



Frank Falinski (Autor)

**Überproduktion von Subkomplexen der F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-Dehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus* und abschließende Untersuchungen zur Verbereitung von Methanophenazin in methanogenen Archaea**

Frank Falinski

---

Überproduktion von Subkomplexen der  
F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-Dehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus*  
und abschließende Untersuchungen zur Verbreitung  
von Methanophenazin in methanogenen Archaea

---



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3308>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1 Organismen und Plasmide	6
2.2 Nährmedien, Puffer und Stammlösungen	11
2.2.1 Medien für <i>E. coli</i>	11
2.2.1.1 LB (Luria-Bertani)-Medium	11
2.2.1.2 SOB-Medium	11
2.2.1.3 SOC-Medium	12
2.2.1.4 MI („maximal induction“-Medium	12
2.2.2 Medium für <i>Ml. tindarius</i>	14
2.2.2.1 Vitaminlösung	15
2.2.2.2 Spurenelementlösung	16
2.2.3 Medium für <i>A. fulgidus</i>	17
2.2.3.1 Mineralienexier	18
2.2.4 Titan-(III)-Citrat-Lösung	18
2.2.5 Pufferlösungen	19
2.2.5.1 Waschpuffer für anaerobes Arbeiten	19
2.2.5.2 Tris-Puffer	19
2.2.5.3 Amylose-Resin	19
2.2.6 Medienzusätze	20
2.3 Zellanzucht	20
2.3.1 Massenzucht von <i>Ml. tindarius</i>	20
2.3.2 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	23
2.3.2.1 Anzucht für Plasmidpräparationen	23
2.3.2.2 Anzucht im 10 l-Maßstab	23
2.3.3 Messung der optischen Dichte	23
2.3.4 Ermittlung von Wachstumsparametern	24
2.3.5 Bestimmung des pH-Wertes	24
2.3.6 Stammhaltung	24
2.3.7 Reinheitskontrollen	24
2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	25
2.4.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	25
2.4.2 Isolierung chromosomaler DNA mit CTAB	25
2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.4.3.1 Schnellpräparation von DNA	26
2.4.3.2 Präparative Plasmidisolierung	27
2.4.3.3 Plasmid-Schnellpräparation	27
2.4.3.4 Schnelle Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> („Cracking“)	28
2.4.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	29
2.4.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	29
2.4.4.2 Fällung von Nukleinsäuren	29
2.4.4.3 Mikrodialyse von Nukleinsäuren	30

2.4.4.4	Reinigung von DNA durch Absorption an Glasmilch	30
2.4.4.5	Reinigung von PCR-Produkten	30
2.4.4.6	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA	31
2.4.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten	32
2.4.5.1	Agarosegelelektrophorese	32
2.4.5.2	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.5	Polymerasekettenreaktion	34
2.6	Enzymatische Modifikation von DNA	36
2.6.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	36
2.6.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	36
2.6.3	Herstellung von glatten Enden und Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden bei DNA-Fragmenten	37
2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.7	Übertragung von DNA in <i>E. coli</i> durch Transformation oder Elektroporation und Selektion rekombinanter Klone	39
2.7.1	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation	39
2.7.2	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation	39
2.7.3	Transformation durch Hitzeschock	40
2.7.4	Transformation durch Elektroporation	40
2.7.5	Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter Klone, die ein Insert im Vektor aufweisen (weiß)	41
2.8	Sequenzierung von DNA	42
2.8.1	Analyse der Sequenzdaten	42
2.9	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	42
2.9.1	Heterologe Expression mit dem pET-System	43
2.9.2	Heterologe Expression mit dem pASK-System	44
2.10	Arbeiten mit Proteinen	45
2.10.1	Einengen und Entsalzen von Proteinlösungen mittels Centrisartröhrchen	45
2.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
2.10.3	Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen	47
2.10.4	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	47
2.10.5	Native Gradienten-PAGE	50
2.10.6	Silberfärbung	52
2.11	Rekonstitution heterolog produzierter Proteine aus „inclusion bodies“	53
2.11.1	Rekonstitution von Proteineinschlußkörpern (YANO et al., 1995, modifiziert)	54
2.11.2	Verdünnung	54
2.11.3	Rekonstitution durch das Vectrase-CD-System	54
2.11.4	Hitzefällung	55
2.12	Reinigung von Proteinen	55
2.12.1	Chromatographie an Strep-Tactin	55

