym mit einem starken Nukleophil erfolgt (Meßmer 1996). Chemisch ist eine solche Aktivierung unter stark sauren Bedingungen möglich (Sykes 1988). Ein Beispiel für ein starkes Nukleophil, das in biologischen Systemen genutzt wird, ist das superreduzierte Cob(I)alamin.

Bei der Spaltung der Etherbindung durch O-Demethylasen wird in der Regel nur die Methylgruppe abgespalten, der aromatische Ring bleibt dabei unangetastet. Eine Ausnahme bildet *Holophaga foetida*. Dieses Bakterium ist in der Lage, den aromatischen Ring vollständig abzubauen (Bak et al. 1992). Viele homoacetogene Bakterien sind zur O-Demethylierung befähigt, z.B. *Acetobacterium woodii* (Bache & Pfennig 1981), *Morella thermoacetica* (Daniel et al. 1991) oder *Eubacterium limosum* (DeWeerd et al. 1988). Gereinigt und charakterisiert wurden bisher jedoch nur zwei O-Demethylase-

Systeme: die Vanillat-O-Demethylase aus *A. dehalogenans* (Kaufmann et al. 1997) und die Vanillat-O-Demethylase aus *Moorella thermoacetica* (Naidu & Ragsdale 2001).

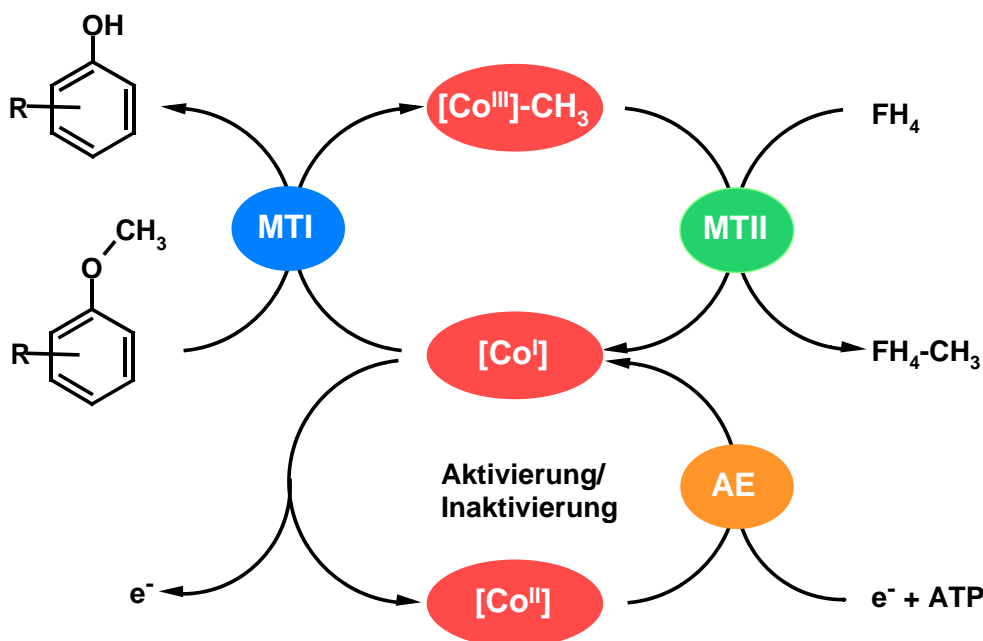


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der O-Demethylierung unter Beteiligung von vier Protein-Komponenten. MTI: Methyltransferase I; Methyl-transferase II; $[\text{Co}^{\text{I}}]$: Corrinoidprotein in der jeweiligen Oxidationsstufe des Cobalt; FH_4 : Tetrahydrofolat.

Die Vanillat-O-Demethylase aus *A. dehalogenans* besteht aus vier Komponenten (Kaufmann et al. 1997, 1998a). Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 2-2 dargestellt. Die erste Teilreaktion wird durch eine Methyltransferase I (MTI) katalysiert. Dabei wird die Methylgruppe vom Phenylmethylether abgespalten und auf ein Corrinoidprotein in seiner superreduzierten Form übertragen. Die Demethylierung des Methylcobalamin und die Methylierung von Tetrahydrofolat erfolgt durch die Methyltransferase II (MTII). Aufgrund seines sehr negativen Redoxpotentials kann das dabei entstandene Cob(I)alamin im Verlauf mehrerer Reaktionszyklen gelegentlich zu Cob(II)alamin oxidiert werden. Zur Reaktivierung des durch die Autoxidation entstandenen inaktiven Cob(II)alamin-Proteins wird ein aktivierendes Enzym (AE) benötigt, das die Reduktion des inaktiven Cob(II)alamins zum katalytisch aktiven Cob(I)alamin unter ATP-Verbrauch katalysiert. Ob oder wie die vier Komponenten in der Zelle assoziiert sind, wurde bisher nicht geklärt.

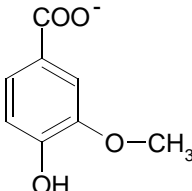
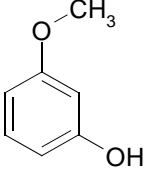
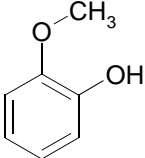
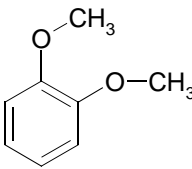
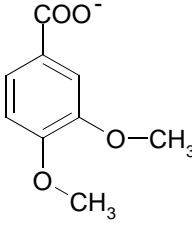
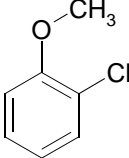
Durch die Verwendung verschiedener Phenylmethylether als Wachstumssubstrat sind O-Demethylasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten in *A. dehalogenans* induzierbar (Engelmann 1998). Als Hinweis dafür diente der Vergleich der Substratspektren von Rohextrakten aus Zellen, die auf Vanillat oder 3-Methoxyphenol gewachsenen waren (Tab. 2-1). Vanillat wurde von Rohextrakt aus Vanillat-gewachsenen Zellen wesentlich schneller umgesetzt als dies bei 3-Methoxyphenol-gewachsenen Zellen der Fall war. Dagegen wurden Veratrol, 3-Methoxyphenol und 2-Chloranisol von Rohextrakt aus 3-Methoxyphenol-gewachsenen Zellen umgesetzt, jedoch nicht von Rohextrakt aus Vanillat-gewachsenen Zellen. Dies deutete darauf hin, daß mindestens zwei

induzierbare O-Demethylasen in *A. dehalogenans* existieren. Die Tatsache, daß 3,4-Dimethoxybenzoat von beiden Rohextrakten nur sehr schlecht umgesetzt wurde, jedoch *A. dehalogenans* dieses Substrat als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnte, ließ darauf schließen, daß möglicherweise mehr als zwei induzierbare O-Demethylasen vorhanden sind.

Bei dem Bakterium *Holophaga foetida* konnte bereits die Induzierbarkeit zweier O-Demethylasen durch die Substrate 3,4,5-Trimethoxybenzoat oder 3,5-Dimethoxyphenol gezeigt werden (Kreft & Schink 1997). Auch in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 existieren induzierbare O-Demethylasen. Interessant ist hierbei, daß die beiden beschriebenen Systeme die Demethylierung über ganz unterschiedliche Mechanismen katalysieren. DDVA (2,2'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl) wird durch ein sauerstoffabhängiges Oxygenase-System (LigX) demethyliert, dagegen Vanillat durch ein Tetrahydrofolat-abhängiges Methyltransferase-System (LigH) (Sonoki et al. 2000). Einige Enzymsysteme mit Reaktionsmechanismen analog zur anaeroben O-Demethylase sind auch in anderen Organismen vorhanden. Das Sulfat-reduzierende Bakterium Stamm WN verfügt über ein solches Enzymsystem zur Demethylierung von Dimethylsulfonpropionat (Jansen & Hansen 2000). Für den Methylchlorid-Abbau unter aeroben Bedingungen wurde bei dem α -Proteobakterium *Methylobacterium chloromethanicum* Stamm CM4 ein ähnliches Enzymsystem beschrieben (Studer et al. 2001). Weitere Methyltransferase-Reaktionen dieses Typs wurden in methanogenen Archaeen beschrieben. *Methanosarcina barkeri* ist in der Lage, mit einem ähnlichen Enzymsystem den Transfer der Methylgruppe von Methanol auf Coenzym M zu katalysieren (Sauer et al. 1997), als Methylsubstrate werden von diesem Methanogenen aber auch Dimethylsulfid oder methylierte Amine verwertet (Burke & Krzycki 1997, Tallant & Krzycki 1997, Tallant et al. 2001). Auch hier sind zwei Methyltransferasen beteiligt, wobei eine der beiden Methyltransferasen ein Corrinoid enthält und somit gleichzeitig die Rolle des Methylgruppenakzeptors übernimmt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Reinigung und Charakterisierung einer weiteren induzierbaren O-Demethylase aus *A. dehalogenans*. Dabei sollte festgestellt werden, ob es sich bei den induzierbaren O-Demethylasen ebenfalls um ein Vier-Komponenten-System handelt, welches die O-Demethylierung nach dem selben Reaktionsmechanismus wie die Vanillat-O-Demethylase katalysiert (Abb. 2-2), oder ob Enzymsysteme mit grundlegend unterschiedlichen Reaktionsmechanismen induziert werden, wie dies bei *S. paucimobilis* SYK-6 beschrieben wurde (Sonoki et al. 2000). Bei einem zur Vanillat-O-Demethylase analogen System gibt es hinsichtlich der Induzierbarkeit wiederum mehrere Möglichkeiten. Denkbar wäre, daß z. B. nur die Methyltransferase I induziert wird, die zusammen mit den anderen, immer gleich bleibenden Komponenten eine O-Demethylase mit einem anderen Substratspektrum bildet. Möglich wäre aber auch, daß mehrere oder alle Komponenten induzierbar sind. Dies sollte ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

Tab. 2-1: Vergleich der Substratspezifität von Rohextrakten aus *A. dehalogenans* gewachsen auf Vanillat oder 3-Methoxyphenol. Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe eines gekoppelten optischen Tests zum Nachweis von Methyltetrahydrofolat ermittelt.

Substrate im Enzymtest	Enzymaktivität (nkat/g) der Rohextrakte von Zellen gewachsen auf		
	Vanillat	3-Methoxyphenol	
	Vanillat (4-Hydroxy-3-methoxybenzoat)	142	13
	3-Methoxyphenol	<5	16
	2- Methoxyphenol	116	33
	Veratrol (1,2-Dimethoxybenzol)	<5	130
	3,4-Dimethoxybenzoat	<5	<5
	2-Chloranisol	<5	144

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendetes Material

Organismen

Das strikt anaerobe Bakterium *Acetobacterium dehalogenans* wurde aus dem Faulturm der Kläranlage in Stuttgart-Möhringen von J. Traunecker isoliert (Traunecker et al. 1991). Die Bakterien stammen aus der Stammhaltung der Arbeitsgruppe von Prof. G. Diekert des Lehrstuhls für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig unter der Nummer 11527 hinterlegt.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Sigma-Aldrich Chemie (Deisendorf), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg) und Lancaster (Mühlheim am Main) bezogen und waren von höchster Reinheit.

Biochemikalien

DNase I stammte von der Firma Fluka (Neu-Ulm). Lactat-Dehydrogenase, NAD⁺, NADP⁺ und ATP wurden von der Firma Biomol (Hamburg) bezogen. Cyanocobalamin und Hydroxocobalamin wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Deisendorf) bezogen, Faktor A und Pseudovitamin wurden von Prof. B. Kräutler von der Ludwig-Franzens-Universität Innsbruck zur Verfügung gestellt. Tetrahydrofolat wurde durch Hydrierung von Folsäure (Blair & Saunders, 1970) synthetisiert. Die Enzyme Methylentetrahydrofolat-Reduktase und -Dehydrogenase wurden aus *Peptostreptococcus productus* Stamm Marburg angereichert (Wohlfarth et al. 1990, Wohlfarth et al. 1991).

Gase

Alle Gase lieferte die Firma Linde (Leuna): N₂ (Reinheitsgrad 5.0), H₂ (Reinheitsgrad 4.3), Formiergas (95% N₂/5% H₂) und CO₂ (4.8).

3.2 Kultivierung von *Acetobacterium dehalogenans*

Acetobacterium dehalogenans wurde auf dem von Traunecker et al. (1991) beschriebenen Medium kultiviert. Als Energie- und Kohlenstoffquelle dienten 3-Methoxyphenol oder Vanillat. Ein Liter Medium setzte sich zusammen aus 20 ml Spurenelementlösung, 1 ml Vitaminlösung und 2 g Hefeextrakt (Oxoid, Wesel). Diese Bestandteile wurden mit Basalmedium auf das Endvolumen aufgefüllt.

Basalmedium:	NH ₄ Cl	1,00 g
	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,42 g
	KH ₂ PO ₄	0,16 g
	Na ₂ HPO ₄	2,20 g
	NaH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	1,10 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
	Resazurin	0,02 g

Die angegebenen Bestandteile wurden mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Vitaminlösung:	Biotin	2 mg
	Folsäure	2 mg
	Pyridoxalhydrochlorid	10 mg
	Thiaminhydrochlorid	5 mg
	Riboflavin	5 mg
	Nicotinsäure	5 mg
	Calciumpanthothenat	2 mg
	Vitamin B ₁₂	2 mg
	4-Aminobenzoessäure	5 mg
	Liponsäure	5 mg

Die angegebenen Bestandteile wurden mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Spurenelementlösung:	Nitrilotriessigsäure	0,5 g
	0,5 M NaOH	10 ml
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6,2 g
	MnSO ₄ x 1 H ₂ O	0,5 g
	NaCl	1,0 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
	CoCl ₂ x 7 H ₂ O	0,18 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g

3 MATERIAL UND METHODEN

CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,05 g
AlCl ₃ x 3 H ₂ O	0,1 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,011 g
NiCl ₂	0,02 g
NaH SeO ₃	0,001 g

Nitritotriessigsäure wurde zunächst in NaOH gelöst, danach wurden die übrigen Substanzen zugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf das Endvolumen von einem Liter aufgefüllt.

- Cystein/HCl-Lösung (5% w/v): 2,5 g Cystein-Hydrochlorid-Lösung wurden in 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Kaliumcarbonat-Lösung (10% w/v): 10 g Kaliumcarbonat wurden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- 3-Methoxyphenol/Vanillat-Stammlösung: Es wurde eine 0,1/0,5 M Stammlösung hergestellt. Die entsprechende Menge 3-Methoxyphenol/Vanillat wurde in einem Fünftel des Endvolumens mit bidestilliertem Wasser suspendiert. Mit 1 M NaOH wurde der pH-Wert auf 7 bis 7,3 eingestellt, wodurch 3-Methoxyphenol/Vanillat in Lösung gebracht wurde. Schließlich wurde mit bidestilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Das Basalmedium, die Substrat-, die Cystein/HCl und die Kaliumcarbonat-Lösung wurden getrennt mit Stickstoff anaerobisiert und autoklaviert.

Die Bakterien wurden in 0,1 und 2 Liter Serumbottles bzw. Schottflaschen (Schott, Mainz) kultiviert. Die Flaschen wurden zur Hälfte mit Basalmedium gefüllt und mit Butylgummistopfen (Ochs, Bovenden) gasdicht verschlossen. Mit Hilfe einer Begasungsanlage (Neumann 1993) wurde der Sauerstoff weitgehend, durch abwechselndes Evakuieren und Begasen mit Stickstoff, entfernt. Die Gasphase über dem Medium wurde mit Kohlendioxid (130 kPa Überdruck) und Stickstoff (aufgefüllt auf 150 kPa Überdruck) eingestellt. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Durch Zugabe von 5% Cystein/HCl (10 ml/l) wurde der im Medium verbliebene Sauerstoff eliminiert, der pH-Wert wurde mit 10%iger Kaliumcarbonat-Lösung (20 ml/l) auf 7,2 - 7,4 eingestellt. Angeimpft wurde mit 10% (v/v) Inokulum. Zu Beginn der Kultivierung wurde 4-5 mM 3-Methoxyphenol als Energie- und Kohlenstoffquelle zugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 25°C und 100 Upm in einem Schüttelwasserbad oder im entsprechend temperierten Brutraum. Das Wachstum der Bakterien wurden anhand der Zunahme der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Der Substratverbrauch wurde durch die Abnahme der 3-Methoxyphenol bzw. die Zunahme der 1,3-Dimethoxybenzolkonzentration gemessen. Nach Verbrauch des anfangs zugegebenen 3-Methoxyphenols wurde nochmals 10 mM Substrat zugegeben. Der Substratverbrauch wurde mittels HPLC-Analyse kontrolliert (siehe Kapitel 3.4).

Grosskulturen (10 l) wurden in Schottflaschen (20 l, Schott, Mainz) inkubiert. Die entsprechende Menge Basalmedium wurde aerob in der Flasche autoklaviert. Nach der Sterilisation wurde das Medium durch Durchgasen mit Stickstoff und Kohlendioxid anaerobisiert. Getrennt autoklavierte Cystein/HCl-, Kaliumcarbonat- und 3-Methoxyphenol-Stammlösungen wurden während dieses Anaerobisierungsprozesses im oben angegebenen Mengenverhältnis zugegeben. Angeimpft wurde mit 20% Inokulum. Die Gasphase wurde nach dem Animpfen auf die oben angegebene Gasmischung von Stickstoff und Kohlendioxid eingestellt, wobei ein Druck von 0,3 bar nicht überschritten wurde, da das Kulturbehältnis höheren Drücken nicht standgehalten hätte. Die Flasche wurde gasdicht mit einem Butylgummistopfen verschlossen.

3.3 Zellernte und Herstellung von Rohextrakt

Die Zellernte erfolgte aerob in der späten exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{578nm} = 0,7 - 0,8$) durch 10-minütiges Zentrifugieren (Zentrifuge Avanti™ J-20, Rotortyp JLA-10.500, Beckmann, München) mit 4.500 x g bei 4°C. Das Waschen, Einfrieren und Lagern der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Die Zellen wurden zweimal mit anaerobem 50 mM Mops/KOH-Puffer pH 6,5 gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde im zuletzt genannten Puffer aufgenommen (pro g Feuchtzellen ca. 1 ml Puffer) und bei – 80°C eingefroren und gelagert.

Der Zellaufschluß wurde unter anaeroben Bedingungen mit einer Frenchpress-Zelle (SIM-AMINCO, Max. Druck: 40.000 psi, Spectronic Instruments, New York, USA) durchgeführt. In der Anaerobenkammer (Coy, Grass Lake, Michigan USA) wurde zu den bereits in Mops/KOH-Puffer aufgenommenen Feuchtzellen der Proteaseinhibitor AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-Benzol-Sulfofluorid Hydrochlorid, Endkonzentration 1-2 mM) und DNaseI (1 mg) zugegeben, die Zellsuspension wurde in die Frenchpress-Zelle gefüllt. Der Aufschluss erfolgte bei 137.000 kPa. Zelltrümmer, Zellmembranbruchstücke und unaufgeschossene Zellen wurden durch Zentrifugation bei 100.000 x g für 45 min bei 4°C in einer Ultrazentrifuge LM-8, Rotortyp 60 ti (Beckmann, München) entfernt. Die Proteinkonzentration des Rohextraktes betrug 60 mg/ml.

3.4 Analytische Methoden

Bestimmung von Phenylmethylethern

Die Phenylmethylether wurden über Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem UV/Vis-Detektor bei 210 nm bestimmt. Das Fließmittel bestand aus 25% Methanol (v/v) und 0,3% (v/v) Orthophosphorsäure in bidestilliertem Wasser und wurde mit einem Celluloseacetat-Filter (Porengröße 0,45 µM) filtriert. Die Meßbedingungen waren wie folgt:

Gerät:	Merck-Hitachi Pump L-7100
Detektor:	Merck-Hitachi L-4200 UV-Vis Detektor (Merck, Darmstadt)
Integrator:	Merck-Hitachi D-2500 Chromato-Integrator (Merck, Darmstadt)
Säule:	GromSIL, 100 Octyl-4 FE, 125 x 4,6 mm, 5 µm (Grom, Herrenberg)
Flußrate:	0,8 ml/min
Probenvolumen:	10 µl

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt (Bradford, 1976).

Bestimmung der O-Demethylase-Aktivität

Die O-Demethylase-Aktivität wurde anhand der Bildung von Methyltetrahydrofolat in einem gekoppelten optischen Test gemessen (Meßmer et al. 1996). Die im folgenden aufgeführten Reaktionen (Abb. 3-1) waren Bestandteil des Tests:

- (1) Bildung von Methyltetrahydrofolat durch Methylierung von Tetrahydrofolat katalysiert durch die O-Demethylase.
- (2) Umsetzung von Methyltetrahydrofolat zu Methylentetrahydrofolat katalysiert durch die Methylentetrahydrofolat-Reduktase. Diese endergone Reaktion ($\Delta G^{\circ} = + 22 \text{ KJ/mol}$) wurde mit der exergonen Reduktion von Pyruvat zu Lactat ($\Delta G^{\circ} = -25 \text{ KJ/mol}$), katalysiert durch die Lactat-Dehydrogenase, gekoppelt.
- (3) Methylentetrahydrofolat wurde unter Reduktion von NADP^+ zu Methenyltetrahydrofolat oxidiert. Dieser Schritt wurde durch die Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase katalysiert.

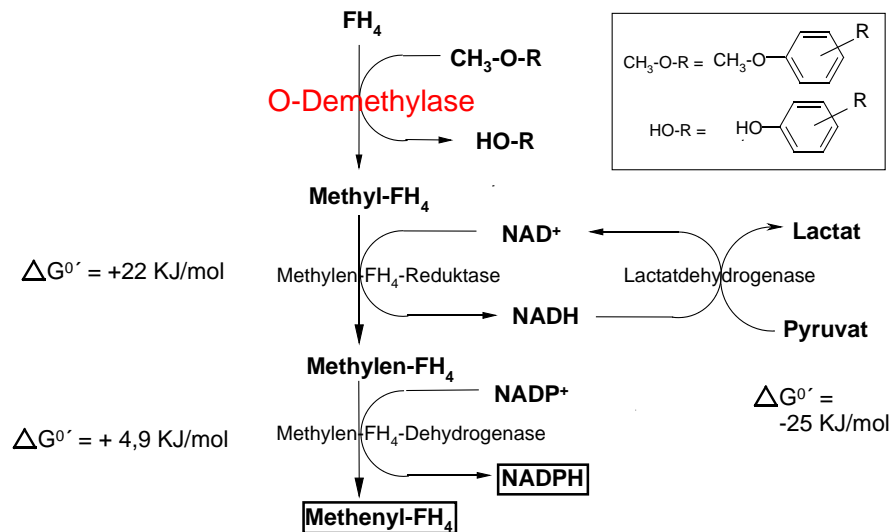


Abb. 3-1: Reaktionen des gekoppelten optischen Tests zur Aktivitätsbestimmung der O-Demethylase aus *A. dehalogenans*. Die photometrisch nachweisbaren Produkte sind eingerahmt.

Die Bildung von Methenyltetrahydrofolat und NADPH wurde photometrisch anhand der Absorptionzunahme bei 350 nm gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{350 \text{ nm}} = 30,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Meßmer et al.1995) herangezogen.

Testpuffer: Folgende Substanzen wurden in den angegebenen Endkonzentrationen in 100 mM Mops/KOH-Puffer pH 6,5 mit 1 mM MgCl_2 gelöst:

DTT	5 mM
NAD^+	1 mM
NADP^+	1 mM
ATP	1 mM
Pyruvat	10 mM
Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase	10 nkat/ml
Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase	15 nkat/ml
Lactat-Dehydrogenase	340 nkat/ml

Der Testpuffer wurde anaerobisiert und in Serumgläschen bei -20°C gelagert. Tetrahydrofolat wurde direkt vor Durchführung der O-Demethylase-Tests in der Anaerobenkammer mit dem Testpuffer gemischt. Die Tetrahydrofolatkonzentration im Test war 1 mM.

Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die zu sequenzierenden Proteine wurden aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) geblottet (Ausubel et al. 1987). Der Proteintransfer erfolgte in einem Tankblotter (BIO-RAD, München) über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer Spannung von 32 V. Der verwendete Puffer bestand aus Tris (25 mM), Glycin (192 mM) und Methanol 15 % (v/v).

Die aminoterminalen Sequenz wurde durch automatisierten Edmann-Abbau von V. Nödinger und E. Bonacker (Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart) bestimmt.

Metallanalyse der Methyltransferase MTI_{ver} und des Corrinoideproteins Cp_{ver}

MTI_{ver} und Cp_{ver} wurden bis zu apparater Homogenität gereinigt (siehe Kapitel 3.6). Die Proben (0,5 -1 mg/ml) waren gelöst in 50 mM Mops/KOH-Puffer pH 6,5 mit 0,15 M KCl. Der Metallgehalt der Proben wurde durch ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) am Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena durch K. Voigt bestimmt.

Bestimmung der Masse des Cofaktors des Corrinoideproteins Cp_{ver}

Der Corrinoidecofaktor wurde mittels Cyanidextraktion (siehe Kapitel 3.6) aus dem Corrinoideprotein Cp_{ver} extrahiert und gereinigt. Das gereinigte Corrinoide wurde in 0,1 ml bzw. 0,15 ml Wasser gelöst, die Konzentration war 14,4 bzw. 14,8 µM. Die Konzentration des Corrinoide wurde anhand der Absorptionsdifferenz bei 361 nm mittels des Extinktionskoeffizienten von Cyanocobalamin $\epsilon_{361\text{ nm}} = 28,05 \mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ berechnet.

Die Bestimmung der Masse erfolgte mittels ESI-MS (Elektrospray Massenspektrometrie) am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durch Dr. W. Poppitz.

3.5 2D-Gelelektrophorese

Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden die Proteine aus Rohextrakten, hergestellt aus 3-Methoxyphenol- und Vanillat-gewachsenen Zellen, aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem Immobiline DryStrip Kit für 2D-Gelelektrophorese der Firma Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Westermeier 1997). Der Rohextrakt (100 µg Protein) wurde auf die industriell gefertigten Gelstreifen (Immobiline DryStrips, pH 4-7, Länge 110 mm, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Das entsprechende Volumen Rohextrakt wurde mit dem vierfachen Volumen Probenpuffer gemischt.

Probenpuffer:	Harnstoff	12 g
	Triton X-100 (0,5%)	0,13 ml
	Pharmalyte 3-10 (Amersham-Pharmacia, Freiburg)	0,13 ml
	DTT	50 mg

Mit bidestilliertem Wasser wurde auf ein Endvolumen von 25 ml aufgefüllt.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit der Multiphor II Elektrophoresis Unit und dem Spannungsgeber Electrophoresis Power Supply EPS3500XL (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg). Es wurde das im folgenden aufgeführte Programm verwendet:

0 - 0,01 Stunden	0 – 200 V
0,01 – 6.21 Stunden	200 V
6.21 – 11.21 Stunden	200 – 2000 V
11.21 – 17.71 Stunden	2000 V

Die Stromstärke betrug 1 mA, die Leistung 5 W, die Temperatur wurde bei 20°C konstant gehalten (Multitemp III thermostatic circulator, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Die SDS-PAGE wurde mit einem 12%igem Trenngel und einem 9%igem Sammelgel durchgeführt. Es wurden Gelpatten mit den Abmessungen 16 cm x 18 cm x 1 mm hergestellt. Die Immobiline DryStrips wurden auf das Sammelgel gelegt und mit 0,5 %iger Agarose überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer Hoefer SE 600 (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer konstanten Temperatur von 13,5°C (Multitemp III thermostatic circulator, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt.

