

Die Peroxidase-Aktivität Selenocystein-haltiger Proteine des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum*

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Tina Parther

geb. am 16. Juli 1974

in Nordhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. P. Dürre
3. Prof. Dr. L. Flohé

Tag der Verteidigung: 09. Juli 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005274

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005274>]

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	8
2.1. Organismen und Plasmide	8
2.1.1. Nährmedien	9
2.1.2. LB (Luria Bertani)-Medium (SAMBROOK, <i>et al.</i> , 1989)	9
2.1.3. Medium für die Anzucht von <i>E. acidaminophilum</i> (ZINDEL, <i>et al.</i> , 1988).....	9
2.1.4. Medienzusätze.....	10
2.2. Zellanzucht	10
2.2.1. Aerobe Zellanzucht	10
2.2.2. Anaerobe Anzuchten	11
2.2.3. Messung des Bakterienwachstums.....	11
2.2.4. Stammhaltung	11
2.3. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	11
2.3.1. Behandlung von Geräten und Lösungen	11
2.3.2. Phenol/Chloroform-Extraktion	12
2.3.3. Mikro dialyse von DNA-Lösungen (MARUSYK & SEARGEANT, 1980)	12
2.3.4. Fällung von Nukleinsäuren	12
2.3.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	12
2.4. Isolierung von Nukleinsäuren.....	13
2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	13
2.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. acidaminophilum</i>	14
2.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	14
2.5.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese	14
2.5.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	14
2.5.3. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA	15
2.5.4. Größenbestimmung von Nukleinsäuren.....	15
2.6. Enzymatische Modifikation von DNA	15
2.6.1. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	15
2.6.2. Ligation von DNA-Fragmenten	16
2.6.3. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin.....	16
2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	16
2.7.1. PCR mit <i>Taq</i> -DNA-Polymerase.....	16
2.7.2. PCR mit <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase.....	17
2.7.3. <i>Primer extension</i>	18

2.7.4.	Verwendete Primer.....	18
2.8.	Herstellung und Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone.....	19
2.8.1.	Transformation durch Elektroporation (DOWER, <i>et al.</i> , 1988).....	19
2.9.	Northern Hybridisierung.....	20
2.9.1.	Auftrennung von RNA und Northern Blot.....	20
2.9.2.	Hybridisierung.....	20
2.9.3.	Chemilumineszenznachweis.....	20
2.10.	Sequenzierung von DNA.....	21
2.10.1.	Sequenzierung am ABI377-Sequencer.....	21
2.10.2.	Auswertung der Sequenzdaten.....	21
2.11.	Präparation von zellfreien Extrakten.....	22
2.11.1.	Zellernte und Lagerung der Zellen.....	22
2.11.2.	Zellaufschluß.....	22
2.11.3.	Zentrifugation.....	23
2.12.	Bestimmung der Proteinkonzentration (BRADFORD, 1976, modifiziert).....	23
2.13.	Messung von Enzymaktivitäten.....	23
2.13.1.	Bestimmung von NADPH-Oxidase-Aktivität.....	24
2.13.2.	Aktivitätsmessung von Thioredoxin.....	24
2.13.3.	Messung von Peroxidase-Aktivität.....	24
2.13.4.	Messung von Peroxinitrit-Reduktase-Aktivität.....	26
2.14.	Methoden zur Proteinanreicherung.....	26
2.14.1.	Chromatographie an Anionenaustausch-Materialien.....	26
2.14.2.	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	27
2.14.3.	Gelpermeationschromatographie.....	27
2.14.4.	Affinitätschromatographie.....	27
2.15.	Entsalzen und Einengen von Proteinlösungen.....	28
2.15.1.	Dialyse.....	28
2.15.2.	Entsalzen durch Chromatographie an Bio-Gel PD-10.....	28
2.15.3.	Centricon-Konzentratoren.....	28
2.15.4.	Konzentrierung mittels (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung.....	28
2.15.5.	Konzentrierung mittels Polyethylenglykol.....	29
2.15.6.	Chloroform-Methanol-Fällung (WESSEL & FLÜGGE, 1984).....	29
2.16.	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	29
2.16.1.	SDS-PAGE nach LAEMMLI, 1970.....	29
2.16.2.	SDS-PAGE nach SCHÄGGER & VON JAGOW, 1987.....	31
2.16.3.	Native Gradienten-PAGE.....	31
2.17.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot) nach TOVEY & BALDO, 1989.....	32

2.18.	Proteinfärbungen in Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen.....	33
2.18.1.	Proteinfärbung mit Coomassie nach WEBER & OSBORN, 1969	33
2.18.2.	Silberfärbung nach BLUM, <i>et al.</i> , 1987.....	33
2.18.3.	Proteinfärbung auf Blotmembranen.....	33
2.19.	Markierung von Proteinen mit 4-Vinylpyridin.....	34
2.20.	pH-selektive Markierung von Seleno-Proteinen mit Iodoacetyl-LC- Biotin.....	34
2.21.	N-terminale Aminosäuresequenzierung und Massenbestimmung.....	34
2.22.	Immunologische Methoden	34
2.22.1.	Gewinnung von Antikörpern.....	34
2.22.2.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	35
2.22.3.	Immunopräzipitation.....	35
2.23.	Chemikalien.....	35
3.	Experimente und Ergebnisse.....	36
3.1.	Enzymatische Untersuchungen mit Rohextrakt von <i>E. acidaminophilum</i>	36
3.2.	pH-selektive Markierung von Seleno-Proteinen mit EZ-Link™Iodoacetyl-LC-Biotin	38
3.3.	Reinigung und Charakterisierung einer Peroxidase aus <i>E. acidaminophilum</i>	39
3.3.1.	Chromatographie an Q-Sepharose	40
3.3.2.	Chromatographie an Butyl-Sepharose	40
3.3.3.	Gelpermeations-Chromatographie an Sephacryl 200 HR.....	41
3.3.4.	Charakterisierung von Protein B hinsichtlich seiner Peroxidase-Aktivität.....	43
3.3.5.	Bestimmung der kinetischen Daten von Protein B	45
3.3.6.	Schutz der Glutamin-Synthetase vor Fe ³⁺ /DTT/O ₂ -vermittelter Inaktivierung durch Protein B aus <i>E. acidaminophilum</i>	46
3.3.7.	Beteiligung von Protein B an der NADPH-abhängigen Peroxidreduktion.....	47
3.4.	Untersuchungen zum nativen Elektronendonator von Protein B.....	49
3.4.1.	Reinigung einer NADPH-Oxidase aus <i>E. acidaminophilum</i>	49
3.4.2.	Komplementation der NADPH-abhängigen Peroxidreduktion.....	51
3.5.	Heterologe Expression von GrdB-Varianten in <i>E. coli</i>	55
3.5.1.	Zielgerichtete Mutagenese der konservierten Cysteine zu Alanin.....	55
3.5.2.	Expression der <i>grdB</i> -Varianten und Reinigung der rekombinanten Proteine.....	56
3.5.3.	Messung von Enzymaktivitäten	57
3.5.4.	Bestimmung des Selenocysteingehaltes durch Massenspektroskopie	59
3.6.	Simultane Expression von <i>grdB</i> und <i>grdE</i>	61
3.6.2.	Expression, Reinigung und Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	64
3.6.3.	Bindung von 2- ¹⁴ C-Glycin an die GrdB-Varianten.....	65
3.7.	Untersuchungen zu PrxU	66
3.7.1.	Molekularbiologische Untersuchungen der <i>prxU</i> -Genregion.....	66

3.7.2.	Heterologe Expression und Reinigung von PrxU und PrxU47C als Strep-tagII-Fusionsproteine	71
4.	Diskussion.....	84
4.1.	Eine Seleno-Protein-abhängige Peroxidase-Aktivität im Rohextrakt.....	84
4.2.	Die Peroxidase-Aktivität von Protein B	86
4.2.1.	Vergleich der Reinigungsschemen für Protein B.....	87
4.2.2.	Der Reaktionsmechanismus der Peroxidase-Aktivität.....	89
4.2.3.	Charakterisierung der Peroxidase-Aktivität von Protein B.....	93
4.3.	Die Funktion von GrdE.....	94
4.4.	Das Seleno-Peroxiredoxin	102
4.4.1.	Charakterisierung des <i>prxU</i> -Genproduktes.....	102
4.4.2.	Charakterisierung der <i>prxU</i> -Genregion aus <i>E. acidaminophilum</i>	107
4.4.3.	PrxU-Eine Linolsäurehydroperoxid-Reduktase	116
4.4.4.	Die native Struktur von PrxU.....	122
4.5.	Abschließende Betrachtungen zur Entstehung und Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies in anaeroben Mikroorganismen	124
4.6.	Ausblick.....	127
5.	Zusammenfassung	129
6.	Literaturverzeichnis	132

Anhang

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ΔE	Extinktionsänderung
ε	Extinktionskoeffizient
Ω	Ohm
μ -	mikro-
A	Adenin
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
Aktiv.	Aktivität
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Bettvolumen
c-	Zenti-
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
d	Schichtdicke
Da	Dalton
ddUTP	Didesoxyuridintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DH	Dehydrogenase
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxynuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiotreithol
e^-	Elektron
Ea	<i>E. acidaminophilum</i>
E_A	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
FTSC	Fluorescein-Thiosemicarbazid
G	Guanin
g	Gramm
g	Normfallbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAB	EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin
J	Joule
k-	Kilo-

K	Kelvin
K-Phosphat	Kaliumphosphat
kb	Kilobasenpaare
k_m	Michaelis-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LSP	Linolsäurehydroperoxid
m-	Milli-
m	Meter
m	Anstieg
M	molar
min	Minute
modif.	modifiziert
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Mpa	Megapascal
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n-	Nano-
N	Normal
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	$NADH+H^+$ Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	$NADPH+H^+$ (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NRO	NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase
NROR	NADPH:Rubredoxin-Oxidoreduktase
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OD_{550}	Optische Dichte bei 550 nm, bezogen auf 1 cm Schichtdicke
oPDA	ortho-Phenylendiamin
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ox.	oxidiert
p-	Pico-
Pa	Pascal
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykoll
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	universelle Gaskonstante
RBS	Ribosomenbindestelle
RE	Rohextrakt
red.	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
ROO	Rubredoxin: O_2 -Oxidoreduktase
ROX	GeneScan-500 Größenstandard
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SECIS	<i>selenocysteine insertion sequence</i>
SH	Thiolgruppe
SOD	Superoxid-Dismutase
SOR	Superoxid-Reduktase
spez.	spezifisch

SV	Säulenvolumen
<i>t</i> -	tertiär
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N', N', N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> -RNA
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
U	Uracil
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
ü. N.	über Nacht
V	Volt
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Aspartat	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	U	U (Sec)	Selenocystein
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	X		variable AS
M	Met	Methionin	Y	Tyr	Tyrosin

1. EINLEITUNG

Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffderivaten als Nebenprodukte im aeroben Stoffwechsel ist unvermeidlich. Molekularer Sauerstoff besitzt zwei ungepaarte Elektronen mit parallelem Spin in seinen Molekülorbitalen (jeweils ein Elektron im nicht-bindenden π^* Y und π^* Z Orbital und ein leeres Z Orbital). Daher ist Sauerstoff im Grundzustand gegenüber den meisten Stoffen, mit Ausnahme von Radikalen, unreaktiv. Doch bereits die Überführung von O_2 in den Singulettzustand 1O_2 (π -Elektronen mit antiparallelem Spin) erhöht seine Reaktivität und stellt die biologisch relevante angeregte Form des Sauerstoffmoleküls dar. Die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff führt zur Bildung des reaktiven Superoxidradikals O_2^- , welches unter sauren Bedingungen zu seiner protonierten Form HOO^\bullet (Hydroperoxyl-Radikal) übergeht (BIELSKI, 1985; FARR & KOGOMA, 1991). Durch die Übertragung eines weiteren Elektrons wird H_2O_2 gebildet, welches in der Lage ist, reduzierte Eisen- und Kupfer-Ionen zu oxidieren (Fenton-Reaktion) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; FARR & KOGOMA, 1991; STORZ & IMLAY, 1999). Das bei dieser Reaktion entstehende Hydroxylradikal OH^\bullet mit einem Standardelektronenpotential von +2300 mV gehört neben Ozon zu den reaktivsten Sauerstoff-Derivaten (FARR & KOGOMA, 1991; KWAN & VOELKER, 2003).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden in der Zelle von verschiedenen Komponenten und Enzymen gebildet. So stellt z. B. die Autooxidation der Flavin-haltigen Enzyme NADH-Dehydrogenase II, Succinat-DH, Sulfit-Reduktase und Fumarat-Reduktase in *Escherichia coli* die Hauptquelle für die Bildung von O_2^- und H_2O_2 dar (IMLAY & FRIDOVICH, 1991; MESSNER & IMLAY, 1999; STORZ & IMLAY, 1999). Die Glutathion-Reduktase, als Beispiel für cytosolische Proteine, ist in der Lage signifikante Mengen an Superoxidanion zu bilden (MASSEY, *et al.*, 1969; IMLAY & FRIDOVICH, 1991). Als weiteres Beispiel ist Cytochrom P-450 aus Leberzellen von Säugetieren zu nennen. P-450 repräsentiert bis zu 4% des Gesamtproteins und spielt eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von ROS (ESTABROOK & PETERSON, 1990). Auch nicht-enzymatische Reaktionen von O_2 mit Ubichinonen, Katecholen, Thiolen und Flavinen spielen eine signifikante Rolle bei der Generierung von O_2^- in der Zelle (FARR & KOGOMA, 1991). Wasserstoffperoxid entsteht in der Zelle hauptsächlich durch die von der Superoxid-Dismutase katalysierten Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 und O_2 , sowie durch die Übertragung von zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff, die durch verschiedene Oxidasen katalysiert wird (FARR & KOGOMA, 1991). Die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals erfolgt hauptsächlich durch die Oxidation von reduzierten Eisen-Ionen mit H_2O_2 im Zuge der Fenton-Reaktion (FARR & KOGOMA, 1991; STORZ & IMLAY, 1999; KWAN & VOELKER, 2003). Neben dieser wichtigen Quelle führen auch die Radiolyse des Wassers, sowie die Absorption von Photonen einer Wellenlänge von 365 nm durch Tryptophan-Resten zur Entstehung von OH^\bullet (HILL & ALLEN, 1978; VIEIRA, *et al.*, 1999). Die Aktivierung von molekularem Sauerstoff

zum Singulett-Sauerstoff erfolgt hauptsächlich durch die photosensitiven Reaktionen von O_2 mit Riboflavinen und Photopigmenten, sowie durch die Spaltung von Superoxid und peroxidiertem Glutathion (FOOTE, 1982; SIES, 1986; FUKUZAWA, 2000). Weiterhin wird 1O_2 durch die Reaktion von H_2O_2 mit freiem oder gebundenem Cu^{2+} gebildet. (FRELON, *et al.*, 2003). Ozon (O_3) entsteht im Zuge der Luftverschmutzung während der Photoreaktion von molekularem Sauerstoff unter Beteiligung von Kohlenwasserstoffen (FARR & KOGOMA, 1991).

ROS schädigen eine Vielzahl von Biomolekülen, wie z. B. Lipide, Proteine und DNA, deren biologische Funktionen dadurch beeinträchtigt werden. Durch das Superoxidanion O_2^- werden vor allem Thiole, Ascorbate, Tocopherole und Katecholamine oxidiert (FRIDOVICH, 1989; HILL & ALLEN, 1978; FARR & KOGOMA, 1991). Proteine, die ein $[Fe-S]_4$ -Cluster besitzen, sind besonders sensitiv gegenüber der Oxidation durch dieses reaktive Sauerstoffderivat (GARDNER & FRIDOVICH, 1991; STORZ & IMLAY, 1999). Die bei weitem wichtigste Reaktion von O_2^- in diesem Zusammenhang stellt dessen spontane Dismutation zu H_2O_2 und O_2 dar (FRIDOVICH, 1989). Wie bereits erwähnt, reagiert ersteres schnell mit kontaminierenden Metall-Ionen und führt somit zu der Entstehung des toxischen Hydroxylradikals (FARR & KOGOMA, 1991; STORZ & IMLAY, 1999; KWAN & VOELKER, 2003). Aber auch H_2O_2 selbst stellt ein schwaches Oxidationsmittel dar. Neben der Oxidation von Thiolgruppen in Proteinen bzw. reduziertem Glutathion ist es auch zur direkten Reaktion mit Keto-Säuren befähigt. Auf Grund seiner hohen Reaktivität reagiert das Hydroxylradikal OH^\bullet mit Diffusions-limitierter Geschwindigkeit mit fast allen Biomolekülen (SINGH & SINGH, 1982; STORZ & IMLAY, 1999; COSTA SEAVER & IMLAY, 2001). So führen die Reaktionen des Radikals mit DNA zur Blockierung der Replikation sowie zu Strangbrüchen und können somit eine hohe Mutagenität bedingen (IDE, *et al.*, 1985; BREIMER & LINDAHL, 1984; IMLAY & LINN, 1986; BREEN & MURPHY, 1995; CADET, *et al.*, 1997; POGOZELSKI & TULLIUS, 1998). Neben der direkten Oxidation von Thiolgruppen und Aminen beinhalten die Reaktionen von Biomolekülen mit dem ebenfalls hochreaktiven Ozon die Bildung von Ozonoiden (zyklischen Peroxiden), H_2O_2 und Aldehyden, sowie die Reaktionen mit ungesättigten Fettsäuren (Diene) (MENZEL, 1984; SQUADRITO, *et al.*, 2000). Die Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf Biomoleküle belaufen sich auf Additionsreaktionen mit konjugierten Bindungen, Olefinen (Bildung von Allylhydroperoxiden) und Dienen (Entstehung von Endoperoxiden), wie sie z. B. in ungesättigten Fettsäuren und Histidinen vorkommen (FOOTE, 1982; PIERLOT, *et al.*, 2000). Singulett-Sauerstoff gilt daher als Initiator der Lipidperoxidation (KAPPUS, 1985; FARR & KOGOMA, 1991; KIM, *et al.*, 2002). Ebenso wird die Schädigung von DNA durch 1O_2 diskutiert (RAVANAT, *et al.*, 2001)

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die Entstehung von ROS innerhalb des aeroben Stoffwechsels unvermeidlich. Zum Schutz vor deren toxischer Wirkung haben aerob lebende Zellen vielfältige Mechanismen entwickelt. Die Entgiftung von ROS kann dabei sowohl auf enzymatischem Wege durch die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (SOD), als auch auf nicht-enzymatischem Wege

durch Antioxidantien, wie z. B. β -Karatine, Glutathion, α -Tocopherol, Ascorbat und Bilirubin erfolgen. Weiterhin können bereits durch ROS entstandene Schädigungen durch verschiedene Enzyme behoben werden. Dazu gehören z. B. DNA-Reparatur-Systeme, Glutathion-Peroxidasen, Peroxiredoxine und Methioninsulfoxid-Reduktasen (JACOBSON, *et al.*, 1989). Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Katalase als ein in der Natur weit verbreitetes Enzym erkannt (BERGMAYER, 1970). Dieses Fe-haltige Protein katalysiert die Disproportionierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 und ist in aeroben bzw. aerotoleranten Organismen weit verbreitet. Man unterscheidet zwei Arten von Häm-Katalasen: monofunktionale Katalase, welche in Eukaryoten, Prokaryoten und Archaea vorkommt und ausschließlich die Disproportionierungsreaktion katalysiert, sowie die in Prokaryoten und Archaea gebildete bifunktionale Katalase-Peroxidase, die sowohl über eine Katalase-, als auch über eine Peroxidase-Aktivität verfügt (BROWN-PETERSON & SALIN, 1995; FRAAIJE, *et al.*, 1996; LOEWEN, 1996; ROCHA & SMITH, 1997; TERZENBACH & BLAUT, 1998). Die Entgiftung des Superoxidradikals erfolgt durch die Reaktion der Superoxid-Dismutase (SOD), welche die Disproportionierung von O_2^- zu H_2O_2 und O_2 katalysiert (McCORD & FRIDOVICH, 1969). In Abhängigkeit von der Art der metallischen Co-Faktoren unterscheidet man Cu/Zn-, Mn-, Fe- und Ni-SODs (YOUN, *et al.*, 1996). Cu/Zn-haltige SODs konnten sowohl in Eukaryoten, als auch in Bakterien identifiziert werden. In Mitochondrien und Prokaryoten wurden Mn-SODs detektiert, das Vorkommen von Fe-SODs hingegen beschränkte sich bislang auf Prokaryoten und Chloroplasten (SMITH & DOOLITTLE, 1992), kürzlich wurde jedoch auch eine cytosolische Fe-haltige SOD in der Hefe *Rhodotorula glutinis* identifiziert (RADCHAUDRI, *et al.*, 2003). Ni-haltige SODs sind bislang nur in *Streptomyces* Spezies beschrieben worden (YOUN, *et al.*, 1996; KIM, *et al.*, 1996; LECLERE, *et al.*, 1999).

Zur Entgiftung von Alkylhydroperoxiden (z. B. Lipidperoxide) in der Zelle sind spezielle Peroxidasen in der Lage. Zu ihnen gehören die bereits erwähnten Häm-haltigen Katalase-Peroxidasen, Peroxidasen mit Mangan oder Vanadium als prosthetische Gruppe, sowie die zu den Vertretern der Pyridinnukleotid:Disulfid-Oxidoreduktasen homologen NADH-Peroxidasen (STEHLE, *et al.*, 1993; CLAIBORNE, *et al.*, 1999). Als eine der wichtigsten gilt jedoch die in eukaryotischen und Gram-negativen prokaryotischen Organismen vorkommende Glutathion-Peroxidase (Gpx). Dieses erstmals 1957 von (MILLS, 1957) beschriebene Enzym enthält keine für Peroxidasen typischen prosthetischen Gruppen wie Häm oder Flavine. Das redoxaktive Zentrum wird durch die Se^- -Gruppe eines Selenocysteins repräsentiert (FORSTROM, *et al.*, 1978; ARTHUR, 2000). Die Reduktion von Hydroperoxiden erfolgt dabei unter Nutzung von zwei Molekülen Glutathion als Elektronendonator (FLOHÉ, 1989). Bislang unterscheidet man vier Vertreter der Selen-haltigen Säuger-Glutathion-Peroxidasen. Gpx 1 oder auch cytosolische Gpx vermag ebenso wie Gpx 2 (gastrointestinale Gpx) H_2O_2 und eine Reihe organischer Peroxide (z. B. Fettsäurehydroperoxide) umzusetzen (SUNDE, 1989; CHU, *et al.*, 1993; ARTHUR, 2000). Bei Gpx 3 handelt es sich um ein Plasmaprotein mit ebenfalls antioxidativer Funktion (TAKAHASHI, *et al.*, 1987; ARTHUR, 2000). Gpx 4 ist eine

Phospholipidhydroperoxid Glutathion-Peroxidase (PHGPx), die im Gegensatz zu den Gpx 1-3 ein breites Spektrum an Lipidperoxiden reduzieren kann und ein wichtiges Membran-Reparatursystem in Säuger-Organismen darstellt (URSINI, *et al.*, 1995).