2.12.2	Anionen-Austausch-Chromatographie an DEAE-Sephacel	56
2.12.3	Affinitätschromatographie an Hydroxylapatit	57
2.13	Reinigung und Synthese von Cofaktoren	57
2.13.1	Reinigung von F <sub>420</sub>	57
2.13.2	Synthese des Heterodisulfids	58
2.14	Optisch-enzymatische Aktivitätsbestimmungen	63
2.14.1	Aktivitätsbestimmung der membrangebundenen Hydrogenase	63
2.14.2	Reduktion von F <sub>420</sub>	63
2.14.3	Bestimmung der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> -Dehydrogenase-Aktivität	64
2.14.4	Bestimmung der Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität	65
2.14.5	Bestimmung der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität	65
2.15	Reinigung redox-aktiver Substanzen aus Cytoplasmamembranen verschiedener methanogener Organismen	65
2.15.1	Zellaufschluß und Methoden der Membranpräparation	66
2.15.2	Gefriertrocknung von Cytoplasmamembranen	
2.15.3	Abtrennung der redox-aktiven Substanz	67
2.15.4	Analytische Trennung über HPLC	67
2.15.5	Präparative Reinigung des Methanophenazins aus <i>Ml. tindarius</i>	68
2.16	Spektroskopische Methoden	68
2.16.1	Massenspektroskopie	68
2.16.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie	69
2.16.3	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie	70
2.17	Spektralphotometrische Untersuchungen	70
2.17.1	Dioden-Array-Photometer	70
2.17.2	UV-Vis-Spektren der Isooktanrohextrakte	71
2.17.3	Aufnahme von UV-Vis-Spektren des Methanophenazins in oxidierter und reduzierter Form	71
2.17.4	Kopplung der Teilreaktionen des F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems durch Methanophenazin	72
2.18	Chemikalien, Biochemikalien und Gase	72
<b>3.</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>75</b>
3.1	Klonierung des Gens <i>fqoB/C</i> der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> in <i>E. coli</i>	78
3.1.1	Amplifizierung des Gens <i>fqoB/C</i> der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> mittels PCR	79
3.1.2	Molekularbiologische Untersuchung des Gens <i>fqoB/C</i>	80
3.1.2.1	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fqoB/C</i> in pZErO-2	80
3.1.2.2	Umklonierung des Gens <i>fqoB/C</i> in pET-21c	81
3.2	Klonierung des Gens <i>fqoD</i> der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> in <i>E. coli</i>	84
3.2.1	Amplifizierung des Gens <i>fqoD</i> der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> mittels PCR	85