3.6 Spezielle Methoden

Anreicherung und Reinigung der Komponenten der Veratrol-O-Demethylase

Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden in der Anaerobenkammer (Coy, Grass Lake, Michigan, USA) unter einer Gasphase von 95% Stickstoff und 5% Wasserstoff mit einer FPLC-Anlage (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

Der Rohextrakt (14-18 ml, 60 mg Protein pro ml) wurde auf eine Q-Sepharose High Performance Säule (1,6 x 10 cm, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit Basispuffer (50 mM Mops/KOH pH 6,5 mit 0,25 mM DTT) äquilibriert. Die Proteine wurden innerhalb von 80 min in einem linear ansteigenden Gradienten von 0 – 1M KCl in Basispuffer eluiert. Bei 0,1 M KCl wurde das Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase (Cp_{ver}) eluiert, bei 0,25 M eine Fraktion mit MTI_{ver} und $Cp1$ und bei 0,35 M eine Fraktion, die weitere O-Demethylase-Komponenten enthielt.

Die Fraktionen, die Cp_{ver} bzw. $MTI_{ver}/Cp1$ enthielten, wurden einzeln über eine Phenyl Superose HR-Säule (1 x 10 cm, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) weiter angereichert. Die Säule wurde mit 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ in Basispuffer äquilibriert. Im linearen Gradienten von 1,6 M – 0 M $(NH_4)_2SO_4$ innerhalb von 60 min eluierte Cp_{ver} bei 0,35 M $(NH_4)_2SO_4$, $Cp1$ bei 0,6 M $(NH_4)_2SO_4$ und MTI_{ver} bei 0,4 M $(NH_4)_2SO_4$.

Bei den drei zuletzt genannten Proteinen bestand der letzte Reinigungsschritt in einer Gelfiltration mit einer Superdex 75 pg-Säule (1,6 x 60 cm, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Säule wurde mit 0,15 M KCl in Basispuffer äquilibriert. Die Proteine wurden mit dem selben Puffer eluiert.

Die O-Demethylase-Komponenten, die in der Anionenaustauschchromatographie bei 0,35 M KCl eluierten, wurden mit einer Phenyl Sepharose High Performance-Säule (1,6 x 10 cm, Amersham-Pharmacia, Freiburg) weiter angereichert. Die Säule wurde mit 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ in Basispuffer äquilibriert. Im Gradienten von 1,6 M – 0 M $(NH_4)_2SO_4$ innerhalb von 60 min eluierten die Proteinkomponenten bei 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$. Eine weitere hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mittels einer SigmaChrom HIC-Phenyl Säule (3,3 ml, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) durchgeführt. Die Säule wurde mit 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 äquilibriert. Es wurde ein Gradient von 1,6 M – 0 M $(NH_4)_2SO_4$ innerhalb von 30 min verwendet. Die O-Demethylase-Komponenten eluierten bei 0 M $(NH_4)_2SO_4$.

Herstellung von Titan(III)citrat

Titan(III)citrat wurde als Reduktionsmittel in photometrischen Tests bei der Ermittlung der Methyltransferase I-Aktivität, zur Ermittlung der Reduktion des Corrinoidproteins Cp_{ver} und als Elektronendonator in der Redoxtitration eingesetzt. Titan(III)citrat wurde als Reduktionsmittel beschrieben, welches die Absenkung des Redoxpotentials in anaeroben Kulturen bis auf -780 mV ermöglicht (Zehnder & Wuhrmann 1976).

Die Herstellung der gepufferten Titan(III)citrat-Lösung erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Zu 10 ml 0,4 M Natriumcitrat pH 7,0 wurden 2 ml 30% (w/v) Titan(III)chlorid in 2 N HCl gegeben. Durch schrittweise Zugabe einer 2 M Natriumcarbonat-Lösung wurde ein pH-Wert von 7,5 bis 8 eingestellt. Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt.

Bestimmung der Methyltransferase I-Aktivität und der Methylierung der Corrinoidproteine Cp_{ver} und Cp_{van}

Die Aktivität von MTI_{ver} wurde anhand der Abnahme der Konzentration der Phenylmethylether bzw. der Zunahme der demethylierten Produkte mittels HPLC bestimmt. Die Methylierung der Corrinoidproteine wurde photometrisch verfolgt.

Als Methylgruppenakzeptor wurden das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase (OdmA = Cp_{van}) und das der Veratrol-O-Demethylase (Cp_{ver}) eingesetzt. Das für Cp_{van} codierende Gen (*odmA*) wurde in den Expressionsvektor pET 11a (Stratagene, Heidelberg) inseriert und in *E.coli* BL21, welcher das Plasmid p_{lysS} (Stratagene, Heidelberg) enthielt, überexprimiert. Nach Reinigung von Cp_{van} aus Rohextrakt von *E. coli* BL21 p_{lysS} pOdmA wurde Hydroxocobalamin als Cofaktor in das Protein eingefügt (Kaufmann et al. 1998b). Cp_{ver} wurde aus 3-Methoxyphenol induzierten *Acetobacterium dehalogenans*-Zellen gereinigt (siehe Kapitel 3.6, Anreicherung und Reinigung der O-Demethylase-Komponenten der Veratrol-O-Demethylase).

Der Test wurde in Micro-Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm), verschlossen mit Butylgummistopfen, durchgeführt. Die Küvetten wurden in der Anarobenkammer mit der MTI_{ver} (1 mg), Corrinoidprotein (Cp_{ver}/Cp_{van}: 60 µM/88 µM) und Titanium(III)citrat in 50 mM Mops/KOH pH 6.5 befüllt. Wurde Cp_{ver} als Methylgruppenakzeptor eingesetzt, wurde zur Reaktionsmischung Methylviologen (0,4 µM) hinzugefügt. Die Zugabe von Methylviologen war notwendig für die Reduktion des Corrinoids zum aktiven Cob(I)alamin. Das Reaktionsvolumen betrug 120 µl.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der folgenden Phenylmethylether gestartet: Vanillat (3-Methoxy-4-Hydroxybenzoat), 3-Methoxyphenol, Veratrol (1,2-Dimethoxybenzol), 2-Methoxyphenol, 3,4-Dimethoxybenzoat, 2-Methoxybenzoat, 4-Methoxybenzoat und 2-Chloranisol (jeweils 300 oder

600 μM). Bei Start der Reaktion, nach 10 Minuten und nach 1 Stunde wurden je 20 μl Probe entnommen. Um die Reaktion zu stoppen wurden jeweils 20 μl 12%ige Trichloressigsäure oder 100%iges Ethanol zugegeben. Um das denaturierte Protein zu entfernen, wurden die Proben fünf Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Mit 10 μl des Überstandes wurden mittels HPLC-Analyse das Substrat und das Produkt gemessen (siehe Kapitel 3.4). Der enzymatische Test wurde unter anaeroben Bedingungen bei 25°C unter Lichtausschluß durchgeführt.

Extraktion und Charakterisierung des Cofaktors aus dem Corrinoidprotein Cp_{ver}

Die Extraktion des Corrinoids aus dem Protein erfolgte nach einer modifizierten Methode von Stupperich et al. 1985 (Anke Siebert, persönliche Mitteilung). Alle Arbeiten wurden aus Sicherheitsgründen unter dem Abzug durchgeführt.

400 μl einer Lösung des gereinigten Corrinoidproteins Cp_{ver} (0,55 mg Corrinoidprotein/ml) wurden mit Essigsäure auf pH 3-4 angesäuert. 2,5 g KCN wurden zur Corrinoidproteinlösung hinzugegeben. Das Serumgläschen mit der Probe wurde sofort mit einem Butylgummistopfen und einem Septum dicht verschlossen und der Ansatz für 15 min bei 100°C inkubiert und anschließend 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet aus denaturiertem Protein wurde nochmals, wie oben angegeben, mit KCN extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt (Volumen: 850 μl).

1,4 g Amberlite XAD-4 (Sigma-Aldrich Chemie, Deisendorf) wurden zunächst mit 30 ml Methanol und mit 60 ml 0,1 M Essigsäure gewaschen. Der Extraktionsüberstand wurde auf das XAD-4-Säulenmaterial gegeben und für 45 min auf dem Schüttler (120 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Das XAD-4 mit dem gebundenen Corrinoid wurde in eine Säule gegossen und mit 15 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Das Corrinoid wurde mit 4 ml Methanol eluiert. Die Probe wurde in einer SpeedVac SVC 100 (GMI, Inc., Albertville, Minnesota, USA) getrocknet. Das rote Pellet wurde in 120 μl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Die Corrinoiden wurden weiter über eine HPLC-Säule (LiChrospher 100, RP 18, 250 x 4 mm, 5 μm , Merck, Darmstadt) gereinigt. Als Fließmittel dienen 100 % Methanol und 0,1 % Essigsäure. Die präparative HPLC wurde mit den im folgenden aufgeführten Geräten unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt:

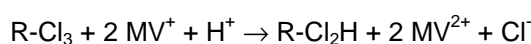
Gerät:	Merck-Hitachi L-6200 Intelligent Pump (Merck, Darmstadt)	
Detektor:	Merck-Hitachi L-4500 Diode Array Detektor (Merck, Darmstadt)	
Probenvolumen:	50 μl	
Gradientenprogramm:	0-10 min	15 % Methanol
	10-30 min	25 % Methanol
	30-40 min	50 % Methanol

Es wurden zwei verschiedene Corrinoidpeaks detektiert. Die corrinoidhaltigen Fraktionen wurden getrennt gesammelt. Die Proben wurde in der Speedvac getrocknet und die gereinigten Corrinoid in 100 bis 150 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

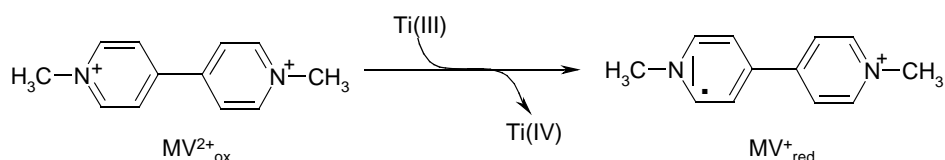
Die Konzentration des Corrinoids in der Probe wurde nach jedem Reinigungsschritt mit Hilfe des UV/Vis-Spektrums unter Einbeziehung der folgenden Extinktionskoeffizienten bestimmt: $\epsilon_{478 \text{ nm}} = 9,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{361 \text{ nm}} = 28,05 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Friedrich 1975).

Charakterisierung des Corrinoid-Cofaktors des Proteins Cp_{ver}

Die Bestimmung der Dechlorierungsgeschwindigkeit von Trichloracetat erfolgte photometrisch durch die Messung der Oxidation von reduziertem Methylviologen als künstlichen Elektronendonator in Gegenwart des Corrinoids als Katalysator gemäß folgender Reaktionsgleichung (Neumann et al. 2002):



Der Redoxindikator Methylviologen (MV; molarer Extinktionskoeffizient bei 578 nm ($\epsilon_{578 \text{ nm}} = 9.7 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) besitzt ein Standardredoxpotential von -447 mV. Methylviologen ist im reduzierten Zustand blau (MV^+_{red}) und im oxidierten Zustand farblos ($\text{MV}^{2+}_{\text{ox}}$). Mit Titan(III)citrat wurde Methylviologen gemäß der folgenden Reaktionsgleichung reduziert:



Aufgrund des negativen Redoxpotentials mußte der Test unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden.

Der Testpuffer bestand aus 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 mM Methylviologen und 4 mM Ammoniumsulfat. Küvetten aus optischem Spezialglas (Helma, Jena) wurden mit Butylgummistopfen (Ochs, Bovenden) verschlossen, durch Durchströmen über Kanülen mit Stickstoff anaerobisiert und mit 700 µl des anaeroben Testpuffers mittels einer Spritze befüllt. Zur Reduktion des $\text{MV}^{2+}_{\text{ox}}$ wurden 5 µl 50 mM Titan(III)citrat-Lösung zugegeben. Nach Zugabe von 100 µl 7 mM Trichloracetatlösung wurde die Reaktion mit 20 µl Corrinoidlösung (1-3 µM) gestartet.

Redox Titration der Corrinoidproteine

Die Redoxpotentiale der Corrinoidproteine der Vanillat- und der Veratrol-O-Demethylase ($C_{p_{van}}$, $C_{p_{ver}}$), wurden mit einer Pt-Ag/AgCl-Redoxelektrode Pt 4800-M5 von Mettler-Toledo GmbH (Gießen) in einer Anaerobenkammer unter 95% Stickstoff/5% Wasserstoff-Atmosphäre in einer Redoxküvette (Helma, Jena) bestimmt. Die Genauigkeit der Redoxelektrode wurde vor Beginn der Redox Titration, durch Standardlösungen für Pt/Ag/AgCl-Elektroden mit Potentialen von 220 und 468 mV sowie durch Titration von 50 μ M Methylviologen ($E^0 = -449$ mV, Wilson 1978) überprüft. Zur Berechnung des Redoxpotentials gegen das Standardwasserstoffpotential wurden, laut Angabe des Herstellers der Redoxelektrode, 207 mV zum angezeigten Potential addiert. Das Redoxpotential wurde mittels pH-Meter angezeigt. Unter Rühren wurde Titan(III)citrat als Reduktionsmittel in definierter Menge zum Corrinoidprotein hinzugeben. Nach jeder Reduktionsmittelzugabe wurde das gemessene Potential abgelesen und das Absorptionsspektrum des Corrinoidproteins aufgenommen. Die Redoxmessungen wurden in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 50 mM Mops/KOH pH 6,5 durchgeführt. Die Reduktion der Corrinoidproteine von der oxidierten zur reduzierten und superreduzierten Form ist durch die dafür typischen spektralen Veränderungen (Friedrich 1975) gut zu verfolgen. Die Auswertung erfolgte anhand der Veränderungen der Absorptionsmaxima, die für den jeweiligen Redoxzustand des Corrinoids charakteristisch sind (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Charakteristische Absorptionsmaxima der Corrinoidproteine in verschiedenen Oxidationsstufen und Extinktionskoeffizienten (Friedrich 1975).

Redoxzustand des Cobaltatoms	+3, Co^{III}	+2, Co^{II}	+1, Co^I
Charakteristischer Peak bei Wellenlänge (nm)	550	478	390
Extinktionskoeffizient für Cyanocobalamin ($mM^{-1} \times cm^{-1}$)	8,7	7,4	28

Die Bestimmung der Redoxübergänge von Co^{III} zu Co^{II} , bzw. von Co^{II} zu Co^I wurde mit Hilfe des Nernst-Plots vorgenommen. Dabei wurde der dekadische Logarithmus von $[Co_{ox}]/[Co_{red}]$ gegen das jeweils gemessene Potential aufgetragen. Der Achsenabschnitt bei $\lg [Co_{ox}]/[Co_{red}] = 0$ liefert das Standardpotential des Elektronenübergangs.

$$E = E^0 + \frac{0.059}{n} \lg \frac{c_{ox}}{c_{red}}$$

E : Redoxpotential

E^0 : Standardredoxpotential

n : Anzahl der Elektronen

$c_{ox}; c_{red}$: Konzentration des oxidierten bzw. reduzierten Corrinoids

Reduktion des Corrinoidproteins Cp_{ver}

Die Reduktion des Corrinoidproteins wurde anhand der Veränderung des Absorptionsspektrums verfolgt. Die Reduktion ist im UV/Vis-Spektrum erkennbar durch die Zunahme der Absorption bei 390 nm (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{386 \text{ nm}} = 28 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, Friedrich 1975) und durch Abnahme der Absorption bei 478 nm. Die Reduktionsversuche wurden unter anaeroben Bedingungen in mit Butylgummistopfen verschlossenen Quarzglasküvetten (Schichtdicke 1 cm) in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 durchgeführt.

ATP-abhängige Reduktion

Die Quarzglasküvetten wurden in der Anaerobenkammer mit Cp_{ver} (10 μM), ATP (4 mM) und Magnesiumchlorid (4 mM) befüllt. Das Reaktionsvolumen betrug 135 μl . Mit einer Spritze wurde Titan(III)citrat (2 mM) zugeben und die Reduktion durch Zugabe von 10 – 25 μl Rohextrakt oder angereichertem aktivierendem Enzym gestartet.

MTI_{ver}-abhängige Reduktion

Die Befüllung der Quarzglasküvetten mit Cp_{ver} (15-20 μM) und Methylviologen (0,01 – 3,8 μM) erfolgte in der Anaerobenkammer. Das Reaktionsvolumen betrug 135 μl . Mit einer Spritze wurde Titan(III)citrat (2 mM) hinzugefügt und die Reduktion durch Zugabe von MTI_{ver} (0 – 20 μM) gestartet.

Oxidation von Methylviologen unter Einfluß von MTI_{ver}

Der Test wurde in mit Butylgummistopfen verschlossenen optischen Spezialglasküvetten (Schichtdicke 1 cm) unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. 55 μM Methylviologen in 50 mM Tris/HCl pH7,5 wurden mit 2 mM Titan(III)citrat reduziert. Mit einer Spritze wurde MTI_{ver} (0 – 12,2 μM) zugegeben. Die Oxidation wurde photometrisch anhand der Abnahme der Absorption bei 578 nm ($\epsilon_{578 \text{ nm}} = 9,78 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$) verfolgt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit H₂O oder Rinderserumalbumin (15 μM) anstelle der MTI_{ver}-Lösung.

3.7 Molekularbiologische Methoden

Die Nukleotidsequenzen aller aufgeführten PCR-Fragmente wurden bei der Firma GATC-Biotech AG (Konstanz) bestimmt. Zur Analyse und Verwaltung wurde die Software SEQUENCHER™ 4.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) verwendet. Der Datenbankvergleich wurde mittels BLAST-Analyse (Altschul et al. 1997) durchgeführt. Alle angegebenen Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die PCR-Experimente wurden mit dem Thermocycler Primus (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *odmA_{ver}*

Aus den N-terminalen Aminosäuresequenzen von *Cp_{ver}* und *MTI_{ver}* wurden die folgenden Primer abgeleitet:

Cp_{ver}-for: 5'-AA(AG) ATI ACI GA(AG) GT(AGCT) AA(AG) CA-3'

MTI_{ver}-rev: 5'-IGT (CT)TT (AG)TA IAC(CT)TC CAT-3'

Die Genamplifikation wurde mit genomischer DNA aus *A. dehalogenans* (0,5 µg) und den genannten Primern (jeweils 50 pmol) unter Verwendung von Ready-to-go PCR-beads™ der Firma Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Die PCR (polymerase chain reaction) wurde mit dem folgenden PCR-Programm durchgeführt:

PCR-Programm A:	1 Zyklus:	96°C, 3 min
	30 Zyklen:	55°C, 1 min
		72°C, 3 min
		96°C, 30 sec
	1 Zyklus:	55°C, 1 min
		72°C, 15 min

Dabei entstand ein PCR-Fragment von 750 bp.

Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *odmB_{ver}* mittels Genome walking

Das Genome walking wurde mit dem Universal Genome Walker™ Kit (Clontech, Heidelberg) durchgeführt. Zur Erstellung einer DNA-Bibliothek wurde die genomische DNA von *A. dehalogenans* mit der Restriktionsendonuklease *StuI* verdaut. An die so entstandenen DNA-Fragmente wurden Adapter-Nukleotide mit bekannter Sequenz ligiert. Die DNA-Bibliotheken wurden als Template in den folgenden PCR-Experimenten eingesetzt.

Die erste PCR wurde mit einem spezifischen Primer Cp_{ver}1-for (10 pmol), abgeleitet aus der Sequenz von *odmA_{ver}*, mit der Sequenz 5'-AAG TCC AAG AAG ATC GGG CCA GCG-3' und dem spezifischen Primer AP1 gegen das Adapter-Nukleotid (10 pmol) (Primer AP1: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3', Clontech, Heidelberg) gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt.

PCR-Programm B: 7 Zyklen: 94°C, 25 sec
72°C, 3 min
32 Zyklen: 94°C, 25 sec
67°C, 3 min
1 Zyklus: 94°C, 25 sec
67°C, 7 min

Es entstand ein PCR-Fragment von ca. 2020 bp. Der primäre PCR-Ansatz wurde zwanzig-fach verdünnt; 1 µl dieses verdünnten PCR-Ansatzes wurde als Template in der zweiten PCR eingesetzt. In der zweiten PCR wurden der *odmA_{ver}*-spezifische Primer Cp_{ver}2-for (10 pmol) (5'-ATT CTC AAT GCT GGT GGC CAG-3') und Primer AP2 (10 pmol) (5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3', Clontech, Heidelberg) verwendet.

PCR-Programm C: 5 Zyklen: 94°C, 25 sec
72°C, 3 min
20 Zyklen: 94°C, 25 sec
67°C, 3 min
1 Zyklus: 94°C, 25 sec
67°C, 7 min

Es entstand ein Fragment mit einer Länge von ca. 2000 bp.

Amplifizierung und Sequenzierung von *odmD_{ver}*, *odmD_{van}* und *odmD_x*

Amplifizierung von *odmD_{ver}*

Das mutmaßliche Corrinoideprotein CopB aus *Acetobacterium woodii* weist eine Homologie von 89,5 % zu dem Corrinoideprotein Cp_{ver} aus *A. dehalogenans* auf. Die Nukleotidsequenz stromaufwärts von *copB* ist bereits bekannt. In dieser Sequenz ist der Teil eines ORF enthalten dessen Bezeichnung *mttb* lautet (Prof. Dr. V. Müller, persönliche Mitteilung, B. Ellinger 1999). Auf *mttb* gibt es mehrere Bereiche die hohe Homologie z. B. zu dem Protein MetH aus *E. coli* (Banerjee et al. 1989) aufweisen. Aus diesen Bereichen wurden die folgenden Primer abgeleitet:

Mttb-1-for: 5'-TTG ATA TTG TTC AGG AAG-3'

Mttb-2-for: 5'-GAC AAA GGG ATA CCT AAA AC-3'

Mttb-3-for: 5'-ATT ACA CAT TGA TCC C-3'

Die aufgeführten Primer wurden jeweils mit dem gegen *odmA_{ver}* spezifischen Primer Cpver2-rev (20 pmol) (5'-TTC GAC TGG CTG GCC ACC AGC-3') kombiniert. Die Genamplifikation wurde mit genomischer DNA aus *A. dehalogenans* (0,5 µg) und den genannten Primern (jeweils 50 pmol) unter Verwendung von Ready-to-go PCR-beads™ der Firma Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Das PCR-Programm A wurde verwendet. Dabei entstanden PCR-Fragmente mit Größen von ca. 500 bp, 600 bp und 800 bp. Die Nukleotidsequenz des 800 bp-Fragmentes wurde bei GATC-Biotech AG (Konstanz) bestimmt. Die Sequenz ergab, daß auf diesem Fragment ein unvollständiger open reading frame (ORF) codiert war. Um die Sequenz des gesamten ORF zu ermitteln, wurde die Methode des Genome walking angewandt (siehe Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *odmB_{ver}* mittels Genome walking; Universal Genome Walker™ Kit, Clontech, Heidelberg). Als Template diente eine DNA-Bibliothek aus *A. dehalogenans*, die mittels Verdau mit dem Restriktionsenzym DvaI erzeugt worden war. In der ersten PCR wurde der Primer Mttb-2-rev mit der Sequenz 5'-AGC ATT TCC ACC AAC GGG-3' und der Primer Ap1 (Clontech, Heidelberg) (jeweils 10 pmol) eingesetzt. Es wurde das PCR-Programm B verwendet. 0,5 µl dieses ersten PCR-Ansatzes wurden als Template in der zweiten PCR eingesetzt (PCR-Programm C), wobei der *odmD_{ver}*-spezifische Primer MTII_{ver}-rev (5'-CCG CAA AGC CGA CAT CGA CC-3') und der Adapter-Oligonukleotidspezifische Primer Ap2 (Clontech, Heidelberg) eingesetzt wurden. Das Produkt dieser beiden PCR-Experimente war ein ca. 600 bp großes Fragment. Es wurden die gleichen PCR-Programme wie unter „Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *odmB_{ver}* mittels Genome walking“ angegeben verwendet.

Amplifizierung von *odmD_{van}*

In einem weiteren PCR-Experiment wurden der *mttb*-spezifische Primer Mttb-2-for (50 pmol) mit dem *odmA_{van}*-spezifischen Primer Cpvan1-rev (50 pmol) (5'-TCC TGG ACC AGT CCG GGG ACC AG-3') kombiniert, 0,5 µg genomischer DNA aus *A. dehalogenans* wurden als Template eingesetzt. Ein Fragment von ca. 500 bp wurde amplifiziert und wie bereits beschrieben sequenziert. Es wurde das PCR-Programm A verwendet.

Amplifizierung von *odmD_x*

Aus der N-Terminalen Aminosäuresequenz der Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase wurde der Primer MTII-for mit der Sequenz 5'-ATI GGI GG(AG) AA(AG) AT(ATC) AA(CT) GG-3' abgeleitet. Der Primer MTII-for (50 pmol) wurde mit dem *odmA_{van}*-spezifischen Primer Cp_{van}3-rev (50 pmol) (5'-AAC TTT CAT ATC CGG ATA AGC-3') kombiniert. 0,5 µg genomischer DNA aus *A. dehalogenans* wurden als Template eingesetzt. Es wurde eine „Touch-Down-PCR“ mit dem folgenden Programm durchgeführt:

PCR-Programm: Zyklus1-10: 96°C, 3 min
65°C → 55°C
30 Zyklen: 55°C, 1 min
72°C, 3 min
96°C, 30 sec
1 Zyklus: 55°C, 1 min
72°C, 15 min

Während der ersten 10 Zyklen wurde die Annealing-Temperatur bei jedem neu beginnenden Zyklus um 1°C gesenkt. Es wurde ein Fragment von 1350 bp amplifiziert.

4 ERGEBNISSE

Aus *Acetobacterium dehalogenans*, gewachsen auf Vanillat, wurden die Komponenten einer Vanillat-O-Demethylase gereinigt (Kaufmann et al. 1997). Rohextrakte von *A. dehalogenans* gewachsen auf Vanillat und 3-Methoxyphenol wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit verschiedene Phenylmethylether demethylieren zu können, untersucht. Das Substratspektrum der beiden Rohextrakte unterschied sich deutlich (Tab. 2-1, Engelmann 1998). Einen weiteren Hinweis auf die Induzierbarkeit von verschiedenen O-Demethylasen lieferte der Vergleich der Proteinmuster von Vanillat- und 3-Methoxyphenol-gewachsenen Zellen in 2D-Gelen (Abb. 4-1). Im Proteinmuster der 3-Methoxyphenol-gewachsenen Zellen zeigten sich an Position a und b (Abb. 4-1 B) Proteinspots, die im 2D-Gel von Vanillat-gewachsenen Zellen (Abb. 4-1 A) nicht zu finden waren.