1989 wurde von (JACOBSON, *et al.*, 1989) erstmals in einem Enterobakterium ein NADP(H)-abhängiges Peroxidasensystem beschrieben, welches in der Lage war, sowohl H₂O₂ als auch Alkylhydroperoxide zu H₂O bzw. den entsprechenden Alkoholen zu reduzieren. Bestandteil dieses Enzymsystems ist ein ca. 22 kDa großes Protein, welches außer einem Thiol-haltigen redoxaktiven Zentrum keine weiteren Co-Faktoren enthält und keinerlei Sequenzhomologien zu Katalasen, Superoxid-Dismutasen oder Glutathion-Peroxidasen aufwies. Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnten konnte eine Vielzahl dieser als Peroxiredoxine bezeichneten Proteine in allen Domänen des Lebens identifiziert und charakterisiert werden (VERDOUCQ, *et al.*, 1999). Peroxiredoxine katalysieren die Reduktion von Peroxiden, benötigen jedoch ähnlich wie Glutathion-Peroxidasen mindestens eine weitere Enzymkomponente zur Übertragung der für die Reduktion notwendigen Elektronen von NADP(H) auf das Peroxiredoxin (JACOBSON, *et al.*, 1989). Innerhalb der Peroxiredoxin-Familie unterscheidet man zwei Cluster: 1-Cys- Peroxiredoxine (1-Cys-Prx) und 2-Cys-Peroxiredoxine (2-Cys-Prx). Die letztgenannte Gruppe kann dabei in zwei weitere Klassen, den typischen und den atypischen 2-Cys-Peroxiredoxinen eingeteilt werden (WOOD, *et al.*, 2003). Alle Vertreter der Peroxiredoxin-Familie enthalten ein konserviertes Cystein im N-terminalen Bereich der Polypeptidkette, welches essentiell für die enzymatische Aktivität ist (CHAE, *et al.*, 1993; JEONG, *et al.*, 1999; KONG, *et al.*, 2000). Die typischen 2-Cys-Peroxiredoxine (z. B. AhpC aus *S. typhimurium* oder das Thiol-spezifische Antioxidant aus *Saccharomyces cerevisiae*) besitzen hohe Sequenzhomologien zu 1-Cys-Peroxiredoxinen, weisen jedoch zusätzlich einen zweiten, im C-terminalen Abschnitt des Proteins lokalisierten reaktiven Cystein-Rest auf (CHAE, *et al.*, 1993; JACOBSON, *et al.*, 1989). Atypische 2-Cys-Peroxiredoxine besitzen ebenfalls ein zweites redoxaktives Cystein, dieses befindet sich jedoch auch im N-terminalen Bereich des Proteins. Zu diesen Enzymen gehören das Bacterioferritin-assoziierte Protein aus *E. coli* (JEONG, *et al.*, 2000) und PrxQ aus *Sedum lineare* (KONG, *et al.*, 2000). Neben diesen wurden außerdem Typ II-Peroxiredoxine beschrieben, die ebenfalls ein N-terminal lokalisiertes essentiellens Cystein besitzen, jedoch nur geringe Sequenzhomologie zu den bereits genannten Peroxiredoxin-Vertretern aufweisen. Sie werden jedoch aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und Reaktionsmechanismus ebenfalls in diese Proteinfamilie eingeordnet (JEONG, *et al.*, 1999). Je nach Art ihres Elektronendonors unterscheidet man im allgemeinen Alkylhydroperoxid-Reduktasen und Thioredoxin-abhängige Peroxidasen (KANG, *et al.*, 1998). Als Beispiele für Alkylhydroperoxid-Reduktasen gelten neben dem bereits erwähnten AhpC/AhpF-System aus *S. typhimurium* (JACOBSON, *et al.*, 1989) die entsprechenden Systeme aus *Bacillus subtilis* (ANTELMAN, *et al.*, 1996), *Amphibacillus xylanus* (NIIMURA, *et al.*, 2000) und *E. coli* (COSTA SEAVER & IMLAY, 2001). Die Reduktion des hier mit AhpC (Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C) bezeichneten Peroxiredoxins wird von einem ca. 55 kDa großem FAD-

haltigen, zu der Familie der NADH:Peroxiredoxin Oxidoreduktasen gehörenden Protein (AhpF) übernommen. Im Gegensatz dazu fungiert im Falle der Thioredoxin-abhängigen Peroxidasen das Thioredoxin-System, welches aus Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase besteht, als elektronenübertragende Komponente. Als Beispiele für diese Enzymsysteme sind Thioredoxin-abhängige Peroxidasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (CHAE, *et al.*, 1994), Mitochondrien (WATABE, *et al.*, 1997), *Helicobacter pylori* (BAKER, *et al.*, 2001) und *Chlamydomonas reinhardtii* (GOYER, *et al.*, 2002) zu nennen. Neben diesen wurden kürzlich auch pflanzliche und bakterielle Glutaredoxin-abhängige Peroxiredoxine beschrieben (ROUHIER, *et al.*, 2001; REYNOLDS, *et al.*, 2002). Eine Besonderheit stellt das Tryparedoxin-Peroxidase-System aus Trypanosomen dar. In diesem Fall erfolgt die Re-Reduktion der zur Familie der 2-Cys-Peroxiredoxine gehörenden Tryparedoxin-Peroxidase durch Tryparedoxin, einem dem Thioredoxin verwandten Proteins, das wiederum durch die niedermolekulare Verbindung N^7, N^8 -bis(Glytathionyl)-Spermidin (Trypanothion) reduziert wird (NOGOCEKE, *et al.*, 1997; LÜDEMANN, *et al.*, 1998; LOPEZ, *et al.*, 2000). Für menschliche 1-Cys-Peroxiredoxine ist Glutathion als Elektronendonator identifiziert worden (FISHER, *et al.*, 1999; MANEVICH, *et al.*, 2002).

Neben den bisher erwähnten Enzymen existieren in der Zelle noch weitere Reparatursysteme für bereits oxidativ geschädigte Biomoleküle. Zu diesen gehören DNA-Reparatursysteme, wie die Exonuklease III, DNA-Polymerasen, RecA (STORZ & IMLAY, 1999; TOUATI, 2000) und das bakterielle unspezifische DNA-Binde-Protein Dps (ALMIRON, *et al.*, 1992), sowie die ubiquitär vorkommende Methioninsulfoxid-Reduktase. Letztere reduziert in Proteinen die durch ROS zu Methioninsulfoxid oxidierten Methioninreste und stellt somit die Funktionsfähigkeit der geschädigten Proteine wieder her (MOSKOVITZ, *et al.*, 1999). Bislang sind zwei Enzym-Formen bekannt, die stereospezifisch entweder Methionin-*S*-sulfoxid (MsrA) oder Methionin-*R*-sulfoxid (SelR) umsetzen (SHAROV, *et al.*, 1999; MOSKOVITZ, *et al.*, 2000). Während MsrA keine Co-Faktoren aufweist, handelt es sich bei SelR um ein Selenocystein-haltiges Protein (KRYUKOV, *et al.*, 2002). Die antioxidativen Eigenschaften der ebenfalls Selen-haltigen Säuger-Thioredoxin-Reduktase, die die Übertragung der Elektronen von NADPH auf oxidiertes Thioredoxin überträgt, beruhen in der Hauptsache auf deren Fähigkeit, sowohl Lipidhydroperoxide (BJÖRNSTEDT, *et al.*, 1995) als auch H_2O_2 zu reduzieren (ZHONG, *et al.*, 2000a).

Die hohe Sensitivität obligat anaerober Prokaryoten gegenüber Sauerstoff wurde zunächst dem Fehlen jeglicher Schutzmechanismen gegenüber ROS zugeschrieben (McCORD, *et al.*, 1971). Jedoch konnte im Laufe der Zeit diese Theorie eindeutig durch die Detektion verschiedenster ROS-Entgiftungsenzyme in obligat anaeroben Organismen widerlegt werden (UESUGI & YAJIMA, 1978). So wurde z. B. in dem anaeroben Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg das Gen für eine SOD (MEILE, *et al.*, 1995) und in dem Bakterium *Desulfovibrio vulgaris* ein Katalase-Gen (KITAMURA, *et al.*, 2001) identifiziert. Beweise für das Vorhandensein entsprechender aktiver

Proteine wurden für *Methanosarcina barkeri* erbracht (SHIMA, *et al.*, 1999; BRIOUKHANOV, *et al.*, 2000). Weiterhin konnten im Rahmen der Gesamtgenom-Sequenzierungen in den Genomen von *Clostridium perfringens* (SHIMIZU, *et al.*, 2002), *Clostridium difficile* (die DNA-Sequenz des Genoms sind unter www.sanger.ac.uk veröffentlicht), *Methanococcus jannaschii* (BULT, *et al.*, 1996) und *Pyrococcus furiosus* (ROBB, *et al.*, 2001) Bereiche mit hohen Homologien zu Peroxiredoxinen detektiert werden. *C. perfringens*, und *C. difficile* verfügen neben diesen auch über SOD-ähnliche Gene (SHIMIZU, *et al.*, 2002; www.sanger.ac.uk). Im Jahre 1999 wurde erstmals in strikt anaeroben, Sulfat-reduzierenden Bakterien eine SOD-Aktivität für ein als Desulfoferrodoxin bezeichnetes Protein nachgewiesen (ROMAO, *et al.*, 1999). Im gleichen Jahr konnte durch (JENNEY, *et al.*, 1999) gezeigt werden, daß es sich bei dieser Art von Proteinen um eine offenbar nur in anaeroben Organismen vorkommende Superoxid-Reduktase (SOR) handelt. Diese Proteine können bis zu zwei katalytische, Eisen-haltige Zentren enthalten (COEHLO, *et al.*, 1997) und katalysieren im Gegensatz zur SOD hauptsächlich die Reduktion und nicht die Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 (JENNEY, *et al.*, 1999). Weiterhin konnten in Sulfat-reduzierenden Bakterien zwei Proteine (Nigerythrin und Rubrerythrin) charakterisiert werden, die die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O katalysieren (COULTER & KURTZ, 2001). Als Elektronendonator für Rubrerythrin, Nigerythrin und SOR wird Rubredoxin diskutiert (JENNEY, *et al.*, 1999; COULTER & KURTZ, 2001).

Der im Rahmen vorliegender Arbeit untersuchte Organismus *Eubacterium acidaminophilum* ist ein Gram-positives obligat anaerobes Bakterium (ZINDEL, *et al.*, 1988), das dem Cluster XI der Clostridien zugeordnet wird (BAENA, 1999). Es ist in der Lage, Glycin in einer gekoppelten Oxidation-Reduktions-Reaktion, die als Stickland-Reaktion (STICKLAND, 1934) bezeichnet wird, zu verwerten. Während Glycin dabei sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor dienen kann, werden die Glycin-Derivate Sarkosin (N-Methylglycin) und Betain (N,N,N-Trimethylglycin) ausschließlich als Elektronenakzeptoren genutzt (ZINDEL, *et al.*, 1988). Durch den Glycin-Decarboxylase-Komplex wird ein Teil des Glycins zu Ammoniak, CO_2 und Metylen-Tetrahydrofolat oxidiert. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente werden über die Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin direkt auf den Glycin-Reduktase-Komplex übertragen. (DIETRICH, *et al.*, 1991b; ANDREESEN, 1994). Dieser besteht aus drei Komponenten, dem substratspezifischen Seleno-Protein B (WAGNER, *et al.*, 1999), Seleno-Protein A (DIETRICH, *et al.*, 1991b) sowie Protein C (SCHRÄDER & ANDREESEN, 1992), die die reduktive Desaminierung des Glycins (bzw. Sarkosins und Betains) zu Ammoniak (bzw. Methylamin und Tetramethylamin) und Acetylphosphat katalysieren. Neben Seleno-Protein A und B der Glycin-Reduktase zeichnet sich *E. acidaminophilum* durch das Vorhandensein weiterer Selenocystein-haltiger Proteine aus. Bislang konnten insgesamt acht verschiedene Seleno-Proteine bzw. -Gene in diesem Organismus nachgewiesen werden. Dazu gehörte ein 22 kDa großes Protein, das anhand von ^{75}Se -Markierung gereinigt und als mögliches Peroxiredoxin identifiziert wurde. Das Gen dieses Proteins konnte kloniert und die Präsenz des Selenocystein-codierenden *in frame* UGA-Codon bestätigt werden. Weiterhin ließ sich eine NADPH-

abhängige Peroxidreduktion im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* nachweisen, deren daran beteiligten Proteinkomponenten jedoch bislang nicht angereichert und charakterisiert werden konnten (PARTHER, 1998; SÖHLING, *et al.*, 2001).

An dieser Stelle weiterführende Untersuchungen mit *E. acidaminophilum* sollten Einblicke in die Prozesse der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffderivaten in dem obligat anaeroben Organismen geben. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Reinigung und Charakterisierung des für die Peroxidase-Aktivität verantwortlichen Proteins und der Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Peroxid-Reduktion.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Organismen und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht über verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp/Phenotyp	Herkunft/ Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue-MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96relA1</i> , <i>lac</i> [F'proAB, <i>lacI^q</i> Δ M15, Tn10(Tetr)]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB-mB-) <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> MN1	F ⁻ <i>proC23 trp30 his51 lac28 rpsL101 λ selC163 $\Delta(srl-recA)306::Tn10$</i>	(TORMAY, <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. acidaminophilum</i>	Wildtyp DSM 3953	(ZINDEL, <i>et al.</i> , 1988)

Die eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Merkmal	Referenz
pASK-IBA 3	Expressionsvektor, Amp ^r , fl-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>t_{lpp}</i> , <i>tet</i> repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, Strep-tag II C-terminal	IBA, Göttingen
pASK-IBA 5	Expressionsvektor, Amp ^r , fl-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>t_{lpp}</i> , <i>tet</i> repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, Strep-tag II N-terminal	IBA, Göttingen
pASBC4	pACYC184:: <i>selB_{Ea.}</i> , <i>selC_{Ea.}</i> , in Richtung Tc ^R - Promotor,	(GURSINSKY, 2002)
pML23	pUC18::3,5 kb <i>HindIII</i> -Fragment	(LÜBBERS & ANDREESEN, 1993)
pDS9	pBluescriptSK(-)::7,45 kb <i>EcoRI</i> -Fragment	(SONNTAG, 1998)
pPX2	pUC18::4,1 kb <i>Sau3A</i> -Fragment	(SÖHLING, <i>et al.</i> , 2001)
pPrxU	pASK-IBA3:: <i>prxU-orf</i> (PrxU)	diese Arbeit
pPrxU47C	pASK-IBA3::mutierter <i>prxU-orf</i> , Austausch Sec ₄₇ zu Cys (PrxU47C)	diese Arbeit
pIBA5B	pASK-IBA5:: <i>grdB1-orf</i> (GrdB)	(REUTER, 2000)
pIBA5MBU	pASK-IBA5::mutierter <i>grdB1-orf</i> , Austausch Sec ₃₅₀ zu Cys (GrdB1U350C)	(REUTER, 2000)
pGrdB1C353A	pASK-IBA5::mutierter <i>grdB1-orf</i> , Austausch Cys ₃₅₃ zu Ala (GrdB1C353A)	diese Arbeit
pGrdB1C356A	pASK-IBA5::mutierter <i>grdB1-orf</i> , Austausch Cys ₃₅₆ zu Ala (GrdB1C356A)	diese Arbeit
pGrdBE	pASK-IBA5::mutierter <i>grdB1-orf</i> , Austausch Sec ₃₅₀ zu Cys, und <i>grdE</i> als Transkriptionseinheit	diese Arbeit
pGrdBE25	pASK-IBA5::mutierter <i>grdB1-orf</i> , Austausch Sec ₃₅₀ zu Cys, und <i>grdE</i> -Bereich 0-722 als Transkriptionseinheit	diese Arbeit
pGrdBE22	pASK-IBA5::mutierter <i>grdB1-orf</i> , Austausch Sec ₃₅₀ zu Cys, und <i>grdE</i> -Bereich 722-1283 als Transkriptionseinheit	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 2

pTrxA	pASK-IBA3:: <i>trxA-orf</i>	diese Arbeit
pTrxB	pASK-IBA3:: <i>trxB-orf</i>	diese Arbeit

2.1.1. Nährmedien

2.1.2. LB (Luria Bertani)-Medium (SAMBROOK, *et al.*, 1989)

LB-Medium wurde zur Anzucht aller verwendeten *E. coli* Stämme eingesetzt.

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ Odest.	ad 1 l

2.1.3. Medium für die Anzucht von *E. acidaminophilum* (ZINDEL, *et al.*, 1988)

Glycin	50,0 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	17,1 mM
KCl	6,7 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	1,0 mM
NH ₄ Cl	4,7 mM
Resazurin (1g/l)	4,0 nM
Spurenelementlösung SL A (s. u.)	1 ml/l

Zugabe nach dem Autoklavieren:

NaHCO ₃ (8,4% (w/v))	50,0 mM
D-(+)-Biotin (10 mg/ml)	82,0 nM
Na ₂ S x 9 H ₂ O (6% (w/v))	2,7 mM

Die Herstellung des anaeroben Mediums erfolgte nach der von (BRYANT, 1972) modifizierten Hungate-Technik unter N₂-Atmosphäre. Zum Entfernen des im Stickstoff enthaltenen Restsauerstoffs wurde das Gas über einen auf ca. 400°C erhitzten Kupferkatalysator (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden) geleitet. Nach Zugabe der NaHCO₃- und Biotinlösung wurde der pH-Wert mit 1 N bzw. 5 N HCl im Falle des 100 l Fermenters auf 7,4-7,6 eingestellt.

Spurenelementlösung SL A nach (HORMANN & ANDREESEN, 1989)

Substanz:	Einwaage/Volumen:	Endkonzentration im Medium [M]:
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g	7,5 x 10 ⁻⁶
ZnCl ₂	0,07 g	5,15 x 10 ⁻⁷
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g	5,15 x 10 ⁻⁷
H ₃ BO ₃	0,006 g	9,75 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g	8,05 x 10 ⁻⁸
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002 g	1,25 x 10 ⁻⁸
NiCl ₂ x H ₂ O	0,024 g	1,05 x 10 ⁻⁷
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,033 g	1,05 x 10 ⁻⁷
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,26 g	1,05 x 10 ⁻⁶
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036 g	1,55 x 10 ⁻⁷
HCl (25% (v/v))	10 ml	
H ₂ Odest.	ad 1 l	

Zunächst wurde das FeCl₂ in der angegebenen Menge HCl vollständig gelöst und mit H₂Odest. aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe der restlichen Substanzen. Die Lösung wurde autoklaviert und konnte über einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert werden.

2.1.4. Medienzusätze

Tab. 3 : Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	125 mg/ml in H ₂ O	125 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	40 µg/ml
Tetracyclin	24 mg/ml in Ethanol/H ₂ O 1:1	12 µg/ml

Die Medienzusätze wurden nach dem Autoklavieren den abgekühlten Medien zugegeben. Die Stammlösungen der Medienzusätze wurden sterilfiltriert und konnten bei -20°C für längere Zeit gelagert werden.

2.2. Zellanzucht

2.2.1. Aerobe Zellanzucht

Die in Tab. 1 aufgeführten *E. coli*-Stämme wurden aerob bei 30°C oder 37°C in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (Typ KS 500, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) bzw. einem Reziproschüttler (Typ HS 500, Janke & Kunkel) bei 125-200 Upm in LB-Medium kultiviert. Je nach Bedarf wurde Antibiotika in der entsprechenden Konzentration (s. 2.1.4.) dem Medium zugesetzt.

2.2.2. Anaerobe Anzuchten

Die Anzucht von *E. acidaminophilum* erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Für Vorkulturen bzw. Hauptkulturen zur RNA-Isolierung kamen Hungate-Röhrchen (16 x 125 mm, Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden) zum Einsatz. Die Anzucht von größeren Kulturvolumina erfolgte in 100 ml bzw. 1 l-Serumflaschen (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden). Das Medium wurde mit 10% Inokulum beimpft und bei 30 bzw. 37°C über Nacht ohne Schütteln inkubiert. Die 100 l-Anzucht von *E. acidaminophilum* erfolgte in einem 100 l Fermenter des Instituts für Biotechnologie (MLU, Halle) unter schwachem Rühren.

2.2.3. Messung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde als Änderung der optischen Dichte bei 600 nm direkt in Hungate-Röhrchen oder in Plastikkuvetten (Roth, Karlsruhe) mit einem Spekol 1200 (Analytik Jena GmbH, Jena) bzw. Uvikon Spektrophotometer 930 (Kontron, Zürich, Schweiz) bestimmt. Überschritt die OD₆₀₀ den Wert von 0,5, wurde die Probe mit Nährmedium entsprechend verdünnt.

2.2.4. Stammhaltung

Anaerobe Kulturen von *E. acidaminophilum* konnten in Hungate-Röhrchen bei 4°C für mind. 3 Monate als Inokulum für neue Kulturen verwendet werden. Für die längerfristige Lagerung der in Tab. 1 aufgeführten *E. coli*-Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 10 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum (s. 2.1.4.)) mit einer Einzelkolonie inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Phase bei 37°C kultiviert. 900 µl Kultur-Lösung wurden 900 µl einer LB-Glycerin-Mischung (1:1) zugesetzt (Endkonzentration Glycerin: 25% (v/v)). Diese Mischung wurde bei -80°C eingefroren und konnte so über mehrere Jahre gelagert werden. Eine kurzfristige Lagerung war auf LB-Platten (ggf. mit Antibiotikum (s. 2.1.4.)) bei 4°C möglich.

2.3. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1. Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle Geräte und hitzestabile Lösungen wurden bei 121°C für 25 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96%igem (v/v) Ethanol gespült, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert. Für Arbeiten mit RNA wurden alle Lösungen zuerst mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation (FEDORCSAK & EHRENBERG, 1966) und wird durch Autoklavieren zu CO₂ und Ethanol zersetzt (KUMAR & LINDBERG, 1972). Nicht autoklavierbare Gefäße wurden

nacheinander mit 3% (v/v) H₂O₂ und DEPC behandeltem H₂O_{dest.} ausgespült. Für die Arbeiten selbst wurden stets Einweghandschuhe getragen.

2.3.2. Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wäßrigen DNA-Lösungen wurde der Lösung 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, sorgfältig gemischt und für 2 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand enthielt die gereinigte DNA. Um verbliebene Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, wurde 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, gründlich gemischt und wie oben beschrieben zentrifugiert.

2.3.3. Mikrodialyse von DNA-Lösungen (MARUSYK & SEARGEANT, 1980)

Die Mikrodialyse diente zur Entsalzung von DNA-Lösungen, speziell Ligationsansätzen, die zur Elektroporation eingesetzt werden sollten. Dazu wurde steriles H₂O_{dest.} in eine sterile Petrischale gefüllt und der Membranfilter (Porengröße 0,025 µm, Millipore GmbH, Eschborn) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Anschließend wurde die zu entsalzende DNA-Probe auf den Membranfilter pipettiert und nach 30 min wieder abgenommen.

2.3.4. Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von Nukleinsäuren diente zu ihrer weiteren Reinigung und Aufkonzentrierung. Für eine Ethanol-fällung wurden der zu fällenden Lösung 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Vol 96% (v/v) eiskalter Ethanol zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei -80°C oder einer Inkubation bei -20°C über Nacht wurde die Probe zentrifugiert (20 min, 13000 Upm, 4°C). Das erhaltenen Pellet wurde mit 70% (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 Upm, 4°C) ca. 10 min bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde dann in sterilem H₂O_{dest.} aufgenommen. Für die Aufarbeitung von Sequenzreaktionen wurde auf RT erwärmter Ethanol verwendet. Die Zentrifugationsschritte erfolgten ebenfalls bei 25°C. Bei der Isopropanolfällung wurde statt Ethanol 0,7 Vol. Isopropanol zugesetzt und wie oben beschrieben verfahren. Dabei war keine Inkubation erforderlich.

2.3.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (Gene Quant, Pharmacia, Freiburg). Bei einer Absorption von 1 wurde von folgenden Konzentrationen ausgegangen (SAMBROOK, *et al.*, 1989):

doppelsträngige DNA	50 µg/ml
RNA	40 µg/ml
Oligonukleotide	31 µg/ml

Die Reinheit von Nukleinsäuren konnte ebenfalls durch photometrische Messungen bestimmt werden. Bei Protein-freien Nukleinsäure-haltigen Lösungen sollte das Verhältnis OD_{260nm} zu OD_{280nm} bei 1,8 liegen. Weiterhin konnte die Konzentration von Plasmiden oder DNA-Fragmenten im Agarosegel (s. 2.5.1.) durch Vergleich der Bandenintensitäten mit DNA bekannter Konzentration abgeschätzt werden. Als Mengenstandard dienen 'ds Control-DNA' aus dem Autoread™ Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg) sowie M13 DNA (Pharmacia, Freiburg).