3.2.2	Molekularbiologische Untersuchung des Gens <i>fqoD</i>	85
3.2.2.1	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fqoD</i> in pZErO-2	85
3.2.2.2	Umklonierung des Gens <i>fqoD</i> in pET-21c	87
3.2.2.3	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fqoD</i> in pASK-IBA5	89
3.3	Gemeinsame Klonierung der Gene <i>fqoB/C</i> und <i>fqoD</i> der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> in <i>E. coli</i>	93
3.3.1	Amplifizierung der Genbereiche <i>fqoB/C</i> und <i>fqoD</i>	93
3.3.2	Molekularbiologische Untersuchung des Genklusters <i>fqoB/CD</i>	94
3.3.2.1	Klonierung und Sequenzierung der Gene <i>fqoB/CD</i> in pZErO-2	94
3.3.2.2	Umklonierung der Gene <i>fqoB/CD</i> aus pZErO-2 in pET-21c	97
3.3.2.3	Klonierung und Sequenzierung der Gen <i>fqoB/C</i> und <i>fqoD</i> in pASK-IBA3 und pASK-IBA5	99
3.4	Heterologe Expression der rekombinanten Plasmide in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	104
3.4.1	Heterologe Expression verschiedener rekombinanter Plasmide in dem <i>E. coli</i> -Stamm B121(DE3)	105
3.4.2	Heterologe Expression verschiedener rekombinanter Plasmide in dem <i>E. coli</i> -Stamm Rosetta(DE3)	108
3.5	Versuche zur Vermeidung der Bildung von Proteineinschlußkörpern	111
3.5.1	Anzucht bei niedrigen Temperaturen	111
3.5.2	Zellaufschluß im Hochsalzpuffer (Amylose Resin)	113
3.6	Rekonstitution durch Dialyse (YANO et al., 1995, modifiziert)	113
3.7	Methoden zur Anreicherung der heterolog produzierten Untereinheiten der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> -Dehydrogenase	115
3.7.1	Anreicherung durch Hitzufällung	115
3.7.2	Anreicherung durch Säulenchromatographie	115
3.7.2.1	Chromatographie an DEAE-Sephacel	115
3.7.2.2	Chromatographie an Hydroxylapathit	117
3.7.2.3	Chromatographie an Strep-Tactin	120
3.8	Proteineinschlußkörper als Anreicherungsschritt	121
3.8.1	Rekonstitution aus Proteineinschlußkörpern	121
3.9	Verbreitung von Methanophenazin in methanogenen Archaea	124
3.9.1	Stand der Vorarbeiten	124
3.10	Zellanzucht von <i>Ml. tindarius</i> in Massenkultur	125
3.11	Extraktion des Phenazin-Derivats aus Membranen von <i>Ml. tindarius</i>	126
3.12	Präparative Reinigung des Phenazin-Derivats aus <i>Ml. tindarius</i>	126
3.13	Strukturaufklärung des Phenazin-Derivats aus <i>Ml. tindarius</i>	128
3.13.1	Massenspektroskopie	128
3.13.2	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie	128
3.13.3	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie	132

3.14	Reaktionen von verschiedenen Elektronenakzeptoren und-donatoren mit gewaschenen Membranen von <i>Ml. tindarius</i>	133
3.14.1	Kopplung der Teilreaktionen des F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems durch Methanophenazin	135
3.15	Untersuchung gewaschener Membranen weiterer methanogener Organismen auf das Vorhandensein von Phenazin-Derivaten	139
3.15.1	HPLC der Isooktanrohextrakte	139
3.15.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie der Isooktanextrakte	141
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>143</b>
4.1	Betrachtungen zum Stoffwechsel der untersuchten Archaea	143
4.1.1	Sulfatreduktion durch <i>A. fulgidus</i> beim Wachstum mit Laktat + Sulfat	143
4.1.2	Methanbildung durch methanogene Archaea	147
4.1.2.1	Methanogenese beim Wachstum mit Methanol ohne H <sub>2</sub>	147
4.1.2.2	Methanogenese beim Wachstum mit H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	150
4.1.2.3	Methanbildung beim Wachstum mit Acetat	152
4.2	Energiekonservierende Systeme der methanogenen Archaea	154
4.2.1	Ionentranslozierende Reaktionen im H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> Stoffwechsel	155
4.2.2	Ionentranslozierende Reaktionen bei der Methanolumsetzung	161
4.2.3	Funktion von Methanophenazin im Acetatstoffwechsel	165
4.3	Betrachtungen zur Evolution des Komplex I aus Bacteria und Archaea	168
4.4	Der Reaktionsmechanismus der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> -Dehydrogenase	171
4.4.1	Reaktionsmechanismus der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	171
4.4.2	Möglicher Reaktionsmechanismus der F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> -Dehydrogenase	172
4.5	Expressionen in dem <i>E. coli</i> -Stamm Rosetta(DE3)	174
4.6	Betrachtungen zum Thema „inclusion bodies“	176
4.7	Rekonstitution aus Proteineinschlußkörpern mit Hilfe des Vectrase-CD-Systems	177
4.8	Phenazine aus Bacteria und Archaea und ihre Funktion	180
4.9	Chemische und biologische Synthese von Phenazin-Derivaten	184
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>186</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>188</b>