Im folgenden wurde versucht, die Komponenten der durch 3-Methoxyphenol induzierbaren O-Demethylase zu reinigen und zu charakterisieren sowie die gereinigten Komponenten den induzierbaren Spots im 2D-Gel zuzuweisen.

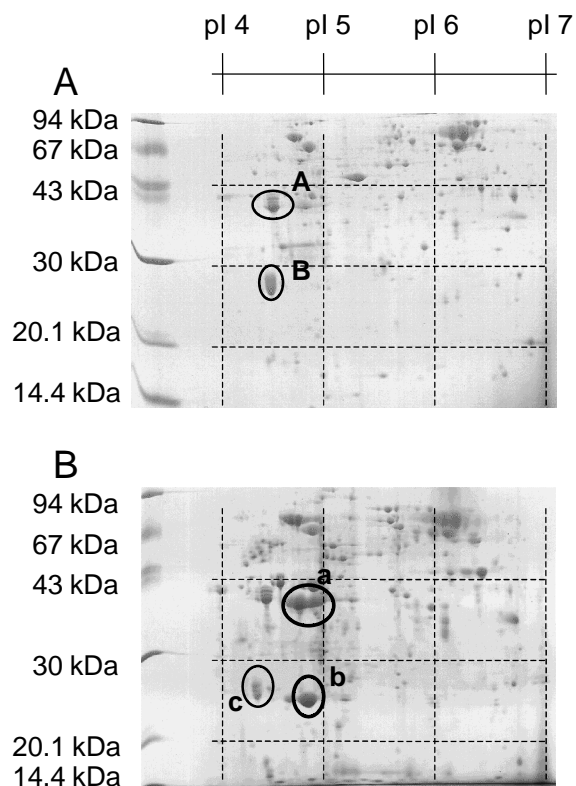


Abb. 4-1: 2D-Gele von Rohextrakt aus Zellen von *A. dehalogenans* gewachsen auf Vanillat (A) oder 3-Methoxyphenol (B). Als Molekulargewichtsmarker dienten Phosphorylase B (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa).

4.1 Reinigung und Eigenschaften von Komponenten der Veratrol-O-Demethylase

Die O-Demethylase-Komponenten wurden im Verlauf der Reinigung mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests detektiert (siehe Material und Methoden 3.4, Meßmer et al. 1996). Veratrol diente dabei als Testsubstrat. Da Veratrol nicht durch die Vanillat-O-Demethylase umgesetzt werden konnte, war sichergestellt, daß die Komponenten einer neuartigen O-Demethylase detektiert und angereichert bzw. gereinigt wurden. Veratrol wurde im Enzymtest mit Rohextrakten von 3-Methoxyphenolgewachsenen Zellen deutlich schneller demethyliert als das eigentlichen Wachstumssubstrat 3-Methoxyphenol. Veratrol erwies sich jedoch als sehr schlechtes Wachstumssubstrat für *A. dehalogenans*. Aus diesem Grund wurde die neuartige O-Demethylase, die im folgenden als Veratrol-O-Demethylase bezeichnet werden wird, aus 3-Methoxyphenolgewachsenen Zellen gereinigt.

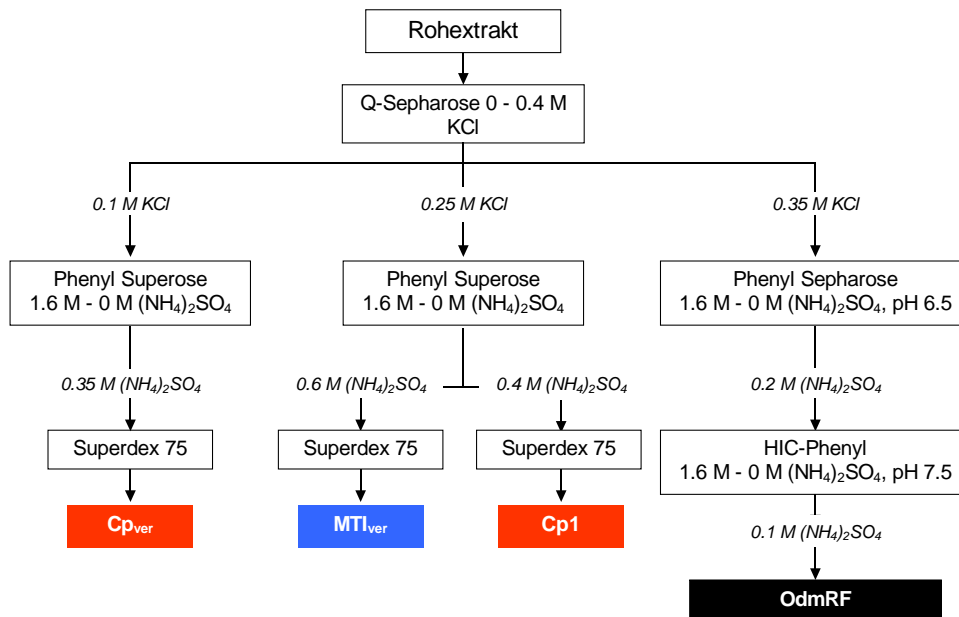


Abb.4-2: Reinigungsschema der O-Demethylase-Komponenten aus 3-Methoxyphenolgewachsenen Zellen. Die aktiven Fraktionen wurden im Salzgradienten bei der entsprechend angegebenen KCl- bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration eluiert. Cp_{ver} : Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase; $\text{Cp}1$: Corrinoidprotein 1; MTI_{ver} : Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase; OdmRF : O-demethylase-rekonstituierende Fraktion.

Der Rohextrakt aus 3-Methoxyphenol-gewachsenen Zellen wurde mittels Anionenaustauschchromatographie mit einer Q-Sepharose-Säule fraktioniert (Abb. 4-2). Um O-Demethylase-Aktivität messen zu können, mußten zwei Fraktionen, die im KCl-Gradienten bei 0,25 und 0,35 M KCl eluierten, kombiniert werden. Die in den beiden Fraktionen enthaltenen O-Demethylase-Komponenten wurden mittels hydrophober Interaktionschromatographie (Phenyl Superose) weiter angereichert. Eine Fraktion, die von der Q-Sepharose-Säule mit 0,25 M KCl eluiert wurde, konnte zusammen mit einer Fraktion, die mit 0,35 M KCl eluiert wurde, Veratrol demethylieren. Die mit 0,25 M KCl eluierte Fraktion

wurde auf einer Phenylsepharose-Säule weiter aufgetrennt. Zwei im O-Demethylase-Test benötigte Fraktionen eluierten bei 0,4 und 0,6 M Ammoniumsulfat. Diese beiden Fraktionen wurden durch Gelfiltration mit einer Superdex 75-Säule gereinigt. Die beiden O-Demethylase-Komponenten wurden als Cp1 (Corrinoidprotein 1) und MTI_{ver} (Veratrol-demethylierende Methyltransferase I) bezeichnet.

Die zweite Q-Sepharose Fraktion (0,35 M KCl) konnte ebenfalls mittels hydrophober Interaktionschromatographie in zwei weiteren Reinigungsschritten angereichert werden. Eine Fraktion, die in Kombination mit Cp1 und MTI_{ver} den Transfer der Methylgruppe von Veratrol auf Tetrahydrofolat katalysierte, eluierte bei 0,1 M Ammoniumsulfat von der HIC-Phenyl-Säule (OdmRF: O-demethylase-rekonstituierende Fraktion).

Auf die Erstellung einer Reinigungstabelle wurde verzichtet, da es sich bei der O-Demethylase um ein Mehrkomponentensystem handelt und bisher nicht geklärt werden konnte, welche der vier Komponenten limitierend für die Aktivität ist. Daher konnte hier keine spezifische Aktivität angegeben werden.

Cp1, MTI_{ver} und OdmRF waren essentiell für die O-Demethylase-Aktivität (Tab. 4-1), zusätzlich wurden ATP und Reduktionsäquivalente benötigt. Die Reduktionsäquivalente konnten sowohl durch Hydrogenase in Verbindung mit Wasserstoff und Methylviologen, als auch durch Titan(III)citrat zur Verfügung gestellt werden.

Tab. 4-1: Abhängigkeit der O-Demethylase-Aktivität von angereicherten (OdmRF, Cp1) bzw. gereinigten (MTI_{ver}) Komponenten. Bei der Kombination der Komponenten OdmRF mit MTI_{ver} und Cp1 wurde eine Aktivität von 160 nkat/g Gesamtprotein ermittelt; dies entspricht einer O-Demethylase-Aktivität von 100%. OdmRF: (O-demethylase-rekonstituierende Fraktion) angereicherte Proteine, vermutlich sind hier ein aktivierendes Enzym und eine Methyltransferase II enthalten; Cp1: Corrinoidprotein 1; MTI_{ver}: Methyltransferase I_{veratrol}.

Kombinierte Komponenten	O-Demethylase-Aktivität (%)
OdmRF + MTI _{ver} + Cp1	100
OdmRF + MTI _{ver}	0
OdmRF + Cp1	0
MTI _{ver} + Cp1	10

Anhand des Absorptionsspektrums konnte festgestellt werden, daß die Fraktion Cp1 ein Corrinoidprotein enthält. Dieses Protein wurde zu 70 % zu apparenter Homogenität angereichert. Da es nur in sehr geringen Mengen in den Zellen vorhanden war (0,05 % des Zellproteins), gelang es nicht, dieses Protein vollständig zu reinigen. Daß es sich bei Cp1 nicht um das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase handelte, konnte durch die unterschiedlichen N-terminalen

Aminosäuresequenzen und die unterschiedlichen Salzkonzentrationen, bei denen die beiden Corrinoidproteine von der Phenylsuperose-Säule eluierten, gezeigt werden (Tab. 4-2, Kaufmann et al. 1997). Im 2D-Gel ist Cp1 bei ca.25 kDa und pI 4.3 (Position C) zu finden (Abb. 4-1).

In der Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose, Abb. 4-2) eluierte bei einem Salzgehalt von 0,1 M KCl eine Fraktion, die eine deutlich erkennbare rote Färbung aufwies. Diese Färbung war nicht zu beobachten, wenn die Zellen mit Vanillat als Wachstumssubstrat gezüchtet worden waren. Anhand des UV/Vis-Spektrums konnte festgestellt werden, daß in dieser Fraktion ein Corrinoidprotein enthalten war. Wie sich später zeigte, handelte es sich bei diesem Protein mit großer Wahrscheinlichkeit um das physiologisch relevante Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase (siehe Kapitel 4.2/4.5). Dieses Corrinoidprotein wurde mittels hydrophober Interaktionschromatographie (Phenyl Superose, Abb.4-2) und einer Gelfiltration (Superdex75, Abb. 4-2) zu 100 % apparenter Homogenität gereinigt (Abb. 4-3). Das Protein wurde als Cp_{ver} (Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase) bezeichnet. Mittels SDS-PAGE wurde eine molekulare Masse von 22 kDa geschätzt (Abb. 4-3, Tab. 4-2), die apparente molekulare Masse des nativen Proteins betrug 18 kDa. Auch hier handelte es sich offensichtlich um ein monomeres Protein. Der Anteil am löslichen Zellgesamtprotein betrug ca. 1,5 %. Durch 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß es sich bei Cp_{ver} um eines der durch 3-Methoxyphenol induzierbaren Proteine handelte, welches an Position b (Abb. 4-1 B) lokalisiert war. Die N-terminale Aminosäuresequenz von Cp_{ver} entsprach weder der Sequenz von Cp1 noch der des Corrinoidproteins der Vanillat-O-Demethylase (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Molekulare Masse und N-terminale Aminosäuresequenzen der gereinigten O-Demethylase-Komponenten. MTI_{ver}: Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase; Cp_{ver}: Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase; Cp1: Corrinoidprotein 1.

	App. molekulare Masse (kDa)		N-terminale Aminosäuresequenz
	Gelfiltration	SDS-PAGE	
MTI _{ver}	30	32	MNQRENFFAMIEGKKPEFIPNSMEVYK
Cp1	25	22	MVDLAKLKNKVELGKF
Cp _{ver}	18	22	MSKITEVKQLVEAGSKKIGPAVQEALNA

Im gekoppelten optischen Test konnte Cp1 nicht durch Cp_{ver} ersetzt werden. Im UV/Vis-Spektrum zeigte sich, daß das Cobalt des Corrinoidcofaktors in der Oxidationsstufe +2 vorlag. Um als Methylgruppenakzeptor dienen zu können, muß das Corrinoid jedoch als superreduziertes Cob(I)alamin vorliegen. Es war jedoch nicht möglich Cp_{ver} allein mit Titan(III)citrat als Elektronendonator zu reduzieren. Um die Funktion von Cp_{ver} als Methylgruppenakzeptor in der O-Demethylase-Reaktion nachweisen zu können, mußte dieses Protein zunächst unter Einfluß von ATP und einem

aktivierendem Enzym bzw. unter Einfluß von MTI_{ver} und Methylviologen reduktiv aktiviert werden (siehe Kapitel 4.3/4.4).

Im gekoppelten optischen Test konnte Cp1 jedoch durch das Corrinoïdprotein der Vanillat-O-Demethylase ersetzt werden, wobei Veratrol als Substrat diente. (Daten nicht gezeigt). Diente Vanillat in diesem Versuch als Substrat, konnte keine O-Demethylase-Aktivität gemessen werden. Dies war ein erster Hinweis darauf, daß die Substratspezifität nicht durch das Corrinoïdprotein als Methylgruppen-Akzeptor bestimmt wird.

Das Protein MTI_{ver} wurde zu apparter Homogenität gereinigt. Mit SDS-PAGE konnte eine molekulare Masse von 32 kDa und durch Gelfiltration von 30 kDa ermittelt werden (Tab. 4-2, Abb. 4-3). Daraus wurde geschlossen, daß es sich um ein monomeres Protein handelte. MTI_{ver} war im 2D-Gel an der Position des induzierbaren Proteinspots a zu finden (Abb. 4-1 B). Dies konnte durch den Vergleich der Proteinmuster der 2D-Gele von Rohextrakt und gereinigter MTI_{ver} , sowie mit Hilfe N-terminaler Aminosäuresequenzierung des aus dem 2D-Gel geblotteten Proteins nachgewiesen werden. Der Anteil von MTI_{ver} am gesamten löslichen Zellprotein entsprach etwa 1 %. Die N-terminale Aminosäuresequenz unterschied sich von allen bisher bekannten Sequenzen der Bestandteile der Vanillat-O-Demethylase (Kaufmann et al. 1997, 1998a). So konnte sichergestellt werden, daß es sich hier um ein bisher nicht charakterisiertes Protein handelte. Auf Funktion und weitere Charakteristika wird in Kapitel 4.2 eingegangen werden.

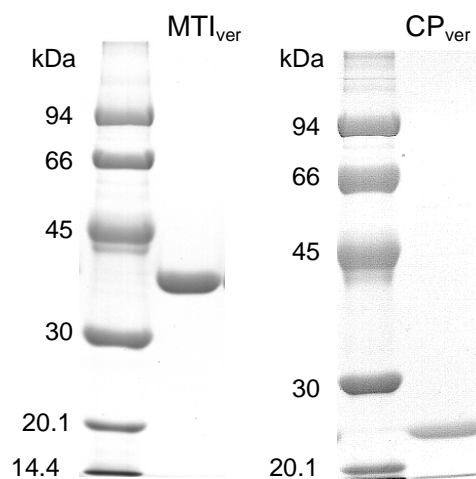


Abb. 4-3: SDS-PAGE der gereinigten O-Demethylase-Komponenten. Als Marker für die molekulare Masse dienten Phosphorylase B (94 kDa), Rinderserumalbumin(67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbonanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa). MTI_{ver} : Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase; CP_{ver} : Corrinoïdprotein der Veratrol-O-Demethylase;

Mittels ICP-AES wurde eine Bestimmung des Metallgehalts mit den zur apparteren Homogenität gereinigten Proteinen MTI_{ver} und CP_{ver} durchgeführt (Tab. 4-3). In MTI_{ver} war nur das Metall Zink in stöchiometrischen Mengen nachweisbar. Der Metallgehalt betrug ein Mol Zink pro Mol Protein.

Zinkionen besitzen jedoch die Eigenschaften, aufgrund ihrer Ladung unspezifisch an Proteinoberflächen binden zu können. Aus diesem Grund wurden zunächst unspezifisch gebundene Zinkionen durch Komplexierung mit EDTA und eine anschließende Reinigung mittels Gelfiltration entfernt (LeClerc & Grahame 1996). Das Verhältnis des nachgewiesenen Zinks zum vorhandenen Protein änderte sich jedoch nicht. Das bedeutet, daß die Zinkionen fest an MTI_{ver} gebunden waren.

Tab. 4-3: Metallanalyse von MTI_{ver} und Cp_{ver} mit ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy). Als Proben wurden das gereinigte Protein MTI_{ver}, eine weitere Probe MTI_{ver}, welches mit EDTA inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration gereinigt wurde, sowie das Corrinoidprotein Cp_{ver} eingesetzt.

Probe	Protein (µM)	Zn (µM)	Co (µM)	Fe (µM)	Cu (µM)	Mn (µM)	Ni (µM)	Se (µM)
MTI _{ver}	14 µM	14,8	-	1,1	-	-	1,0	-
MTI _{ver} , (EDTA-behandelt)	6,3	6,0	-	0,7	-	-	3,1	-
Cp _{ver}	26	12	24,1	2,5	-	-	0,03	-

Die Analyse des Metallgehalts bei Cp_{ver} ergab das Vorhandensein von 1 Mol Cobalt pro Mol Protein. Alle anderen nachgewiesenen Metalle waren in substöchiometrischen Mengen vorhanden und daher vermutlich unspezifisch gebunden.

4.2 Charakterisierung der Methyltransferase I_{veratrol} (MTI_{ver})

An der O-Demethylase-Reaktion sind mehrere Proteine beteiligt: eine Methyltransferase I (MTI), ein Corrinoidprotein (Cp) und eine Methyltransferase II (MTII) (siehe Einleitung, Abb. 2-2). Der gekoppelte optische Test bot eine Möglichkeit, die Geschwindigkeit, mit der die Methylgruppen vom Substrat auf Tetrahydrofolat übertragen werden, zu messen. Jedoch war eine Zuordnung der Funktion zu den einzelnen Komponenten mit diesem Test nicht möglich.

In Fraktion Cp1 war ein Corrinoidprotein enthalten, welches als Methylgruppenakzeptor dienen konnte. Einen Hinweis darauf lieferte die Tatsache, daß Cp1 im gekoppelten optischen Test durch das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase (Cp_{van}) ersetzt werden konnte. Bei ähnlichen Proteinkonzentrationen von Cp1 und Cp_{van} konnte vergleichbare O-Demethylase-Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Da MTI_{ver} an der O-Demethylierung beteiligt war (siehe Kapitel 4.1) und durch das UV/Vis-Spektrum das Vorhandensein eines Corrinoid-Cofaktors in MTI_{ver} ausgeschlossen werden konnte, wurde vermutet, daß es sich bei MTI_{ver} um eine der beiden, an der O-Demethylase-Reaktion beteiligten, Methyltransferasen handelte. Die erste Teilreaktion der O-Demethylase-Reaktion, die Demethylierung des Phenylmethylethers und die Methylierung des Corrinoidproteins, katalysiert durch die Methyltransferase I, diente als Testsystem, mit dem die Funktion von MTI_{ver} nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-4). In diesem Test wurden die Corrinoidproteine Cp_{van} oder Cp_{ver} als Methylgruppenakzeptor, Veratrol oder andere Phenylmethylether als Methylsubstrate und MTI_{ver} als mutmaßliche Methyltransferase I eingesetzt.

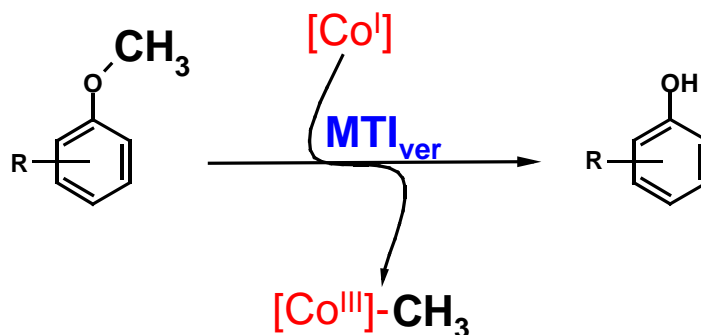


Abb.4-4: Test für die Methyltransferase I-Aktivität. Als Methylgruppenakzeptor dienten die Corrinoidproteine Cp_{van} oder Cp_{ver} in der superreduzierten Form ([Co^I]). Methylsubstrate waren verschiedene Phenylmethylether. Gemessen wurde die Methylierung des Corrinoidproteins über die Änderung des Absorptionsspektrums sowie die Demethylierung des Phenylmethylethers über HPLC-Analyse von Substrat und Produkt (siehe Material und Methoden 3.6, Tab. 4-4/4-5).

Cp_{van} wurde durch Überexpression des Gens *odmA_{van}* in *E.coli* BL21 gewonnen (Kaufmann et al. 1998b). Cp_{ver} wurde aus Rohextrakt von *A. dehalogenans*, gewachsen auf 3-Methoxyphenol, gereinigt (siehe Kapitel 4.1). Cp_1 konnte in diesem Test nicht eingesetzt werden, da es nicht in ausreichender Menge gewonnen werden konnte. Die Bildung von Methylcobalamin konnte photometrisch anhand der Zunahme der Absorption bei 530 nm und der Abnahme bei 390 nm verfolgt werden (Abb. 4-5, Tab. 4-4) die Abnahme der Phenylmethylether und die Bildung der demethylierten Produkte wurden mittels HPLC-Analyse bestimmt (Tab.4-4/4-5).

Methylierung des Corrinoidproteins Cp_{van} durch MTI_{ver}

Bei den Substraten 3-Methoxyphenol, 2-Methoxyphenol, Veratrol, 3,4-Dimethoxybenzoat und 2-Chloranisol konnte im Absorptionsspektrum die Zunahme der Absorption bei 530 nm und damit die Bildung von Methylcobalamin beobachtet werden. Dies war bei der Verwendung von Vanillat jedoch nicht der Fall (Tab. 4-4). In Abb. 4-5 ist diese Veränderung des Absorptionsspektrums des Corrinoidproteins während der Demethylierung von Veratrol (Abb. 4-5 A) und 3-Methoxyphenol (Abb. 4-5 B) dargestellt. Anhand der Geschwindigkeit der Zunahme der Absorption bei 530 nm konnte die Geschwindigkeit der Methylcobalamin-Bildung berechnet werden. Abhängig von der MTI_{ver} -Konzentration war die Reaktion innerhalb der ersten 10 min nach Reaktionsstart linear (Daten nicht gezeigt). Es wurde eine Reaktionsrate von 15 nmol abgespaltener Methylgruppen pro Minute und Milligramm Protein berechnet. Alle Substrate wurden mit vergleichbarer Geschwindigkeit demethyliert.

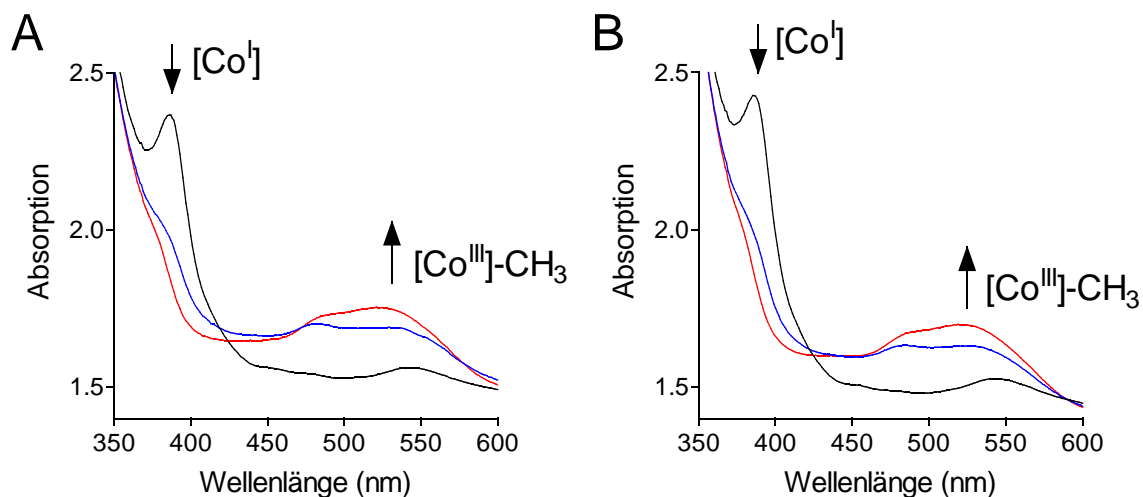


Abb. 4-5: Methylierung des Corrinoidproteins Cp_{van} (88 μ M) mit Veratrol (A) oder 3-Methoxyphenol (B) in Gegenwart der Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase (MTI_{ver} , 1 mg). Die Konzentration der eingesetzten Phenylmethylether betrug 300 μ M. Die Messung erfolgte bei 25°C und pH 6,5. Die Spektren wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ min (schwarze Linie), 1 min (blaue Linie) und 10 min (rote Linie) aufgenommen. $[Co^I]$: Corrinoidprotein mit Cobalt in der Oxidationsstufe +1; $[Co^{III}]-CH_3$: methyliertes Corrinoidprotein.

Bei den Substraten 3-Methoxyphenol, 2-Methoxyphenol und 2-Chloranisol konnten die entsprechenden demethylierten Phenylmethylether in annähernd stöchiometrischen Mengen zu Methylcobalamin nachgewiesen werden (Tab. 4-4). Auch bei den zweifach methoxylierten Phenylmethylethern Veratrol und 3,4-Dimethoxybenzoat konnten Demethylierungsprodukte nachgewiesen werden. Bei Veratrol wurden die beiden möglichen Produkte 2-Methoxyphenol und 1,2-Dihydroxybenzol detektiert. Dies war bei 3,4-Dimethoxybenzoat nicht der Fall, es entstand nur das einfach demethylierte Produkt Vanillat.

Tab. 4-4: Demethylierung von Phenylmethylethern durch MTI_{ver} (1 mg) mit dem Corrinoïdprotein der Vanillat-O-Demethylase (Cp_{van} , 88 μM) als Methylgruppenakzeptor. Die Bildung des demethylierten Phenylmethylethers wurde mittels HPLC, die Methylcobalaminbildung photometrisch verfolgt. Die Messung wurde bei 25°C und pH 6,5 durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten (siehe Material und Methoden 3.6).