2.4. Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA

2.4.1.1. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (BIRNBOIM & DOLY, 1979)

Die Präparation von rekombinanten Plasmiden aus den in dieser Arbeit aufgeführten *E. coli*-Stämmen beruhte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart von SDS. Dazu wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei 12000 Upm, 30 s zentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH8,0 (HCl)) vollständig resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) und vorsichtigem Mischen erfolgte die Lysis der Zellen. Nach Neutralisation mit 150 µl eiskalter Lösung 3 (3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure) wurde vorsichtig gemischt und die Probe 3-5 min auf Eis inkubiert. Das Plasmid lag nun in renaturierter Form vor. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 Upm (5 min), um präzipitierte chromosomale DNA und denaturierte Proteine abzutrennen. Der so gewonnene Überstand wurde durch Zugabe von 5 µl RNase-Stammlösung (10 mg/ml H₂O, zur Entfernung von DNase vor Gebrauch 10 min kochen) einem 15 minütigen RNase-Verdau bei 37°C unterzogen. Um Proteinreste aus der Lösung zu entfernen, erfolgte anschließend eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.3.2.). Im Anschluß daran wurde eine Fällung der Plasmid-DNA mit Isopropanol (s. 2.3.4.) durchgeführt und das dadurch erhaltene Pellet in 20-50 µl sterilem H₂O dest. aufgenommen.

2.4.1.2. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen fand der E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I und der E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab, Erlangen) Anwendung. Die Präparation von *High-Copy*-Plasmiden erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.4.1.3. Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung präparativer Mengen von Plasmid-DNA wurde ein Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Es wurde nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers gearbeitet. Dabei wurde dem 3fachen Kulturvolumen (75 ml) die 3fache Puffermenge (P1-P3) zugesetzt. Die Säule wurde jeweils mit einem Drittel des Überstandes beladen und stets neu äquilibriert. Das Pellet wurde in 150 µl sterilem H₂Odest. aufgenommen. Verbliebene DNA wurde durch erneute Zugabe von 150 µl sterilem H₂Odest. durch Schütteln bei 30°C (1 h oder über Nacht) gelöst.

2.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum*

Die Isolierung von RNA aus *E. acidaminophilum* erfolgte unter Verwendung des RNeasyTM Total RNA Kits (QIAGEN, Hilden). Dazu wurden 10 ml einer entsprechenden Kultur in der logarithmischen Phase durch Zentrifugation bei 4000 x g geerntet. Die anschließende Präparation von RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers und wurde im letzten Schritt mit 50 µl DEPC-H₂O (s. 2.3.1.) eluiert. Die erhaltenen RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.5.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode diente zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Je nach Bedarf lag die Agarosekonzentration in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM EDTA, pH8,0 (HCl)) bei 0,8-1,5% (w/v). Die DNA-Probe wurde mit 0,2 Vol. Stopplösung (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 40% (v/v)) versetzt und bei einer Spannung von 80-95 V (je nach Gelgröße) in horizontalen Elektrophoresekammern (Peqlab, Erlangen) aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die aufgetrennte DNA mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt. Die Färbezeit betrug 15-20 min. Nach kurzer Wässerung wurde das Gel mit einem Gelprint 2000 (MWG Biotech, Ebersberg) betrachtet und fotografiert.

2.5.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente, die zur Klonierung oder als Sonden für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt. Dabei fand der Gel-Extraktions Kit der Fa. Peqlab (Erlangen) Verwendung. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.5.3. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels eines Formaldehyd-haltigen (1% Formaldehyd (v/v) Endkonzentration) Agarosegels. Zur Herstellung eines 1%igen Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x MOPS-Puffer durch Kochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50°C erfolgte die Zugabe von 1% (v/v) Formaldehyd. Zur Probenvorbereitung wurden 6 µl RNA-Lösung mit 12,5 µl Formamid, 2,5 µl 10 x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA, pH7,0), sowie 4 µl Formaldehyd (37% (v/v)) versetzt, der Ansatz für 15 min bei 65°C inkubiert und danach sofort aus Eis abgekühlt. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden den Proben RNA Probenpuffer (Sigma, Deisenhofen) im Verhältnis 1:5 zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V für 2-3 h.

2.5.4. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurde zusätzlich in jedem Agarosegel ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Dazu diente λ -DNA, die mit dem Restriktionsenzym *Pst*I vollständig verdaut wurde. Die Größe der entsprechenden Fragmente betrug in kb (SAMBROOK, *et al.*, 1989): 14,06/ 11,5/ 5,08/ 4,75/ 4,51/ 2,84/ 2,56/ 2,45/ 2,14/ 1,95/ 1,7/ 1,16/ 1,09/ 0,81/ 0,5/ 0,12. 9 weitere Fragmente waren aufgrund ihrer geringen Größe im Gel nicht mehr sichtbar.

Herstellung des Größenstandards:

Restriktionsansatz:	λ -DNA (0,3 µg/µl)	100 µl
	<i>Pst</i> I-Puffer (10 x)	30 µl
	<i>Pst</i> I	30 µl
	H ₂ Odest.	ad 300 µl

Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde dem Ansatz 60 µl Stopplösung (s. 2.5.1.) zugesetzt. Es wurden 3-5 µl auf das Gel aufgetragen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Für die Größenbestimmung von mRNA-Fragmenten in Northern-Hybridisierungen wurde der Digoxigenin-markierte RNA-Längenstandard I (Roche, Mannheim) verwendet. Die Größe der Fragmente betrug in kb: 7,4/ 5,3/ 2,8/ 1,9/ 1,6/ 1,0/ 0,6/ 0,4/ 0,3. Durch halblogarithmische Auftragung der RNA-bzw. DNA-Fragmente gegen ihre Wanderungstrecke im Gel konnten Eichgeraden erstellt und somit die Größe unbekannter Fragmente bestimmt werden.

2.6. Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.1. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden für den Verdau ca. 5 U Restriktionsenzym pro µg zu spaltender DNA eingesetzt. Restriktionsendonukleasen und die entsprechende Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas

(St. Leon Roth) und New England Biolabs (Frankfurt/Main) bezogen. Der Verdau erfolgte über Nacht oder mind. 2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur.

2.6.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden 1 µl linearisierter, dephosphorylierter Vektor (ca. 0,5 µg) und das zu ligierende DNA-Fragment im 5-10 fachen Überschuß mit sterilem H₂Odest. auf 26 µl aufgefüllt, zur Freilegung der kohäsiven Enden 5 min bei 45°C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 µl 10 x Ligationspuffer und ca. 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim). Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.6.3. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Die Markierung erfolgte nach der Methode des 'Random Primed Labeling' (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983), bei der nach Denaturierung des Templates eine zufällige Mischung von Hexanukleotiden angelagert wird, die als Primer für Klenow DNA-Polymerase dienen.

Somit werden Digoxigenin-markierte Nukleotide (DIG-ddUTP) in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Die Markierung erfolgte mit dem 'DIG DNA Labeling Kit' (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Ausgangspunkt dafür waren 15 µl eines durch Agarosegeleextraktion (s. 2.5.2.) gereinigten DNA-Fragmentes (ca. 1 µg).

2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.7.1. PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase

Diese Methode diente zur Herstellung spezifischer DNA-Sonden für Hybridisierungen. Die Standardreaktion erfolgte in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock) der Fa. Biometra, Göttingen. Die einzelnen PCR-Zutaten wurden von der Fa. Peqlab, Erlangen bezogen.

PCR-Ansatz:

Template-DNA	50-200	ng
Primer	50	pmol
10 x Reaktionspuffer	5	µl
dNTP-Mix	0,25	mM
MgCl ₂	2-10	mM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,5	U
H ₂ Odest.	ad 50	µl

Der Ansatz (ohne *Taq*-DNA-Polymerase) wurde zunächst mit 100 µl Mineralöl überschichtet und 5 min bei 95°C im Thermocycler inkubiert (Hot start). Nach Zugabe des Enzyms erfolgten 30 Zyklen mit folgenden Schritten:

Denaturierung	95°C	60 s
Annealing	45-60°C	30 s
Extension	72°C	60 s

Nach Beendigung der Zyklen erfolgte zusätzlich eine Inkubation von 2 min bei 72°C. Die Extensionszeit betrug 1 min/1000 bp. Die Annealing-Temperatur wurde so gewählt, daß sie ca. 10°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer lag. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde die Regel nach (BERTRAM & GASSEN, 1991) genutzt:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times \text{Anzahl der A/T-Paare} + 4^\circ\text{C} \times \text{Anzahl der G/C-Paare}$$

2.7.2. PCR mit *Pwo*-DNA-Polymerase

Aufgrund der *proof-reading* Funktion der *Pwo*-Polymerase wurde diese Methode zur Herstellung von PCR-Fragmenten, die zur Klonierung in Expressionsvektoren dienen sollten, und zur Einführung von Punktmutationen angewendet. Um die Verkürzung der Primer durch die 3'Exonukleaseaktivität der *Pwo*-Polymerase zu verhindern, wurden zunächst zwei Gemische (Mix I und II) für ein Endvolumen von 50 µl wie folgt hergestellt:

Mix I		
Template-DNA	50-200	ng
Primer	50	pmol
dNTP-Mix	0,25	mM

Mix II		
10 x Reaktionspuffer	5	µl
MgCl ₂	2-10	mM
<i>Pwo</i> -Polymerase	0,5	U
H ₂ Odest.	ad 50	µl

Mix I und Mix II wurden auf Eis zusammenpipettiert und sofort im Thermocycler (Biometra, Göttingen) bei 94°C für 30 s inkubiert. Anschließend erfolgten 30 Zyklen (für Mutagenese 16-18 Zyklen) mit folgenden Schritten:

Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	45-60°C	30 s
Extension	72°C	1-10 min

Extension-Zeiten und Annealing-Temperaturen wurden, wie unter 2.7.1. beschrieben, gewählt.

2.7.3. *Primer extension*

Die Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten erfolgte durch Kombination der Fragment-Längenbestimmung mit einer modifizierten *primer extension*-Methode nach (BOORSTEIN & CRAIG, 1989). Für die Reaktion wurden 2 µg Gesamt-RNA mit 1 pmol 6-FAM-markierten Primer gemischt, 10 min bei 70°C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl M-MLV RT 5 x Puffer (Promega, Mannheim) und 2 µl 10 mM dNTPsEs wurde der Reaktionsansatz zur Primeranlagerung bei 48-50°C inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkription durch Zugabe von 0,7 µl M-MLV RT RNase H(-) *point mutant* (200 U/µl; Promega, Mannheim) gestartet und für 1 h bei gleicher Temperatur inkubiert. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C wurde die Reaktion abgestoppt und die cDNA mit 2 ml 3 M Natrium-Acetat (pH5,2) und 60 µl 96%igem (v/v) Ethanol gefällt. Das nach Zentrifugation (14000 Upm, RT, 20 min) erhaltene Pellet wurde mit 80 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Vor der Analyse durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die am ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems, Langen) durchgeführt wurde, wurde das Pellet in *loading buffer* aufgenommen und denaturiert. Die Länge der cDNAs wurde mit Hilfe des internen GeneScan-500 (ROX) Größenstandards (Pe Applied Biosystems, Langen) bestimmt, der den Ansätzen beigefügt wurde. Die Auswertung der Fragmentlängen-Analyse erfolgte mit GENESCAN2.1-Software.

2.7.4. *Verwendete Primer*

Die in den Experimenten verwendeten Primer wurden von Fa. Invitrogen (Karlsruhe), MWG Biotech (Ebersberg) und Metabion (München) bezogen. Tab. 4 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Tab. 4 Zusammenfassung der verwendeten Primer

Primer	Orien- tierung	Sequenz	Plasmid
PRXA3F	<i>fwd.</i>	5´-ATCGAGGGTCTCAAATGGTATCAGTTGGAAAGAA-3´	pPX2
PRXA3R	<i>rev.</i>	5´-AACTATGGTCTCTGCGCTATCTTCAAAGGCTTCCTTTA-3´	pPX2
PRXA5F	<i>fwd.</i>	5´-GCCCCCGGTCTCAGCGCCATGGTATCAGTTGGAAAGAA-3´	pPX2
PRXA5R	<i>rev.</i>	5´-AAGATTGGTCTCTTATCACTAATCTTCAAAGGCTTCCT-3´	pPX2
PXMUF	<i>fwd.</i>	5´-GACTTTACATTTGTCTGCGCCACTGAGTTTCAGC-3´	pPrxU
PXMUR	<i>rev.</i>	5´-GCTGAAACCTCAGTGGCGCAGACAAATGTAAAGTC-3´	pPrxU
TRXB-F	<i>fwd.</i>	5´-GAACAAGGTCTCTAATGGAAAATGTATACGATTT-3´	pML23
TRXB-R	<i>rev.</i>	5´-GACTAAGGTCTCAGCGCTCTCTCGAAGTTAGCCTC-3´	pML23
TRXA-F	<i>fwd.</i>	5´-GAACTCGGTCTCAAATGAGCGCATTACTAGTTGA-3´	pML23
TRXA-R	<i>rev.</i>	5´-CTCCACGGTCTCAGCGCTGCCAACGTGCTTAGCTATCA-3´	pML23
GRDB353F	<i>fwd.</i>	5´-CTACATGAGGCACTGCTACTAGATGCGGTGC-3´	pIBA5B
GRDB353R	<i>rev.</i>	5´-GCACCGCATCTAGTAGCAGTGCCTCATGTAG-3´	pIBA5B
GRDB356F	<i>fwd.</i>	5´-GGCACTTGTACTAGAGCCGGTGCATCTATGG-3´	pIBA5B
GRDB356R	<i>rev.</i>	5´-CCATAGATGCACCGGCTCTAGTACAAGTGCC-3´	pIBA5B
GrdB1_BE F	<i>fwd.</i>	5´-ATATATGGTCTCAGCGCCAGCAAAATTAAGTAGTTCA-3´	pDS5
GrdB1_E/Link	<i>rev.</i>	5´-ATATATGGTCTCACTCGTTATTTAATAGTTTCTTTTTCGAAT-3´	pDS5
GrdE_B1/Link	<i>fwd.</i>	5´-ATATATGGTCTCACGAGGGCAAAATGCGTTTAGAAATTGGAAA-3´	pDS5

Fortsetzung Tab. 4

GrdE_BE R	<i>rev.</i>	5´-ATATAT <u>GGTCT</u> CACTCGTTATTTAATAGTTTCTTTTCGAAT-3´	pDS5
GrdE22F_Link	<i>fwd.</i>	5´-ATATAT <u>GGTCT</u> CACGAGGGCAAAAAATGTGCGTTTCGTCATGCGA-3´	pDS5
GrdE25R	<i>rev.</i>	5´-ATATAT <u>GGTCT</u> CATATCATTAGTTTCCGCTTAGTATGG-3´	pDS5
PrxU734	<i>rev.</i>	5´-Fam-TTCCAACGTGATACCATAAGAC-3´	
STREP _{down}	<i>fwd.</i>	5´-GATAGAGAAAAGTGAATG-3´	pASK-IBA3 pASK-IBA5
STREP _{up}	<i>rev.</i>	5´-GTAGCGGTAACGGCAGAC-3´	pASK-IBA3 pASK-IBA5

*Bsa*I-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

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

2.8.1. Transformation durch Elektroporation (DOWER, *et al.*, 1988)

2.8.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden Kulturen der in Tab. 1 aufgeführten *E. coli*-Stämme bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 in 200 ml LB-Medium mit Tetracyclin (s. Tab. 3) bei 37°C angezogen. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 Upm, 20 min, 4°C) geerntet und das Pellet nacheinander zweimal mit eiskaltem H₂Odest. und einmal mit eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation (5000 Upm, 20 min, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in 0,8 ml 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, in 40 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

2.8.1.2. Transformation

Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser der Fa. Biorad, München. Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl Plasmid-DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Peqlab, Erlangen, Elektrodenabstand: 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wobei eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3,5-4,5 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen 45 min bei 37°C inkubiert. In der Regel wurden 50-200 µl des Ansatzes auf Selektivagar (s. 2.1.1.) ausplattiert. Sollte der Gesamtansatz ausplattiert werden, wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation (10000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in 200 µl LB-Medium resuspendiert.

2.9. Northern Hybridisierung

2.9.1. Auftrennung von RNA und Northern Blot

RNA aus *E. acidaminophilum* wurde wie unter 2.5.3. aufgetrennt und die Gele anschließend für 2 x 25 min in 20 x SSC (3M NaCl, 0,3 M Na-Citrat) gewaschen. Der Transfer von RNA auf positiv geladene QIABRANE-Nylonmembranen (QIAGEN, Hilden) erfolgte für 3 h mit einem Vacuumblotgerät (Appligene-Oncor, Heidelberg) bei einem Unterdruck von 60 mbar. Anschließend wurde die RNA durch zweiminütige Bestrahlung mit UV-Licht (Transilluminator) mit der Nylonmembran vernetzt.

2.9.2. Hybridisierung

Die Hybridisierung von Northern-Blots erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von (ENGLER-BLUM, *et al.*, 1993). Die Prähybridisierung auf Nylonmembranen fixierter DNA erfolgte 1-3 h unter Verwendung eines High-SDS-Hybridisierungspuffers (0,25 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 20% (w/v) SDS, 0,5%(w/v) Blockierungs-Reagenz (Roche, Mannheim); pH7,2 (H₃PO₄) bei 68°C. Anschließend wurde bei der gleichen Temperatur für mind. 12 h mit DIG-markierten PCR-Fragmenten (s. 2.6.3.) hybridisiert. Im Anschluß daran wurde die Membran 3 x 20 min bei Hybridisierungstemperatur gewaschen (Waschpuffer: 20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% (w/v) SDS; pH7,2 (H₃PO₄) und mittels Chemilumineszenznachweis detektiert.

2.9.3. Chemilumineszenznachweis

Dieser Nachweis erfolgte durch Kopplung von Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim) an die DIG-markierte Sonde. Die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert ein Chemilumineszenzsubstrat (CDP-*Star*TM (Roche, Mannheim)), welches in ein instabiles Intermediat zerfällt und dabei Licht emittiert. Dieses kann durch Belichtung eines Röntgenfilmes nachgewiesen werden. Zur Durchführung dieser Reaktion wurde die Membran kurz in Puffer 1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 1% (w/v) Tween 20; pH7,5 (NaOH)) äquilibriert und anschließend in Puffer 2 (Puffer 1 mit 1% (w/v) Blockierungs-Reagenz (Roche, Mannheim)) 30 min zur Verhinderung unspezifischer Bindung des Antikörperkonjugates inkubiert. Danach erfolgte eine 30 minütige Behandlung mit Anti-DIG-AP-Konjugat (0,5 µl je 10 ml Puffer 2). Nach zweimaligem Waschen (je 15 min) der Membran mit Puffer 1 und kurzer Äquilibrierung in Puffer 3 (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl; pH9,5 (HCl)) erfolgte die Inkubation mit Substratlösung (1% (v/v) CDP-*Star*TM in Puffer 3) für 5 min. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde kurz auf Filterpapier getrocknet, anschließend in Plastikfolie eingeschweißt und auf Röntgenfilm (Roche, Mannheim) für 30-60 min exponiert.

2.10. Sequenzierung von DNA

2.10.1. Sequenzierung am ABI377-Sequencer

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach (SANGER, 1977) unter Verwendung des 'Dye Terminator Reaction Mix', ABI, Braunschweig) am automatischen Sequenzierer ABI377 (Version 4.0) (ABI, Braunschweig). Entsprechend der *Cycle sequencing*-Methode wurden Denaturierung der DNA, Annealing der Primer und Extension-Reaktion 20-40 mal wiederholt. Die verwendete Template-DNA lag für die Reaktion in H₂Odest. gelöst vor. Folgender Ansatz wurde vorbereitet und mit 60 µl Mineralöl überschichtet:

Template-DNA	0,2-0,8 µg
Primer 10 pmol	1 µl
'Dye Terminator Reaction Mix'	2 µl
H ₂ Odest.	ad 20 µl

Die Reaktion wurde im Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) mit 33 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	30	s
Annealing	45-60°C	15	s
Extension	60°C	4	min

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Mineralöl entfernt und die DNA bei RT einer Ethanol-fällung (s. 2.3.4.) unterzogen. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Gelpuffer (Formamid, 25 mM EDTA pH8,0 im Verhältnis 5:1) gelöst. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurde der Ansatz für 2 min bei 90°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

2.10.2. Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgten mit der Software Chromas Version 1.43 (Brisbane, Australia.). Weiterhin fanden die Analyseprogramme DNASIS (Version V5.00) und CLONE 4 (Clone Manager-Version 4.0, Scientific & Educational Software, USA) Anwendung. Mit Hilfe der Programme FASTA (PEARSON & LIPMAN, 1988), BLASTP 2.0.1. und BLASTX (ALTSCHUL, *et al.*, 1997) wurden die in den Datenbanken EMBL, SWISS-PROT, PIR, PDB und PRF erfaßten DNA- bzw. Proteinsequenzen mit den DNA- bzw. Proteinsequenzen klonierter DNA-Fragmente verglichen. Vollständige Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLUSTAL W (THOMPSON, *et al.*, 1994) durchgeführt. Die Analyse von Terminationsstrukturen erfolgte mit dem Program *mfold* (WALTER, *et al.*, 1994).

2.11. Präparation von zellfreien Extrakten

2.11.1. Zellernte und Lagerung der Zellen

Die Bakterienzellernte erfolgte in der Regel gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Kulturvolumina bis 2 l wurden in einer Sorvall RC 2-B Zentrifuge (Dupont Instruments, Newton, USA) bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Zellernte aus dem 100 l Fermenter erfolgte mittels einer Durchlaufzentrifuge (Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech, Fellbach) bei 17000 Upm. Die so erhaltenen Zellpellets wurden bei –20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

2.11.2. Zellaufschluß

2.11.2.1. Zellaufschluß unter aeroben Bedingungen

Als Standardpuffer für den Zellaufschluß dienten in der Regel 50-100 mM Tris/HCl pH7,5-8,0 bzw. 50 mM Kaliumphosphat pH7,0-7,5. Die Puffer enthielten je nach Experiment 1-2 mM EDTA und/oder 3 mM DTT. Je 1 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 1 ml des jeweiligen Aufschlußpuffers resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym, 0,1 mg/g Zellen DNaseI, sowie 1 µl/ml 0,2 M PMSF (in Isopropanol) zugesetzt und bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Aufschluß der Zellen mittels einer vorgekühlten French-Press-Zelle (French[®] Pressure cell press SLM Instruments, Polytec GmbH, Eschborn) mit 80 MPa (Mini-Zelle) oder bei größeren Volumina als 3 ml mit 140 MPa (20K-Zelle). Dieser Vorgang wurde 2-3 mal wiederholt.

2.11.2.2. Zellaufschluß unter anaeroben Bedingungen

Für den anaeroben Zellaufschluß wurden die unter 2.11.2.1. aufgeführten Standardpuffer zunächst in Serumflaschen (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden) gefüllt und durch 30 minütiges Begasen mit N₂ anaerobisiert. Die Resuspension der Zellen bzw. Zugabe der Zusätze (s. 2.11.2.1.) erfolgte in einer Coy-Box (Toepffer Lab Systems, Göppingen) bei einem H₂-Gehalt von >3% und einen Sauerstoffanteil von 0 ppm. Während des Aufschlusses mit der French Presse wurde die Suspension beim Einfüllen in den French-Press-Zylinder und in die Serumflaschen mit N₂ begast.

2.11.2.3. Denaturierender Zell-Aufschluß im kleinen Maßstab

Zur Überprüfung von Expressionskulturen auf gebildetes heterologes Protein, wurden aus den jeweiligen Kulturen (s. 2.2.1.) vor Induktion (1 ml) und nach 3 h Induktion (0,5 ml) Proben entnommen, die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 12000 Upm, RT) pelletiert und nach Entfernung des Überstandes in 20 µl 100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von

20 µl SDS-Probenpuffer(s. 2.16.) erfolgte die Denaturierung bei 95°C für 5 min und anschließend der Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.16.)

2.11.3. Zentrifugation

Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde die aufgeschlossene Zellsuspension einer Zentrifugation bei 4°C für 30 min und 30000 x g in einer SORVALL-Zentrifuge (Kendro, Hanau) unterzogen. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation (l8-60 M Ultrazentrifuge, Beckmann Instruments, CA/USA) von 60 min bei 100000 x g und 4°C, um verbleibende Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen.

2.12. Bestimmung der Proteinkonzentration (BRADFORD, 1976, modifiziert)

Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes (70 mg Serva Blau G250, 50 ml Ethanol (96% (v/v), 100 ml H₃PO₄ (85% (v/v), ad 1000 ml H₂Odest.) wurde zunächst der Farbstoff vollständig in Ethanol gelöst. Nach Zugabe der übrigen Bestandteile wurde die Lösung filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt. In einer Kunststoffküvette (Roth, Karlsruhe) wurden zu 20 µl Probe 1 ml Bradford-Reagenz gegeben und die Lösung gut gemischt. Nach 5 min wurde die Absorption bei 590 nm gegen einen Leerwert (H₂Odest. bzw. Puffer der Probe) in einem Uvikon Spektralphotometer 930 (Kontron, Zürich, Schweiz) bzw. Spekol 1200 (Analytik Jena GmbH, Jena) gemessen. Betrug die OD₅₉₀ > 0,5 wurde die Probe entsprechend verdünnt. Die Proteinkonzentration konnte dann anhand einer mit BSA (0-20 µg) erstellten Eichgeraden berechnet werden.

2.13. Messung von Enzymaktivitäten

Photometrische Messungen wurden mit einem Uvikon 930 Spektralphotometer (Kontron, Eching) bzw. mit einem Spekol 1200 (Analytik Jena GmbH, Jena) in 1 cm Küvetten durchgeführt. Die Bestimmung von Peroxidase-Aktivität erfolgte aufgrund der interferierenden NADPH-Oxidase-aktivität der Thioredoxin-Reduktase anaerob in Glasküvetten mit Gummisepten (Sigma, Deisenhofen). Alle weiteren Enzymmessungen wurden in Plastiküvetten (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, im linearen Bereich nach folgender Gleichung.

$$U = \frac{\Delta E / \text{min} \times V}{\epsilon \times d \times v}$$

$\Delta E/\text{min}$	Extinktionsänderung pro min
V	Gesamtvolumen [μl]
ϵ	Spezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
v	Probevolumen [μl]

2.13.1. Bestimmung von NADPH-Oxidase-Aktivität

Testansatz	Tris/HCl bzw. K-Phosphat (pH7,5)	50 mM
	Proteinprobe	5-50 μl
	NADPH	150 μM

Gemessen wurde die Abnahme von NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}}=6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bei 340 nm unter aeroben Bedingungen in einem Gesamtvolumen von 1ml.

2.13.2. Aktivitätsmessung von Thioredoxin

Die Bestimmung der Aktivität von rekombinatem Thioredoxin erfolgte mit dem Komplementationstest nach (MEYER, *et al.*, 1991). Gemessen wurde die Zunahme von NADPH bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) über einen Zeitraum von 5 min.

Testansatz:	Tris/HCl (pH8,5)	50 mM
	EDTA	0,2 mM
	Thioredoxin-Reduktase	5 U
	NADP ⁺	0,4 mM
	DTT	5 mM
	Thioredoxin	x μl
	H ₂ Odest.	ad 1 l

2.13.3. Messung von Peroxidase-Aktivität

2.13.3.1. Herstellung von Linolsäurehydroperoxid

Die Herstellung von Linolsäurehydroperoxid (LSP) erfolgte nach einer modifizierten Methode nach (JEONG, *et al.*, 2000). Dazu wurden 20 mM Linolsäure mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoxidase aus Sojabohnen in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde spektrophotometrisch bei 234 nm verfolgt und nach vollständigem Substratumsatz die Konzentration von LSP durch Messung der Extinktion bei 234 nm ($\epsilon_{\text{LSP}}=25000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bestimmt.

2.13.3.2. Messung von Peroxidase-Aktivität nach (LIM, *et al.*, 1993)

Gemessen wurde die Reduktion von Peroxiden unter Zusatz eines künstlichen Elektronendonors, indem nach Beendigung der Reaktion die Menge des nicht umgesetzten Peroxids bestimmt wurde.

Testansatz:	Tris/HCl bzw. K-Phosphat (pH7,5)	50 mM
	DTT	10 mM
	Peroxid	0,5-1 mM

Die enzymatische Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μ l bei 37°C in einem Zeitraum von 1-7 min. Nach Abstoppen der Reaktion mit 0,75 ml 12,5% (w/v) Trichloressigsäure, wurde der Lösung 0,2 ml 10 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (gelöst in 20 % (v/v) H_2SO_4) und 0,1 ml 2,5 M KSCN zugesetzt. Durch Peroxid oxidiertes Fe^{2+} zu Fe^{3+} reagiert mit KSCN zu einer roten Komplexverbindung, deren bei 450 nm gemessene Intensität linear mit der Peroxidkonzentration korrespondierte. Zur Bestimmung der Peroxidkonzentration wurde vor jeder Meßreihe eine Eichgerade im Bereich von 0-0,25 mM Peroxid erstellt. Die $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ - und KSCN-Lösung wurde stets frisch hergestellt.

2.13.3.3. Nachweis von Peroxiredoxin-Aktivität nach (KIM, *et al.*, 1988), modif.

Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Hemmung der DTT/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ -vermittelten Inaktivierung von Glutamin-Synthetase aus *E. coli*. Durch DTT/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ werden reaktive Sauerstoffderivate generiert, die zur Spaltung und somit zur Inaktivierung von Glutamin-Synthetase führten (KIM, *et al.*, 1985). Peroxiredoxine sind in der Lage, mittels DTT die reaktiven Sauerstoffspezies zu entgiften und somit die Glutaminsynthetase vor Inaktivierung zu schützen (KIM, *et al.*, 1988). Der Nachweis erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Nach Zugabe von 30 μ l frisch hergestellter Inaktivierungslösung (10 mM DTT, 30 μ M FeCl_3 ; die in der obigen Literatur angegebene Konzentration an FeCl_3 von 3 μ M reichte nur für eine 50 %ige Inaktivierung der Glutamin-Synthetase aus.) zu 20 μ l Proteinlösung (0,5 μ g *E. coli* Glutamin-Synthetase (Sigma, Deisenhofen), 100-200 μ g Rohextrakt in 50 mM Tris/HCl pH7,5) erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 30°C. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml γ -Glutamyltransferase-Mix (0,4 mM ADP, 150 mM Glutamin, 10 mM K-Arsenat, 20 mM NH_2OH , 0,4 mM MnCl_2 , 100 mM HEPES, pH7,4) für weitere 30 min bei 30°C inkubiert und die Glutamin-Synthetase-Aktivität nach Zugabe von 0,5 ml Stopplösung (55 g FeCl_3 , 20 g Trichloressigsäure, 21 ml 35% (v/v) HCl, ad 1 l H_2O dest.) bei 540 nm (γ -Glutamylhydroxamat- Fe^{3+} -Komplex) bestimmt.

2.13.3.4. Messung von NADPH-abhängiger Peroxidase-Aktivität durch Komplementation

Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Dabei wurde die Abnahme von NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}}=6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bei 340 nm unter anaeroben Bedingungen gemessen.

Testansatz:	Tris/HCl bzw. K-Phosphat (pH7,5)	50 mM
	NADPH	150 μ M
	Thioredoxin-Reduktase	0,3-1,5 μ M
	Thioredoxin	0,3-1,5 μ M
	Protein A	0,3-1,5 μ M
	Proteinprobe	0,3-1,5 μ M
	Peroxid	0,25-1 mM

Es wurde zuerst NADPH vorgelegt und die einzelnen Komponenten (bis auf das Peroxid) in der Reihenfolge ihre Reduktion hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Messung der verbliebenen NADPH-Oxidase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase zur Kontrolle des Restsauerstoffgehaltes. Erst nachdem keine Extinktionsänderung mehr zu beobachten war (d. h. kein O₂ im Meßansatz), wurde die eigentliche Reaktion durch Zugabe des Peroxids gestartet.

2.13.4. Messung von Peroxinitrit-Reduktase-Aktivität

Zur Messung von Peroxinitritreduktase-Aktivität fand der Enzymtest nach (BRYK, *et al.*, 2000) Anwendung. Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Hemmung der durch Peroxinitrit vermittelten Oxidation von Dihydrorhodamin. Bakterielle Peroxiredoxine sind in der Lage, Peroxinitrit zu entgiften und damit Dihydrorhodamin vor Oxidation zu schützen. Um diesen Effekt zu beobachten, war die Zugabe eines Elektronendonors nicht notwendig (BRYK, *et al.*, 2000). Der Enzymtest wurde als Endpunktbestimmung nach folgendem Ansatz bei RT durchgeführt:

Testansatz:	Tris/HCl, bzw. K-Phosphat (pH7,5)	50 mM
	Dihydrorhodamin	100 μ M
	Proteinprobe	2-1000 nM
	Peroxinitrit	20 μ M

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Peroxinitrits (Qbiogene-Alexis GmbH, Grünberg) wurde die Lösung kurz aufgetaut, aliquotiert und sofort wieder bei -80°C eingefroren. Für jede Meßreihe wurde ein neues Tube aufgetaut und parallel eine Blindreaktion ohne Protein durchgeführt. Von dem jeweiligen Meßansatz und der dazugehörigen Blindprobe konnte anschließend die Menge an entstandenem Rhodamin bei 500 nm gemessen werden ($\epsilon_{\text{Rhodamin}}=10800 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

2.14. Methoden zur Proteinanreicherung

2.14.1. Chromatographie an Anionenaustausch-Materialien

Die Nettoladung eines Proteins ist abhängig von der relativen Anzahl positiv und negativ geladener Gruppen auf der Moleküloberfläche. Bei Anionenaustauschern sind kationische Gruppen kovalent an eine ungeladene Matrix gebunden, die in Wechselwirkung mit niedermolekularen Anionen

(Gegenionen) stehen, welche durch Proteine mit negativer Nettoladung verdrängt werden können. Das ionisch gebundene Protein kann durch Veränderung des pH-Wertes bzw. Erhöhung der Konzentration von freien Ionen in der Lösung wieder eluiert werden. Als Anionenaustauschmaterial wurde Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Chromatographiesäule (50 x 300 mm, Millipore GmbH, Eschborn) wurde mit dem bereits vorgequollenen Material luftblasenfrei gepackt und mit mind. 5 Säulenvolumen (SV) Standardpuffer (in der Regel 50 mM Tris/HCl pH7,5-8,0) bei einer Flußrate von 1 ml/min äquilibriert. Nach Auftrag der Probe (Flußrate 1 ml/min) wurde mit 7-8 SV Standardpuffer gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit einem KCl Gradienten im Bereich von 0-1 M KCl eluiert (Flußrate 1 ml/min, 8 SV). Das Material wurde nach Verwendung nacheinander mit 3 SV 3 M KCl, sowie 5 SV H₂Odest. gewaschen und konnte anschließend in 20% Ethanol bei 4°C aufbewahrt werden.

2.14.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Das Prinzip der hydrophoben Interaktionschromatographie beruht auf der durch hohe Salzkonzentration bedingten Zunahme der Oberflächenspannung des Wassers (MELANDER & HORVATH, 1977), wodurch hydrophobe Wechselwirkungen des Proteins mit dem Säulenmaterial möglich werden. Als Chromatographiematerial wurde Butyl-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Chromatographiesäule (16 x 250 mm, Amicon, Beverly, MA/USA) wurde mit dem bereits vorgequollenen Material luftblasenfrei gepackt und mit 5 SV Standardpuffer (in der Regel 1 M (NH₄)₂SO₄ in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0-7,5) bei einer Flußrate von 0,5-1 ml/min äquilibriert. Nach Auftrag der Probe (Flußrate 0,5-1 ml/min) wurde mit 7-8 SV Standardpuffer gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit einem abfallenden Gradienten im Bereich von 1-0 M (NH₄)₂SO₄ eluiert (Flußrate 0,5-1 ml/min, 8 SV). Das Material wurde nach Verwendung nacheinander mit 5 SV H₂Odest. und 20% Isopropanol gewaschen und konnte anschließend in letzterem bei 4°C aufbewahrt werden.

2.14.3. Gelpermeationschromatographie

Für die Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration) wurde Sephacryl HR200 (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Die Trennung der Proteine erfolgte dabei nach ihrer nativen Größe bei einer Flußrate von 0,1 ml/min. Als Puffer diente 50 mM K-Phosphat, pH7,5 + 3 mM DTT.

2.14.4. Affinitätschromatographie

2.14.4.1. Chromatographie an Streptactin-Sepharose

Die Reinigung von rekombinaten Strep-tagII-Fusionsproteinen erfolgte mittels Streptactin-Sepharose nach Angaben des Herstellers (Institut für Bioanalytik GmbH, Göttingen)

2.14.4.2. Chromatographie an Anti-PrxU/ProteinA-Sepharose

Zunächst wurde der entsprechende Antikörper durch nicht-kovalente Wechselwirkungen an ProteinA-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) gekoppelt. 50 mg der Sepharose-*beads* wurden dazu 5 x mit je 3 ml H₂Odest. gewaschen und mit 3 ml NET2-Puffer (50 mM Tris/HCl pH7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Nonidet P-40) 3 x 15 min äquilibriert. Anschließend wurden ca. 1 mg des entsprechenden Antikörpers zusammen mit den ProteinA-Sepharose-*beads* für 1 h bei RT inkubiert. Danach schloßen sich drei Waschschrte für je 5 min mit NET2-Puffer an. Das so hergestellte Affinitätsmaterial wurde nachfolgend in eine Polypropylen-Leersäule (QIAGEN, Hilden) gefüllt und mit 10 mM K-Phosphat pH7,2 äquilibriert. Danach erfolgte die Aufgabe der Proteinprobe, ein Waschschrte (5 SV) mit Äquilibrierungspuffer und die Elution von gebundenem Protein mit 3,5 M MgCl₂ (in 10 mM K-Phosphat pH7,2). Alle Chromatographieschritte erfolgten durch Gravitation.

2.15. Entsalzen und Einengen von Proteinlösungen

2.15.1. Dialyse

Zum Entsalzen von Proteinlösungen wurde eine *snake-skin*-Dialysemembran (Pierce, Rockford, USA) mit den Ausschlußgrößen 7 und 10 kDa verwendet. Die Dialyse erfolgte bei 4°C unter langsamen Rühren und mehrmaligem Pufferwechsel für 12 h.

2.15.2. Entsalzen durch Chromatographie an Bio-Gel PD-10

Zum schnellen Entsalzen oder Umpuffern von geringen Mengen (bis zu 1 ml) an Proteinlösungen wurden PD-10-Säulen (Bio-Rad, München) verwendet. Das Funktionsprinzip beruht auf einer Gelfiltration.

2.15.3. Centricon-Konzentratoren

Zur Konzentrierung und gleichzeitigen Entsalzung von Proteinlösungen wurden die Ultrafiltrationseinheiten Centricon (Amicon, Beverly, MA, USA) mit den Ausschlußgrößen 3000, 10000 oder 30000 nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.15.4. Konzentrierung mittels (NH₄)₂SO₄-Fällung

Zunächst wurde das Protein der zu konzentrierenden Lösung durch Zugabe von festem, gemörsertem (NH₄)₂SO₄ durch Rühren auf Eis für 1 h gefällt. Die Endkonzentration an (NH₄)₂SO₄ betrug dabei 80% (w/v). Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschrte für 15 min bei 30000 x g und 4°C. Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet in dem gewünschten Endvolumen aufgenommen und dialysiert (s. 2.15.1.).

2.15.5. Konzentrierung mittels Polyethylenglykol

Zum Einengen von anaeroben Proteinlösungen wurde eine zur besseren Handhabung in der Coy-Box (Toepffer Lab Systems, Göppingen) eine Konzentrierung durch PEG durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (*snake-skin*-Dialysemembran (Pierce, Rockford, USA)) gefüllt, verschlossen und einige Stunden bis zum Erhalt des gewünschten Volumens auf festes PEG (15-20000 g/mol) gelegt.

2.15.6. Chloroform-Methanol-Fällung (WESSEL & FLÜGGE, 1984)

Um stark verdünnte Proteinlösungen im SDS-Gel sichtbar machen zu können, wurde diese Methode zur Konzentrierung der Proben angewendet. Dazu wurden 100 µl Probe mit 100 µl Chloroform versetzt und gut geschüttelt. Nach Zugabe von 300 µl H₂Odest. wurde erneut geschüttelt und für 2 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert (RT, 12000 Upm). Anschließend wurde der Überstand bis zur Interphase verworfen, und der verbliebenen Lösung 300 µl Methanol zugesetzt. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in SDS-Probenpuffer (s. 2.16.1.) aufgenommen.

2.16. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die PAGE wurde eine Minigel Twin-Elektrophorese-Einheit mit 10 x 10 x 0,1 cm Platten oder Multigel-Long-Elektrophorese-Einheit mit 14 x 14 x 0,1 cm (Biometra, Göttingen) verwendet.

2.16.1. SDS-PAGE nach LAEMMLI, 1970

Bei dieser Methode wurden die Proteine durch Kochen und Reduktion der Disulfid-Brückenbindungen (durch das im SDS-Probenpuffer enthaltene Mercaptoethanol) denaturiert und im Gel ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt.

Herstellung von Polyacrylamidgelen:

Für das Trenngel wurden die Lösungen nach folgendem Schema gemischt.

Trenngel

Acrylamidkonzentration	10,0	12,5	15,0	17,5	%
Rotiphorese Gel30 (Roth, Karlsruhe)	2,0	2,5	3,0	3,5	ml
Trenngelpuffer	1,2	1,2	1,2	1,2	ml
0,5% (w/v) SDS-Lsg.	1,2	1,2	1,2	1,2	ml
H ₂ Odest	1,6	1,1	0,6	0,1	ml
TEMED	5	5	5	5	μl
APS-Lsg. (10% (w/v))	30	30	30	30	μl

Die Lösung wurde gut gemischt, gleichmäßig zwischen die Gelelektrophoreseplatten gegossen und mit H₂Odest. überschichtet.

Sammelgel (5%ig)

Rotiphorese Gel30 (Roth, Karlsruhe)	0,33	ml
Sammelgepuffer	0,4	ml
0,5% (w/v) SDS-Lsg.	0,4	ml
H ₂ Odest.	0,87	ml
TEMED	2	μl
APS-Lsg. (10% (w/v))	10	μl

Nach Trocknung (Filterpapier) der Trenngeloberfläche wurde die Sammelgellösung auf das auspolymerisierte Trenngel geschichtet und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt.

Probenvorbereitung und Auftrag:

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2 x Probenpuffer (2 ml Sammelgepuffer; 0,2 g SDS; 5 ml Glycerin; 0,5 ml Mercaptoethanol; 0,1 ml 1%iges (w/v) Bromphenolblau; 2,4 ml H₂Odest.) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt (Aufbewahrung der Proben über einen längeren Zeitraum war bei -20°C möglich.). Nach Spülen der Probenaschen mit Elektrophoresepuffer (3 g Tris; 14,4 g Glycin; 1 g SDS; ad 1 l H₂Odest.) wurden 1-100 μg Protein (Probenvolumen 10-20 μl) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Proteinmarker Σ 7, der sich wie folgt zusammensetzt: Rinderalbumin 66 kDa; Ei-Albumin 45 kDa; Glycerinaldehyd-3-P-DH 36 kDa; Carboanhydrase 29 kDa; Trypsinogen 24 kDa; Trypsin-Inhibitor 20 kDa; Lactalbumin 14 kDa (Sigma, Deisenhofen). 10 μl wurden wie die übrigen Proben vorbereitet und auf das Gel aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen:

Die PAGE erfolgte in Elektrophoresepuffer. Nachdem die Proben 10 min bei 10 mA in das Sammelgel hineingelaufen waren, erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 25 mA pro Gel.

Trenngelpuffer	Tris pH8,8 (HCl)	1,5 M
Sammelgepuffer	Tris pH6,8 (HCl)	0,5 M

2.16.2. SDS-PAGE nach SCHÄGGER & VON JAGOW, 1987

Diese Methode kam zum Einsatz, wenn Proteine geringer Größe aufgetrennt werden sollte. Es wurden zwei unterschiedliche Elektrophoresepuffer für Anode und Kathode verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte wie unter 2.16.1. beschrieben. Für ein 10%iges Trenngel wurden folgende Lösungen gemischt.

AA/BAA-Lösung	1,22	ml
3 x Gelpuffer	2,0	ml
40% (v/v) Glyzerin	2,0	ml
H ₂ Odest.	0,78	ml
TEMED	3,5	µl
APS-Lsg. (10% (w/v))	70	µl

Die 4%ige Sammelgellösung für ein Gel setzte sich wie folgt zusammen.

AA/BAA-Lösung	0,2	ml
3 x Gelpuffer	0,62	ml
H ₂ Odest.	1,68	ml
TEMED	2	µl
APS-Lsg. (10% (w/v))	20	µl

Probenvorbereitung und -auftrag, sowie Verwendung des Größenstandards erfolgte wie unter 2.16.1. Die Auftrennung der Proteinproben wurde im unten angegebenen Puffersystem bei 90 V für 2-3 h durchgeführt.

AA/BAA-Lösung	Acrylamid	48	g
	Bisacrylamid	1,5	g
	H ₂ Odest.	ad 100	ml
Gelpuffer (3 x)	Tris	3	M
	20% (w/v) SDS	15	ml
	H ₂ Odest.	ad 1	l
	pH8,45 (HCl)		
Anodenpuffer	Tris	0,2	M
	pH8,9 (HCl)		
Kathodenpuffer	Tris	0,1	M
	Tricin	0,1	M
	20% (w/v) SDS	5	ml
	H ₂ Odest.	ad 1	l
	pH8,25 (nicht einstellen)		

2.16.3. Native Gradienten-PAGE

Mit dieser Methode wurden Proteine nach Ihrer nativen Größe aufgetrennt. Zur Herstellung linearer Gradientengele mit Polyacrylamidkonzentrationen von 5-27,5% wurden folgende Lösungen verwendet:

5% Acrylamid (Lösung L)	Rotiphorese Gel40	13	ml
	(Roth, Karlsruhe)		
	2 M Tris/HCl, pH8,5	12,5	ml
	H ₂ Odest.	ad 100	ml
27,5% Acrylamid (Lösung S)	Rothiphorese Gel40	76	ml
	(Roth, Karlsruhe)		
	2 M Tris/HCl, pH8,5	12,5	ml
	Glyzerin	8,6	ml
	H ₂ Odest.	ad 100	ml

Für ein Gel wurden jeweils 3 ml der Lösungen S und L in einen Gradientenmischer pipettiert und mit je 1,5 µl TEMED, sowie 7,5 µl APS-Lösung (10% (w/v)) versetzt. Die Kammern wurden geöffnet und das Gel unter Rühren und unter Einsatz einer Peristaltikpumpe zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde wie unter 2.16.1. verfahren. Das SDS im 5%igen Sammelgel wurde durch eine entsprechende Menge H₂Odest. ersetzt. Die Proben wurden mit nativem Probenpuffer (4 g Saccharose; 5 mg Bromphenolblau; H₂Odest. ad 10 ml) versetzt und anschließend bei 100 V über Nacht elektrophoretisch (Elektrophoresepuffer: 12,1 g Tris; 7,5 g Glycin; H₂Odest. ad 1 l; pH 8,7 nicht einstellen) aufgetrennt. Als Größenstandard diente 'High molecular weight' Marker: Thyroglobulin 669 kDa; Ferritin 440 kDa; Katalase 232 kDa; Lactat-DH 140 kDa; Rinderalbumin 67 kDa (Pharmacia, Freiburg).