Testsubstrate	Demethylierte(s) Produkt(e)	Konzentration der demethylierten Produkte (μM)	Methylcobalamin- bildung (μM)
Vanillat	-	0	0
3-Methoxyphenol	1,3-Dihydroxybenzol	91	70
2-Methoxyphenol	1,2-Dihydroxybenzol	70	68
Veratrol	2-Methoxyphenol 1,2-Dihydroxybenzol	76	82
3,4-Dimethoxy benzoat	Vanillat	70	42
2-Chloranisol	2-Chlorphenol	60	41

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß es sich bei MTI_{ver} um eine Methyltransferase I handelt, die offensichtlich ein anderes Substratspektrum besitzt als die Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase. Vanillat konnte nicht umgesetzt werden, auch wenn das Corrinoïdprotein der Vanillat-O-Demethylase als Methylgruppenakzeptor eingesetzt wurde. Dahingegen wurden Substrate wie Veratrol oder 3-Methoxyphenol demethyliert. Dies war mit den Komponenten der Vanillat-O-Demethylase nicht möglich (Kaufmann et al. 1998a).

Methylierung des Corrinoidproteins Cp_{ver} durch MTI_{ver}

Die Funktion des Corrinoidproteins Cp_{ver} konnte mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.1). Daher sollte mit Hilfe des oben beschriebenen Testsystems die Methylierung von Cp_{ver} photometrisch nachgewiesen werden. Der Test wurde unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Damit der Corrinoidcofaktor zum aktiven Cob(I)alamin reduziert werden konnte, wurde zusätzlich Methylviologen (Endkonzentration 0,4 µM) zugegeben. Die Möglichkeiten zur Aktivierung von Cp_{ver} werden in Kapitel 4.4 näher beschrieben werden.

Tab. 4-5: Demethylierung von Phenylmethylethern durch MTI_{ver} (1 mg) mit dem Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase (Cp_{ver}, 60 µM) als Methylgruppenakzeptor. Zur reduktiven Aktivierung von Cp_{ver} wurde Methylviologen (0,4 µM) zugegeben. Die Abnahme des Substrates und die Bildung des demethylierten Phenylmethylethers wurde durch HPLC-Analyse ermittelt. Die Messung wurde bei 25°C und bei pH 6,5 durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten (siehe Material und Methoden 3.6).

Testsubstrate	Demethylierte(s) Produkt(e)	Substratabnahme (µM)	Produktbildung (µM)
Vanillat	-	0	0
3-Methoxyphenol	1,3-Dihydroxybenzol	40	30
2-Methoxyphenol	-	0	0
Veratrol	2-Methoxyphenol	65	50

Der Versuch wurde mit den Substraten Vanillat, 3-Methoxyphenol, 2-Methoxyphenol und Veratrol durchgeführt (Tab. 4-5). Bei 3-Methoxyphenol und Veratrol zeigte sich im Absorptionsspektrum eine Zunahme der Absorption bei 530 nm; zusätzlich konnten bei den beiden zuletzt genannten Substraten die Produkte 1,3-Dihydroxybenzol und 2-Methoxyphenol nachgewiesen werden. 2-Methoxyphenol, welches bei der einfachen Demethylierung von Veratrol entstand, wurde jedoch nicht weiter zu 1,2-Dihydroxybenzol umgesetzt. Wurde 2-Methoxyphenol direkt als Substrat im Test eingesetzt, konnte auch hier keine Bildung von Methylcobalamin und 1,2-Dihydroxybenzol gemessen werden. Vanillat konnte ebenfalls nicht als Substrat dienen.

Aufgrund des sehr negativen Redoxpotentials des Corrinoidproteins Cp_{ver} kam es in diesem Versuch offenbar sehr leicht zur Autoxidation zu Cob(II)alamin. Im UV/Vis-Spektrum waren sowohl Cob(II)- als auch Methylcobalamin zu erkennen. Daher konnte die Stöchiometrie zwischen der Menge des entstandenen demethylierten Produktes und der Menge des gebildeten Methylcobalamins nicht angegeben werden. Aus dem selben Grund war eine Angabe der Methylierungsrate nicht möglich.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob MTI_{ver} die Demethylierung von Phenylmethylethern mit freiem B₁₂ katalysiert. Dies war jedoch nicht der Fall (Daten nicht gezeigt).

MTI_{ver} konnte die Demethylierung verschiedener Substrate mit Cp_{van}, Cp_{ver} und Cp1 als Methylgruppenakzeptor katalysieren. Dies läßt darauf schließen, daß MTI_{ver} hinsichtlich des Corrinoidproteins als Substrat keine große Spezifität aufweist. Die Substratspezifität für die Phenylmethylether wurde offensichtlich weitestgehend durch MTI_{ver} bestimmt, da z.B. Vanillat, auch mit Cp_{van} als Methylgruppenakzeptor, durch MTI_{ver} nicht umgesetzt wurde. Einen Hinweis darauf, daß die Substratspezifität nicht ausschließlich von der MTI_{ver} abhängt, liefert die Umsetzung von 2-Methoxyphenol, das von MTI_{ver} nur in Gegenwart von Cp_{van}, nicht aber mit Cp_{ver} demethyliert wurde.

4.3 Charakterisierung des Corrinoidproteins Cp_{ver}

Das Corrinoidprotein Cp_{ver} wird gemeinsam mit der Methyltransferase MTI_{ver} beim Wachstum von *A. dehalogenans* auf 3-Methoxyphenol induziert. Es handelt sich bei Cp_{ver} mit großer Wahrscheinlichkeit um das physiologisch relevante Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase. Im Vergleich zum Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase weist es einige Unterschiede auf. Der auffälligste Unterschied besteht darin, daß das Corrinoidprotein Cp_{ver} offensichtlich erheblich schwieriger zum aktiven Cob(I)alamin-Protein zu reduzieren war als das Corrinoidprotein Cp_{van}. Die Möglichkeiten zur reduktiven Aktivierung von Cp_{ver} werden im Kapitel 4.4 vorgestellt werden.

Dieses Kapitel widmet sich der Charakterisierung des zuletzt genannten Corrinoidproteins. Von besonderem Interesse waren dabei der Metallgehalt, die Stöchiometrie des Corrinoidcofaktors zum Protein, der Typ des Corrinoidcofaktors im Protein und die Redoxeigenschaften von Cp_{ver}. Die aufgezählten Charakteristika sind entscheidend für die Funktion eines Corrinoidproteins.

Absorptionsspektrum des Corrinoidproteins Cp_{ver}

Das Absorptionsspektrum des Corrinoidproteins Cp_{ver} zeigte das Vorhandensein eines Corrinoidcofaktors (Abb.4-6). Corrinoidproteine zeichnen sich durch charakteristische Absorptionsspektren aus, die zur stofflichen Unterscheidung und zur quantitativen Bestimmung dienen können. Die Absorptionsspektren von Corrinoiden sind vor allem auf das konjugierte Doppelbindungssystem ihres Corrinrings zurückzuführen. Abhängig von der Oxidationsstufe des zentralen Cobalts weisen Corrinoidproteine verschiedene Absorptionsmaxima auf. Die charakteristischen Absorptionsmaxima sind bei Cob(III)alamin 550 nm und 361 nm, bei Cob(II)alamin bei 478 nm und bei Cob(I)alamin bei 386 nm.

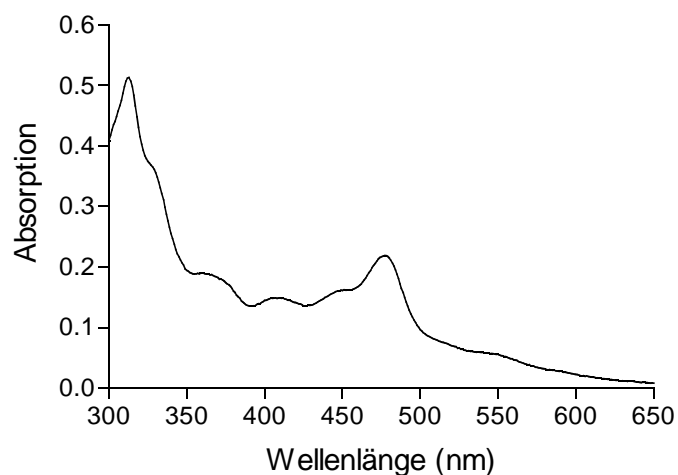


Abb. 4-6: Absorptionsspektrum des nativen Corrinoidproteins Cp_{ver}. Das Cobalt des Corrinoids liegt in der Oxidationsstufe +2 vor. [Cp_{ver}]: 26 µM; pH 7,5.

Das Absorptionsspektrum des nativen Proteins Cp_{ver} weist bei 478 nm ein Absorptionsmaximum auf. Dies bedeutet, daß das Corrinoide des nativen Cp_{ver} als Cob(II)alamin vorlag. Aus dem Spektrum konnte die Konzentration des Corrinoide durch die Absorptionsdifferenz bei 478 nm berechnet werden ($\epsilon_{478\text{ nm}} = 7,4\text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, Friedrich 1975). Die Konzentration des Corrinoidecofaktors betrug 29 μM , die Proteinkonzentration, berechnet aus der Proteinbestimmung und der molekularen Masse, 26 μM . Die Metallanalyse mittels ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, siehe Kapitel 4.1, Tab 4-3) ergab einen Metallgehalt von 0,9 Mol Cobalt pro Mol Protein. Aus den Daten wurde geschlossen, daß pro Mol Cp_{ver} ein Mol B₁₂ gebunden war.

Extraktion und Charakterisierung des Cofaktors aus dem Corrinoideprotein Cp_{ver}

Corrinoideproteine können unterschiedliche Corrinoidecofaktoren enthalten. Der bekannteste ist Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin), weitere Beispiele wären Aquocobalamin oder Faktor A (Friedrich 1975). Die verschiedenen Corrinoide unterscheiden sich z. B. durch ihre spektralen Eigenschaften und durch unterschiedliche Massen, hervorgerufen durch unterschiedliche Axialliganden. Auch Ihre Fähigkeit zur abiotischen reduktiven Dechlorierung von Chlorkohlenwasserstoffen kann zur Charakterisierung herangezogen werden (Neumann et al. 2002).

Um den Corrinoidecofaktor des Corrinoideproteins Cp_{ver} zu charakterisieren, mußte dieser zunächst durch Cyanidextraktion aus dem Protein extrahiert und gereinigt werden. Die einzelnen Reinigungsschritte und die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tab. 4-6 aufgeführt (siehe Material und Methoden 3.6). Der letzte Reinigungsschritt erfolgte mittels HPLC. Mit Hilfe des Dioden Array Detektors wurden zwei deutlich getrennte Corrinoide-Peaks detektiert (Abb. 4-7). Die Retentionszeit des zweiten Peaks entsprach der des Standards Cyanocobalamin, die des ersten Peaks konnte keiner der getesteten Standardsubstanzen (Hydroxocobalamin, Cyanocobalamin, Pseudovitamin B₁₂, Faktor A) zugewiesen werden. Sie alle wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt von der HPLC-Säule eluiert. Dieses Ergebnis war überraschend. Zunächst wurde daraus geschlossen, daß das Corrinoideprotein Cp_{ver} zwei verschiedene Corrinoidecofaktoren enthalten könnte und keine große Spezifität hinsichtlich der Bindung des Corrinoide aufweist. Die im folgenden aufgeführten Daten ließen jedoch eine andere Schlußfolgerung zu.

Tab. 4-6: Cyanidextraktion des Corrinoideproteins Cp_{ver}. Die einzelnen Extraktions- und Reinigungsschritte wurden wie in Material und Methoden 3.6 beschriebenen durchgeführt. Die Konzentration des Corrinoide wurde aus den jeweiligen Absorptionsspektren bestimmt ($\epsilon_{361} = 28,05 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Peak 1/Peak 2: corrinoidehaltige Peaks, die mit dem Dioden Array Detektor während der HPLC-Reinigung detektiert wurden (Abb. 4-7).

Extraktions-/Reinigungsschritt	Probenvolumen (μl)	Corrinoide- konzentration (μM)	Ausbeute (%)
Natives Cp _{ver}	400	29,6	100
Extraktion mit KCN und Zentrifugation	850	12,3	88
Amberlite XAD-4-Chromatographie	120	57,5	58
HPLC	Peak 1: 100	14,8	12,5
	Peak 2: 150	14,6	18,5

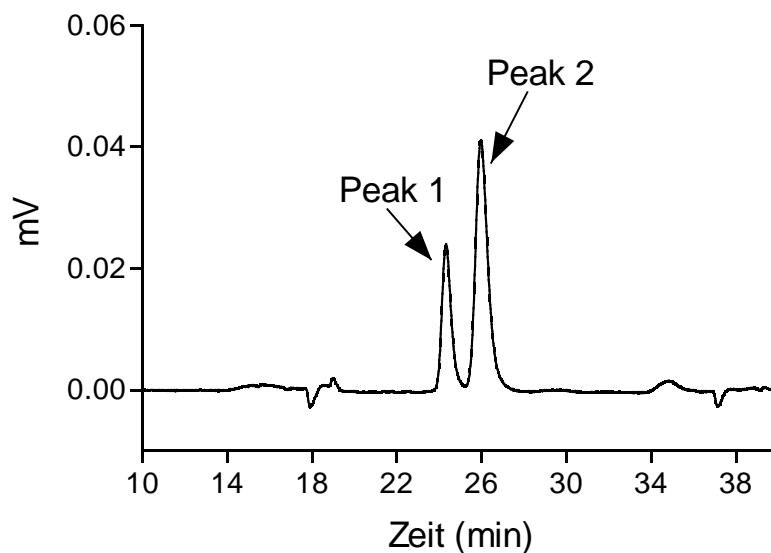


Abb. 4-7: HPLC-Elutionsprofil des Cofaktors des Corrinoideproteins Cp_{ver}. Bedingungen und Vorgehensweis siehe Material und Methoden 3.6. In den Proben der beiden gekennzeichneten Peaks (Peak 1, Peak 2) wurden über die Absorptionsspektren Corrinoide nachgewiesen (Abb.4-8).

Die Aufnahme der Absorptionsspektren und die Ermittlung der Massen mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS) sollten Aufschluß darüber geben, welcher Corrinoidecofaktor in den Proben enthalten war und ob es sich tatsächlich um zwei unterschiedliche Corrinoide handelte. Zusätzlich wurde bei beiden Proben die Dechlorierungsgeschwindigkeit von Trichloracetat, die durch

Corrinoide katalysiert wird, bestimmt. Dabei wurde mit Titan(III)citrat reduziertes Methylviologen als Elektronendonator eingesetzt. Die Oxidation des Methylviologens bzw. die Dechlorierung von Trichloracetat wurde dabei photometrisch verfolgt (Neumann et al. 2002). Die Geschwindigkeit der Dechlorierung, bezeichnet als K-Wert, wird in Mol Cl⁻ pro Mol B₁₂ und Stunde ([s⁻¹]) angegeben.

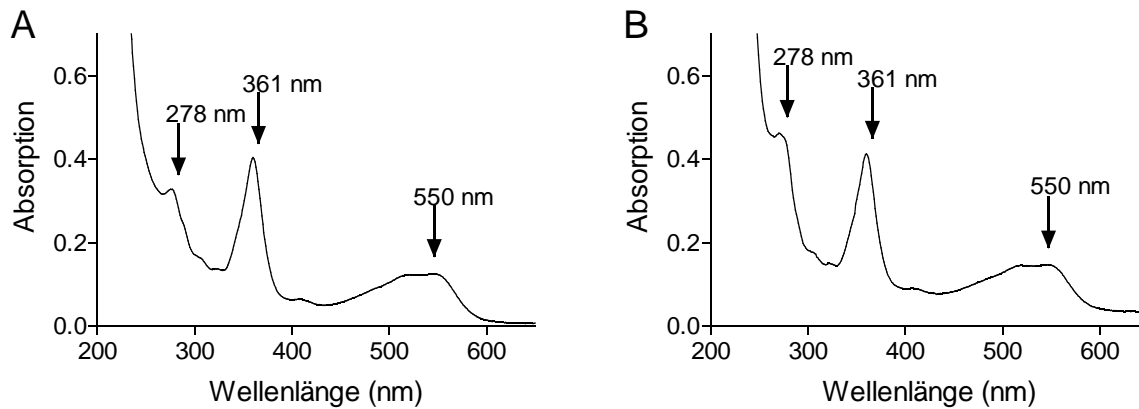


Abb. 4-8: Absorptionsspektren der aus dem Corrinoideprotein Cp_{ver} gereinigten Cofaktoren. (siehe Material und Methoden 3.6, Tab. 4-6). A: Corrinoidecofaktor nach Reinigung mittels HPLC, siehe Abb. 4-7, Peak 1; B: Corrinoidecofaktor nach Reinigung mittels HPLC, siehe Abb. 4-7, Peak 2.

Die Absorptionsspektren der beiden Corrinoideproben besaßen Absorptionsmaxima bei 278 nm, 361 nm und 550 nm (Abb. 4-8). Dieselben Maxima weist das Absorptionsspektrum des Standards Cyanocobalamin auf (Isler et al. 1988). Mit dem Corrinoide, das im ersten Peak enthalten war, wurde für die Dechlorierung von Trichloracetat ein K-Wert von 751 s⁻¹ bestimmt, für das des zweiten Peaks ein K-Wert von 866 s⁻¹. Der K-Wert für die Standardsubstanz Cyanocobalamin betrug 850 s⁻¹. Mittels ESI-MS wurden für die Corrinoide aus den beiden Proben jeweils eine Masse von 1377 g/mol bestimmt. Ebenfalls 1377 g/mol wurden für den Standard Cyanocobalamin gemessen (Abb. 4-9). Die Ionisierung der Corrinoide moleküle erfolgte durch ein Natriumion, welches unspezifisch am Corrinringssystem haftete. Abzüglich der Masse des Natriumions von 23 g/mol betrug die Masse der Proben und des Standards jeweils 1354 g/mol. Dies entspricht der berechneten Masse für Cyanocobalamin unter Berücksichtigung der Isotopenverteilung. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist in dem Corrinoideprotein Cp_{ver} nur der Cofaktor Cyanocobalamin enthalten, obwohl zwei unterschiedliche Corrinoidepeaks nach der Cyanidextraktion detektiert wurden. Das unterschiedliche Verhalten der beiden Corrinoideproben während der HPLC-Reinigung könnte seine Ursache in unterschiedlichen Enantiomeren haben. Auch die Tatsache, daß sich die Dechlorierungsraten der beiden Corrinoideproben leicht unterscheiden, sollte nicht überbewertet werden, da die Aufnahme der Absorptionsspektren sowie die Bestimmung der Masse die genaueren Daten zur Charakterisierung des Corrinoids liefern. Da der Cyanocobalamin-Standard nur einen einzigen Peak im HPLC-Elutionsprofil aufwies, ist auszuschließen, daß es sich bei Peak 1 um ein Präparationsartefakt handelt.

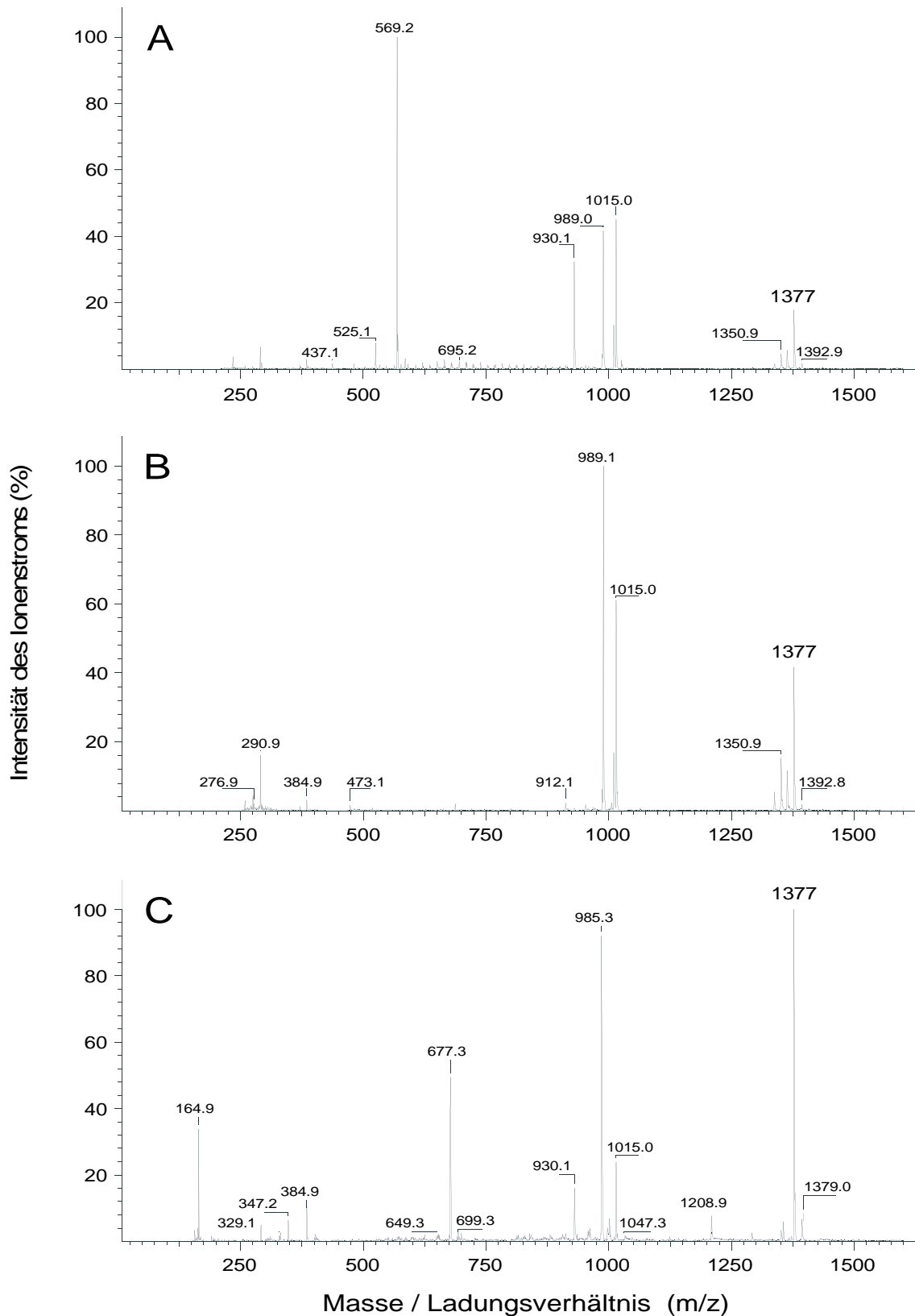


Abb. 4-9: Bestimmung der Massen der gereinigten Corrinoiden mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI). Die Corrinoiden waren in H₂O gelöst, als Standardsubstanz wurde Cyanocobalamin verwendet. A: Corrinoid in Peak 1, Abb. 4-7/8; B: Corrinoid in Peak 2, Abb. 4-7/8, C: Standard Cyanocobalamin

Bestimmung des Redoxpotentials der Corrinoidproteine Cp_{van} und Cp_{ver}

Die Oxidationsstufe des Cofaktors ist entscheidend für die Funktion des Corrinoidproteins als Methylgruppenakzeptor während der O-Demethylierung. Besonders wichtig ist hierbei das Potential, bei dem der Übergang vom inaktiven Cob(II)- zum aktiven Cob(I)alamin erfolgt. Aus diesem Grund wurde mit den Corrinoidproteinen Cp_{van} und Cp_{ver} eine Redox Titration durchgeführt. Das jeweilige Corrinoidprotein wurde dabei unter kontrollierten Bedingungen durch Zugabe von definierten Mengen Titan(III)citrat von Cob(III)alamin zu Cob(II)- und Cob(I)alamin reduziert. Dabei wurden die Absorptionsspektren aufgenommen, anhand derer bestimmt werden konnte, bei welchem Redoxpotential der Übergang zwischen den genannten Oxidationsstufen erfolgte. Die Bestimmung der Mittelpunktspotentiale der Redoxübergänge von Co^{III} zu Co^{II}, bzw. von Co^{II} zu Co^I wurde mit Hilfe des Nernst-Plots vorgenommen. Die Bestimmung des Redoxpotentials erfolgte bei pH 7,5, da bei leicht basischem pH die notwendigen anoxischen Bedingungen leichter zu gewährleisten sind. Für das Corrinoidprotein Cp_{van} wurde bei pH 7,5 für den Übergang von Cob(III)- zu Cob(II)alamin ein Redoxpotential von 171 mV bestimmt, für den Übergang von Cob(II)- zu Cob(I)alamin ein Redoxpotential von -413 mV.

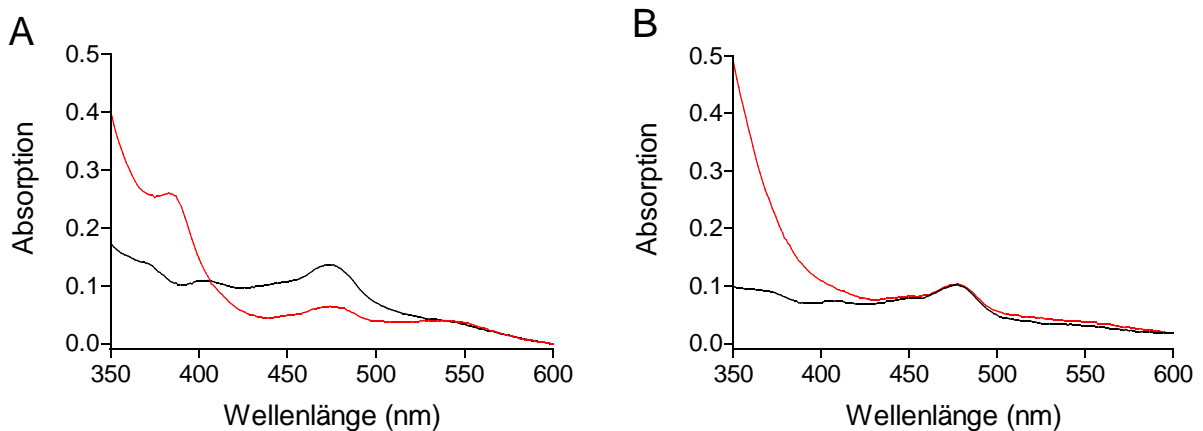


Abb. 4-10: Redox Titration der Corrinoidproteine Cp_{van} und Cp_{ver}. Cp_{van} wurde durch Überexpression von *odmA* in *E. coli* BL21 gewonnen (Kaufmann et al. 1998b), Cp_{ver} wurde aus *A. dehalogenans*, gewachsen auf 3-Methoxyphenol, gereinigt. A: Absorptionsspektren von Cp_{van}, aufgenommen bei den gemessenen Potentialen -18 mV (schwarze Linie) und -432 mV (rote Linie). B: Absorptionsspektren von Cp_{ver}, aufgenommen bei den gemessenen Potentialen 0 mV (schwarze Linie) und -492 mV (rote Linie). [Cp_{van}]: 18 µM; [Cp_{ver}]: 14 µM; pH 7,5.