2.17. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot) nach TOVEY & BALDO, 1989

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen und zur Durchführung der N-terminalen Aminosäureanalyse wurden die durch PAGE (s. 2.16.) aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Pierce, Rockford, USA) transferiert. Dazu wurde zunächst das Gel 10 min in Transferpuffer (50 mM Borsäure pH9,0 (NaOH); 200 ml Methanol; H₂Odest. ad 1 l) bei RT inkubiert. Gleichzeitig wurde eine PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und je 1 min in Methanol, sowie H₂Odest. und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Der Transfer erfolgte unter Verwendung der Fastblot B34-Apparatur (Biometra, Göttingen). Von der Anode aus wurde folgende luftblasenfreie Schichtung vorgenommen:

- 3 x GB002 Gel Blotting-Papier (Biometra, Göttingen) in Transferpuffer getränkt
- PVDF-Membran
- Gel
- 3 x GB002 Gel Blotting-Papier (Biometra, Göttingen) in Transferpuffer getränkt

Der Transfer erfolgte bei 4°C 30-60 min bei einer Stromstärke von 1,2-2,4 mA/cm.

2.18. Proteinfärbungen in Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen

2.18.1. Proteinfärbung mit Coomassie nach WEBER & OSBORN, 1969

Die Polyacrylamidgele wurden für 10-30 min in Coomassie-Lösung (2 g SERVA Blau R250; 0,5 g SERVA Blau G250; 425 ml Ethanol; 50 ml Methanol; 100 ml Essigsäure; H₂Odest. ad 1 l) unter leichtem Bewegen inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des unspezifisch gebundenen Farbstoffes durch Inkubation in Entfärbe-Lösung 1 (70 ml Essigsäure; H₂Odest. ad 1 l) in Abhängigkeit von Gelkonzentration und -typ für mehrere Stunden bzw. ü. N.

2.18.2. Silberfärbung nach BLUM, *et al.*, 1987

Die Silberfärbung wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit speziell für das Sichtbarmachen geringer Proteinmengen eingesetzt.

Schritt	Lösung	Behandlungszeit
1) Fixieren	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure 0,5 ml Formaldehyd (37% (v/v))	1 h oder über Nacht
2) Waschen	50% (v/v) Ethanol	3 x 10 min
3) Vorbehandlung	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	1 min
4) Spülen	H ₂ Odest.	3 x 20 s
5) Imprägnieren	2 g/l AgNO ₃ 0,75 ml Formaldehyd (37% (v/v))	20 min
6) Spülen	H ₂ Odest.	2 x 20 s
7) Entwickeln	60 g/l Na ₂ CO ₃ 0,5 ml Formaldehyd (37% (v/v)) 4 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	<10 min
8) Waschen	H ₂ Odest.	2 x 20 s
9) Stoppen	50% (v/v) Methanol 12% Essigsäure	15 min
10) Waschen	H ₂ Odest.	>20 min

Die Lösungen 3) und 7) wurden bei 4°C gelagert, die Lösung 5) wurde vor jedem Gebrauch frisch hergestellt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur unter Nutzung einer Laborwippe durchgeführt.

2.18.3. Proteinfärbung auf Blotmembranen

Diese Methode wurde angewendet, um die auf PVDF-Membranen transferierten Proteine für die N-terminale Aminosäureanalyse sichtbar zu machen. Dazu wurde die Membran einige Sekunden in Coomassie-Lösung (s. 2.18.1.) getaucht und anschließend mittels Entfärbelösung 2 (330 ml Methanol; 100 ml Essigsäure; H₂Odest. ad 1 l) von unspezifisch gebundenem Farbstoff befreit.

2.19. Markierung von Proteinen mit 4-Vinylpyridin

Zur massenspektroskopischen Untersuchung von Proteinen mußten die Sulfhydryl-Gruppen der Cysteine zunächst blockiert werden, um die unerwünschte Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen während der Analyse zu verhindern. Dazu wurden 20 µl Proteinlösung durch Zugabe von 52 µl Denaturierungslösung (8 M Guanidin/HCl-Lösung; 25 mM DTT) und 17,5 µl Puffer (1 M Tris/HCl, pH8,5; 1 mM EDTA) bei RT für 15 min denaturiert. Anschließend erfolgte die Markierung durch Zugabe von 2 µl 4-Vinylpyridin und Inkubation für 45 min bei RT.

2.20. pH-selektive Markierung von Seleno-Proteinen mit Iodoacetyl-LC-Biotin

Die pH-selektive Markierung des Selenocysteins in Proteinen erfolgte aufgrund des niedrigen pK_a-Wertes der Selenol-Gruppe bei einem pH-Wert von 6,8. Einer 2,5 mg Protein enthaltenden, auf pH 6,8 eingestellten Lösung wurden 24 µl einer 2,5 mM (gelöst in DMF) EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin (Pierce, Rockford, USA) zugesetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnte die Probe direkt entweder auf ein PAG (s. 2.16.) oder für Enzymmessungen eingesetzt werden.

2.21. N-terminale Aminosäuresequenzierung und Massenbestimmung

Für die N-terminale Aminosäureanalyse wurden die Proteine zunächst mittels PAGE (s. 2.16.) aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert (s. 2.17.), angefärbt (s. 2.18.3.) und die entsprechenden Banden für die Analyse ausgeschnitten. Die N-terminalen Aminosäureanalysen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Karl Peter Rücknagel (MPI, AG Prof. Fischer, Halle) durchgeführt. Für die Massenbestimmung der Selenocystein-haltigen GrdB-Varianten wurden die Proteine zunächst mit 4-Vinylpyridin markiert (s. 2.19.) und in einem SDS-PAG (2.16.1.) aufgetrennt. Anschließend wurde die relevante Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten. Alle nachfolgenden Schritte (Elution des Proteins, Protease-Verdau mit Trypsin, Massenbestimmung der Peptide, Charakterisierung der Isotopenverteilung) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Institut für Biochemie, MLU Halle) durchgeführt.

2.22. Immunologische Methoden

2.22.1. Gewinnung von Antikörpern

Die Immunisierung der Kaninchen, Gewinnung von Serum, sowie Affinitätsreinigung und anschließender Konjugation der Antikörper mit HRP (*horse radish peroxidase*) wurde von der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) durchgeführt. Für die Immunisierung des Kaninchens wurden

100 µl rekombinantes, an Streptactin-Sepharose (s. 2.14.4.1.) gereinigtes Protein mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

2.22.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem Transfer von Proteinen auf die PVDF-Membran (s. 2.17.) wurde die Membran kurz mit H₂Odest. gespült und für zunächst für 30 min bei RT in Blockierungslösung (3% BSA (w/v); 0,5% (v/v) Tween 20; 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH7,5, H₂Odest. ad 1 l) inkubiert und anschließend mit 1:1000 bzw. 1:10000 verdünntem Antikörper (10 µl bzw. 1 µl affinitätsgereiniger HRP-konjugierter Antikörper (s. 2.22.1.) in 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH7,5, H₂Odest. ad 10 ml) für 1 h bei RT behandelt. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurde die Membran 3 x 5 min mit 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH7,5 gewaschen. Die nachfolgende Detektion der an den Antikörper gekoppelten HRP konnte direkt auf der Membran erfolgen, wobei ein chromophores Substrat durch HRP umgesetzt wurde. Dazu wurde die Membran in Detektionslösung (100 mM Tris/HCl, pH8,5; 0,015% (v/v) H₂O₂; 0,001% 4-Chlornaphtol) bis zum Sichtbarwerden der Banden inkubiert, anschließend kurz mit H₂Odest. gespült und getrocknet. Für den Nachweis geringer Mengen an Antigen wurde der 'GST Western Blotting Kit (Chemilumineszenz)' (Roche, Mannheim) angewendet. In diesem Falle wurde ein Chemilumineszenzsubstrat durch die Peroxidase unter Lichtemission umgesetzt, welche durch Schwärzung eines Röntgenfilmes (Roche, Mannheim) dokumentiert werden konnte. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers

2.22.3. Immunopräzipitation

Für die Immunoprezipitation wurden zunächst die Antikörper an ProteinA-Sepharose, wie unter 2.14.4.2. beschrieben, gekoppelt. Die *beads* wurden mit 50 mM Tris/HCl, pH7,5 äquilibriert, über Spin-Säulen (Biorad, München) durch Zentrifugation (12000 Upm, 2 min, RT) getrocknet und in 500 µl Proteinlösung aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min leicht schüttelnd bei RT. (Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Enzymaktivität gegenüber Sauerstoff wurde dieser Schritt unter anaeroben Bedingungen durchgeführt). Die Proteinlösung wurde anschließend durch Spin-Säulen von den ProteinA-Sepharose-*beads* separiert. Je nach Proteinkonzentration wurden die Inkubation mit frischen *beads* bis zu 3 mal wiederholt. Die erhaltene Proteinlösung wurde direkt für Enzymmessungen eingesetzt.

2.23. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert vermerkt von den Firmen SERVA (Heidelberg), Merck (Darmstadt, Roche (Mannheim), Difco (Detroit, USA), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe), Gibco (Eggenstein), Sigma (Deisenhofen) und Gerbu (Gaiberg) bezogen.

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1. Enzymatische Untersuchungen mit Rohextrakt von *E. acidaminophilum*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde in *E. acidaminophilum* ein Selenocystein-haltiges Protein mit hohen Sequenzhomologien zu Peroxiredoxinen identifiziert (WAGNER, 1997). In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits das Vorhandensein einer NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* (Abb. 1) mit 15 U/g für H₂O₂, 12 U/g für *t*-Butylhydroperoxid und 17 U/g für Cumolhydroperoxid nachgewiesen werden (PARTHER, 1998).

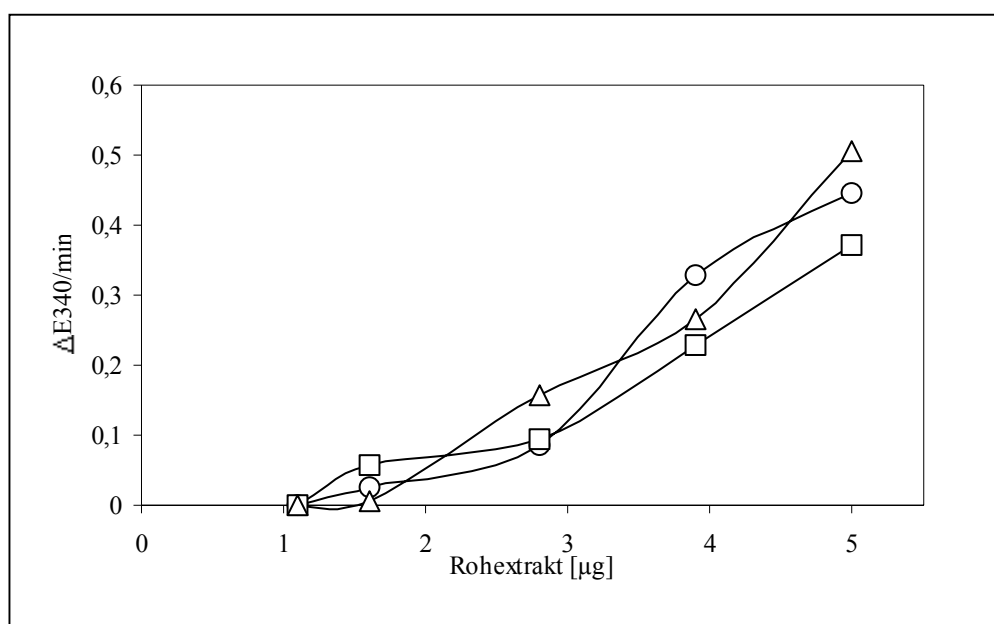


Abb. 1: NADPH-abhängige Peroxidreduktion

Das Diagramm zeigt die Zunahme der Extinktionsänderung bei 340 nm (Abnahme von NADPH) durch Rohextrakt von *E. acidaminophilum* nach Zugabe von verschiedenen Peroxiden: 1 mM H₂O₂ (○), 1 mM Cumolhydroperoxid (Δ) und 1 mM *t*-Butylhydroperoxid (□) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Peroxidase-System von *E. acidaminophilum* aus mindestens zwei Enzym-Komponenten besteht. Es wurde postuliert, daß das von (WAGNER, 1997) isolierte Selenocystein-haltige Peroxiredoxin, das Thioredoxin und die Thioredoxin-Reduktase von *E. acidaminophilum* an diesem System beteiligt sein könnten. Die Komplementation mit dem Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-System gelang jedoch nicht, so daß auch die Reinigung des Peroxiredoxins anhand der NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität bislang nicht erfolgreich war (PARTHER, 1998). Daher sollte zunächst ein Testsystem entwickelt werden, welches eine direkte Detektion des Peroxiredoxins ohne Komplementation ermöglichte. Eine Variante bot die Inhibierung der DTT/Fe³⁺/O₂-vermittelten Inaktivierung der Glutamin-Synthetase aus *E. coli* nach (KIM, *et al.*, 1988). Die Glutamin-Synthetase wird durch reaktive Sauerstoffspezies (generiert durch DTT und Fe³⁺) nicht-enzymatisch gespalten und somit inaktiviert (KIM, *et al.*, 1985). Peroxiredoxine sind in der

Lage, unter Nutzung von DTT die reaktiven Sauerstoffderivate zu entgiften. (KIM, *et al.*, 1988; KANG, *et al.*, 1998). Die Präparation von Rohextrakt der auf Glycin gezogenen *E. acidaminophilum*-Zellen (s. 2.1.3.) erfolgte aufgrund der hohen Instabilität der Peroxidase-Aktivität (PARTHER, 1998) unter anaeroben Bedingungen (s. 2.11.). Der Testansatz wurde, wie unter 2.13.3.3. beschrieben, durchgeführt. Abb. 2 zeigt die verbleibende Glutamin-Synthetase-Aktivität nach zeitlich variierender aerober Inkubation mit DTT und Fe^{3+} . Ohne Protein bzw. unter Zugabe von 250 μg hitzeinaktiviertem Rohextrakt (10 min, 100°C) sank die Glutamin-Synthetase-Aktivität bereits nach 7 min Inkubationszeit auf < 20%. Die Inkubation mit 250 μg nativem Rohextrakt führte hingegen auch nach 17 min Inkubation nur zu einem Aktivitätsverlust von 30%.

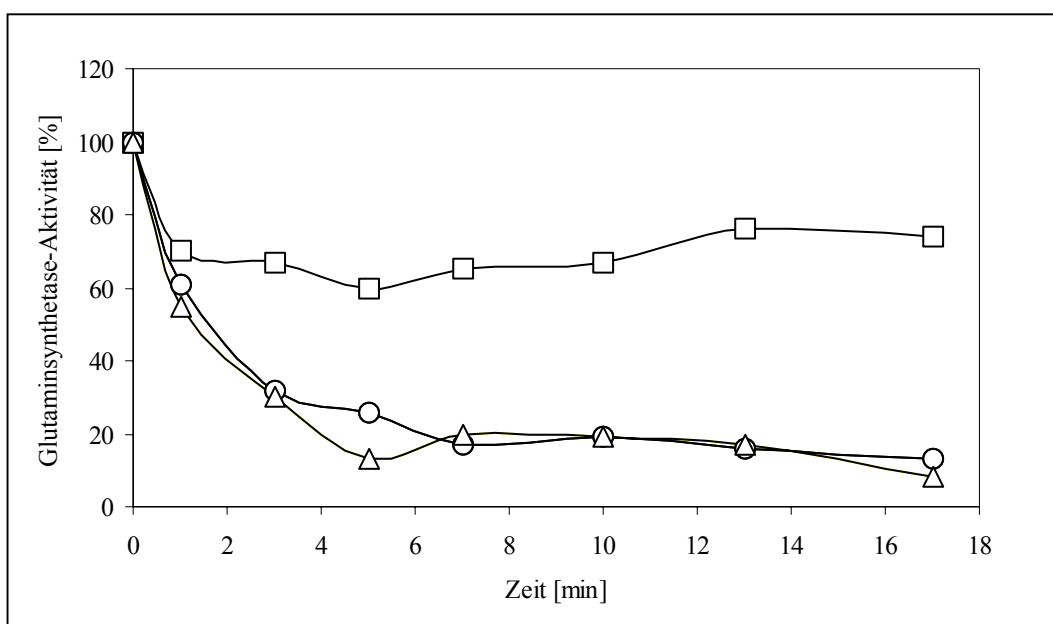


Abb. 2: Schutz der Glutaminsynthetase aus *E. coli* vor DTT/ Fe^{3+} / O_2 -vermittelter Inaktivierung durch Rohextrakt von *E. acidaminophilum* ohne Protein (o), 250 μg Rohextrakt (\square); 250 μg hitzeinaktivierter Rohextrakt (Δ).

Die direkte Messung der Reduktion von Peroxiden unter Nutzung von DTT als Elektronendonator war nach einer modifizierten Methode von LIM, *et al.*, 1993 (s. 2.13.3.2.) möglich. So konnten für die in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzten Substrate H_2O_2 , Cumolhydroperoxid und *t*-Butylhydroperoxid jeweils eine spezifische Enzymaktivität von 150 (\pm 10) U/g ermittelt werden. Eine schwache Peroxidase-Aktivität konnte mit 20 (\pm 2) U/g für Linolsäurehydroperoxid beobachtet werden. Die zeitabhängige Umsetzung von Peroxiden durch Rohextrakt ist am Beispiel von Cumolhydroperoxid in Abb. 3 gezeigt. Ohne Protein, ohne DTT bzw. mit hitzeinaktiviertem Rohextrakt erfolgte keine Peroxidreduktion.

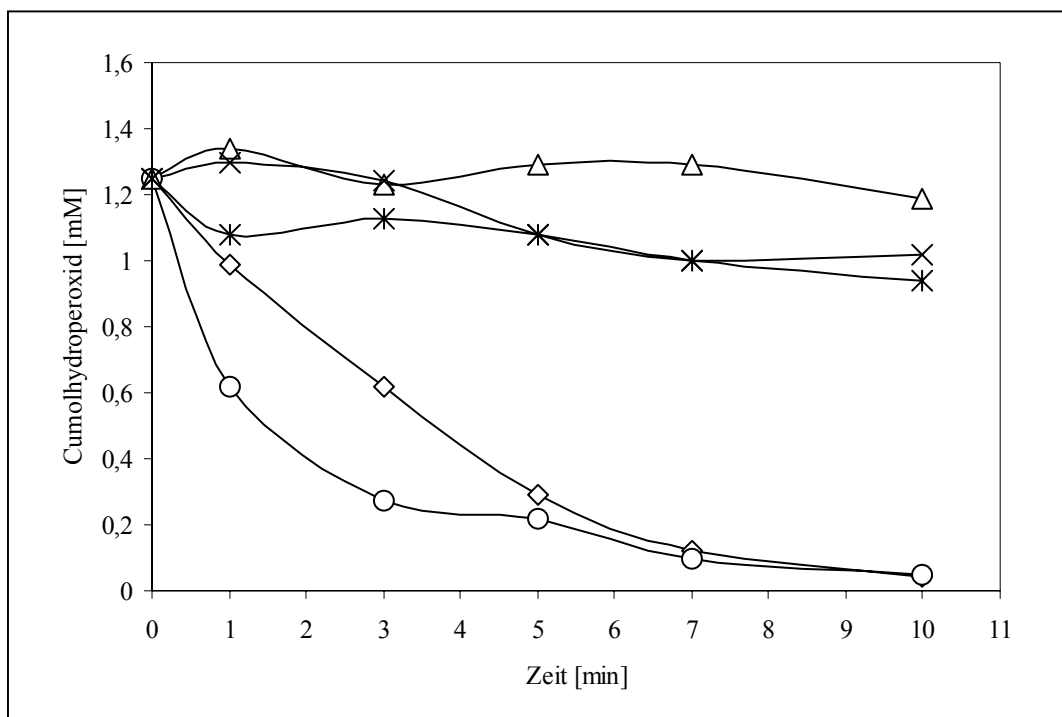


Abb. 3: DTT-abhängige Reduktion von Cumolhydroperoxid durch Rohextrakt von *E. acidaminophilum*
 100 µg Rohextrakt (◇), 200 µg Rohextrakt (○), hitzeinaktivierter Rohextrakt (△), ohne Protein (×), ohne DTT (*).

3.2. pH-selektive Markierung von Seleno-Proteinen mit EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin

Im Anschluß an die Aktivitätsmessungen im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* sollte gezeigt werden, ob ein Seleno-Protein für die gemessenen Peroxidase-Aktivitäten verantwortlich war. Selenocystein zeichnet sich durch eine höhere Nukleophilie im Vergleich zum Cystein aus. So liegt die Selenol-Gruppe bei einem pH von 6,5 bereits ionisiert vor. Im Gegensatz dazu erfolgt die vollständige Deprotonierung bei Cysteinen erst ab einem pH-Wert von 8,0 (GORLATOV & STADTMAN, 1998). Durch diese unterschiedlichen Eigenschaften ist es möglich, Seleno-Proteine spezifisch mit Iodoacetat- bzw. Bromacetat-Derivaten zu carboxymethylieren und damit zu inaktivieren (GORLATOV & STADTMAN, 1998; SUN, *et al.*, 1999). Für den Nachweis wurde Rohextrakt aus 3 g auf Glycin angezogenen Zellen von *E. acidaminophilum* unter anaeroben Bedingungen präpariert (s. 2.11.2.2.). Als Aufschluß-Puffer diente 50 mM K-Phosphat-Puffer, pH6,8, 3 mM DTT. Der Proteingehalt des Rohextraktes betrug 63 mg/ml. 3,5 mg Protein wurden einer Behandlung mit EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin (Pierce, Rockford, USA; im weiteren mit IAB abgekürzt, s. 2.20.) unterzogen und anschließend für Enzymaktivitätsmessungen mit den Substraten Cumolhydroperoxid, *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ nach der Methode von LIM, *et al.*, 1993 (s. 2.13.3.2.) eingesetzt. Um auszuschließen, daß das Lösungsmittel für IAB, DMF, einen Einfluß auf die Enzymaktivität hat, wurde als Kontrolle ein Ansatz mit 28% (v/v) DMF ohne IAB mitgeführt. Der Tab. 5 ist zu

entnehmen, daß die Peroxidase-Aktivität nach Behandlung mit IAB für alle Substrate auf ca. 20% sank. DMF hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymaktivität.

Tab. 5: pH-selektive Inhibierung der Peroxidase-Aktivität mit IAB

Substrat	relative Enzymaktiv. im RE [%]	relative Enzymaktiv. im RE nach 0,4 µM IAB [%]	relative Enzymaktiv. im RE mit 28 %(v/v) DMF [%]
Cumolhydroperoxid	100 ¹	19 (± 2,8)	93 (± 4,0)
<i>t</i> -Butylhydroperoxid	100 ¹	19 (± 1,0)	99 (± 0,6)
H ₂ O ₂	100 ¹	22 (± 7,5)	95 (± 0,6)

¹100% entsprechen einer relativen Enzymaktivität von 0,2 µmol/min (spez. Enzymaktivität: 60 U/g)

Um die Bindung von IAB an die Proteine nachweisen zu können, wurde ein Teil des mit IAB behandelten Ansatzes auf ein 12,5 %iges (w/v) PAG (2.16.19.) aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (2.17.). Aufgrund des Biotin-*linkers* von IAB konnten die markierten Proteine mit Streptavidin-HRP-Konjugat immunologisch nachgewiesen werden (s. 2.22.2.). Auf diese Weise wurden in *E. acidaminophilum* neun mit Biotin markierte Proteinbanden identifiziert. Ein starkes Signal gaben zwei Proteine der Größe 22 und 17 kDa, weitere, allerdings schwächere Signale wurden bei 47, 45, 30, 23, 19, 10 und 9 kDa detektiert (s. Abb. 4). Der mit der Markierung einhergehende Verlust der Peroxidase-Aktivität deutet auf die Katalyse dieser Reaktion durch ein Seleno-Protein hin.

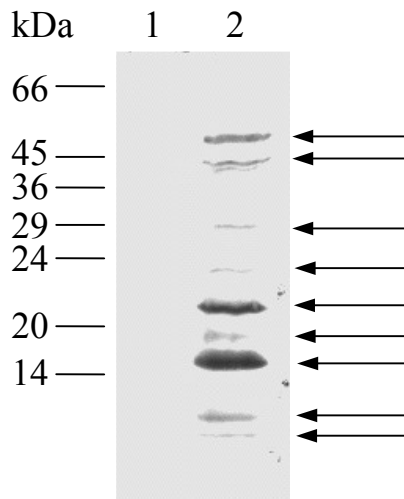


Abb. 4: pH-selektive Markierung von Seleno-Proteinen in *E. acidaminophilum*

Transferierte Proteine aus einem 12,5%ige SDS-PAG auf PVDF-Membran. Detektion der biotinylierten Proteine mit Streptavidin-HRP-Konjugat. Spur 1: 600 µg RE von *E. acidaminophilum*; Spur 2: 600 µg RE von *E. acidaminophilum* nach Inkubation mit EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin

3.3. Reinigung und Charakterisierung einer Peroxidase aus *E. acidaminophilum*

Zur Messung von Peroxidase-Aktivitäten zwecks Lokalisierung des Proteins während der Reinigung kam der Enzymtest nach LIM, *et al.*, 1993 (s. 2.13.3.2.) zum Einsatz. Als Substrat diente stets

0,5 mM Cumolhydroperoxid. Alle Reinigungsschritte erfolgten aufgrund der hohen Sauerstoffempfindlichkeit der Peroxidase-Aktivität (PARTHER, 1998) unter anaeroben Bedingungen.

3.3.1. Chromatographie an Q-Sepharose

Zunächst wurden 30 g Zellen (Feuchtgewicht) von *E. acidaminophilum* unter anaeroben Bedingungen in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 3 mM DTT aufgeschlossen (s. 2.11.2.2.). Der so gewonnene Rohextrakt besaß einen Proteingehalt von 32 mg/ml und eine spezifische Aktivität von 0,12 U/mg. 40 ml Rohextrakt (1280 mg, 154 U) wurden auf eine Q-Sepharose-Säule (Bettvolumen: 80 ml, Durchmesser: 5 cm) mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen mit Aufschlußpuffer (5 Bettvolumen, Flußrate: 1 ml/min) wurde gebundenes Protein mittels eines KCl-Gradienten (0-1 M) in Aufschlußpuffer innerhalb von 8 Bettvolumen eluiert. Es schloß sich ein Nachspülen mit einem Bettvolumen 1 M KCl an. Eluiertes Protein wurde in 11 ml Fraktionen aufgefangen. Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, eluierte die Hauptaktivität zwischen 0,3 und 0,4 M KCl innerhalb der Fraktionen 52-55 (40 ml). Diese Fraktionen wurden vereinigt und gegen 50 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,5, 3 mM DTT dialysiert.

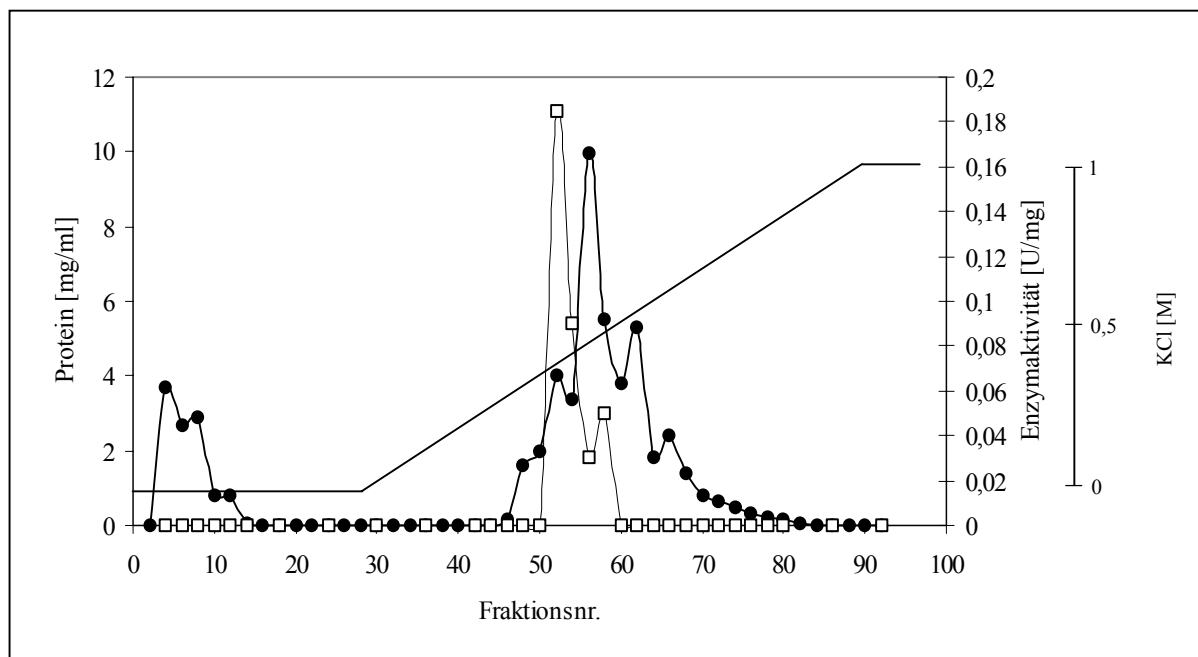


Abb. 5: Elutionsprofil der Peroxidase-Aktivität nach Chromatographie an Q-Sepharose

●: Proteingehalt der Fraktionen; □: Enzymaktivität in den entsprechenden Fraktionen.

3.3.2. Chromatographie an Butyl-Sepharose

Die vereinigten Fraktionen nach Q-Sepharose besaßen einen Proteingehalt von 5,5 mg/ml und eine spez. Enzymaktivität von 0,4 U/mg. 40 ml (220 mg, 88 U) des Q-Sepharose-Pools wurden mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 1,5 M eingestellt und auf eine mit 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM K-Phosphat-Puffer

pH 7,5, 3 mM DTT äquilibrierte Butyl-Sepharose-Säule (BV: 30 ml, Durchmesser 1,5 cm) aufgetragen (Flußrate: 0,5 ml/min). Anschließend erfolgte das Waschen der Säule mit 4 BV Äquilibrierungspuffer. Gebundenes Protein eluierte innerhalb eines abfallenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 1,5-0 M über 7 BV. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml. Wie in Abb. 6 gezeigt, eluierte die Hauptaktivität der Peroxidase bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 0,5-0,6 M innerhalb der Fraktionen 58-62 (25 ml).

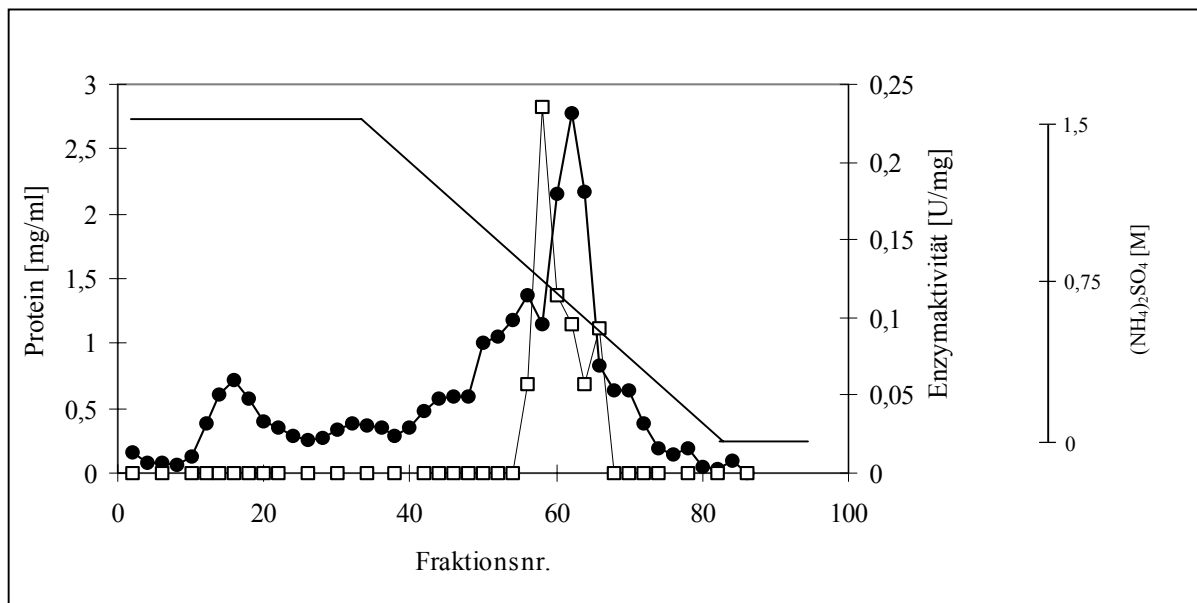


Abb. 6: Elutionsprofil der Peroxidase-Aktivität nach Butyl-Sepharose

●: Proteingehalt in den Fraktionen; □: Enzymaktivitäten in den entsprechenden Fraktionen.

3.3.3. Gelpermeations-Chromatographie an Sephacryl 200 HR

Der aus der Anreicherung an Butyl-Sepharose erhaltene Pool besaß einen Proteingehalt von 1,3 mg/ml und eine spez. Enzymaktivität von 0,9 U/mg (32 mg, 27 U). Für die Durchführung einer Gelpermeations-Chromatographie mußte die Probe auf ein Volumen von 1 ml eingengt werden. Da die Anreicherung unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, kamen für die Aufkonzentrierung nur eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bzw. eine Konzentrierung mittels PEG in Frage (s. 2.15.4. bzw. 2.15.5.). Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen 50 mM K-Phosphat pH 7,5, 3 mM DTT. In beiden Fällen konnte in der aufkonzentrierten Probe stets ein Aktivitätsverlust um 33 % beobachtet werden. Die so erhaltene Proteinlösung (1 ml, 14,3 mg, 0,5 U/mg) wurde auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte Gelpermeations-Säule (Sephacryl HR200, BV 50 ml) mit einer Flußrate von 0,1 ml/min aufgetragen, mit 80 ml 50 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,5, 3 mM DTT eluiert und in 1 ml Fraktionen aufgefangen (s. Abb. 7). In den Fraktionen 10 und 11 war eine Peroxidase-Aktivität von 1,7 U/mg nachweisbar.

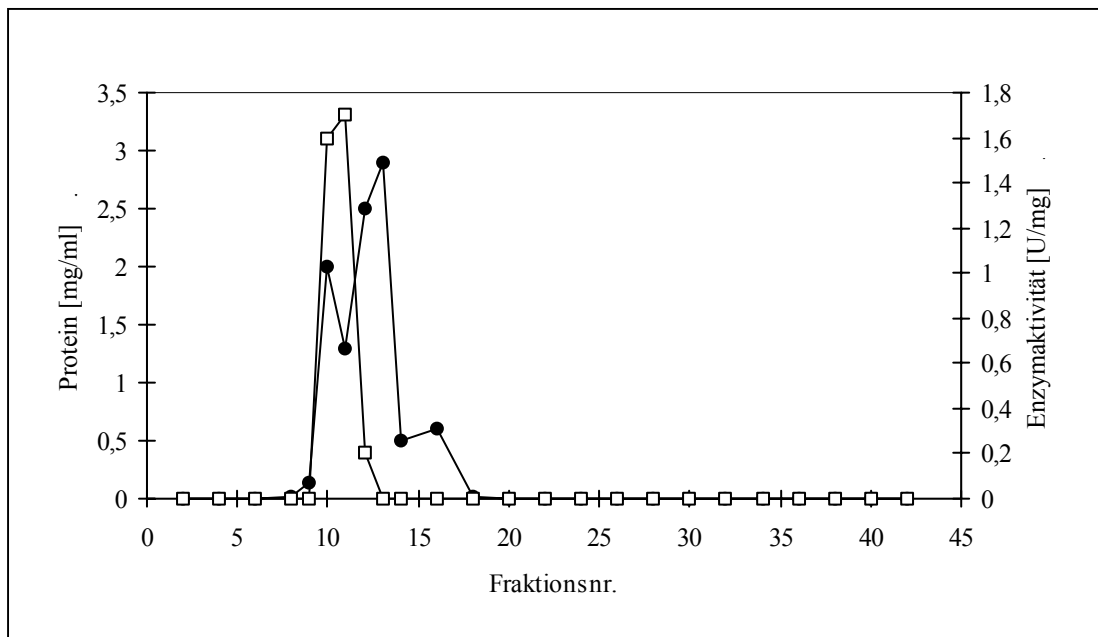


Abb. 7: Elutionsprofil der Peroxidase-Aktivität nach Gelpermeationschromatographie

●: Proteingehalt der Fraktionen; □: Enzymaktivität der entsprechenden Fraktionen.

Nach diesem Anreicherungsschritt lagen, wie in Abb. 8 gezeigt, 0,8 mg in Form von drei Haupt-Proteinen der Größen 47, 29 und 22 kDa vor. Das kleinste Protein entsprach rein größenmäßig dem erwarteten 22 kDa Seleno-Peroxiredoxin. Um dies zu verifizieren wurden die ersten 5 AS der drei Proteine durch eine N-terminale Sequenzierung bestimmt (s. 2.21.). Die Proteine zeigten eindeutige Sequenzhomologien zu den von (WAGNER, 1997) identifizierten drei Proteinkomponenten des substratspezifischen Protein B der Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum*, wobei das 47 kDa Protein dem GrdB und das 25 kDa Protein dem N-terminales Spaltprodukt des Proproteins GrdE entsprach. Das 22 kDa Protein war N-terminal blockiert, konnte aber nach Umsatz mit oPDA als C-terminales Spaltprodukt von GrdE identifiziert werden (WAGNER, 1997). In Tab. 6 und Abb. 8 ist die Reinigung von Protein B nochmals zusammenfassend dargestellt. Diese Anreicherung konnte im Rahmen dieser Arbeit vier mal reproduziert werden. Allerdings schwankten die Anfangsaktivitäten im Rohextrakt zwischen 0,1 und 0,15 U/mg. Die Anreicherung lag jedoch vergleichbar zwischen 10-15-fach.

Tab. 6: Anreicherung einer Cumolhydroperoxid- und DTT-abhängigen Peroxidase-Aktivität aus *E. acidaminophilum*

Reinigungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [-fach]
Rohextrakt	1280	154	0,12	100	1
Q-Sepharose	220	88	0,4	57	3,3
Butyl-Sepharose	32	27	0,9	34	7,5
Gelfiltration	0,8	1,4	1,7	2	14

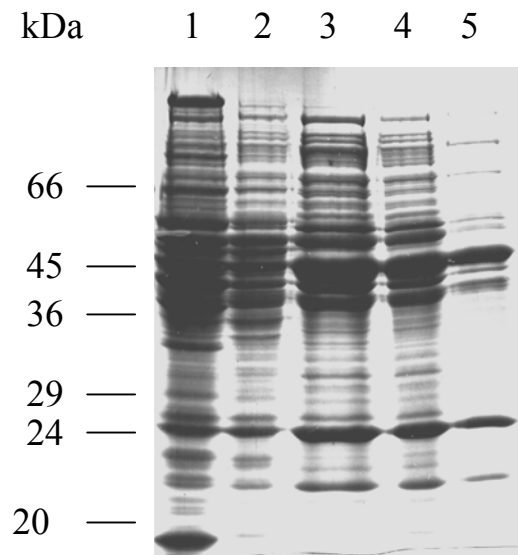


Abb. 8: Anreicherung von Protein B aus *E. acidaminophilum*

12,5% SDS-PAGE; Spur 1: 100 μg Rohextrakt von *E. acidaminophilum*; Spur 2: 58 μg nach Chromatographie an Q-Sepharose; Spur 3: 38 μg nach Chromatographie an Butyl-Sepharose; Spur 4: 30 μg nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung; Spur 5: 8 μg nach Chromatographie an Sphacryl 200 HR.

3.3.4. Charakterisierung von Protein B hinsichtlich seiner Peroxidase-Aktivität

Die enzymatischen Untersuchungen von Protein B aus *E. acidaminophilum* wurden mit dem nach der Gelfiltration erhaltenen Proteinen (s. 3.3.3.) durchgeführt. Wenn nicht gesondert vermerkt, wurde zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der Peroxidase-Test nach LIM, *et al.*, 1993 unter Einsatz der Substrate DTT (10 mM) und Cumolhydroperoxid (0,5 mM) bei 37°C und einem pH-Wert von 7,5 verwendet.

3.3.4.1. Bestimmung des Temperatur-Optimums

Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums betrug die eingesetzte Proteinmenge für die Messungen von 20-30°C 4 μg und von 35-45°C 10 μg . Die höhere Proteinkonzentration ermöglichte eine kürzere Inkubationszeit. Diese war notwendig, da im entsprechenden Temperaturbereich eine Abnahme von Cumolhydroperoxid auch ohne Zugabe von Protein innerhalb der für die Temperaturen 20-30°C verwendeten Reaktionszeit zu beobachten war. Die entsprechende Blindreaktion wurde für alle Temperaturen bestimmt und von dem gemessenen Wert der Enzymaktivitäts subtrahiert. Das Temperaturoptimum betrug 35°C (s. Abb. 10), was in der Nähe der optimalen Wachstumstemperatur von *E. acidaminophilum* (34°C) lag. Die Auftragung des dekadischen Logarithmus der jeweiligen spezifischen Aktivität gegen die Reziproken der Inkubationstemperatur in Kelvin (Arrhenius-Auftragung) ergab im linearen Bereich den Anstieg $m = -10849 \text{ K}$. Nach der Gleichung $E_A = -2,303 \times R \times m$, ließ sich für die von Protein B katalysierte Reaktion eine Aktivierungsenergie (E_A) von $\approx 200 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ berechnen.

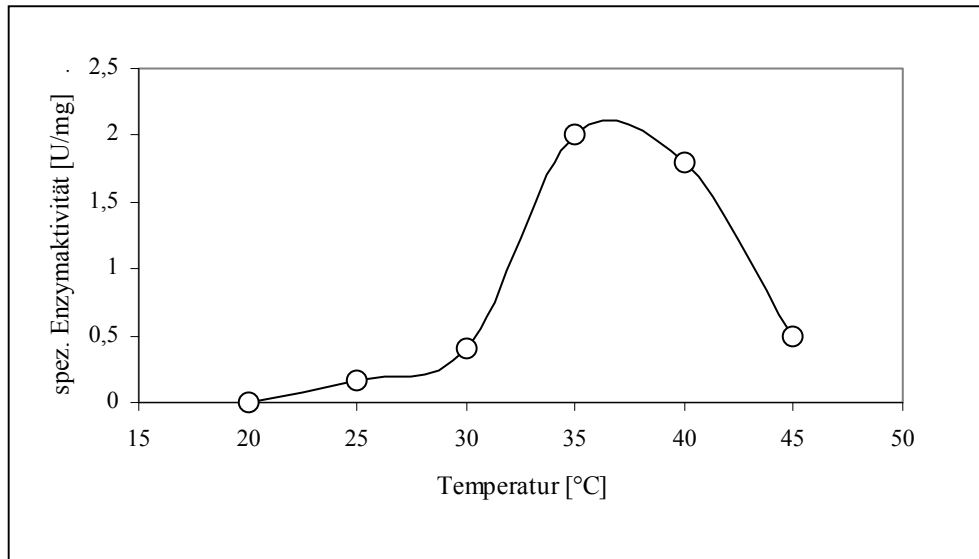


Abb. 9: Temperatur-Optimum der von Protein B katalysierten Peroxid-Reduktion

3.3.4.2. Bestimmung des pH-Optimums

Für die Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums wurden 7 μg Protein B eingesetzt. Das pH-Optimum betrug 8,0 für Tris/HCl-Puffer und 7,5 für KP-Puffer (s. Abb. 10). Dabei zeigte jedoch das Protein in KP-Puffer nur ca. 75 % der Enzymaktivität, die unter Verwendung des Tris/HCl-Puffers erhalten wurde. Weitere Messungen im alkalischen Bereich waren nicht möglich, da ab einem pH-Wert von $>9,0$ eine rapide Abnahme von Cumolhydroperoxid ohne Zugabe von Protein innerhalb der verwendeten Reaktionszeit zu beobachten war.

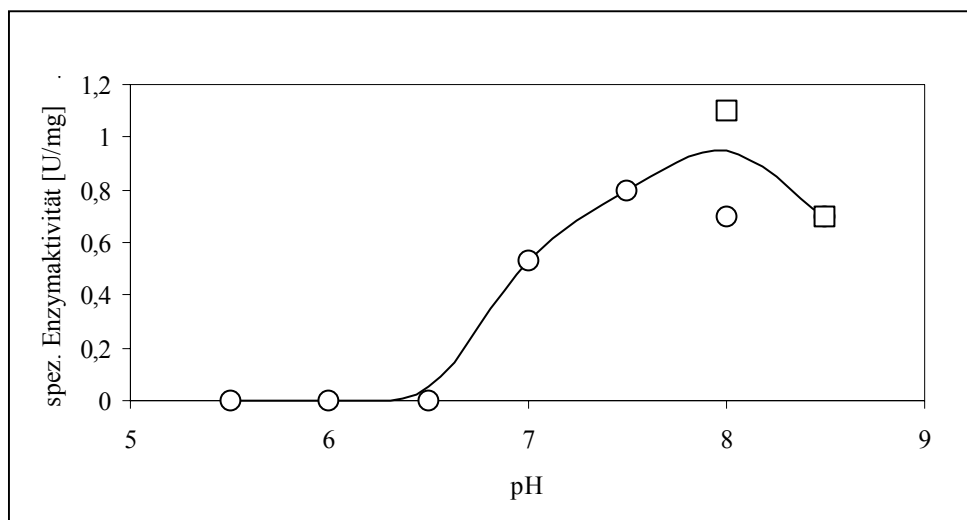


Abb. 10: pH-Optimum der von Protein B katalysierten Peroxid-Reduktion

o: 50 mM KP, pH5,5-8,0; □: 50 mM Tris/HCl; pH8,0-8,5

3.3.4.3. Charakterisierung des Substratspektrums

Zur Charakterisierung des Substratspektrums von Protein B wurden verschiedene Peroxide und Elektronendonatoren im Enzymtest eingesetzt. Die Messung für das Substrat Peroxynitrit erfolgte wie unter 2.13.4. beschrieben. Die spezifischen und relativen Enzymaktivitäten sind für die verschiedenen Peroxide in Tab. 7 dargestellt. So konnte für Cumolhydroperoxid die höchste spez. Aktivität ermittelt werden. Im Vergleich zu diesem wurden *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ nur mit einer Rate von ca. 50-60% umgesetzt. Für Linolsäurehydroperoxid konnte keine Enzymaktivität beobachtet werden. Eine Peroxynitrit-Reduktase-Aktivität von Protein B konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Tab. 7: Substratspektrum von Protein B hinsichtlich seiner Peroxidase-Aktivität

Peroxid	Spez. Aktivität [U/mg]	Relative Aktivität [%]
Cumolhydroperoxid ¹	1,1	100
<i>t</i> -Butylhydroperoxid ¹	0,7	64
H ₂ O ₂ ¹	0,6	55
Linolsäurehydroperoxid	–	–
Peroxynitrit ²	–	–

¹Die spez. und relativen Enzymaktivitäten wurden mit 7 µg gereinigtem Protein bestimmt. Als Elektronendonator diente DTT.