Das Corrinoidprotein Cp_{ver} lag bereits zu Beginn der Redox Titration als Cob(II)alamin vor. Mit Titan(III)citrat allein konnte keine Reduktion dieses Corrinoidproteins zum Cob(I)alamin erreicht werden. In Abb. 4-10 sind die Absorptionsspektren von Cp_{ver} bei -18 und -432 mV und von Cp_{van}, bei 0 und -492 mV einander gegenübergestellt. Bei Cp_{van} ist das entstandene Cob(I)alamin anhand des Absorptionsmaximums bei 390 mV deutlich erkennbar (Abb. 4-10 A). Dagegen blieb das Cobalt des Corrinoidproteins Cp_{ver} unverändert in der Oxidationsstufe +2, obwohl insgesamt ein Potential von -492 mV erreicht wurde (Abb. 4-10 B). Der Übergang von Cob(II)- zu Cob(I)alamin muß also negativer

als -492 mV sein. Das Redoxpotential von Titan(III)citrat war offensichtlich nicht ausreichend, um Cp_{ver} zu reduzieren. Auf die Ermittlung des Potentials beim Übergang von Cob(III)- zu Cob(II)alamin bei dem Protein Cp_{ver} wurde verzichtet, da dies für dessen Funktion als Methylgruppenakzeptor nicht relevant ist.

4.4 Aktivierung des Corrinoidproteins Cp_{ver}

Das Redoxpotential von Titan(III)/Titan(IV)citrat war nicht ausreichend um das zentrale Cobalt des Corrinoidproteins Cp_{ver} von der Redoxstufe +2 in die Redoxstufe +1 zu überführen (siehe Kapitel 4.3). Als Methylgruppenakzeptor in der O-Demethylierung muß das Corrinoid im Corrinoidprotein jedoch als superreduziertes Cob(I)alamin vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Möglichkeiten gefunden, Cp_{ver} reduktiv zu aktivieren. Zum einen wurde Cp_{ver} in Gegenwart von ATP und Rohextrakt reduziert (ATP-abhängige Aktivierung), zum anderen erfolgte eine Aktivierung in Anwesenheit von Methylviologen und MTI_{ver} (MTI_{ver}-abhängige Aktivierung).

ATP-abhängige Aktivierung

Das Corrinoid in Cp_{ver} ist aufgrund seines negativen Redoxpotentials (siehe Kapitel 4.3) mit dem Reduktionsmittel Titan(III)citrat allein nicht zu Cob(I)alamin reduzierbar. Durch Zusatz von ATP, Rohextrakt und Titan(III)citrat wurde das Corrinoid in Cp_{ver} zu Cob(I)alamin reduziert. Die Abnahme von Cob(II)alamin und die Bildung von Cob(I)alamin ist im Absorptionsspektrum anhand der Abnahme der Absorption bei 478 nm und der Absorptionzunahme bei 390 nm gut zu beobachten (Abb. 4-11).

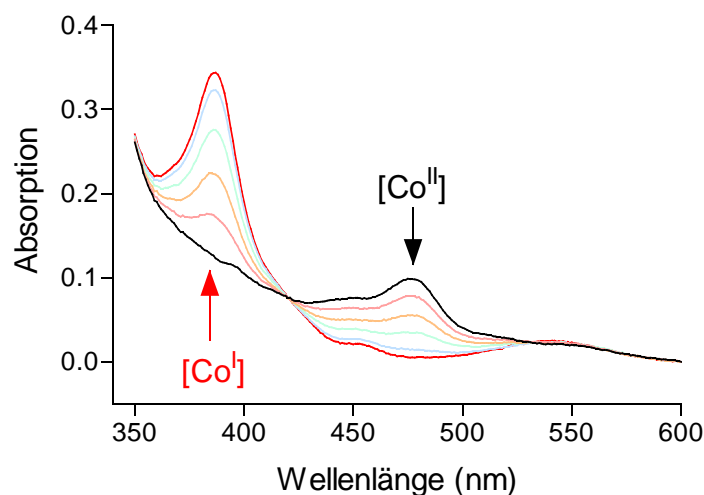


Abb. 4-11: ATP-abhängige Reduktion des Corrinoidproteins Cp_{ver} in Gegenwart von Rohextrakt. Die Spektren wurden über einen Zeitraum von insgesamt 25 min aufgenommen. (0 Minuten: schwarze Linie, 25 Minuten: rote Linie). [Co^{III}]: Corrinoidprotein in der Oxidationsstufe +1/+2; ATP: 4 mM; Rohextrakt: 0,2 mg Protein; Titan(III)citrat: 2 mM, [Cp_{ver}]: 10 µM; pH 7,5; Temperatur 25 °C.

Bei dem in Abb. 4-11 dargestellten Beispiel wurde die Reduktion von 10 µM Cp_{ver} mit ATP/MgCl₂ (4 mM), Titan(III)citrat (2 mM) und Rohextrakt (0,2 mg) gestartet. Das Corrinoidprotein wurde innerhalb von 25 min vollständig reduziert. Sowohl ATP als auch der Rohextrakt waren für die

Reduktion notwendig. Eine Bildung von Cob(I)alamin, erkennbar an der Entstehung eines Absorptionsmaximums bei 386 nm, war in Abwesenheit von Rohextrakt oder ATP nicht möglich (Abb. 4-12). Es wurde untersucht, ob der Zusatz eines Redoxmediators wie z.B. Methylviologen (0,05 – 2 mM) die Geschwindigkeit der Reduktion steigern kann. Dies war jedoch nicht der Fall.

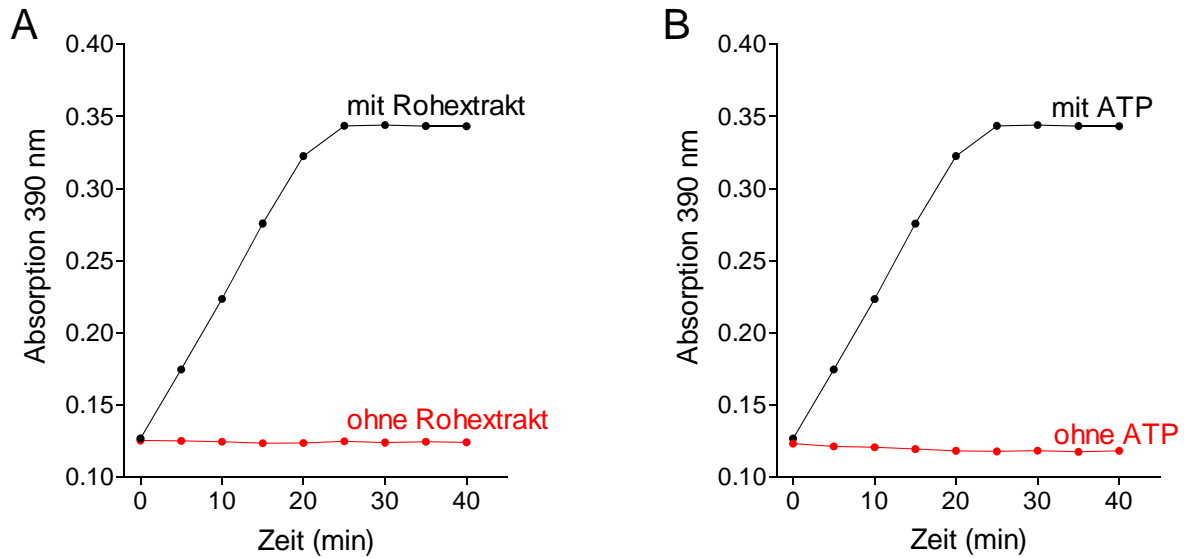


Abb. 4-12: Abhängigkeit der Cp_{ver}-Reduktion mit Titan(III)citrat von Rohextrakt (A) und ATP (B). ATP (4 mM), Rohextrakt: (0,2 mg Protein); Titan(III)citrat: 2 mM; [Cp_{ver}]: 10 µM; pH 7,5; Temperatur 25 °C. Kinetik in Gegenwart aller angegebenen Komponenten: schwarze Linie. A: Kinetik in Gegenwart aller angegebenen Komponenten mit Ausnahme von Rohextrakt (rote Linie); B: Kinetik in Gegenwart aller angegebenen Komponenten mit Ausnahme von ATP (rote Linie) (siehe Material und Methoden 3.6).

Aus den dargestellten Experimenten wurde geschlossen, daß im Rohextrakt offensichtlich eine aktivierende Komponente enthalten war, welche die Reduktion jedoch nur in Anwesenheit von ATP katalysieren konnte. Ein solches aktivierendes Enzym (Komponente C) wurde als Bestandteil der Vanillat-O-Demethylase aus *A. dehalogenans* bereits beschrieben (Kaufmann et al. 1997, 1998a). Das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase ließ sich mit Titan(III)citrat allein reduzieren. Wurde jedoch Hydrogenase mit Ferredoxin unter Wasserstoffatmosphäre als elektronenlieferndes System benutzt, so wurde eine strikte Abhängigkeit der Aktivität von der aktivierenden Komponente und ATP gefunden. Bei dieser Komponente, im folgenden Komponente C genannt, handelte es sich vermutlich um ein Homotrimer (nativ 195 kDa, SDS-PAGE 67 kDa, Kaufmann et al. 1998a), dessen Reinigung sich aufgrund seines niedrigen prozentualen Anteils am Gesamtzellprotein ($\leq 0,002$ %) als schwierig erwies.

Das aktivierende Enzym (AE) sollte aus Rohextrakt von *A. dehalogenans*, gewachsen auf 3-Methoxyphenol, angereichert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Testsystem benötigt, das es ermöglichte, spezifisch das aktivierende Enzym zu detektieren. Mit dem bisher verwendeten gekoppelten optische Test war eine Funktionszuordnung nicht möglich und damit auch keine spezifische Detektion einzelner Komponenten. In diesem neu entwickelten Test wurde die Reduktion

von Cp_{ver} photometrisch verfolgt wie in Abb. 4-11 dargestellt. Da die Reduktion nur in Gegenwart des aktivierenden Enzyms erfolgt, kann dieses Protein auf diese Weise detektiert werden. Die Reduktion wurde durch Zugabe von AE-haltiger Fraktion aus dem jeweiligen Reinigungsschritt gestartet und eine Kinetik der Cob(I)alaminbildung anhand der Absorptionzunahme bei 386 nm aufgenommen (siehe Material und Methoden 3.6).

Im ersten Anreicherungsschritt wurde mittels Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) eine Fraktion, die aktivierendes Enzym enthielt, mit 0,35 M KCl eluiert. Mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests konnte in früheren Versuchen (siehe Kapitel 4.1, Abb. 4-2) bereits gezeigt werden, daß in dieser Fraktion mindestens eine für die O-Demethylase-Aktivität essentielle Komponente enthalten sein muß. Der nächste Reinigungsschritt erfolgte mittels hydrophober Interaktionschromatographie (Phenyl Sepharose). Auch hier fand sich die aktivierende Komponente in der Fraktion, die bereits als Odm-RF (O-Demethylase-rekonstituierende Fraktion, Kapitel 4.1, Abb. 4-2) bezeichnet wurde. In Odm-RF wurde die Anwesenheit einer Methyltransferase II und eines aktivierenden Enzyms vermutet. Das Vorhandensein des zuletzt genannten Enzyms in dieser Fraktion konnte hier bewiesen werden. Mit Hilfe einer weiteren hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC-Phenyl) wurde das aktivierende Enzym noch weiter angereichert. Es wurde im Salzgradienten bei 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$ eluiert. Die Daten zur Anreicherung des aktivierenden Enzyms sind in Tab. 4-7 zusammengefaßt.

Tab. 4-7: Anreicherung des aktivierenden Enzyms aus *A. dehalogenans* gewachsen auf 3-Methoxyphenol. Es wurden 8 g Feuchtzellen eingesetzt. Vorgehensweise und Details siehe Material und Methoden 3.6.

	Gesamt- aktivität (nkat)	Ausbeute (%)	Spezifische Aktivität (nkat/mg)	Anreicherungs- faktor
Rohextrakt	55800	100	70	1
Q-Sepharose	18900	34	78	1,1
Phenyl Sepharose	1359	2,4	113	1,6
HIC-Phenyl	583	1	201	2,9

Die aktivierende Komponente konnte bis zu einer Aktivität von 201 nkat/mg Protein angereichert werden. Die Ausbeute war jedoch ausgesprochen schlecht. Der Versuch, das Protein zur apparenten Homogenität zu reinigen, scheiterte bisher. Ein Problem bestand sicherlich in der sehr geringen

Konzentration des aktivierenden Enzyms. Ein weiteres Problem stellte der hohe Verlust während der bisher noch nicht optimierten Reinigungsprozedur dar.

MTI_{ver}-abhängige Aktivierung

Durch Zugabe von MTI_{ver}, Methylviologen und Titan(III)citrat konnte das Corrinoidprotein Cp_{ver} ebenfalls reaktiviert werden. Abb. 4-13, A zeigt die Absorptionsspektren von Cp_{ver} 45 Minuten nachdem die Reduktion durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen gereinigter MTI_{ver} (0, 3,5, 7, 14 µM) gestartet wurde. Deutlich erkennbar ist, daß Cp_{ver} nicht vollständig reduziert wurde. Außerdem hing die Menge des gebildeten Cob(I)alamin von der MTI_{ver}-Konzentration ab (Abb. 4-14, B). Ohne Zusatz von MTI_{ver} fand keine Reduktion statt. Mit steigender MTI_{ver}-Konzentration stieg auch die Menge an gebildetem Cob(I)alamin an. In Tab. 4-8 sind die Mengen an gebildetem Cob(I)alamin der jeweiligen MTI_{ver}-Konzentration gegenübergestellt. Daraus geht hervor, das Cob(I)alamin offenbar in annähernd stöchiometrischen Mengen zur MTI_{ver}-Konzentration gebildet wurde. Auch die Geschwindigkeit der Cob(I)alaminbildung, erkennbar an der Geschwindigkeit der Absorptionzunahme bei 390 nm, war offensichtlich von der MTI_{ver}-Konzentration abhängig (Abb. 4-13 B). Aus der Graphik (Abb. 4-13 B) geht zudem hervor, daß die Reduktion nach 30 Minuten abgeschlossen war.

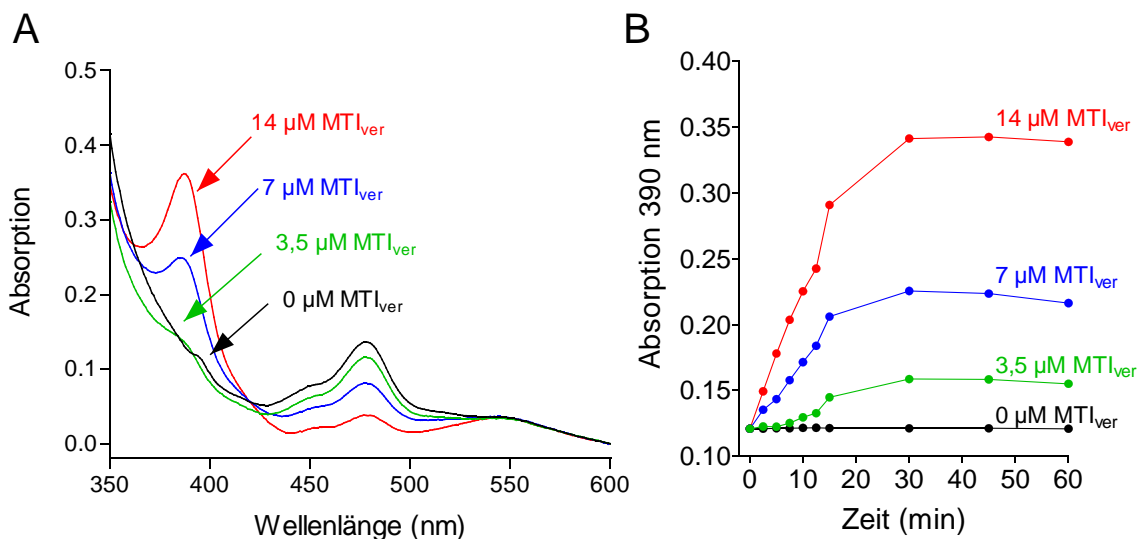


Abb. 4-13: MTI_{ver}-abhängige Reduktion von Cp_{ver}. A: Absorptionsspektren des Corrinoidproteins Cp_{ver} 45 Minuten nach Start der Reduktion mit den angegebenen MTI_{ver}-Konzentrationen. B: Kinetik der Zunahme der Absorption bei 390 nm während der Reduktion von Cp_{ver} mit den angegebenen MTI_{ver}-Konzentrationen. [Cp_{ver}]: 15 µM, [Titan(III)citrat]: 2 mM; Methylviologen: 0,4 µM; pH 7,5; Temperatur: 25°C.

Der Einfluß von Methylviologen auf die Cob(I)alaminbildung wurde getestet. Die MTI_{ver}-Konzentration wurde konstant gehalten (14 µM) und die Methylviologenkonzentration (0 - 3,8 µM) variiert (Abb. 4-14). Ohne Methylviologen konnte keine Reduktion von Cp_{ver} (15 µM) beobachtet werden. Bei Steigerung der Methylviologenkonzentration von 0,23 - 2,3 µM nahm auch die

Geschwindigkeit der Reduktion deutlich zu. Bei Konzentrationen oberhalb von 2,3 μM Methylviologen konnte jedoch keine weitere Steigerung der Reduktionsrate beobachtet werden.

Tab. 4-8: Stöchiometrie der Cp_{ver} -Reduktion in Abhängigkeit von der MTI_{ver} -Konzentration in Gegenwart von Methylviologen. Die Konzentration des gebildeten Cob(I)alamin wurde mit Hilfe der Absorptionsspektren berechnet ($\epsilon_{386\text{ nm}} = 28\text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). [Cp_{ver}]: 15 μM ; pH 7,5; Temperatur: 25°C. Die Daten stammen aus sechs unabhängigen Experimenten.

$[\text{Co}^{\text{I}}]$ (μM)	$[\text{MTI}_{\text{ver}}]$ (μM)	Methylviologen (μM)
2,2	3,5	0,4
6,0	7	0,4
10,7	14	0,4
2,6	2,9	2,3
8,0	6,5	2,3
10,0	11,5	2,3

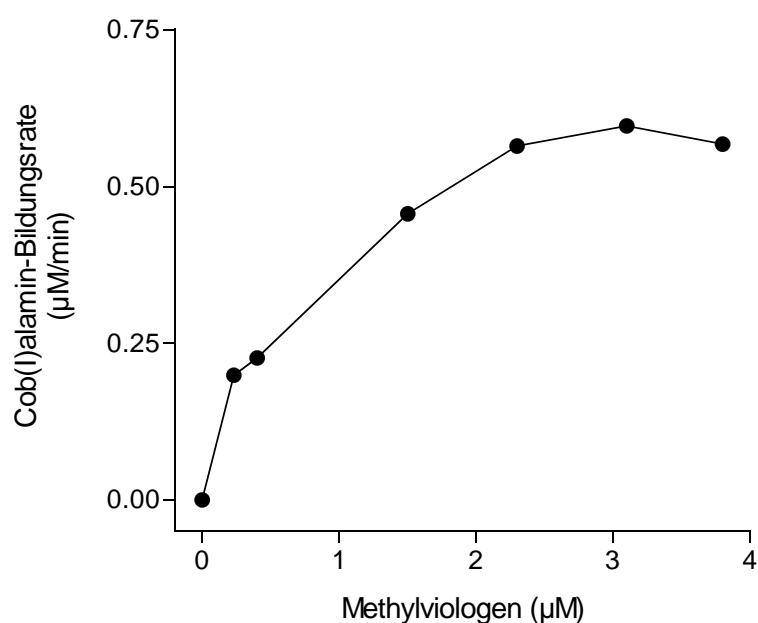


Abb. 4-14: Abhängigkeit der Rate der Cp_{ver} -Reduktion von der Methylviologenkonzentration. [Cp_{ver}]: 15 μM ; [MTI_{ver}]: 11,5 μM ; pH 7,5; Temperatur 25°C.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß zunächst MTI_{ver} durch Methylviologen reduziert wurde, welches daraufhin ein Elektron auf das Cp_{ver} -Molekül übertrug. Aus diesem Grund wurde getestet, ob durch Titan(III)citrat reduziertes Methylviologen unter Einfluß von MTI_{ver} tatsächlich oxidiert wird. Der Test wurde unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Methylviologen ($55 \mu M$) wurde zunächst mit Titan(III)citrat reduziert und die Oxidation durch Zugabe verschiedener Mengen MTI_{ver} gestartet. Die Oxidation des Methylviologen wurde photometrisch verfolgt. Die Konzentration des oxidierten Methylviologen wurde anhand des Extinktionskoeffizienten bei 578 nm berechnet. Die Oxidation eines Teils des Methylviologen durch eindringenden Luftsauerstoff war nicht zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde parallel zu jeder Probe gemessen, wieviel Methylviologen durch das Einspritzen desselben Volumens H_2O oxidiert wurde. Methylviologen wurde in Anwesenheit von MTI_{ver} oxidiert (Abb. 4-15). Abhängig von der zugegebenen Menge MTI_{ver} sank zwischen 20 und 30 Minuten die Geschwindigkeit der durch MTI_{ver} -abhängigen Oxidation ab und näherte sich der Geschwindigkeit der Oxidation in der jeweiligen Kontrolle an. Zur Berechnung des durch Zugabe von MTI_{ver} oxidierten Methylviologens wurde die Absorptionsdifferenz bei 578 nm nach 35 Minuten herangezogen. Die Konzentration des oxidierten Methylviologens in der Kontrolle wurde jeweils abgezogen. In Tab. 4-9 ist aufgeführt, wieviel Methylviologen unter Einfluß verschiedener Konzentrationen MTI_{ver} oxidiert wurde. Annähernd ein Mol Methylviologen wurde durch ein Mol MTI_{ver} oxidiert. Dies läßt darauf schließen, daß ein MTI_{ver} -Molekül ein Elektron aufnehmen konnte, wobei Methylviologen als künstlicher Elektronendonator diente.

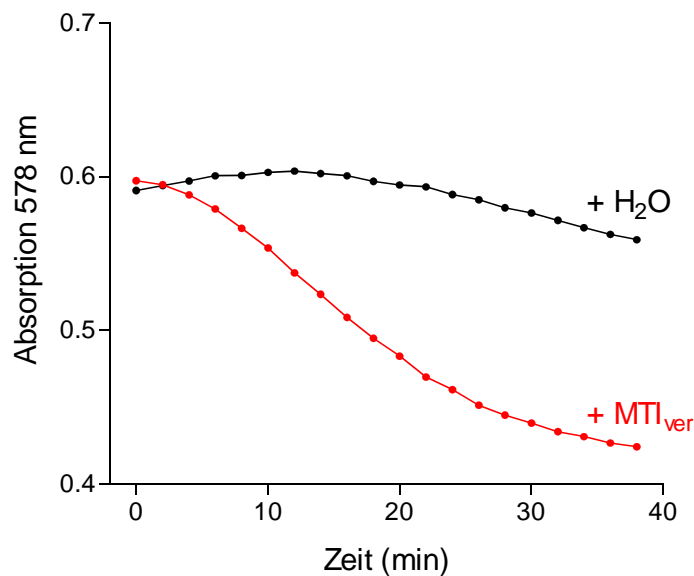


Abb. 4-15: Oxidation von Methylviologen in Abhängigkeit von MTI_{ver} (rote Linie). Der Test wurde unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Oxidation des Methylviologen wurde durch Zugabe von MTI_{ver} gestartet, in der Kontrolle (schwarze Linie) wurde anstelle von MTI_{ver} H_2O zugeben. [MTI_{ver}]: $12,2 \mu M$; [Methylviologen]: $55 \mu M$, pH 7,5, Temperatur $25^\circ C$.

Um sicher zu stellen, daß nicht jedes beliebige Protein einen ähnlichen Effekt bezüglich der Oxidation von Methylviologen erzeugen kann, wurde derselbe Test mit Rinderserumalbumin anstelle von MTI_{ver} durchgeführt. Die Kinetik der Methylviologen-Oxidation entsprach jedoch der, die in den Kontrollen mit H₂O gemessen wurde. Außerdem wurde getestet, ob MTI_{ver} möglicherweise über Hydrogenase- oder Formiatdehydrogenaseaktivität verfügte (Daten nicht gezeigt). Dies war nicht der Fall.

Tab. 4-9: Stöchiometrie der Methylviologen-Oxidation zur eingesetzten MTI_{ver}-Konzentration. Zur Berechnung der Menge des oxidierten Methylviologens wurde die Absorptionsdifferenz nach 35 Minuten herangezogen ($\epsilon_{578 \text{ nm}} = 9,78 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). [Methylviologen]: 55 μM , pH 7,5, Temperatur 25°C.

[MTI _{ver}] (μM)	[oxidiertes Methylviologen] (μM)
1,4	1,1
2,7	2,2
12,2	13,6

4.5 Genorganisation der O-Demethylasen

Von den gereinigten Proteinen der Vanillat-O-Demethylase wurden bisher zwei Gene kloniert und sequenziert: das des Corrinoidproteins Cp_{van} , welches als $odmA_{van}$ bezeichnet und bereits aktiv exprimiert wurde (Kaufmann et al. 1998b) und das der Methyltransferase I mit der Bezeichnung $odmB_{van}$ (Röser 2002). Außerdem ist bekannt, daß sich das Gen für die Methyltransferase I direkt im Anschluß stromabwärts vom Gen des Corrinoidproteins befindet. Aufgrund der Tatsache, daß sich dazwischen keine regulatorischen Elemente wie ein Terminator oder Promotor befinden, wird davon ausgegangen, daß die beiden Gene cotranskribiert werden. In dieser Arbeit wurde versucht, die Gene der Bestandteile der Veratrol-O-Demethylase zu identifizieren. Die Ergebnisse sollten weiteren Aufschluß über die genetische Organisation der O-Demethylasen geben.

Im folgenden werden die Gene der Corrinoidproteine der O-Demethylasen mit $odmA$ bezeichnet, die Gene für die Methyltransferasen I mit $odmB$ und die Gene für die mutmaßlichen Methyltransferasen II mit $odmD$.

Amplifizierung und Analyse des Gens für das Corrinoidprotein Cp_{ver} ($odmA_{ver}$)

Aus den N-terminalen Aminosäuresequenzen des Corrinoidproteins Cp_{ver} und der Methyltransferase I MTI_{ver} der Veratrol-O-Demethylase wurden degenerierte Primer abgeleitet, mit denen ein 750 bp langes DNA-Fragment mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wurde. Auf dem PCR-Produkt befand sich ein offener Leserahmen (ORF), der für ein Protein mit 208 Aminosäuren codierte (Anhang 1). Diesem mit $odmA_{ver}$ bezeichneten Leserahmen folgte eine mögliche Ribosomenbindungsstelle und der Beginn eines weiteren ORFs (54 Nukleotide/18 Aminosäuren). Die Sequenz stimmte mit dem Aminoterminus von MTI_{ver} überein. Das zeigte, daß die Gene des Corrinoidproteins und der Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase auf dem Genom benachbart liegen und vermutlich Teil eines Operons sind. Wie bereits beschrieben, trifft dies auch auf die Gene des Corrinoidproteins und der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase zu.