Die entsprechenden Enzymaktivitäten für die verschiedenen Elektronendonatoren sind Tab. 8 zu entnehmen. Die höchste spezifische Aktivität wurde für DTT bestimmt. Im Vergleich dazu waren die relativen Aktivitäten mit den anderen getesteten Elektronendonatoren nur gering.

Tab. 8: Spektrum der Elektronendonatoren

e Donor ¹	Spez. Aktivität [U/mg] ²	Relative Aktivität [%] ²
DTT	1,1	100
DTE	0,4	36
2-Mercaptoethanol	0,2	18
Glutathion (red.)	0,1	9
L-Cystein	0,2	18

¹Die Konzentration der eingesetzten Elektronendonatoren betrug 10 mM

²Die spez. und relativen Enzymaktivitäten wurden mit 7 µg gereinigtem Protein bestimmt. Als Substrat diente Cumolhydroperoxid.

3.3.5. Bestimmung der kinetischen Daten von Protein B

Zur Bestimmung der kinetischen Daten k_m und V_{max} von Protein B hinsichtlich seiner Peroxidase-Aktivität wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration unter konstanten Bedingungen gemessen. Als Substrate wurden Cumolhydroperoxid, *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ eingesetzt. Der Einfluß von verschiedenen DTT-Konzentrationen wurde nicht untersucht, da DTT für Protein B keinen natürlichen Elektronendonator darstellte und daher für die Charakterisierung des Proteins nicht relevant war. Abweichend von dem, für die Bestimmung der Parameter empfohlenen Substratkonzentrationsbereich von $k_m/10$ bis $10 \times k_m$, wurden die Substrate Cumolhydroperoxid und *t*-Butylhydroperoxid zwischen einer Konzentration von $k_m/10$ und $3 \times k_m$,

H₂O₂ zwischen $k_m/3$ und $2 \times k_m$ variiert. Messungen bei höheren Substratkonzentrationen verlangten eine erheblich längere Reaktionszeit, so daß nicht mehr sichergestellt werden konnte, daß die ermittelten Meßwerte tatsächlich auf die Umsetzung durch das Enzym zurückzuführen waren, da ab einer Inkubationszeit von 8 min bei 37 °C bereits der Kontrollansatz ohne Protein eine deutliche Abnahme von Peroxid zeigte. Dieses Problem betraf vor allem die Messungen mit H₂O₂, da hier auch bei sehr niedrigen Konzentrationen der Zerfall des Substrates unter den Meßbedingungen größer war als der Umsatz durch das Enzym. Daher wurde für H₂O₂ für alle Meßpunkte eine Blindprobe ohne Protein mitgeführt und die erhaltenen Werte entsprechend von der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms subtrahiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte nach drei verschiedenen Methoden. Eine gängige Methode ist die reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration nach LINEWEAVER & BURK, 1934. Der Nachteil dieses Verfahrens bestand jedoch darin, daß die Meßwerte, die für niedrige Substratkonzentrationen erhalten werden, mit einem relativ großen Fehler behaftet sind und deshalb leicht überbewertet werden. Zusätzlich wurden zwei weitere Auswertungsmöglichkeiten, die Auftragung nach EADIE, 1942 (Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den Quotienten aus Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration) und das Verfahren nach HANES, 1932 (Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration) genutzt, da diese mit kleineren Auswertefehlern behaftet sind. So wurde für Cumolhydroperoxid ein k_m -Wert von 6×10^{-1} nach LINEWEAVER & BURK, 1934 bestimmt. Im Gegensatz dazu wurde nach EADIE, 1942 und HANES, 1932 ein k_m von 8 und 9×10^{-2} ermittelt. Für *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ konnte durch alle drei Methoden ein und derselbe k_m -Wert von 9×10^{-2} bzw. $2,7 \times 10^{-1}$ ermittelt werden. Weitere kinetische Daten sind Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9 Kinetische Daten der von Protein B katalysierten Peroxidase-Aktivität

Substrat	K _m [mM]		
	Lineweaver-Burk	Eadie	Hanes
Cumolhydroperoxid	$6,0 \times 10^{-1}$	$8,0 \times 10^{-2}$	$9,0 \times 10^{-2}$
<i>t</i> -Butylhydroperoxid	$9,0 \times 10^{-2}$	$9,0 \times 10^{-2}$	$9,0 \times 10^{-2}$
H ₂ O ₂	$2,6 \times 10^{-1}$	$2,7 \times 10^{-1}$	$2,7 \times 10^{-1}$
	V _{max} [U x mg ⁻¹]		
	Lineweaver-Burk	Eadie	Hanes
Cumolhydroperoxid	2,5	0,6	0,6
<i>t</i> -Butylhydroperoxid	0,5	0,5	0,5
H ₂ O ₂	0,3	0,3	0,3

3.3.6. Schutz der Glutamin-Synthetase vor Fe³⁺/DTT/O₂-vermittelter Inaktivierung durch Protein B aus *E. acidaminophilum*

Durch diesen Nachweis sollte überprüft werden, ob Protein B aus *E. acidaminophilum* auch an der im Rohextrakt beobachteten Protektion von Glutamin-Synthetase vor oxidativer, Fe³⁺/DTT-vermittelter Inaktivierung beteiligt ist. Der Enzymtest wurde, wie unter 2.13.3.3. beschrieben, durchgeführt. Die eingesetzte Proteinmenge an gereinigtem Protein B betrug 13 µg. Als Kontrolle diente ein Testansatz

mit 13 µg hitzeinaktiviertem Protein B (10 min, 100°C). Die ermittelten relativen Enzymaktivitäten sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

Tab. 10: Schutz der Glutamin-Synthetase vor Fe²⁺/DTT/O₂-vermittelter Inaktivierung durch Protein B

Probe/Meßansatz	relative Enzymaktivität der Glutamin-Synthetase [%]
Glutamin-Synthetase	100
Glutamin-Synthetase + Fe ²⁺ /DTT/O ₂	0
Glutamin-Synthetase + Fe ²⁺ /DTT/O ₂ + Protein B	70
Glutamin-Synthetase + Fe ²⁺ /DTT/O ₂ + Protein B hitzeinaktiviert	0

Die Aktivität der Glutamin-Synthetase ging nach 10 minütiger Behandlung mit Fe³⁺/DTT/O₂ vollständig verloren. Durch zusätzliche Anwesenheit von 13 µg Protein B im Testansatz verringerte sich die Ausgangs-Aktivität nur um 30%. Hitzeinaktiviertes Protein B war dagegen nicht in der Lage die vollständige oxidative Inaktivierung der Glutamin-Synthetase zu verhindern.

3.3.7. Beteiligung von Protein B an der NADPH-abhängigen Peroxidreduktion

Wie bereits in 3.1. beschrieben, verfügte Rohextrakt von *E. acidaminophilum* neben der Fähigkeit, Glutaminsynthetase vor DTT/Fe³⁺/O₂-vermittelter Inaktivierung zu schützen bzw. Peroxide unter Nutzung von DTT als Elektronendonator zu reduzieren, auch über eine NADPH-abhängige Peroxidase-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Reduktion der Peroxide mittels DTT, als auch die Hemmung der Glutamin-Synthetase-Inaktivierung auf die Enzymaktivität von Protein B der Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* zurückzuführen war (s. 3.3.). Im folgenden sollte nun geprüft werden, ob GrdB eine Komponente des an der NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität aus *E. acidaminophilum* beteiligten Enzymkomplexes darstellte. Da der natürliche Elektronendonator für diese Reaktion bislang nicht bekannt war, mußte ein Verfahren gefunden werden, GrdB spezifisch aus dem Rohextrakt von *E. acidaminophilum* zu entfernen. Eine Möglichkeit dafür bot eine Immunopräzipitation mit gegen GrdB gerichteten polyklonalen Antikörpern. Diese wurden von der Fa. Davids Biotechnologie durch die Immunisierung von Kaninchen (s. 2.22.1.) bereitgestellt. Als Antigen zur Immunisierung bzw. anschließenden Affinitätsreinigung des Antikörpers wurden 2 mg des unter 3.5. beschriebenen, heterolog in *E. coli* exprimierten mit N-terminalen Strep-tagII-fusionierten GrdBU350C eingesetzt. Die Immunopräzipitation erfolgte wie unter 2.22.3. dargestellt unter Einsatz von 50 µg ProteinA-Sepharose-beads und 1,5 mg Anti-GrdB unter anaeroben Bedingungen. Als Proteinlösung wurden 6,5 mg anaerob präparierter Rohextrakt von *E. acidaminophilum* eingesetzt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine eventuelle Inaktivierung des Enzyms aufgrund der langen Inkubationszeit mit den Anti-GrdB-Sepharose-beads auszuschließen, wurden als Blindprobe 6,5 mg Rohextrakt mit ungekoppelter ProteinA-Sepharose identisch zum Präzipitations-Ansatz behandelt. Als weitere Kontrolle diente Rohextrakt von *E. acidaminophilum*, dem das Seleno-Peroxiredoxin (PrxU_{Ea}) fehlte, da dieses Protein ursprünglich als Bestandteil des Enzymsystems, welches die NADPH-abhängige Peroxidreduktion im Rohextrakt

katalysierte, vermutet wurde. Dazu wurde PrxU_{Ea} ebenfalls durch spezifische immunologische Ausfällung mit entsprechenden Antikörpern (s. 3.7.2.) entfernt. Es wurden 140 µg PrxU-Antikörper an 50 mg ProteinA-Sepharose gekoppelt (s. 2.22.3.) und die so erhaltenen *beads* mit 6,5 mg anaerob präpariertem Rohextrakt für 2 h bei RT inkubiert (anaerob). Die anschließenden Enzymmessungen erfolgten wie unter 2.13.3.4. beschrieben mit 0,5 M Cumolhydroperoxid. Für 2 mg Rohextrakt konnte somit eine NADPH-abhängige Peroxidase-Aktivität von 15 U/g ermittelt werden. Im Gegensatz dazu betrug die spez. Enzymaktivität von mit Anti-GrdB behandeltem Rohextrakt (2,7 mg) nur 0,7 U/g. Die mit Anti-PrxU-AK behandelte Probe (2,5 mg) wies eine Aktivität von 18 U/g auf (s. Abb. 11). Um die Vollständigkeit der Immunopräzipitation zu überprüfen, wurden von der jeweiligen Probe 20 µg auf ein 12,5%iges SDS-PAG (s. 2.16.1.) aufgetragen, die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 2.17.) und das Vorhandensein von GrdB bzw. PrxU_{Ea} immunologisch nachgewiesen. Aus Abb. 11 wird ersichtlich, daß PrxU komplett und GrdB nahezu vollständig durch die Behandlung mit den entsprechenden Antikörpern aus dem Rohextrakt entfernt werden konnte.

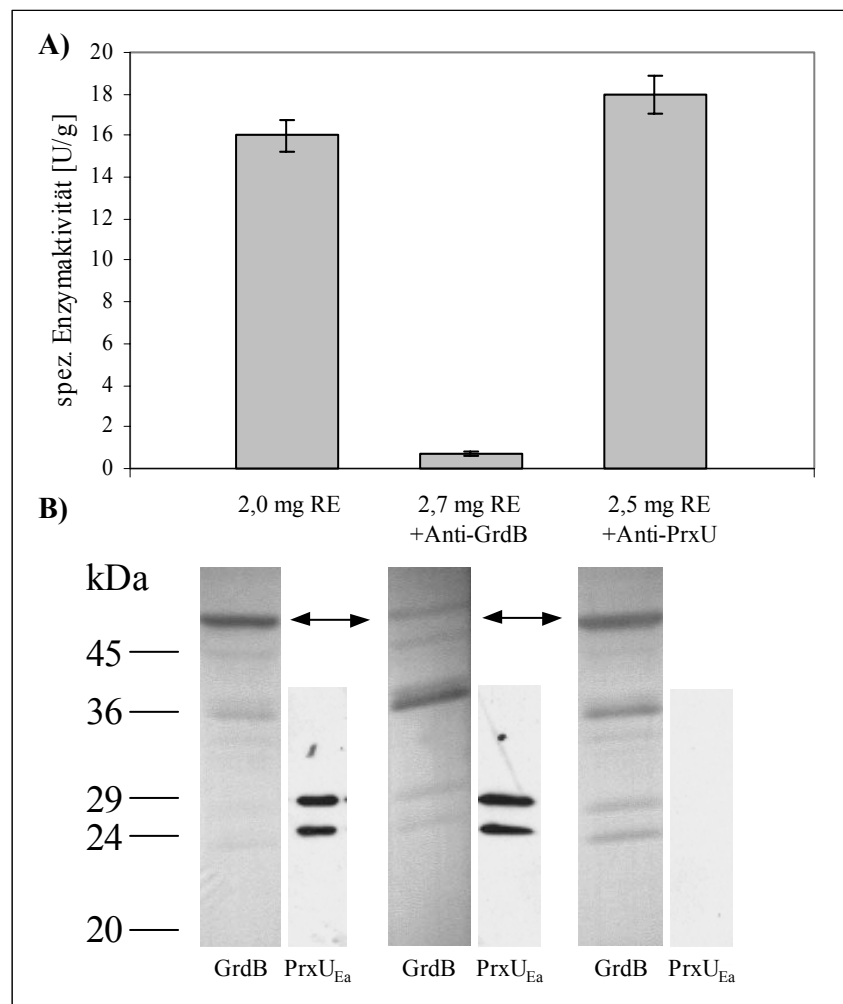


Abb. 11: Beteiligung von GrdB an der NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität aus *E. acidaminophilum*
 A: graphische Darstellung der NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität von Rohextrakt mit und ohne Behandlung mit Anti-GrdB- bzw. Anti-PrxU-ProteinA-Sepharose-*beads*.
 B: Western Blot und immunologischer Nachweis von GrdB und PrxU in den zu A korrespondierenden Proben. Die Pfeile geben die Position von GrdB an.

3.4. Untersuchungen zum nativen Elektronendonator von Protein B

Im Kapitel 3.3.7. konnte gezeigt werden, daß GrdB einen Bestandteil des Enzymkomplexes darstellte, welcher die NADPH-abhängige Peroxidase-Reaktion katalysierte. Dabei reagierte GrdB direkt mit den Peroxiden, wobei DTT als künstlicher Elektronendonator genutzt wurde (s. 3.3.). Interessant war es nun, den oder die natürlichen Elektronenüberträger, die das Bindeglied zwischen NADPH und GrdB darstellten, zu identifizieren und ggf. zu charakterisieren. Erste Ansatzpunkte dafür fanden sich in einer Veröffentlichung von (NIIMURA, *et al.*, 2000), in der eine H₂O₂ bildende NADH-Oxidase aus *Amphibacillus xylanus* beschrieben wurde, die neben ihrer Oxidase-Aktivität auch über eine Alkylhydroperoxid-Reduktase-Aktivität (AhpF-Aktivität) verfügt und als solche die elektronenübertragende Komponente zwischen AhpC (Peroxiredoxin) und NADH in *A. xylanus* darstellte. Diese Proteine gehören neben den NADH-Dehydrogenasen zur Familie der NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktasen, die hohe Ähnlichkeiten zu Thioredoxin-Reduktasen besitzen. Sie verfügen wie diese über ein redoxaktives Sequenzmotiv –CxxC– in der Nähe der Pyridinnukleotid-Bindestellen sowie über ein weiteres, in Thioredoxin-Reduktasen nicht vorhandenes –CxxC-Motiv im N-Terminus der Polypeptidkette (POOLE, *et al.*, 2000). Da diese Proteine in der Lage sind, die Reduktion von Disulfidbindungen unter Nutzung von NAD(P)H zu katalysieren (POOLE, *et al.*, 2000), könnte ein solches Protein ebenfalls an der durch Protein B vermittelten NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität beteiligt sein. Da NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktasen von Gram-positiven Organismen meist eine hohe NAD(P)H-Oxidase-Aktivität aufweisen (POOLE, *et al.*, 2000), sollte festgestellt werden, ob neben der Thioredoxin-Reduktase aus *E. acidaminophilum*, deren Oxidase-Aktivität bereits bekannt war (MEYER, 1993), weitere Proteine mit entsprechender Aktivität in diesem Organismus existierten.

3.4.1. Reinigung einer NADPH-Oxidase aus *E. acidaminophilum*

Zunächst wurde Rohextrakt von *E. acidaminophilum* auf die Anwesenheit einer NADH bzw. NADPH-Oxidase-Aktivität untersucht. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 2.13.1. beschrieben. Abb. 12 zeigt die Extraktproportionalität der Reaktion. Für NADH konnte eine spez. Enzymaktivität von 11 U/g und für NADPH von 45 U/g ermittelt werden.

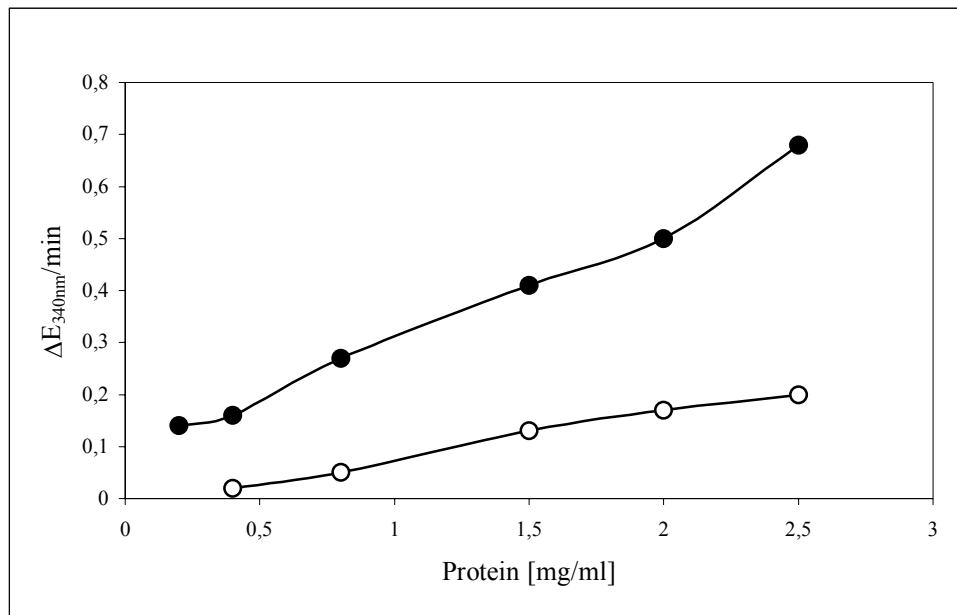


Abb. 12: Extraktproportionalität von NADH- und NADPH-Oxidase-Aktivität im Rohextrakt von *E. acidaminophilum*

●: NADPH; ○: NADH

Den Ausgangspunkt für die Anreicherung einer NADPH-Oxidase aus *E. acidaminophilum* bildete Rohextrakt präpariert aus 5 g auf Glycin gezogenen Zellen (s. 2.11.2.1.) mit einem Proteingehalt von 100 mg/ml und einer spez. Enzymaktivität von 0,016 U/mg. Es folgte zunächst ein Anreicherungsschritt an Q-Sepharose. Dazu wurden 400 mg Protein auf eine mit 4 BV 50 mM Tris/HCl, pH7,5 äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (Flußrate: 1 ml/min) aufgetragen. Die Säule wurde mit 6 BV Äquilibrierungspuffer gewaschen und gebundenes Protein mit einem aufsteigenden KCl-Gradienten von 0-1 M KCl in 50 mM Tris/HCl, pH7,5 eluiert. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Fraktionsgröße 10 ml. Protein-haltige Fraktionen wurden auf NADH- und NADPH-Oxidase-Aktivität hin überprüft. NADPH-Oxidase-Aktivität eluierte bei einer KCl-Konzentration von 0,8 M innerhalb der Fraktionen 59-61 (Daten nicht gezeigt) mit einer spez. Enzymaktivität von 0,7-0,5 U/mg. Eine für NADH spezifische Oxidase-Aktivität konnte in keiner der Fraktionen nachgewiesen werden. Die Fraktionen 59-61 wurden vereinigt (19,5 mg Protein, 0,6 U/mg, 11,7 U), gegen 50 mM K-Phosphat pH7,5 dialysiert, mit festem gemörserten $(NH_4)_2SO_4$ auf 1,5 M $(NH_4)_2SO_4$ eingestellt und auf eine mit 1,5 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM K-Phosphat, pH7,5 äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule (20 ml BV) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 6 BV Äquilibrierungspuffer gewaschen und gebundenes Protein mit einem fallenden Gradienten von 1,5-0 M $(NH_4)_2SO_4$ eluiert. Für alle Schritte betrug die Flußrate 1 ml/min und die Fraktionsgröße 2,5 ml. Die NADPH-Oxidase-Aktivität eluierte innerhalb der Fraktionen 69-72 bei 0,9 M $(NH_4)_2SO_4$ mit einer spezifischen Enzymaktivität von 3-4,4 U/mg. Wie in Abb. 13 gezeigt, konnte durch die beschriebenen zwei Reinigungsschritte ein Protein mit einer Größe von 36 kDa bis zur Homogenität angereichert werden. Die N-terminale Aminosäureanalyse der ersten fünf AS ergab eine 100%ige Identität zu den ersten fünf AS der Thioredoxin-Reduktase aus *E. acidaminophilum*. Demnach existierten in diesem Organismus neben

dieser keine weiteren Proteine mit prominenter NADPH-Oxidase-Aktivität. Die Anreicherung ist in Tab. 11 zusammengefaßt.

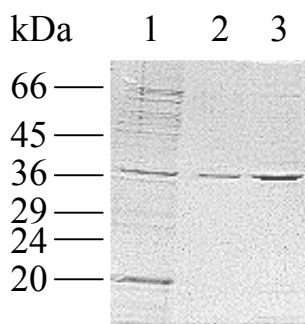


Abb. 13 Anreicherung einer NADPH-Oxidase aus *E. acidaminophilum*

12,5%iges SDS-PAG; Spur 1: 6 µg Q-Sepharose-Pool; Spur 2: 2,5 µg Phenyl-Sepharose-Pool; Spur 3: 5 µg Phenyl-Sepharose-Pool.

Tab. 11: Anreicherung einer NADPH-Oxidase aus *E. acidaminophilum*

Reinigungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [-fach]
Rohextrakt	400	6,4	0,016	100	1
Q-Sepharose	19,5	11,7	0,6	4,8	37,5
Phenyl-Sepharose	1,4	5	3,6	0,4	225

3.4.2. Komplementation der NADPH-abhängigen Peroxidreduktion

Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase von *E. acidaminophilum* stellen ein zentrales Enzymsystem innerhalb des Glycin-Stoffwechsels dieses Organismus dar (HARMS, *et al.*, 1998) und fungieren dabei als essentielle Elektronendonatoren bei der reduktiven Desaminierung (DIETRICH, *et al.*, 1991a, s. Einleitung). In früheren Arbeiten wurde bereits versucht, die NADPH-abhängige Peroxidase-Aktivität durch Komplementation mit dem Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System zu reinigen, was jedoch nicht zum gewünschten Erfolg führte (PARTHER, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nun mit dem bereits gereinigten, Peroxidase-Aktivität besitzenden Protein B (s. 3.3.) Komplementationstests mit Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase bzw. weiteren Proteinen durchgeführt werden. Die direkte Reinigung der Proteine Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* war sehr zeitaufwendig und führten im Fall des Thioredoxins nicht immer zum gewünschten Reinheitsgrad des Proteins (PARTHER, 1998). Ein weiteres Problem stellte die enzymatische Instabilität der gereinigten Thioredoxin-Reduktase über einen längeren Zeitraum dar. Um also möglichst effektiv beide Proteine enzymatisch aktiv bereitstellen zu können, sollten die Gene *trxA* (Thioredoxin) und *trxB* (Thioredoxinreduktase) aus *E. acidaminophilum* in den Strep-tagII-Vektor pASK-IBA3 (C-terminale Strep-tagII-Fusion) kloniert werden und rekombinant in *E. coli* überexprimiert werden. Durch selektive Bindung des Strep-tagII tragenden Proteins an Streptactin-Sepharose war eine Einschnitt-Reinigung möglich (s. 2.14.4.1.).