Das Corrinoidprotein Cp_{ver} ist zum Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase (Cp_{van}) zu 78%/86% identisch bzw. ähnlich. Es wies wie Cp_{van} das B_{12} -Bindemotiv DxHxxG-41-SxL-(21-22)-GG auf, welches bekannt ist aus B_{12} -abhängigen Methyltransferasen wie z.B. die Methionin-Synthase oder Methanol-CoM-Methyltransferase oder Coenzym B_{12} -abhängigen Mutasen wie der Glutamat-Mutase oder der Methylmalonyl-CoA-Mutase (Marsh & Holloway 1992, Tollinger et al. 1998). Die Strukturaufklärung der Cobalamin-bindenden Region der Methionin-Synthase aus *E. coli* (Drennan et al. 1994) und der Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii* (Mancia et al. 1996) zeigten, daß die Aminosäurereste der Konsensussequenz an der Bindung des Corrinoid-Cofaktors beteiligt sind. Ein Histidinrest des Proteins ersetzt dabei den unteren axialen Liganden, die

Dimethylbenzimidazol-Base. Das Dimethylbenzimidazol befindet sich in einer glycinreichen Bindungstasche des Proteins.

Die aminoternale Sequenz von Cp_{van} weist ein als „P-Loop“ bezeichnetes ATP/GTP-Bindemotiv auf (AKVEAGKS, Hodgman 1988). Auch in Cp_{ver} findet sich diese Sequenz teilweise wieder, jedoch unterscheiden sich die ersten beiden Aminosäuren (QLVEAGKS). Diese Konsensussequenz ist normalerweise an der Bindung einer Phosphatgruppe beteiligt. Dieser P-Loop ist auch in anderen B₁₂-haltigen Enzymen zu finden, z. B. in dem Corrinoid-Fe/S-Protein aus *C. thermoaceticum*. Vermutlich ist das Sequenzmotiv an der Cofaktorbindung beteiligt, denn Dimethylbenzimidazol ist über Ribose-3-phosphat mit dem Corrinring verbunden. Diese Struktur ist ähnlich zu ATP.

Der Sequenzvergleich von Cp_{ver} mit weiteren bekannten Proteinen (BLAST; Altschul et al. 1997) ergab unter anderem Ähnlichkeit (63 - 64 %) zu mehreren Corrinoidproteinen aus *Methanosarcina acetivorans* (Galagan et al. 2002), zu einem Corrinoid-Methyltransferase-Protein aus *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al. 2000) und zu dem Dimethylamin-Corrinoidprotein Mtbc aus *Methanosarcina barkeri* (Ferguson et al. 2000). Alle diese Proteine weisen das bereits genannte B₁₂-Bindemotiv auf. Die Homologie zu Cp_{ver} betraf immer den Bereich des beschriebenen B₁₂-Bindemotivs

Amplifizierung und Analyse des Gens für die Methyltransferase MTI_{ver} (*odmB_{ver}*)

Aus der Sequenz von *odmA_{ver}* wurden zwei spezifische Primer (Cp_{ver}1-for, Cp_{ver}2-for) für das Corrinoidprotein Cp_{ver} abgeleitet. Mittels Genome walking konnte ein Fragment von ca. 2000 bp amplifiziert werden (Abb. 4-16). Im ersten PCR-Experiment wurden die Primer Cp_{ver}1-for und Ap1 kombiniert (siehe Material und Methoden 3.7). Als Template-DNA dienten die Fragmente der mit dem Restriktionsenzym *Stu*I erzeugten DNA-Bibliothek, an Adapter-Oligonukleotide ligiert worden waren. Es entstand ein PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 2020 bp. Dieses PCR-Fragment wurde in der zweiten PCR als Template eingesetzt. Es wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 2000 bp amplifiziert. Auf dem Fragment befand sich ein vollständiger ORF (*odmB_{ver}*) mit einer Länge von 966 bp. Die aminoternale Sequenz stimmte mit dem N-Terminus von MTI_{ver} überein. In 5'-Richtung vor *odmB_{ver}* konnte eindeutig die Sequenz von *odmA_{ver}* identifiziert werden. Es wurden hier 492 Nukleotide der Sequenz von *odmA_{ver}* ermittelt, die Übereinstimmung zu der bereits ermittelten Sequenz betrug 100%. Vor dem ATG-Start-Codon des ORF *odmB_{ver}* wurde im Abstand von fünf Nukleotiden eine mögliche Ribosomenbindestelle lokalisiert. Zwischen den ORFs *odmA_{ver}* und *odmB_{ver}* konnten keine Promotorregionen oder eine Haarnadelstruktur mit thyminreicher Sequenz als Terminationsstelle identifiziert werden. Das läßt die Vermutung zu, daß die beiden Gene gemeinsam transkribiert werden.

In einem Abstand von 378 bp zu *odmB_{ver}* befand sich in 3'-Richtung der Anfang eines weiteren ORF (*ctax*). Von *ctax* wurden 463 bp sequenziert. Vor *ctax* befand sich eine mögliche Ribosomenbindungsstelle, außerdem konnten zwischen *ctax* und *odmB_{ver}* mehrere Palindromsequenzen

identifiziert werden, die eine Haarnadelschleife und damit einen Terminator bilden könnten (Anhang 1). Die Sequenz von *ctax* wies die höchste Ähnlichkeit zu einem „methyl-accepting chemotaxis protein“ aus *Clostridium acetobutylicum* (Nölling et al. 2001) auf.

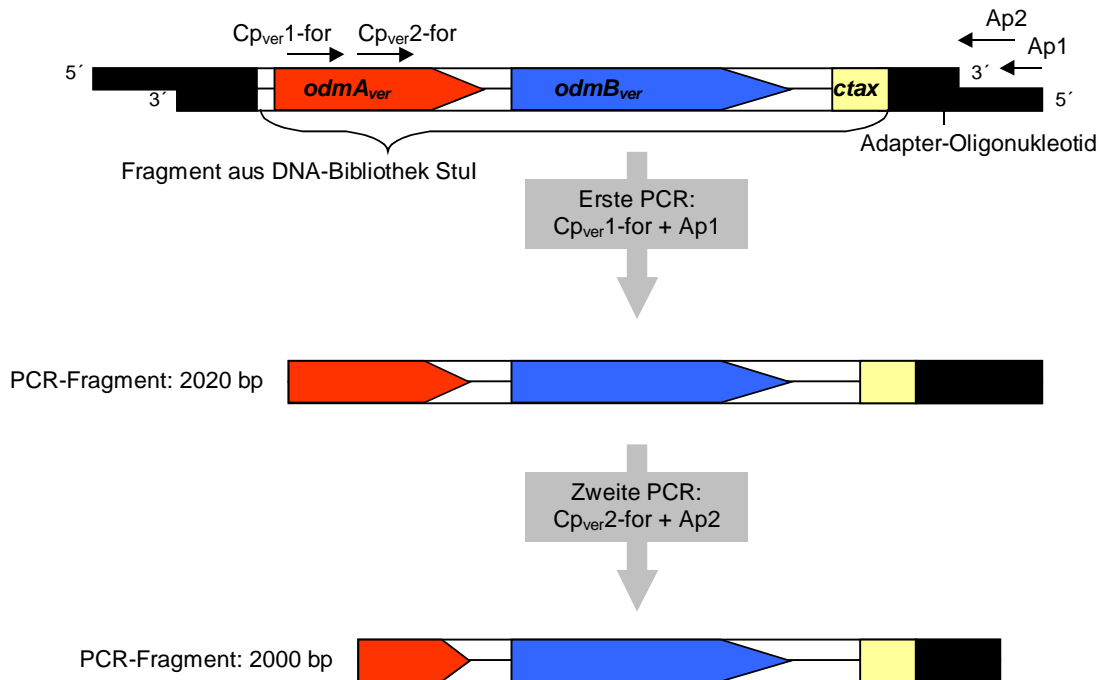


Abb. 4-16: Amplifizierung eines DNA-Fragmentes mit den ORFs *odmB_{ver}* und *ctax* mittels Genome walking. Die Vorgehensweise und Details sind aus Material und Methoden 3.7 zu entnehmen. *odmA_{ver}*: ORF codierend für das Corrinoidprotein *Cp_{ver}*; *Cp_{ver}1-for/Cp_{ver}2-for*: *odmA_{ver}*-spezifische Primer; *Ap1*, *Ap2*: Adapter-Oligonukleotid-spezifische Primer. (Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu).

Die Nukleotidsequenz des Gens der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase (*odmB_{van}*) wurde ebenfalls amplifiziert und sequenziert (Röser 2002). Die Methyltransferasen der Veratrol- und der Vanillat-O-Demethylase *MTI_{ver}* und *MTI_{van}* waren nur 27%/46% identisch bzw. ähnlich. Der Datenbankvergleich (BLAST, Altschul et al. 1997) ergab für die Methyltransferase *MTI_{ver}* signifikante Ähnlichkeit (46%/47%) zu verschiedenen Methyltransferasen, darunter zu einer mutmaßlichen Methylthiol:Coenzym M Methyltransferase *CmuC* aus *Methylobacterium chloromethanicum* (Vanelli et al. 1999) und einer Methyltransferase *MtsA* von *Methanosarcina barkeri* (Paul et al. 1996, Tallant et al. 2001). *CmuC* wurde in einem Gencluster gefunden, dessen Produkte essentiell sind für die Fähigkeit auf Methylchlorid zu wachsen. Die Funktion von *CmuC* konnte bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch weist die Nukleotidsequenz Ähnlichkeiten zu einem charakterisierten Protein dieses Genclusters auf, das eine zur Methyltransferase I der O-Demethylasen analoge Reaktion katalysiert. *MtsA* bildet eine Untereinheit eines Methylthiol:Coenzym M Methyltransferase-Komplexes. Bei der Methanogenese aus Dimethylsulfid wird intermediär Methyl-Coenzym M gebildet. *MtsA* katalysiert sowohl die Demethylierung von Dimethylsulfid als auch die Methylierung von Coenzym M. *MtsA* ist ein Homodimer. Pro Mol Homodimer ist ein Mol Zink gebunden. Als Zinkbindestelle wurde die Sequenz

LHICG postuliert (Matthews & Goulding 1997, Paul & Krzycki 1996, LeClerc & Grahame 1996). Die konservierte Sequenz HxC findet sich in verschiedenen Methyltransferasen und auch in der Cobalamin-unabhängigen Methionin Synthase MetE aus *E. coli* (Tab. 4-10). Durch Mutationsexperimente konnten diese Aminosäuren als Zink-Liganden in MetE identifiziert werden (Zhou et al. 1999).

Die Metallanalyse der Methyltransferase MTI_{ver} ergab einen Metallgehalt von 1 Mol Zink pro Mol MTI_{ver} (siehe Kapitel 4.1, Tab. 4-3). Auch hier ist die konservierte Aminosäuresequenz HxC zu finden. Eine solche konservierte Sequenz ist jedoch in der Methyltransferase MTI_{van} nicht zu finden. Eine Metallanalyse des Proteins MTI_{van} wurde bisher nicht vorgenommen. Aus Tab. 4-10 sind der Zinkgehalt und die hypothetischen Aminosäuresequenzen der Zinkbindestellen zu entnehmen. Bei den Enzymen MtsA und MetE wurde ebenfalls ein Metallgehalt von 1 Mol Zink pro Mol Enzym festgestellt.

Tab. 4-10: Mutmaßliche Zinkbindestelle verschiedener Methyltransferasen. Die möglichen Zink-Liganden sind fettgedruckt. Bei MTI_{ver}, MtsA und MetE wurde ein Metallgehalt von 1 Mol Zink pro Mol Enzym bestimmt, bei MTI_{van} und CmuC wurde keine Metallanalyse vorgenommen.

Organismus	Protein	Aminosäuresequenz	Literatur
<i>A. dehalogenans</i>	MTI _{ver}	202 GVIFSQ HT CGKCEEI	Diese Arbeit
<i>A. dehalogenans</i>	MTI _{van}	210 VELIIH H SDSYAANL	Röser 2002
<i>M. chloromethanicum</i>	CmuC	244 SADILF H SCGAALPI	Vanelli et al. 1999
<i>M. barkeri</i>	MtsA	230 SCPLIL H ICGDTSKL	Zhou et al. 1999
<i>E. coli</i>	MetE	635 DTQIHT H MCYCEFND	Zhou et al. 1999

Amplifizierung und Analyse der Gene der hypothetischen Methyltransferasen II (*odmD_{ver}*, *odmD_{van}* und *odmD_x*)

odmA_{ver} wies eine Identität von 89 % zu einem ORF *copB* aus *Acetobacterium woodii* auf, welcher für ein mutmaßliches Corrinoidbindeprotein (CopB) codiert. In 5'-Richtung vor *copB* ist die Sequenz über einer Länge von 777 bp bekannt und enthält einen Teil eines ORF, der mit *mttb* bezeichnet wurde (persönliche Mitteilung V. Müller, Ellinger 1999). Aufgrund der hohen Homologie von *odmA_{ver}* zu *copB* wurde vermutet, daß die Sequenz stromaufwärts vor *odmA_{ver}* zu *mttb* sehr ähnlich sein könnte. Die Sequenz von *mttb* wies mehrere Konsensussequenzen auf, die z. B. auch in dem Protein MethH aus *E. coli* (Banerjee et al. 1989) vorhanden waren. Aus diesen Bereichen wurden drei verschiedene Primer abgeleitet (Mttb-1-for, Mttb-2-for, Mttb-3-for, Abb. 4-17). Ein PCR-Experiment wurde durchgeführt, wobei diese Primer mit dem *odmA_{ver}* spezifischen Primer Cp_{ver}1-rev kombiniert wurden (Abb. 4-17). In diesen PCR-Experiment entstanden spezifische PCR-Produkte von 780 bp, 600 pb und 500 pb. Die Länge der Fragmente entsprach den Berechnungen, die aufgrund der Vermutung gemacht wurden, daß die Sequenz stromaufwärts vor *odmA_{ver}* große Homologie zu *mttb* aufweist. Das PCR-Produkt, welches aus der Kombination der Primer Mttb-1-for mit Cp_{ver}1-rev entstand, wurde unabhängig von zwei Seiten sequenziert. Die Nukleotidsequenz enthält einen Teil eines ORF, der zu *mttb* zu 89 % homolog ist und mit *odmD_{ver}* bezeichnet wird.

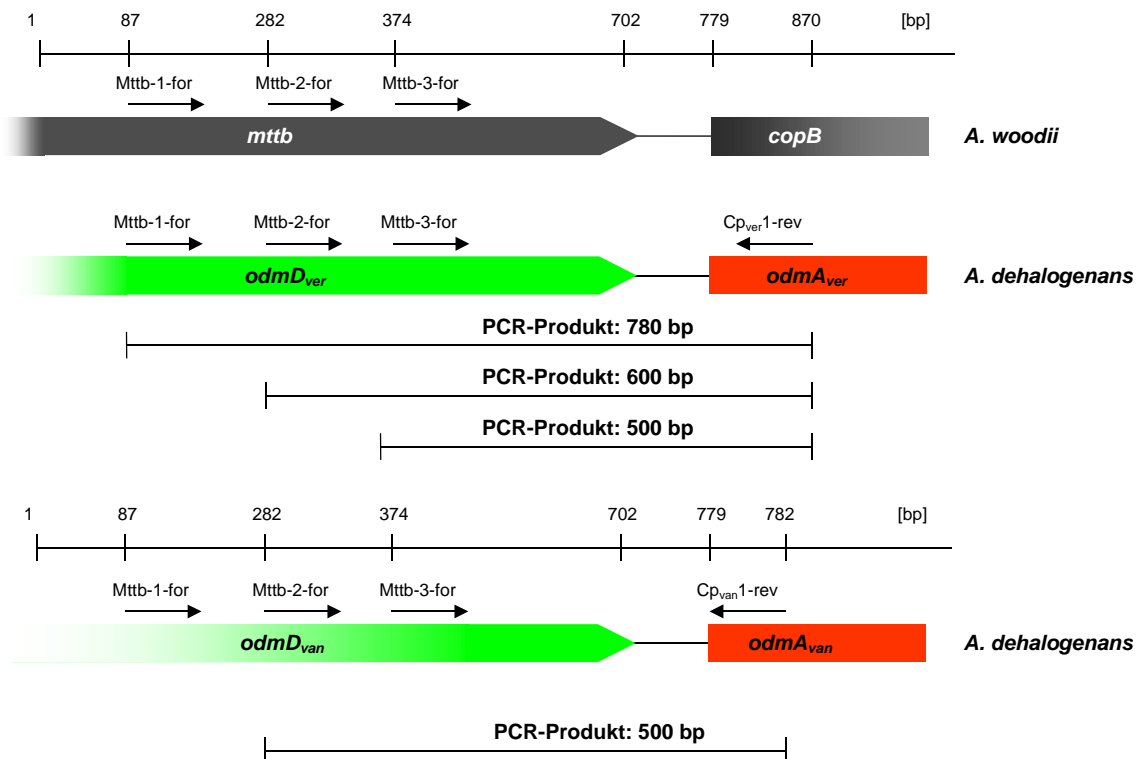


Abb. 4-17: Amplifizierung der Gene *odmD_{ver}* und *odmD_{van}*, die für die mutmaßliche Methyltransferasen II der Veratrol- bzw. Vanillat-O-Demethylasen codieren. *odmA_{ver/van}*: für die Corrinoidprotein Cp_{ver/van} codierende Gene, *mttb*: Gen einer mutmaßlichen Methyltransferase aus *A. woodii*, *copB*: Gen eines hypothetischen Corrinoidbindeproteins aus *A. woodii*.

Um festzustellen, ob stromaufwärts vor dem Gen des Corrinoidproteins der Vanillat-O-Demethylase *odmA_{van}* ebenfalls eine mutmaßliche Methyltransferase II codiert ist, wurde der *odmA_{van}* spezifische Primer Cp_{van}1-rev mit den *mttB*-spezifischen Primern kombiniert (Abb. 4-17). Mit den Primern Mttb-1-for und Mttb-3-for wurden bei diesem Experiment mehrere Fragmente unterschiedlicher Größe erzeugt, spezifische PCR-Produkte mit erwarteter Größe konnten nicht identifiziert werden. Die Kombination der Primer Mttb-2-for mit Cp_{van}1-rev ergab ein spezifisches PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 500 bp. Darauf befand sich ein Teil eines ORF der mit *odmD_{van}* bezeichnet wurde. Die Nukleotidsequenz wies zu dem bekannten Teil von *odmD_{ver}* eine Homologie von 76 % auf. Auf dem Fragment war auch der N-Terminus eines Corrinoidproteins zu finden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um das Gen *odmA_{van}* für das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase Cp_{van}. Die Aminosäuresequenz, die hier aus der Nukleotidsequenz abgeleitet wurde, weist im Vergleich zur Aminosäuresequenz, die durch automatisierten Edmann-Abbau bestimmt wurde, Unterschiede in zwei Aminosäuren auf (Anhang 2). Möglich ist, daß dies auf einen systematischen Fehler bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzierung zurückzuführen ist. Es ist bekannt, daß z. B. Glycin-haltige Puffer, die bei der Vorbereitung der Probe für die Sequenzierung verwendet werden, die Auswertung stören können. Daher kann nicht mit letzter Sicherheit behauptet werden, daß es sich tatsächlich um das Gen für die mutmaßliche Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase handelt, obwohl dies sehr wahrscheinlich der Fall ist. Offensichtlich existieren in *A. dehalogenans* mehrere zueinander sehr ähnliche Gencluster.

Mit den aufgeführten Experimenten wurden bisher nur Teile der einander sehr ähnlichen Gene, die mit *odmD_{ver/van}* bezeichnet wurden, sequenziert. Mittels Genome walking gelang es, ein weiteres DNA-Fragment stromaufwärts vor der bisher bekannten Sequenz von *odmD_{ver}* zu amplifizieren (Abb. 4-18). Mit der DNA-Bibliothek, erzeugt mit dem Restriktionsenzym DvaI, als DNA-Template und dem *odmD_{ver}*-spezifischen Primer Mttb-3-rev in Kombination mit Primer Ap1 (siehe Material und Methoden 3.7) wurde ein PCR-Fragment mit der Größe von 780 bp erzeugt (Abb. 4-18). Dieses Fragment wurde in der zweiten PCR als Template eingesetzt, wobei der *odmD_{ver}*-spezifische Primer MTII_{ver}-rev mit Ap2 kombiniert wurde. Dabei entstand ein PCR-Fragment von 600 bp. Die Größendifferenz zwischen den Fragmenten aus den beiden PCR-Experimenten entsprach der Entfernung der beiden verwendeten Primer auf dem bisher bekannten Teil des ORF *odmD_{ver}*. Die Nukleotidsequenz des 3'-Ende dieses Fragmentes stimmte mit dem 5'-Ende des bisher bekannten Teils des Leserahmens *odmD_{ver}* überein; der überlappende Teil erstreckte sich über 70 bp. So konnte sichergestellt werden, daß das gewünschte DNA-Fragment amplifiziert und sequenziert worden war und es sich dabei um einen weiteren Teil von *odmD_{ver}* handelte. Die zusammengesetzte Sequenz von *odmD_{ver}* enthielt einen vollständigen ORF, der für insgesamt 345 Aminosäuren codiert. Jedoch wurde, beginnend mit der achtzigsten Aminosäure, ein Stück Aminosäuresequenz identifiziert, welches zu der N-terminalen Aminosäuresequenz der bereits charakterisierten Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase (MTII_{van}) zu 52 % homolog ist (Kaufmann et al. 1998a, Abb. 4-18). Dieser neu definierte ORF *odmD_{ver}* codiert 269 Aminosäuren. Vor dem Start-Codon ATG des Leserahmens konnte im Abstand von acht Basenpaaren eine mögliche Ribosomenbindungsstelle identifiziert werden. Basierend auf der Vermutung, daß die Methyltransferasen II der O-Demethylasen einander sehr ähnlich sind, lassen die

bisher ermittelten Daten die Vermutung zu, daß der Leserahmen *odmD_{ver}* eine Untereinheit einer induzierbaren Methyltransferase II der Veratrol-O-Demethylase codiert. Bei der Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase handelt es sich um ein Homodimer mit einer molaren Masse von 64 kDa (Kaufmann et al. 1998b).

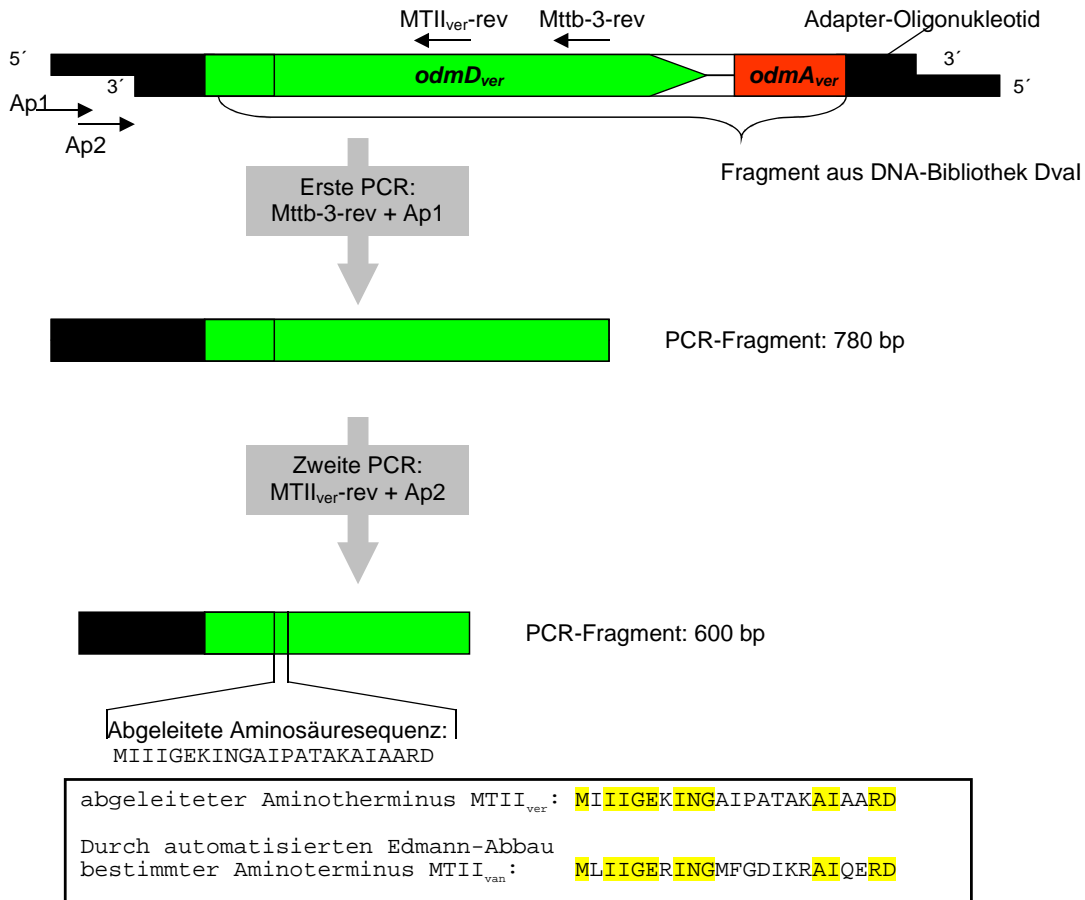


Abb. 4-18: Amplifizierung eines Fragmentes mit dem ORF *odmD_{ver}* mittels Genome walking. Die Vorgehensweise und Details sind aus Material und Methoden 3.7 zu entnehmen. Die N-terminale Aminosäuresequenz von MTII_{van} wurde durch automatisierten Edmann-Abbau bestimmt (Kaufmann et al. 1997B). Die Grün-Weiß-gepunktete Fläche stellt den sequenzierten Bereich stromaufwärts vor dem Gen *odmD_{ver}* dar. *odmA_{ver}*: für das Corrinoidprotein Cp_{ver} codierender ORF; Cp_{ver}1-for/Cp_{ver}2-for: *odmA_{ver}*-spezifische Primer; Ap1, Ap2: Adapter-Nukleotidspezifische Primer. (Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu).

Aus der aminoterminalen Sequenz der Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase (*OdmD*, Kaufmann et al. 1998a) konnte der degenerierte Primer MTII-for abgeleitet werden (siehe Material und Methoden 3.7). Dieser Primer wurde mit dem Primer Cp_{van}3-rev in einem weiteren PCR-Experiment kombiniert. Der Primer Cp_{van}3-rev wurde aus der Nukleotidsequenz des Corrinoidproteins Cp_{van} abgeleitet. Es wurde ein Fragment von 1350 bp amplifiziert. Der aminoterminalen Bereich war zu den bekannten Bereichen *odmD_{ver/van}* zu 74 % bzw. 76 % homolog (Abb. 4-19, Anhang 3). An diesen mit *odmD_x* bezeichneten ORF schloß sich eine Sequenz an, die eine mögliche Ribosomenbindestelle enthielt, darauf folgte der Beginn eines weiteten ORF (*odmA_x*), dessen Sequenz eindeutig für ein Corrinoidprotein, erkennbar an dem vorhandenen B₁₂-Bindemotiv, codierte. Die Sequenz war zu *odm_{van/ver}* zu 78 % homolog, jedoch nicht identisch (Abb. 4-19, Anhang 3). Mit dem Primer Cp_{van}3-rev

konnte offensichtlich noch ein weiteres, sehr ähnliches Corrinoidprotein amplifiziert werden. Wie bereits festgestellt wurde, existieren offensichtlich mehrere einander sehr ähnliche Gencluster in *A. dehalogenans*. Der Primer Cp_{van}3-rev wurde aus einem Bereich der Nukleotidsequenz von *odmD_{van}* abgeleitet, der nicht homolog zur Sequenz von *odmD_{ver}* war. So sollte ein Primer erzeugt werden, der nur spezifisch war für das Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase (Cp_{van}). Aus dem Versuch geht jedoch hervor, daß mindestens ein weiteres Corrinoidprotein existieren muß, das in diesem Bereich homolog ist zu Cp_{van}.

Der Datenbankvergleich mittels BLAST-Analyse (Altschul et al. 1997) ergab, daß *odmD_{ver}* eine signifikante Identität bzw. Ähnlichkeit von 28/46 % zu der Tetrahydrofolat/Corrinoid-FeS-Protein Methyltransferase MeTr (codiert durch *acsE*) aus *Morella thermoacetica* aufweist (Roberts et al. 1994). MeTr katalysiert den Transfer einer Methylgruppe von Methyltetrahydrofolat zu einem Cobalt Fe/S-Protein, dies ähnelt der Reaktion, die durch die Methyltransferase II der O-Demethylase katalysiert wird. Desweiteren wies die von *odmD_{ver}* bekannte Sequenz signifikante Ähnlichkeiten zu 5-Methyltetrahydrofolat-Homocysteine-Methyltransferasen und Methioninsyntasen aus Stämmen von *M. tuberculosis* und *M. leprae* auf. Außerdem waren die Aminosäurereste 8 – 143 des aus der Sequenz des von *odmD_{ver}* abgeleiteten Proteins zu 24%/43% identisch bzw. ähnlich zu den Aminosäureresten 452 – 598 der Methionin-Synthase (Meth) aus *E. coli*. Meth wurde als Protein beschrieben, welches über Bindedomänen für Homocystein, Cobalamin, Adenosylmethionin und Methyltetrahydrofolat verfügt (Goulding et al. 1997). Die Methyltetrahydrofolat-Bindedomäne wurde innerhalb der Aminosäurereste 354 – 649 lokalisiert, indem Versuche mit künstlich verkürzter Meth durchgeführt wurden. Dies umfaßt den Bereich, zu dem die hypothetische Methyltransferase II der Veratrol-O-Demethylase Homologien aufwies.

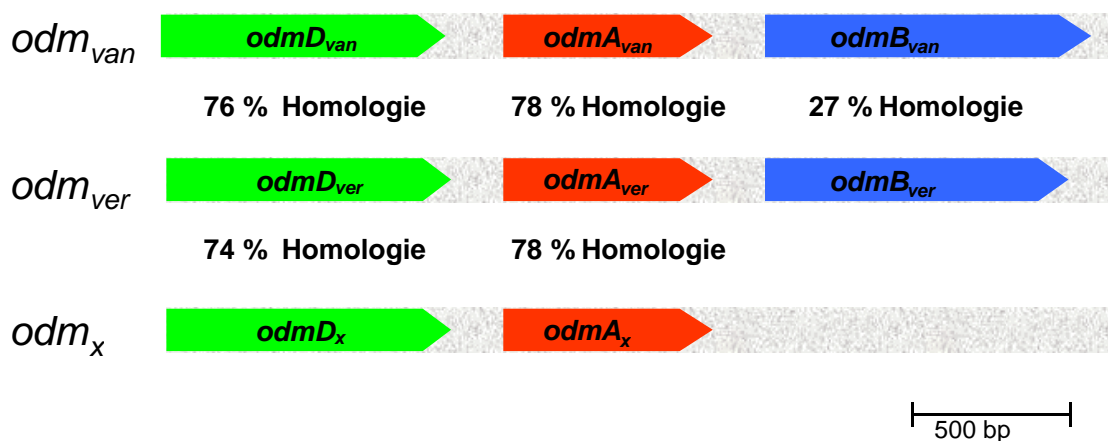


Abb. 4-19: Organisation der Gene der O-Demethylase-Komponenten in Genclustern. Die schraffierten Bereiche symbolisieren die bisher nicht sequenzierten Teile der Gencluster. *odm_{van/ver}*: Gene der Vanillat-/Veratrol-O-Demethylase; *odm_x*: Gene einer bisher nicht charakterisierten O-Demethylase; *odmD*: Gene die für eine mutmaßlichen Methyltransferase II codieren; *odmA*: Corrinoidprotein-codierende Gene; *odmB*: Methyltransferase I codierende Gene.

Mit den aufgeführten PCR-Experimenten konnten Teile der Gencluster, die für die Vanillat-, die Veratrol- und vermutlich eine bisher nicht näher charakterisierte O-Demethylase codieren, identifiziert werden. Die ORFs für die Methyltransferasen I und II sowie das Corrinoidprotein sind immer in der gleichen Weise angeordnet. Aus den gewonnenen Daten geht hervor, daß die Corrinoidproteine und die Methyltransferasen II der verschiedenen bekannten O-Demethylasen einander sehr ähnlich sind (74-82 % Homologie). Dies gilt nicht für die Methyltransferasen I, die nur zu 27 % identisch und zu 46 % ähnlich sind (Abb. 4-19). Außerdem liefern die gewonnenen Daten einen weiteren Hinweis darauf, daß außer der Vanillat- und der Veratrol-O-Demethylase noch mindestens eine weitere O-Demethylase in *A. dehalogenans* vorhanden ist. Die Gene der beiden Methyltransferasen und des Corrinoidproteins der verschiedenen O-Demethylasen sind in einem Operon organisiert, wobei die Termination der Transkription vermutlich nach dem Gen *odmB* erfolgt. Am 5'-Ende des bisher bekannten Teils des Genclusters, codierend für die Komponenten der Veratrol-O-Demethylase, konnten jedoch kein Promotor oder andere regulatorische Elemente gefunden werden. So kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, wie dieses Operon reguliert wird und ob noch weitere Gene diesem Operon angehören. Möglich wäre ein Gen für das aktivierende Enzym. Ein Gen für ein solches Protein ist in *A. dehalogenans* bisher nicht identifiziert worden. Da es jedoch essentiell für die O-Demethylase-Aktivität ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es ebenfalls diesem mutmaßlichen Operon angehört.

5 DISKUSSION

Acetobacterium dehalogenans ist in der Lage, ein breites Spektrum von Phenylmethylethern zu verwerten. Offensichtlich benötigt das Bakterium dazu jedoch auch verschiedene O-Demethylasen, um möglichst effektiv das „Nahrungsangebot“ nutzen zu können. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß mindestens zwei O-Demethylasen in *A. dehalogenans* induzierbar sind. Möglicherweise existieren sogar noch weitere O-Demethylasen in diesem Bakterium. Diese Schlußfolgerung stammt aus dem Befund, daß 3,4-Dimethoxybenzoat von der gereinigten Methyltransferase MTI_{ver} zu Vanillat abgebaut wurde. Während des Wachstums von *A. dehalogenans* auf 3,4-Dimethoxybenzoat wurde jedoch Isovanillat als erstes Demethylierungsprodukt nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf die Induktion einer O-Demethylase in 3,4-Dimethoxybenzoat-gewachsenen Zellen hin, welche bezüglich der Position der Methoxygruppe am aromatischen Ring eine andere Spezifität aufweist. Andere Organismen weisen ebenso das Phänomen auf, verschiedene, einander jedoch ähnliche Enzyme für die Verwertung einer bestimmten Substratgruppe zu verwenden. Gut dokumentiert ist dies am Beispiel von *Methanosarcina barkeri*. Dieser methanogene Organismus kann unter anderem Mono-, Di- und Trimethylamin verwerten und verfügt zu diesem Zweck über verschiedene Enzymsysteme. Beteiligt sind auch hier immer zwei Methyltransferasen und ein Corrinoïd, das in diesem Falle an die Methyltransferase gebunden ist (Ferguson et al. 2000). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Methyltransferasen und Corrinoïdproteine der O-Demethylase Homologien zu Methyltransferasen und Corrinoïdproteinen von Archaeen speziell *M. barkeri* aufweisen. Unter dem Gesichtspunkt, daß es Beweise für den lateralen Gentransfer zwischen Archaea und Bakteria gibt, belegt durch die Sequenzierung des Genoms von *Thermotoga maritima* (Nelson et al. 1999), ist dies jedoch nicht außergewöhnlich.

Bei dem Bakterium *Holophaga foetida* konnte ebenfalls gezeigt werden, daß es über zwei O-Demethylasen verfügt, die unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. Das Orthosystem demethylierte nur Phenylmethylether, bei denen sich am aromatischen Ring Hydroxy- und Methoxygruppe in Orthostellung zueinander befanden. Das Metasystem hingegen war in der Lage, Phenylmethylether zu demethoxylieren, bei denen sich die Substituenten in Meta-Stellung zueinander befinden (Kreft & Schink 1997). Aus *A. dehalogenans* wurde eine O-Demethylase gereinigt, die eine hohe Spezifität für Vanillat besaß und aus diesem Grund als Vanillat-O-Demethylase bezeichnet wurde (Kaufmann et al. 1997). Charakteristisch für die Vanillat-O-Demethylase war ihre Fähigkeit nur Phenylmethylether umsetzen zu können, die eine Hydroxygruppe in Orthoposition zu Methoxygruppe besitzen, sie kann deshalb auch als Orthosystem bezeichnet werden. Durch das Wachstum der Bakterien auf 3-Methoxyphenol wurde jedoch mindestens eine weitere O-Demethylase induziert, erkennbar am veränderten Substratspektrum der Rohextrakte und an den veränderten Proteinmustern im 2D-Gel (Engelmann 1998). Ein Corrinoïdprotein und eine Methyltransferase I dieser induzierbaren O-Demethylase wurden gereinigt und ein aktivierendes Enzym angereichert. Dieses induzierbare

Enzymsystem wurde als Veratrol-O-Demethylase bezeichnet aufgrund der Tatsache, daß dieser Phenylmethylether im Test mit den höchsten Raten umgesetzt wurde. Warum das eigentliche Wachstumssubstrat 3-Methoxyphenol im Test viel schlechter verwertet wurde, konnte bisher nicht geklärt werden.

Die Methyltransferase MTI_{ver} katalysierte die Demethylierung von Phenylmethylethern mit den Corrinoidproteinen Cp_{van} , Cp_{ver} und $Cp1$. Dies deutet darauf hin, daß MTI_{ver} keine große Spezifität hinsichtlich des Corrinoidproteins als Substrat aufweist. Das Substrat Vanillat wurde von MTI_{ver} nicht umgesetzt, unabhängig davon, ob Cp_{ver} oder Cp_{van} als Methylgruppenakzeptor eingesetzt wurde. Dagegen waren z. B. die Phenylmethylether Veratrol und 3-Methoxyphenol, die von MTI_{ver} umgesetzt wurden, keine Substrate der Vanillat-O-Demethylase. Die Methyltransferase I vermittelte in diesen Fällen die Substratspezifität. Daß das Corrinoidprotein dennoch einen Einfluß auf die Substratspezifität haben kann, zeigte sich daran, daß 2-Methoxyphenol von MTI_{ver} nur dann demethyliert werden konnte, wenn Cp_{van} der Methylgruppenakzeptor war. Welche strukturellen Voraussetzungen der Phenylmethylether jedoch erfüllen muß, um von den Bestandteilen der Veratrol-O-Demethylase MTI_{ver} und Cp_{ver} umgesetzt zu werden, ist bisher nicht geklärt worden. Ein eindeutiges Muster wie z. B. bei der Vanillat-O-Demethylase, die nur Phenylmethylether mit einer Methoxygruppe in Orthoposition zur Hydroxygruppe demethyliert, wurde nicht gefunden.

Aufgrund des Substratspektrums, der molekularen Masse und dem Proteinmuster des 2D-Gels konnte geschlossen werden, daß es sich bei MTI_{ver} um eine induzierbare Methyltransferase I handelt, die sich klar von der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase unterscheidet. Das Corrinoidprotein der Veratrol-O-Demethylase ist ebenfalls deutlich unterschiedlich zum Corrinoidprotein der Vanillat-O-Demethylase. Nicht nur die N-terminalen Aminosäuresequenzen unterscheiden sich, sondern auch das Elutionsverhalten von Cp_{van} und Cp_{ver} während der Reinigung. Außerdem waren die Redoxpotentiale beim Übergang von Cob(II)- zu Cob(I)alamin unterschiedlich. Auch hier zeigte sich anhand des 2D-Gels die Induzierbarkeit dieses Proteins. Dafür, daß es sich bei dem Corrinoidprotein Cp_{ver} tatsächlich um den „physiologischen“ Methylgruppenüberträger der Veratrol-O-Demethylase handelt, sprechen die folgenden Befunde: 1. Cp_{ver} wurde gemeinsam mit MTI_{ver} durch Wachstum des Bakteriums auf 3-Methoxyphenol induziert; 2. die Gene für MTI_{ver} und Cp_{ver} sind in einem Gencluster organisiert, welches vermutlich, zusammen mit mindestens einem weiteren offenen Leserahmen, ein Operon bildet.

Mehrere Gencluster wurden in *A. dehalogenans* gefunden, die ORFs enthalten, welche für die O-Demethylase-Komponenten Corrinoidprotein (*odmA*), Methyltransferase I (*odmB*) und Methyltransferase II (*odmD*) codieren. Vollständig wurden die genannten Gene nur bei den Enzymen bzw. Proteinen der Veratrol-O-Demethylase sequenziert. Teilweise liegen die vergleichbaren Daten zu den Genen der Vanillat-O-Demethylase vor und zusätzlich die Sequenz eines Genclusters, das große Ähnlichkeit zu den Genen der beiden genannten O-Demethylasen aufweist. Von den genannten Genen wurde eine aktive heterologe Expression bisher nur mit dem Gen des Corrinoidproteins der Vanillat-O-Demethylase (Kaufmann et al. 1998b) und dem der Methyltransferase I der Vanillat-O-

Demethylase (D. Röser, persönliche Mitteilung) durchgeführt. Jedoch stimmen die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Methyltransferase MTI_{ver} und des Corrinoideproteins Cp_{ver} mit den aus der jeweiligen Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen überein. Außerdem ist die Ähnlichkeit von $odmA_{ver}$ mit dem bereits aktiv exprimierten Gen $odmA_{van}$ groß. Dafür, daß es sich bei $odmD_{ver}$ tatsächlich um das Gen einer Methyltransferase II handelt, spricht zum einen die Ähnlichkeit der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten N-terminalen Aminosäuresequenz mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase, die durch automatisierten Edmann-Abbau bestimmten worden war (Kaufmann et al. 1998a). Ein weiterer Beleg für diese Vermutung ist die signifikante Ähnlichkeit zu Methyltransferasen, die eine analoge Reaktion katalysieren, wie z. B. zu der Tetrahydrofolat/Corrinoide-FeS-Protein Methyltransferase MeTr aus *Morella thermoacetica* (Roberts et al. 1994). Auch die Tatsache, daß in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von $odmD_{ver}$ homologe Bereiche zur Methyltetrahydrofolat-Bindedomäne der Methioninsynthase MetH aus *E. coli* vorhanden sind (Goulding et al. 1997), spricht für diese Interpretation.

Interessant ist, daß alle drei Gencluster in derselben Weise angeordnet sind. In 5'-3'-Richtung ist zuerst das Gen für die mutmaßliche Methyltransferase II, dann das Gen für das Corrinoideprotein und schließlich das Gen für die Methyltransferase I angeordnet. Die Gene werden vermutlich gemeinsam transkribiert. Vergleicht man die Sequenzen miteinander, so fällt auf, daß die jeweiligen Gene $odmA$ und $odmD$ große Homologie aufweisen, jedoch die beiden bekannten für die Methyltransferase I codierenden Gene ($odmB$) vergleichsweise geringe Ähnlichkeit zeigen. Dies stimmt mit der Vermutung überein, daß die Methyltransferasen I in der Hauptsache die Substratspezifität vermitteln, also im Vergleich zu den anderen O-Demethylase-Komponenten die größten Unterschiede aufweisen müssen.

Wie bereits erwähnt, wurde ein drittes Gencluster gefunden, welches für eine mutmaßliche Methyltransferase II und ein Corrinoideprotein codiert. Außerdem wurde aus 3-Methoxyphenol-induzierten Zellen noch ein weiteres Corrinoideprotein $Cp1$ gereinigt, welches ebenfalls als Methylgruppenakzeptor während der O-Demethylierung dienen konnte. Es ist möglich, daß diese Proteine Bestandteil weiterer, bisher nicht charakterisierter O-Demethylasen sind. Sie könnten jedoch auch Bestandteile der Methylchlorid-Dehalogenase sein. Aufgrund der starken Sauerstoffempfindlichkeit konnte die Komponenten dieses Enzymsystems nicht gereinigt werden. Es ist jedoch bekannt, daß die Methylchlorid-Dehalogenase ebenfalls ein Corrinoideprotein beinhaltet. Für die Dehalogenase wird ein zur O-Demethylase analoger Reaktionsmechanismus postuliert.

Das Corrinoideprotein der Veratrol-O-Demethylase Cp_{ver} ähnelt zwar in seiner Aminosäuresequenz zu 78 % dem des Corrinoideproteins Cp_{van} , die beiden Corrinoideproteine weisen jedoch beim Übergang von Cob(II)- zu Cob(I)alamin einen deutlichen Unterschied auf. Bei Cp_{van} wurde ein Redoxpotential von -413 mV gemessen, das von Cp_{ver} war negativer als -490 mV. Das bedeutet, daß dieses Corrinoideprotein mit dem Reduktionsmittel Titan(III)citrat allein nicht zu Cob(I)alamin zu reduzieren war. Um aber als starkes Nukleophil und damit als Methylgruppenakzeptor wirken zu können, muß

das Corrinoïdprotein als Cob(I)alamin vorliegen. Um das Corrinoïdprotein Cp_{ver} zu reduzieren und damit zu aktivieren gab es zwei Möglichkeiten. Die Reduktion zu Cob(I)alamin konnte einerseits durch Zugabe von Rohextrakt und ATP erreicht werden, das Corrinoïdprotein Cp_{ver} wurde jedoch auch durch die Anwesenheit von MTI_{ver} und Methylviologen reduktiv aktiviert, in beiden Fällen war zusätzlich die Zugabe von Titan(III)citrat als Reduktionsmittel notwendig.

Im Rohextrakt von *A. dehalogenans* war offensichtlich ein reduktionsaktivierendes Enzym enthalten, welches die Reduktion des inaktivem Cob(II)alamin in Abhängigkeit von ATP katalysiert. Die Eigenschaft des Corrinoïdproteins, nur in Anwesenheit des Rohextraktes bzw. aktivierenden Enzyms und ATP reduziert zu werden, wurde als Testsystem für die Anreicherung dieses Enzyms aus Rohextrakt von *A. dehalogenans*, gewachsen auf 3-Methoxyphenol, genutzt. Bisher konnte dieses Enzym jedoch noch nicht vollständig gereinigt werden. Das Hauptproblem bestand sicherlich in seiner sehr geringen Konzentration. Aus Vanillat-gewachsenen Zellen wurde bereits ein solches aktivierendes Enzym, bezeichnet als Komponente C (Kaufmann et al. 1998a), gereinigt. Auch hier war die Reinigung aufgrund der niedrigen Konzentration schwierig. Aufgrund ähnlicher Elutionsprofile der beiden aktivierenden Komponenten während der Reinigung mittels FPLC kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um das selbe Enzym handelt. Die reduktive Aktivierung von Enzymen in Zusammenhang mit einem aktivierenden Enzym und ATP ist bereits an einigen Beispielen belegt. So dient die Komponente A als Elektronendonator für die Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase; wobei der Elektronentransfer über ein [4Fe-4S]-Cluster von der Hydrolyse von ATP abhängig ist (Hans et al. 1999, Locher et al. 2001). Ein weiteres Beispiel liefert die Benzoyl-CoA-Reduktase, welche durch ATP aktiviert werden muß, um die Reduktion des aromatischen Ringes zu katalysieren (Boll et al. 1997). Am besten vergleichbar mit der O-Demethylase ist jedoch ein Enzymsystem aus *Methanosarcina barkeri* Stamm Fusaro, welches die Übertragung von Dimethylamin auf Coenzym M katalysiert (Daas et al. 1996, Wassenaar et. al. 1998). Beteiligt sind zwei Methyltransferasen, wobei die Methyltransferase I einen Corrinoïdcofaktor enthält und die Methylgruppe des Substrates auf den Cofaktor überträgt. Auch hier ist die superreduzierte Form des Corrinoïds essentiell für dessen Funktion und es wird eine Reaktivierung im Falle der Autoxidation des Corrinoïds benötigt. Diese Funktion übernimmt das Methyltransferase-aktivierende Protein (MAP). MAP wird dabei durch ATP phosphoryliert. Aus thermodynamischer und mechanistischer Sicht stellt sich bei der ATP-getriebenen reduktiven Aktivierung die interessante Frage, wie die Hydrolyse von ATP mit einer Redoxreaktion mit einem sehr negativen Standardredoxpotential gekoppelt wird.

Die Reduktion des Corrinoïdproteins unter Einfluß der Methyltransferase MTI_{ver} und Methylviologen war ein überraschender Befund ohne bekannte Parallelen in funktionell analogen Systemen. Die Mechanismen, die zu dieser Reduktion führen, können bisher nicht erklärt werden. Zunächst fiel auf, daß stöchiometrische Mengen an MTI_{ver} erforderlich waren, um Cob(I)alamin zu erzeugen. Desweiteren war die Geschwindigkeit der Cob(I)alaminbildung abhängig von der Methylviologenkonzentration. Aus den bis jetzt gesammelten Daten stellt sich das folgende Bild dar: Durch Titan(III)citrat reduziertes Methylviologen überträgt ein Elektron auf das MTI_{ver} -Molekül, das

darauhin in der Lage ist, Cob(II)- zu Cob(I)alamin zu reduzieren. Aus der Charakterisierung der MTI_{ver} ging hervor, daß es sich um ein zinkhaltiges Enzym handelt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß das Zinkion in Zusammenhang steht mit der Reduktion des Corrinoidcofaktors. Zn^{2+} wirkt hier vermutlich als starke Säure und erleichtert so den nukleophilen Angriff auf die Methylgruppe. So wurde im Beispiel von *Methanosarcina barkeri* bereits gezeigt, daß die Fähigkeit der Methyltransferase MtaB zur Übertragung einer Methylgruppe abhängig ist vom Vorhandensein des Zinkions (Sauer & Thauer 1997). Eine andere Erklärung wäre, daß im Enzym vorhandene Thiolgruppen (Cysteine) an der Reduktion beteiligt sind. Dafür gibt es jedoch keine Belege. Auch wenn die MTI_{ver} -abhängige Aktivierung bisher nicht erklärt werden kann, konnte trotzdem auf diese Weise das Corrinoidprotein reaktiv aktiviert werden. Ob die MTI_{ver} -abhängige Reduktion tatsächlich von physiologischer Bedeutung ist, konnte hier nicht aufgeklärt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß durch Verwendung verschiedener Phenylmethylether unterschiedliche O-Demethylasen in *A. dehalogenans* induziert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß es sich um vier-Komponenten-Systeme handelt. Offensichtlich werden mindestens drei Komponenten induziert: die Methyltransferase II, das Corrinoidprotein und die Methyltransferase I. Angesichts der Hinweise, daß die Methyltransferase I in der Hauptsache die Substratspezifität bestimmt, ist dies erstaunlich und wirft die Frage auf, warum nicht nur jeweils dieses Enzym induziert wird. Ob auch jedesmal ein spezifisches aktivierendes Enzym induziert wird, ist ebenfalls unklar. Denkbar wäre auch, daß das aktivierende Enzym unter den einzelnen O-Demethylasen austauschbar ist oder nur ein einziges aktivierendes Enzym für die Aktivierung verschiedener Corrinoidproteine verantwortlich ist. Homoacetogene Bakterien spielen in der Natur eine Hauptrolle beim Abbau von Phenylmethylethern, die beim Abbau von Lignin entstehen, und vermutlich sind immer mehrere O-Demethylasen gleichzeitig induziert, um dem Bakterium zu ermöglichen viele der angebotenen Substrate zu nutzen.

LITERATURVERZEICHNIS

- S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402
- F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith, K. Struhl (1987) *Current protocols in molecular biology*, Greene, Publishing Associates, Inc. and John Wiley and sons, Inc., USA
- R. Bache, N. Pfennig (1981) Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* 130: 255-261
- F. Bak, K. Finster, F. Rothfuß (1992) Formation of dimethylsulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 157: 529-534
- R.V. Banerjee, N.L. Johnston, J.K. Sobeski, P. Datta, R.G. Matthews (1989) Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli* metH gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 264: 13888-13895
- F.-H. Bernhardt, A.X. Trautwein, H. Twifer (1988) 4-Methoxybenzoate monooxygenase from *Pseudomonas putida*: isolation, biochemical properties, substrate specificity and reaction mechanism of the enzyme compounds. *Methods of Enzymology*, Academic Press, New York, London, 161: 281-294
- J.A. Blair, K.J. Saunders (1970) A convenient method for the preparation of D,L-5-methyltetrahydrofolic acid (D,L-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-monoglutamic acid). *Anal. Biochem.* 34: 376-381
- M. Boll, S.S. Albracht, G. Fuchs (1997) Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosintriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 244: 840-851
- M.M. Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- S.A. Burke, J.A. Krzycki (1997) Reconstitution of monomethylamine:coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* 272: 16570-16577

- P.J.H. Daas, W.R. Hagen, J.T. Keltjens, C. van der Drift, G.D. Vogels (1996) Activation mechanism of methanol:5-hydroxybenzimidazolylcobamide methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. J. Biol. Chem. 271: 22346-22351
- S.L. Daniel, E.S. Keith, H. Yang, Y.S. Lin, H.L. Drake (1991) Utilization of methoxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: expression of the CO-dependent O-demethylating activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180: 416-422
- K.A. DeWeerd, A. Saxena, D.P. Nagle, J.M. Suflita (1988) Metabolism of the ¹⁸O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other labeled methoxybenzoic acids in anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1237-1242
- G. Diekert, M. Hansch, R. Conrad (1984) Acetate synthesis from 2 CO₂ in acetogenic bacteria: is carbon monoxide an intermediate? Arch. Microbiol. 138: 224-228
- G. Diekert, G. Wohlfarth (1994) Energetics of acetogenesis from C₁-Units. In: H.L. Drake (Hrsg.) *Acetogenesis*, Chapman & Hall, New York, S. 158-179
- C. Drennan, S. Huang, J.T. Drummond, R.G. Matthews, M.L. Ludwig (1994) How a protein binds B₁₂: A 3.0 Å X-Ray structure of B₁₂-binding domains of methionine synthase. Science 266:1669-1674
- B. Ellinger (1999) Methyltransferasen und Corrinoid-Bindeproteine aus *Acetobacterium woodii*. Klonierung von *mttA1*, *mttAII*, *mttB* und *copB*, ihre Regulation und zelluläre Lokalisation. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität München
- T. Engelmann (1998) Verwertung verschiedener Phenylmethylether durch das strikt anaerobe Bakterium *Acetobacterium dehalogenans*. Diplomarbeit. Universität Stuttgart
- D.J. Ferguson, N. Gorlatova, D.A. Grahame, J.A. Krzycki (2000) Reconstitution of dimethylamine:coenzyme M methyl transfer with a discrete corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. J. Biol. Chem. 275: 29053-29060
- A.C. Frazer (1994) O-demethylation and other transformations of aromatic compounds by acetogenic bacteria. In: H.L. Drake (Hrsg.) *Acetogenesis*, Chapman & Hall, New York, S. 445-483
- W. Friedrich (1975) Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoid, in *Fermente, Hormone, Vitamine* (R. Ammon & W. Dirscherl, eds) Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- J. E. Galagan, C. Nusbaum, A. Roy, M. G. Endrizzi, P. McDonald, W. FitzHugh, S. Calvo, R. Engels, S. Smirnov, D. Atnoor, A. Brown, N. Allen, J. Naylor, N. Stange-Thomann, K. DeArellano, R. Johnson, L. Linton, P. McEwan, K. McKernan, J. Talamas, A. Tirrell, W. Ye, A. Zimmer, R.D. Barber, I. Cann, D.E. Graham, D.A. Grahame, A.M. Guss, R. Hedderich, C. Ingram-Smith, H.C. Kuettner, J.A. Krzycki, J.A. Leigh, W. Li, J. Liu, B. Mukhopadhyay, J.N. Reeve, K. Smith, T.A. Springer, L.A. Umayam, O. White, R.H. White, E. Conway de Macario, J.G. Ferry, K.F. Jarell,

- H. Jing, A.J.L. Macario, I. Paulsen, M. Pritchett, K.R. Sowers, R.V. Swanson, S.H. Zinder, E. Lander, W.W. Metcalf, B. Birren (2002) The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome org.* 12: 532-542
- B.R.S. Genthner, C.L. Davis, M.P. Bryant (1981) Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 12-19
- C. Goulding, D. Postigo, R. Matthews (1997) Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin and adenosylmethionine. *Biochem.* 36: 8082-8091
- M. Hans, J. Sievers, U. Muller, E. Bill, J.A. Vorholt, D. Linder, W. Buckel (1999) 2-hydroxyl-CoA dehydratase from *Clostridium symbiosum*. *Eur. J. Biochem.* 265: 404-414
- T.C. Hodgman (1988) A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333: 22-23
- S.-I. Hu, H.L. Drake, H.G. Wood (1982) Synthesis of acetyl coenzyme A from carbon monoxide, methyltetrahydrofolate, and coenzyme A by enzymes from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 149: 440-448
- O. Isler, G. Brubacher, S. Ghisla, B. Kräutler (1988) Vitamine II. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- M. Jansen, T.A. Hansen (2000) DMSP:tetrahydrofolate methyltransferase from the marine sulfate-reducing bacterium strain WN. *J. Sea Res.* 43: 225-231
- T. Kaneko, Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, A. Sas Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, Y. Kim Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, Y. Mat Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, C. Sugim Takeuchi, M. Yamada, S. Tabata (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338
- F. Kaufmann, G. Wohlfarth, G. Diekert (1997) Isolation of O-Demethylase, an ether cleaving enzyme of the homoacetogenic strain MC. *Arch. Microbiol.* 168: 136-142
- F. Kaufmann, G. Wohlfarth, G. Diekert (1998a) O-Demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*. Substrate specificity and function of the participating proteins. *Eur. J. Biochem.* 253: 706-711
- F. Kaufmann, G. Wohlfarth, G. Diekert (1998b) O-Demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*. Cloning, sequencing, and active expression of the gene encoding the corrinoid protein. *Eur. J. Biochem.* 257: 515-521

- J.A. Kreft, B. Schink (1997) Specificity of O-demethylation in extracts of homoacetogenic *Holophaga phoetida* and demethylation kinetics measured by a coupled photometric assay. Arch. Microbiol. 197: 363-368
- G.M. LeClerc, D.A. Grahame (1996) Methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes from *Methanosarcina barkeri*. J. Biol. Chem. 271: 18725-18731
- K.P. Locher, M. Hans, A.P. Yeh, B. Schmid, W. Buckel, D.C. Rees (2001) Crystal structure of the *Acidaminococcus fermentans* 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase component A. J. Mol. Biol. 307: 297-308
- F. Mancía, N.H. Keep, A. Nakagawa, P.F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bösecke, O. Diat, P.R. Evans (1996) How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methyl-malonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. Structure 4: 339-350
- E.N.G. Marsh, D.E. Holloway (1992) Cloning and sequencing of glutamate mutase component S from *Clostridium tetanomorphum*. Homologies with other cobalamin-dependent enzymes. FEBS Lett. 310: 167-170
- R.G. Matthews, C.W. Goulding (1997) Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: the role of zinc. Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 332-339
- M. Meßmer, G. Wohlfarth, G. Diekert (1993) Methyl chloride metabolism of the strictly anaerobic methyl chloride-utilizing homoacetogen strain MC. Arch. Microbiol. 160: 383-387
- M. Meßmer (1995) Anaerober Stoffwechsel von Methylchlorid und Phenylmethylethern im homoacetogenen Stamm MC. Shaker Verlag.
- M. Meßmer, S. Reinhardt, G. Wohlfarth, G. Diekert (1996) Studies on methyl chloride dehalogenase and O-demethylase in cell extracts of the homoacetogen strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay. Arch. Microbiol. 165: 18-25
- D. Naidu, S.W. Ragsdale (2001) Characterization of a three-component vanillate O-demethylase from *Morella thermoacetica*. J. Bacteriol. 183: 3276-3281
- K.E. Nelson, R.A. Clayton, S.R. Gill, M.L. Gwinn, R.J. Dodson, D.H. Haft, E.K. Hickey, J.D. Peterson, W.C. Nelson, K.A. Ketchum, L. McDonald, T.R. Utterback, J.A. Malek, K.D. Linher, M.M. Garrett, A.M. Stewart, M.D. Cotton, M.S. Pratt, C.A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, J.A. Eisen, O. White, S.L. Salzberg, H.O. Smith, J.C. Venter, C.M. Fraser (1999) Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature 399: 323-329
- A. Neumann (1993) Untersuchung zur anaeroben Dechlorierung von Tetrachlorethen in *Dehallospirillum multivorans* spec. nov.. Diplomarbeit. Universität Stuttgart.

- A. Neumann, A. Siebert, T. Trescher, S. Reinhardt, G. Wohlfahrth, G. Diekert (2002) Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. Arch. Microbiol. 177: 420-426
- J. Nölling, G. Breton, M.V. Omelchenko, K.S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H.M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, GTC Sequencing Center Production, Fishing and Bioinformatics Teams, Y.I. Wolf, R.L. Tatusov, F. Sabathe, L Doucette-Stamm, P. Soucaille, M.J. Daly, G.N. Bennet, E.V. Koonin, D.R. Smith (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. 183: 4823-4838
- L. Paul, J.A. Krzycki (1996) Sequence and transcript analysis of a novel *Methanosarcina barkeri* methyltransferase II homologue and its associated corrinoid protein homologous to methionine synthase. J. Bacteriol. 178: 6599-6607
- D.L. Roberts, S. Zhao, T. Doukov, S.W. Ragsdale (1994) The reductive acetyl coenzyme A pathway: Sequence and heterologous expression of active methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein methyltransferase from *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. 176: 6127-6130
- D. Röser (2002) Untersuchungen zur Struktur des Vanillat-O-Demethylase Operons aus *Acetobacterium dehalogenans*. Diplomarbeit, Universität Jena
- K. Sauer, U. Harms, R.K. Thauer (1997) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. Eur. J. Biochem. 243: 670-677.
- K. Sauer, R.K. Thauer (1997) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Zinc dependence and thermodynamics of the methanol:cob(I)alamin methyltransferase reaction. Eur. J. Biochem. 249: 280-285
- H.G. Schlegel (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage. Thieme Stuttgart S. 453 ff
- B. Schuppert, B. Schink (1990) Fermentation of methoxyacetate to glycolate and acetate by newly isolated strains of *Acetobacterium* sp.. Arch. Microbiol. 153: 200-204
- T. Sonoki, T. Obi, S. Kubota, M. Higashi, E. Masai, Y. Katayama (2000) Coexistence of two different O demethylation systems in lignin metabolism by *Sphingomonas paucimobilis* SYK6: Cloning and sequencing of the lignin biphenyl specific O-demethylase (LigX) gene. Appl. Env. Microbiol. 66: 2125-2132
- A. Studer, E. Stupperich, S. Vuilleumier, T. Leisinger (2001) Chloromethane:tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. Eur. J. Biochem. 268: 2931-2938

- E. Stupperich, I. Steiner, M. Rühlemann (1985) Isolation and analysis of bacterial cobamides by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 155: 365-370
- P. Sykes (1988) Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, New York, S. 144-166
- T.C. Tallant, J.A. Krzycki (1997) Methylthiol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate. *J. Bacteriol.* 179: 6902-6911
- T.C. Tallant, L. Paul, J. A. Krzycki (2001) The MtsA subunit of the methylthiol:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* catalyzes both half-reactions of corrinoid-dependent dimethylsulfide:coenzyme M methyl transfer. *J. Biol. Chem.* 276:4485-4493
- K. Tanaka, N. Pfennig (1988) Fermentation of 2-methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus*. *Arch. Microbiol.* 149: 181-187
- M. Tollinger, R. Konrat, B.H. Hilbert, E.N. Marsh, B. Kräutler (1998) How a protein prepares for B₁₂ binding: structure and dynamics of the B₁₂-binding subunit of glutamate mutase from *Clostridium tetanomorphum*. *Structure* 6: 1021-1033
- J. Traunecker, A. Preuß, G. Diekert (1991) Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 416-421
- T. Vanelli, M. Messmer, A. Studer, S. Vuilleumier, T. Leisinger (1999) A corrinoid-dependent catabolic pathway for growth of a *Methylobacterium* strain with chloromethane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4615-4620
- R.W. Wassenaar, J.T. Keltjens, C. van der Drift (1998) Activation and reaction kinetics of the dimethylamine/coenzyme M methyltransferase in *Methanosarcina barkeri* strain Fusaro. *Eur. J. Biochem.* 258: 597-602
- R. Westermeier (1997) Electrophoresis in practice. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- G.S. Wilson (1978) Determination of oxidation-reduction potentials. *Methods Enzymol.* 54: 396-410
- G. Wohlfarth, G. Geerligs, G. Diekert (1990) Purification and properties of NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Peptostreptococcus productus*. *Eur. J. Biochem.* 192: 411-417
- G. Wohlfarth, G. Geerligs, G. Diekert (1991) Purification and characterization of NADP⁺-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). *J. Bacteriol.* 173: 1414-1419

- A.J.B. Zehnder, K. Wuhrmann (1976) Titanium(III)citrate as a non-toxic, oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* 194: 1165-1166
- Z.S. Zhou, K. Peariso, J.E. Penner-Hahn, R.G. Matthews (1999) Identification of the zinc ligands in cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from *E. coli*. *Biochem.* 38: 15915-15926

1801 aaaaaataaagaacaagaataaggggaggatacaagatgaatcagagagagaatTTTTTT
 1861 gcgatgatcgagggaaagaacccggagtttatcccgaattcaatggaggTTTATAAAACC
 M N Q R E N F F
 A M I E G K K P E F I P N S M E V Y K T
 1921 tgtgTTatggcaacaagtataatagacagtcctTTTTcaagggggattagatgcctatggt
 C V M A T S I I D S P F Q G G L D A Y G
 1981 gtcaattggattgcaaccaagaaggatcaattcctgaacctaataagttcatgTTtaat
 V N W I A T K E G S I P E P N K F M F N
 2041 gacattaccgactggaaggatcatgTTaaatttccaaatgTTgatacactggggattgaa
 D I T D W K D H V K F P N V D T L G I E
 2101 gaagctgctaaaatggaactagcagatgTaaaacgagatgaaatggttataaatgTTTT
 E A A K M E L A D V K R D E M V I N V F
 2161 agtgcctgtggtttgTTcgaacgaatggcagcctTTtatgggctTTtgagaacacactctgt
 S A C G L F E R M A A F M G F E N T L C
 2241 tcgctggTggaagatccagatgcaagccgtgaattTTTTtgaggctTTtgccgatttccga
 S L V E D P D A S R E F F E A F A D F R
 2301 attgattgccataatcgaattatcgacgcttatcaaccggatgtgattacctactTTgat
 I D C H N R I I D A Y Q P D V I T Y F D
 2361 gacttagccacggccaacggcctgTTtatgtcacccaaggTTtatcgcgaaagtcattaag
 D L A T A N G L F M S P K V Y R E V I K
 2421 ccagctcatcaacggatagctgaagcagttacctccagaggcgtgatttctcacaacat
 P A H Q R I A E A V T S R G V I F S Q H
 2481 acctgcggaaaatgcaagaattgtcggtgactTTgtcgaaatgggggctaaaatattgg
 T C G K C E E I V G D F V E M G A K I W
 2541 cattcagctcaataagcaatgatctcgaagggaataatggatagatataaaggaaagctg
 H S A Q I S N D L E G I M D R Y K G K L
 2601 attattgaaggcggatgggactcttccggcccggtcagttatattggcgctcaattgaa
 I I E G G W D S S G P V S Y I G A S I E
 2661 gatttaattgaagaagccaaacgctgcgtcagagtatacggaccgaagggttaattacatc
 D L I E E A K R C V R V Y G P K G N Y I
 2721 ttcatgccggtgctgatgaatgaaaacggaaactcattactggctcgggtgatccccgtctg
 F M P V L M N E N G N S L L V G D P R L
 2781 gaaccatgctaaaagctttcaatgaaataaacaagctttaagaaaatgagTTaaactta
 E P M L K A F N E I N K L • inv.rep1-----
 2841 tgaaaaaagcagtagtcaccggactaatcgggtggggtcatgggtctgTTcatgagTTTTc
 -----> <-----inv.rep1
 2901 tgatgaactggttactgatcccaattcccgaacagtgctggccaacgcctcggcaatg
 inv.rep2-----> <-----
 2961 gcatcagtggtttgctcagcggTTTTatgggtggctTTtatcgggctgctgatgtatatga
 -----inv.rep2
 3021 aaaaaaacacggctccagaaaaataaacgaatcgcataaaaacgacagcaaacacagcgt
 inv.rep3----->
 3081 tccaaccgctgtgTTgTTTTcatctttacaaaaacaacgTTTTtaatttaattgTT
 <-----inv.rep3 /.rep4----->
 3141 tttagaaaaatcatgctatactgataaaaaatcacagattttaaactaaacaggtgaagca
 ★★★★★
 <-----inv.rep4

ctax

3201 atgaatcaattcgaaacccggaagcctaatacaaaaacgcctcagcgcacctgggtcgacatc
M N Q F E T R K P N Q K R L S D L V D I

3261 aaaaccctccaggaattcttgacgcctttaccactactaccggcctgatggccaatatt
K T L Q E I L D A F T T T T G L M A N I

3321 gtcgatggcgaaggggtctcaatctttccgcgcaaggggattaagaaatgctgtaaattc
V D G E G V S I F P R K G I K K C C K F

3381 tgccgcattatctatagtctggaagggcggcaagaaccgctgtcagggcggcttacaacgg
C R I I Y S L E G G K N R C Q A A Y K R

3441 gccggcaagcagggcggcactgtttggcggagccctatatatttttcgctgtccctcaggtctg
A G K Q A A L F G E P Y I F R C P S G L

3501 attgagtgggcgccgattgtcttaaattggcggagcatgtcggcaccgattatctgcggc
I E W A A P I V L N G E H V G T I I C G

3561 caggtgctgatgtgggagccggaggagtttttctggattgaactcaggaagatgaaccag
Q V L M W E P E E F F W I E L R K M N Q

3601 gcaatcaccgatgattttgaagaagtgtttgaagacagtcggggac
A I T D D F E E V F E D S R G

Anhang 1: Gencluster mit den offenen Leserahmen *odmD_{ver}*, *odmA_{ver}*, *odmB_{ver}* und *ctax*. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind angegeben. Sternchen (★) markieren mögliche Ribosomenbindungsstellen; der Punkt (•) markiert das Stopcodon; die fettgedruckten und unterstrichenen Aminosäuren wurden durch automatisierten Edmann-Abbau bestimmt (Material und Methoden 3.4), aus diesen Sequenzen wurden die degenerierten Primer für Cp_{ver} und MTI_{ver} abgeleitet; die gestrichelten Pfeile mit der Bezeichnung inv. Rep1-4 markieren die Bereiche, die Palindromsequenzen enthalten.

OdmD_{van}
685 accgcctggatgtatTTTgcccgattTaatggccaggtcaagaatatgggattgatccctca
T A W M Y L P I - W P G Q E Y G I D P S
745 agaatgcacattgatccattgggtcgaaatgctgtgtacctccgaagatgggattgccatg
R M H I D P L V E M L C T S E D G I A M
805 gtcgtcgaagtaatccgcagcattaaagaacaataccccaccatccatgtcaccggcgca
V V E V I R S I K E Q Y P T I H V T G A
865 gtcagtaatatTTTccttcaacctgcccggcccgaaaaatgggtcaacatgggctttaccgtc
V S N I S F N L P A R K M V N M G F T V
925 ctggcgatgaatgccggctctggacagtgccatttctcgacccaccaacgggtgatctgatg
L A M N A G L D S A I L D P T N G D L M
985 ggcattcatctTTTgccaactgaagcgttTgtTgggCGaagacgactactgtatggaatatatt
G I I F A T E A L L G E D D Y C M E Y I
1045 ggcgcttaccgggaagggattTTTcggtcagaagaaatagtccagtcaggagTTTTtaaat
G A Y R E G I F G Q K K •
1105 agaaccatcattaaattgtacaacctatttctgttaatcggcacacacagccagttgccag
★★★★ ***OdmA_{van}?***
1165 atgttgaaaataaaaaaaaaataaatagtgaacaggagaaaagacatgtcaaaaattgaaga
M S K I E E
MTI_{van}: M K M E E
1225 agttaaagcaaaagtagaagtcggtaagTcaaaactggt
V K A K V E A G K S K L
V K A K V E A G K S K L

Anhang 2: Gencluster mit den offenen Leserahmen *odmD_{van}* und *odmA_{van}* Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind angegeben. Vermutlich ist in dieser Nukleotidsequenz das Gen für die für die Methyltransferase II der Vanillat-O-Demethylase enthalten. Mit **MTI_{van}** ist die N-terminale Aminosäuresequenz der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase, die durch automatisierten Edmann-Abbau bestimmt wurde, gekennzeichnet (fettgedruckt); Sternchen (★) markieren mögliche Ribosomenbindungsstellen; der Punkt (•) markiert das Stopcodon.

OdmD_x
324 ctaaccgcgaaagcgatagcggcaaaggatgtcgaatztatccggaacctggcgattaag
L T A K A I A A K D V E F I R N L A I K
384 caggccgaagctggggctaatttcacgacgtctgtgcctcagtggacgatgacatcgaa
Q A E A G A N F I D V C A S V D D I E
444 ctggaaacgatgaaatggttgattgacatcgttcaggatgctactgacgtgcccattgca
L E T M K W L I D I V Q D A T D V P I A
504 gtggacagcccaatgtttatacctgcattgaatcgatgaaatactgcaacaaaccagga
V D S P N V Y T C I E S M K Y C N K P G
564 ctgtttaactccgtgtcattagaaggggacaagggtcgatgtggcctttaagggtactggcc
L F N S V S L E G D K V D V A F K V L A
624 gataccaagtgggaatgtgtggcctttgctaaacagtgacaagggcatccctaaaaccgcc
D T K W E C V A L L N S D K G I P K T A
684 aaggatcgtctggaactgttcactgacttaatggcaaatgccaggaatataagattgac
K D R L E L F T D L M A K C Q E Y K I D
744 ccctcccgcacatcgatcccttgattgaaatgctgtgcacctcggaagatgggatt
P S R M H I D P L I E M L C T S E D G I
804 accatgggtcaccgaagtcattcgggaaatcaaaaagcaatatccaaccattcatgtcacc
T M V T E V I R E I K K Q Y P T I H V T
864 ggtgcccgtcagcaacatztatctttcaatctaccagcccggcggattgccaaccaggccttt
G A V S N I S F N L P A R R I A N Q A F
924 gccgtttggccatgagcgcggcggcagcctttattctcgatcccctgaacaaggat
A V L A M S A G M D S F I L D P L N K D
984 atgatgggaatgctgtttgcccaccgaagcgatgatgggtgaagatgaatactgcatggaa
M M G M L F A T E A M M G E D E Y C M E
1044 tatatcgggtgctttccgggaaggatattttcgtaaaataagttacaaccaaacccggcact
Y I G A F R E G I F V K • ★★★★★
1104 cacacaggttccgggtgattaaaataaaaattagttataaaaatcaaaggagaaattgaaa
OdmA_x
1164 atgtcaaaaattgaagatgtaaaagtattggctcgaaccggtaaatcaaagaaggttgcc
M S K I E D V K V L V E T G K S K K V A
1224 gcagccgcttcaggaagctctggatgccgggtgataaagcgcaggatattctggatgcaatg
A A V Q E A L D A G D K A Q D I L D A M
1284 gttgcctccatgggctgggtcggggataaattctcatctggagaaatctttgttccagaa
V A S M G V V G D K F S S G E I F V P E
1344 atgttaattgcccgaagcgatgtccaaaggggtagaagtgttaaaaccagtgatggcc
M L I A A K A M S K G V E V L K P V M A
1404 ggcgatggcgccaattcactgggaacctgtatcatgggaactgtagccggcgatctgcac
G D G A N S L G T C I M G T V A G D L H
1464 gatatcggtaaaaacctgggtgtgatgatgcttgaaagcgtggcctttgatatgggtgac
D I G K N L V V M M L E S A G F D M V D
1524 ctgggcttgacgtaccggcagacaagttttagaagcggtaaaagaaaataataatggt
L G V D V P A D K F V E A V K E N N N V
1584 gtattagttgcttctggtctgttaaccactaccatgccagcgttaaaagaagccggt
V L V A C S G L L T T T M P A L K E A V
1644 caaacgcataaacga
Q T H K R

Anhang 3: Gencluster mit den offenen Leserahmen *odmD_x* und *odmA_x*. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind angegeben. Die Gene codieren vermutlich für eine Methyltransferase II und das Corrinoidprotein einer bisher noch nicht charakterisierten O-Demethylase. Sternchen (★) markieren mögliche Ribosomenbindungsstellen; der Punkt (●) markiert das Stopcodon.

LEBENS LAUF

Name	Tina Engelmann
Geburtsdatum	6. August 1970
Geburtsort	Stuttgart-Bad Cannstatt

Schulbildung

1977 -1981	Friedrich-Silcher-Grundschule in Fellbach
1981-1990	Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium in Stuttgart-Bad Cannstatt
Mai 1990	Abitur

Berufsausbildung

1990 - 1993	Ausbildung zur Arzthelferin bei Dr. med. L. Kirchner (Internist) in Fellbach und in der gewerbliche Berufsschule in Schorndorf
1.2.1993 – 30.9.1993	Arzthelferin bei Dr. med. G. Bihl in Stuttgart

Studium

Oktober 1993	Studium der technischen Biologie an der Universität Stuttgart
März 1998	Beginn der Diplomarbeit bei Frau Prof. Diekert am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart mit dem Thema „Verwertung verschiedener Phenylmethylether durch das strikt anaerobe Bakterium <i>Acetobacterium dehalogenans</i> “.
Dezember 1998	Diplom Biologie, technischer Orientierung
Januar 1999	Beginn der praktischen Untersuchungen für die Dissertation bei Frau Prof. Diekert mit dem Thema „Die Veratrol-O-Demethylase aus <i>Acetobacterium dehalogenans</i> : Reinigung, Charakterisierung und Aktivierung der O-Demethylase-Komponenten“ am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie an der Friedrich-Schiller Universität in Jena.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Isolation and characterization of a veratrol:corrinoid protein methyl transferase from *Acetobacterium dehalogenans*.

Tina Engelmann, Franz Kaufmann, Gabriele Diekert (2001) Archives of Microbiology 175: 376 – 383

Poster und Vortrag im Rahmen der VAAM-Jahrestagung

(VAAM: Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e.V.)

1999	Poster	Utilization of different phenyl methyl ethers by <i>Acetobacterium dehalogenans</i> and identification of newly induced proteins by two-dimensional gel electrophoresis. Tina Engelmann, Franz Kaufmann, Gabriele Diekert
2000	Poster	Biochemical characterization of a novel O-demethylase from <i>Acetobacterium dehalogenans</i> . Tina Engelmann, Franz Kaufmann, Gabriele Diekert
2001	Poster	Isolation and characterization of a veratrol:corrinoid protein methyl transferase from <i>Acetobacterium dehalogenans</i> . Tina Engelmann, Franz Kaufmann, Gabriele Diekert
2002	Kurzvortrag	Characterization of the components of the veratrol:O-demethylase of <i>Acetobacterium dehalogenans</i> . Tina Engelmann, Gabriele Diekert
2002	Poster	Studies on O-demethylase activation in <i>Acetobacterium dehalogenans</i> . Torsten Schubert, Tina Engelmann, Gabriele Diekert
2002	Poster	Cloning and Sequencing of the genes encoding of the methyltransferase I _{vanillate} and the O-demethylase corrinoid proteins of <i>Acetobacterium dehalogenans</i> . Dirk Röser, Tina Engelmann, Gabriele Diekert

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden verwendet.

Jena, den

Tina Engelmann

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tina Engelmann, geb. am 6.8.1970, daß mir die Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist. Die vorliegende Dissertation „Die Veratrol-O-Demethylase aus *Acetobacterium dehalogenans*: Reinigung, Charakterisierung und Aktivierung der O-Demethylase-Komponenten“ wurde von mir selbstständig angefertigt und es wurden keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln, persönlichen Mitteilungen und Quellen benutzt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde beim Fakultätsrat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena und an keiner anderen Stelle zur wissenschaftlichen Prüfung oder zur Dissertation eingereicht.

Jena, den

Tina Engelmann

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei allen Personen die mir bei der Ausarbeitung dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere bei:

Frau Prof. Dr. Gabriele Diekert für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung.

Herrn Dr. Franz Kaufmann für die Vorarbeit auf dem Gebiet der O-Demethylasen in *Acetobacterium dehalogenans* und für die Vermittlung praktischer Kenntnisse.

Frau Dr. Anke Neumann dafür, daß sie mir während der gesamten Dauer dieser Arbeit mit vielen Ratschlägen bei den biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Volker Müller und Frau Bärbel Ellinger von der Ludwig-Maximilians-Universität München für Informationen, die hilfreich waren bei der Aufklärung der Genorganisation der O-Demethylasen.

Herrn Klaus Voigt und Herrn Dr. Wolfgang Poppitz für die Durchführung der Metallanalyse und der Massenspektrometrie.

Frau Heidi Orthaus für die praktische Hilfe im Labor.

allen Mitarbeitern des Institutes für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie für die hervorragende Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