3.4.2.1. Expression von Thioredoxin und Thioredoxin Reduktase als Strep-tagII-Fusionsproteine in *E. coli*

Zur Klonierung von *trxA* und *trxB* wurden die genannten Gene mit den Primerpaaren TRXAF/TRXAR bzw. TRXBF/TRXBR, die eine *BsaI*-Restriktionsschnittstelle enthielten (s. Tab. 4) amplifiziert (s. 2.7.2.). Als Template diente das Plasmid pML23 (s. Tab. 2). Die PCR resultierte in Fragmenten der erwarteten Größe von ca. 0,35 kb (*trxA*) und 0,95 kb (*trxB*). Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *BsaI* verdaut und in den ebenfalls mit *BsaI* behandelten Vektor pASK-IBA3 gerichtet ligiert, sowie in *E. coli* XL1-Blue-MRF' transformiert. Aus jeweils fünf entstandenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und die Inserts mittels Sequenzierung auf die korrekte Ligation der Fragmente hin überprüft. Die positiven Stämme wurden anschließend einer Testexpression im 10 ml-Maßstab (s. 2.11.2.3.) unterzogen. Im Fall von Thioredoxin konnte bei allen getesteten Stämmen nach der Induktion eine zusätzliche Protein-Bande bei 14 kDa identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde ein Plasmid ausgewählt und mit pTrxA bezeichnet. Für Thioredoxin-Reduktase wurde hingegen kein exprimiertes Protein in der erwarteten Größe von 36 kDa nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu *E. coli* (51,11% GC) besitzt *E. acidaminophilum* einen geringeren GC-Gehalt (45,21%), welches eine andere Häufigkeit der Nutzung entsprechender Codons bedingt (DÖRING, *et al.*, 2001). Zu den von *E. coli* selten genutzten Codons gehören CUA (Leu), AUA (Ile), sowie AGA und AGG (Arg). *trxB* enthält 27 der genannten Codons, daher wurden die genannten fünf positiven Plasmide in den Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (s. Tab. 1), welcher zusätzlich die für die o.g. seltenen Codons entsprechenden tRNA-Gene plasmidkodiert besitzt, transformiert und die Testexpression wiederholt. In diesem Fall konnte für jeden der fünf untersuchten Stämme ein zusätzliches Protein der Größe von 36 kDa identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Eines dieser Plasmid wurde ausgewählt und mit pTrxB bezeichnet. Für die Reinigung von heterologem Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase wurden pTrxA bzw. pTrxB enthaltende Stämme in 500 ml LB-Selektivmedium nach Inokulation mit 10 ml einer Übernacht-Kultur bei 30 °C bis zu einer OD₅₅₀ von >0,5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion des *tetA*-Promotors mit 0,2 µg/ml AHT innerhalb von 3 h bei 30 °C. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet und die Expression im SDS-Gel überprüft (s. 2.11.2.3.). Aus den Zellen wurde Rohextrakt wie unter 2.11.2.1. und 2.11.3. beschrieben, präpariert und die Strep-tagII fusionierten Proteine durch Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose gereinigt (s. 2.14.4.1.). Thioredoxin eluierte vollständig innerhalb der zweiten Elutionsfraktion, die einen Proteingehalt von 0,25 mg/ml aufwies. Das entsprach einem Proteingehalt von ca. 100 µg/500 ml Kulturvolumen. Thioredoxin-Reduktase eluierte vollständig innerhalb der Fraktionen 2-3, die eine intensive Gelbfärbung (zurückzuführen auf den FAD-Gehalt der rekombinanten Thioredoxin-Reduktase). Der Proteingehalt betrug durchschnittlich 4,6 mg/ml. Da der Rohextrakt auch nach Affinitätsreinigung noch deutlich FAD-haltiges Protein enthielt (gelbliche Färbung), wurde er einer zweiten Passage über Streptactin-Sepharose unterzogen. Der Proteingehalt der wiederum gelb gefärbten Fraktionen 2 und 3 betrug diesmal ca. 3,8 mg/ml, so daß von einem Anteil an rekombinanten Protein von mindestens 8 mg/500 ml Kulturvolumen ausgegangen werden

konnte. Wie in Abb. 14 gezeigt, lag die Thioredoxin-Reduktase nach der Elution von Streptactin-Sepharose homogen vor. Die Reinigung von Thioredoxin resultierte in zwei Proteinbanden vergleichbarer Intensität mit den Größen 14 und 15 kDa.

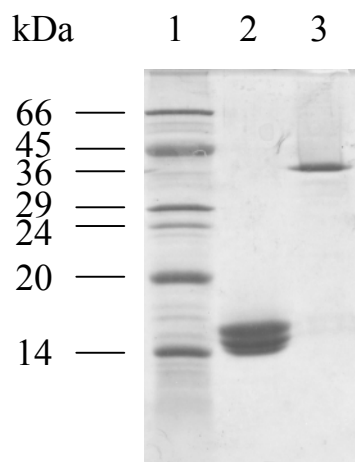


Abb. 14 Reinigung von Strep-tagII fusioniertem Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase

17,5%iges SDS-PAG; Spur 1: 10 µl Größenstandard $\Sigma 7$, Spur 2: 4 µg Thioredoxin (Fraktion 2); Spur 3: 2,5 µg Thioredoxin-Reduktase (Fraktion 2).

Die gereinigte Thioredoxin-Reduktase wurde anschließend auf NADPH-Oxidase-Aktivität (s. 2.13.1.) hin überprüft. 10 µg Protein besaßen eine spezifische Enzymaktivität von 1,1 U/mg. Zur Untersuchung der Thioredoxin-Aktivität fand der Komplementationstest nach MEYER, *et al.*, 1991 Anwendung (s. 2.13.2.). Die spezifische Enzymaktivität betrug 0,5 U/mg. Die Aktivität der Thioredoxin-Reduktase war sowohl bei 4°C, -20°C als auch bei -80°C über einen längeren Zeitraum nicht stabil. Daher wurde für die Komplementations-Messungen stets am gleichen Tag gereinigtes Protein eingesetzt.

3.4.2.2. Versuche zur Messung von NADPH-abhängiger Peroxidase-Aktivität

Die Messung von NADPH-abhängiger Peroxidase-Aktivität erfolgte wie unter 2.13.3.4. beschrieben mit 0,5 mM Cumolhydroperoxid als Substrat zunächst mit den Proteinen GrdB (gereinigt aus *E. acidaminophilum* (s. 3.3.), rekombinanter Strep-tagII-fusionierter Thioredoxin-Reduktase und fusioniertem Thioredoxin (s. 3.4.2.1.) unter anaeroben Bedingungen. Die enzymatische Aktivität der beiden letztgenannten Proteine wurde vorab durch den Komplementationstest (MEYER, *et al.*, 1991, s. 2.13.2.) überprüft. Eine NADPH-abhängige Reduktion von Cumolhydroperoxid konnte jedoch für die Proteinkombination GrdB, Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase nicht nachgewiesen werden. Daher sollte versucht werden, durch andere Proteine, die theoretisch an der Reaktion beteiligt sein könnten, diese zu komplementieren. Dabei kam zunächst Protein A der Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* in Betracht. Dieses Seleno-Protein überträgt unter Oxidation einen Carboxymethylrest (ARKOWITZ & ABELES, 1991) von Protein B auf Protein C. Die Reduktion der dabei entstehenden Se-S-Brücke erfolgt durch NADPH über das Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-

System. (MEYER, 1993). Somit steht Protein A katalytisch sowohl mit Protein B als auch mit dem Thioredoxin-System in Verbindung und könnte daher den fehlenden Elektronenüberträger für die NADPH-abhängige Peroxidreduktion darstellen. Aus *E. acidaminophilum* isoliertes Protein A sowie rekombinantes, Strep-tagII-fusioniertes GrdAU44C wurde freundlicherweise von J. Jäger (persönliche Mitteilung) bereitgestellt. Jedoch konnte auch durch zusätzlichen Einsatz dieses Proteins zum Testansatz keine Peroxidase-Aktivität festgestellt werden. Im Rahmen der Arbeiten von (WAGNER, 1997) wurde ein 10 kDa Seleno-Protein mit bislang unbekannter Funktion aus *E. acidaminophilum* isoliert. Eine durch Peptid-Map (WAGNER, 1997) und molekularbiologische Untersuchungen des korrespondierenden Gens (LECHEL, 1999; GRÖBE, 2001) identifizierte redoxaktive Sequenz –ACATUD– legte die Vermutung nahe, daß diese Protein eventuell an an Redox-Prozessen beteiligt ist, z. B. einer Peroxidase-Aktivität. Jedoch konnte auch nach Zugabe von rekombinatem Step-tagII-fusioniertem PrpU33C (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Gröbe; persönliche Mitteilung) zum Testansatz keine Peroxidase-Aktivität beobachtet werden. In Tab. 12 sind die untersuchten Kombinationen der Komponenten des Enzymtests zusammengefaßt.

Tab. 12: Schematische Darstellung der Kombinationen von verschiedenen Komponenten im Meßansatz für NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität.

Komponente	Kombination								
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NADPH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumolhydroperoxid	-	+	+	-	+	+	+	+	+
GrdB ¹	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Thioredoxin-Reduktase ¹	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Thioredoxin ¹	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ProteinA ¹	-	-	-	-	-	-	+	-	+
GrdA1U44C	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PrpU33C ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	+

¹ eingesetzt in äquimolaren Mengen

3.4.2.3. Bildung von H₂O₂ durch Thioredoxin-Reduktase

Hinsichtlich ihrer Reaktionsprodukte wird in Bakterien zwischen H₂O- und H₂O₂-bildenden NADH bzw. NADPH-Oxidasen unterschieden (NISHIYAMA, *et al.*, 2001). Wie in diesem Kapitel beschrieben, konnte nur die Thioredoxin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* anhand einer NADPH-Oxidase-Aktivität angereichert werden. Hinsichtlich der Entstehung von ROS in dem obligat anaeroben Organismus war es interessant, ob bei dieser Reaktion H₂O oder H₂O₂ gebildet wird. Für diese Untersuchungen wurde die Oxidase-Aktivität von 20 µg rekombinanter Thioredoxin-Reduktase wie unter 2.13.1. beschrieben, ermittelt und der Verbrauch an NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) berechnet. Zeitgleich wurden 100 µl dieser Reaktion mit 12,5 % TCA abgestoppt und die Menge an gebildetem Peroxid durch die Oxidation von Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ (s. 2.13.3.2.) bestimmt ($\epsilon_{[\text{Fe}(\text{SCN})_2]^+} = 33 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Dabei konnte die Entstehung von äquimolaren Mengen H₂O₂ im Vergleich zu NADPH nachgewiesen werden (s. Tab. 13).

Tab. 13: H₂O₂-Entstehung durch die NADPH-Oxidase-Aktivität von Thioredoxin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* im Vergleich zum NADPH-Verbrauch.

NADPH	Thioredoxin-Reduktase	NADPH-Verbrauch [nmol]	H ₂ O ₂ -Entstehung [nmol]
+	–	0	0
–	+	0	0
+	+	16,1	16,5

3.5. Heterologe Expression von GrdB-Varianten in *E. coli*

Wie im Kapitel 3.3. beschrieben wurde, konnte aus *E. acidaminophilum* Protein B der Glycin-Reduktase, bestehend aus GrdB (47 kDa) und dem prozessierten Protein GrdE (25 und 22 kDa), anhand einer Peroxidase-Aktivität gereinigt werden. Die Fähigkeit, als Nebenaktivität Peroxide zu reduzieren, ist für eine Reihe Selenocystein-haltiger Proteine, wie z. B. Säuger-Thioredoxin-Reduktase (ZHONG, *et al.*, 2000a), mit Selenocystein substituierte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (BOSCHI-MULLER, *et al.*, 1998) und das semisynthetische Seleno-Subtilisin (BELL, *et al.*, 1993), beschrieben worden. Speziell für die Thioredoxin-Reduktase wurde ein Reaktionsmechanismus postuliert (ZHONG, *et al.*, 2000a), an dem das Cystein und das Selenocystein des in Säugetier-Thioredoxin-Reduktasen konservierten N-terminalen –GCUG-Motivs sowie zwei weitere Cysteine beteiligt sind. Die 47 kDa große Untereinheit von Protein B aus *E. acidaminophilum*, GrdB, verfügt über ein ähnliches konserviertes Motiv mit der Anordnung –UxxCxxC–. Daher sollten zunächst die rekombinanten Proteine GrdB und GrdBU350C (REUTER, 2000) auf Peroxidase-Aktivität hin untersucht, anschließend die konservierten Cysteine im o. g. Motiv jeweils zu Alanin mutiert und die Gene der daraus resultierenden Proteine GrdBC353A und GrdBC356A heterolog in *E. coli* synthetisiert werden. Anschließende Aktivitätsmessungen mit den gereinigten Proteinen sollten erste Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus von GrdB hinsichtlich seiner Peroxidase-Aktivität liefern.

3.5.1. Zielgerichtete Mutagenese der konservierten Cysteine zu Alanin

Das Wildtyp-Gen *grdB* (Plasmid pIBA5B, s. Tab. 2) sowie das *grdB*-Gen mit der Mutation des für Selenocystein codierenden TGA-Codons zum Cystein-Codon TGC (Plasmid pIBA5MBU, s. Tab. 2) lagen zu Beginn dieser Arbeiten bereits kloniert in den Expressionsvektor pASK-IBA5 (N-terminaler Strep-*tagII*) vor (REUTER, 2000). Als Ausgangspunkt der Mutagenese diente das Plasmid pIBA5B (REUTER, 2000, s. Tab. 2) sowie jeweils zu *grdB* und zu sich selbst komplementäre Primer-Paare (GRDB353F/ GRDB353R bzw. GRDB356F/GRDB356R, s. Tab. 4), welche die gewünschte Mutation enthielten. Mittels PCR mit *Pwo*-DNA-Polymerase (s. 2.7.2.) wurde das gesamte Plasmid amplifiziert, der Ansatz mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut (selektive Entfernung der Template-DNA) (s. 2.6.1.) und in *E. coli* XL1-Blue-MRF' transformiert (s. 2.8.1.). Um jeweils ein Plasmid mit der richtigen Mutation zu erhalten, war es in diesem Fall nötig, mehr als

20 Plasmide zu isolieren und zu sequenzieren. Entsprechend ihrer Mutation wurden die resultierenden Plasmide mit pGrdBC353A und pGrdBC356A bezeichnet. Wie bereits erwähnt, besitzen die Gene der Proteine GrdB, GrdBC353A und GrdBC356A jeweils ein *in-frame* TGA-Codon, welches in *E. coli* drei Reaktionsabläufe induzieren kann: den Einbau von Selenocystein, den Abbruch der Translation, was zu einem unvollständigen Peptid führen würde (SCOLNIK, *et al.*, 1968) oder eine Suppression, d. h. eine UGA-Erkennung durch tRNA^{Trp}, was in einem Einbau von Tryptophan und damit einer vollständigen Polypeptidkette resultieren würde (EGGERTSON & SÖLL, 1988; HIRSH & GOLD, 1971). Der Einbau von Selenocystein konnte bislang allerdings in keinem Genprodukt von in *E. coli* heterolog exprimierten Genen von *E. acidaminophilum* unter normalen Expressionsbedingungen beobachtet werden. Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde durch (GURSINSKY, 2002) eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, auch Gene von Selenocystein-haltigen Proteinen von *E. acidaminophilum* korrekt in *E. coli* heterolog zu exprimieren. Voraussetzung dafür war die zusätzliche Anwesenheit der Gene *selB* (Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor) und *selC* (Selenocystein-spezifische tRNA) aus *E. acidaminophilum*, lokalisiert auf dem Plasmid pASBC4 (GURSINSKY, 2002). Daher wurden die Plasmide pGrdMBU5, pGrdBC353A und pGrdBC356A in den Stamm *E. coli* XL1-Blue-MRF' transformiert, welcher bereits das Plasmid pASBC4 enthielt (GURSINSKY, 2002, s. Tab. 2).

3.5.2. Expression der *grdB*-Varianten und Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Expression der unter 3.5.1. beschriebenen *grdB*-Gene (rekombinante GrdB-Varianten mit N-terminaler Strep-tagII-Fusion) wurde in einem Kulturvolumen von 0,5 l bei 30 °C durchgeführt. Die Induktion des *tetA*-Promotors erfolgte bei einer OD₅₅₀ von >0,5 mit 0,2 µg/ml AHT. Weiterhin wurde der Kultur 1 µg/ml Na₂SeO₃ als Selen-Quelle zum Zeitpunkt der Induktion hinzugefügt. Je nach Beschaffenheit der Streptactin-Affinitätsmatrix (s. 2.14.4.1.) konnten aus den Zellen bis zu 1,6 mg GrdB350C, 0,4 mg GrdBWT, 0,4 mg GrdBC353A, sowie 0,4 mg GrdBC356A isoliert werden. Wie bereits durch (REUTER, 2000) beschrieben wurde, konnte rekombinantes GrdB350C nicht zur Homogenität gereinigt werden. Dies konnte auch für die im Rahmen dieser Arbeiten exprimierten rekombinanten Proteine GrdBWT, GrdBC353A und GrdBC356A beobachtet werden. Nach der Affinitätsreinigung an Streptactin-Sepharose (s. 2.14.4.1.) eluierten zwei Hauptbanden der Größen 47 und 20 kDa sowie drei schwächere Banden mit 44, 26 und 31 kDa von der Säule. Laut (REUTER, 2000) handelte es sich bei der 47 kDa-Bande um das intakte, mit N-terminalen Strep-tagII-fusionierte GrdB. Das 20 kDa-Protein besaß ebenfalls einen N-terminalen Strep-tagII und wurde bereits im Rohextrakt nachgewiesen. Um die von (REUTER, 2000) ermittelte Spaltstelle in GrdB zu überprüfen, wurde das mit C-terminalen Strep-tagII fusionierte GrdB350C in *E. coli* exprimiert und gereinigt. An dem entstandenen 30 kDa Spaltprodukt (C-terminaler Strep-tagII) erfolgte die Sequenzierung der ersten fünf AS des N-Terminus (s. 2.21.). Ein weiteres, von (REUTER, 2000) erhaltene, 31 kDa-

Protein konnte nicht detektiert werden. Abweichend von (REUTER, 2000) (Identität zu den AS 195-199) konnte für das 30 kDa Protein (diese Arbeit) sowohl ein starkes Signal, dessen ersten fünf AS mit den AS 190-195 von GrdB identisch waren, als auch ein schwaches Signal, dessen N-Terminus mit den AS 198-203 von GrdB übereinstimmten, erhalten werden. Die jetzt ermittelten AS-Sequenzen der N-Termini im Vergleich zu den von (REUTER, 2000) erhaltenen, die dazugehörige AS-Sequenz von GrdB, sowie die berechneten Molekulargewichte sind in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: N-terminale AS-Sequenz der 30 kDa GrdB-Fragmente mit C-terminalem Strep-tagII
erhaltene AS-Sequenzen

30 kDa Fragment ^a		
GrdB (AS 181-206)	MFKEDRGAKRAVAMLVKCLKGEEYET	
N-Terminus 28,2 kDa ^b	AVAML	
N-Terminus 27,4 kDa ^c		LKGEE
GrdB (AS 181-206)	MFKEDRGAKRAVAMLVKCLKGEEYET	
N-Terminus 28,1 ^b (30 ^d) kDa (REUTER, 2000)	KEDRG	
N-Terminus 29,4 ^b (31 ^d) kDa (REUTER, 2000)		LVKKL

^a7 µg Protein (Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose), Auftrennung im 12,5%igen SDS-PAG

^baus den N-Termini abgeleitetes theoretisches Molekulargewicht des 30 kDa GrdB-Fragmentes mit C-terminal fusioniertem Strep-tagII (starkes Signal)

^caus den N-Termini abgeleitetes theoretisches Molekulargewicht des 30 kDa GrdB-Fragmentes mit C-terminal fusionierten Strep-tagII (schwaches Signal)

^dGröße des erhaltenen Fragmentes im 12,5%igen SDS-PAG.

3.5.3. Messung von Enzymaktivitäten

Ziel dieses Experimentes war es, die Peroxidase-Aktivitäten der verschiedenen GrdB-Varianten miteinander zu vergleichen und dadurch erste Hinweise für einen möglichen Reaktionsmechanismus zu erhalten. Die Bestimmung der spez. Enzymaktivitäten wurde jedoch durch die im Kapitel 3.5.2. beschriebene Spaltung der GrdB-Proteine erschwert, da die exakte Menge des intakten Proteins durch das Vorhandensein des 22 kDa Spaltproduktes nicht ermittelt werden konnte. Um dennoch vergleichbare Mengen an ungespaltenem Protein im Enzymtest einsetzen zu können, wurden zunächst die unter 3.5.2. erhaltenen Proteinlösungen zur Entfernung des Elutionsmittels Desthiobiotin über eine PD10-Säule entsalzt (s. 2.15.2.) und die Intensität der jeweiligen 47 kDa-Proteinbande in einem 12,5%igen SDS-PAG verglichen. Entsprechend der Abb. 15 wurden im Falle der Proteine GrdB, GrdB350C und GrdB353A das 2fache, im Falle von GrdB356A das 4fache der im PAG aufgetragenen Proteinmenge im Enzymtest nach (LIM, *et al.*, 1993) eingesetzt. Als Substrat diente 0,5 mM Cumolhydroperoxid. Die Reaktion erfolgte bei 37°C in einem Zeitraum von 5 min.

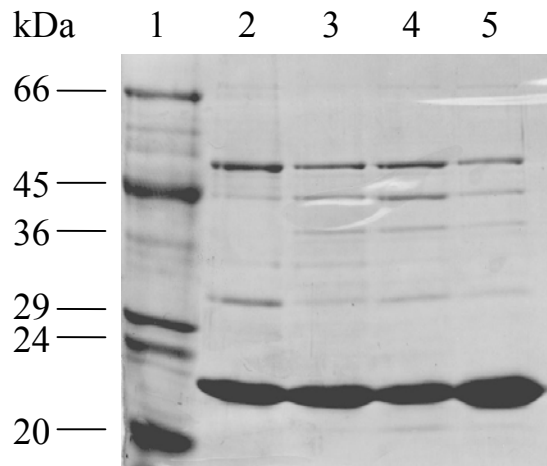


Abb. 15: Vergleich der Proteinmengen der intakten GrdB-Varianten

12,5%iges SDS-PAG; Spur 1: 10 μ l Proteingrößenstandard Σ 7; Spur 2: 9 μ g GrdBU350C; Spur 3: 11 μ g GrdB; Spur 4: 9 μ g GrdBC353A; Spur 5: 16 μ g GrdBC356A.

Wie Tab. 15 und Abb. 16 zu entnehmen ist, besaß das Wildtyp-Protein GrdB mit 6,2 nmol/min die höchste relative Enzymaktivität. Im Vergleich dazu wies die Cystein-Mutante GrdBU350C nur ca. 60% der Aktivität des unmutierten Proteins auf. Der Austausch der Cysteine an Position 353 bzw. 356 zu Alanin hatte ein Absinken der Aktivität auf ca. 40% zur Folge. Hitzeinaktiviertes Protein zeigte keine Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Tab. 15: Relative Enzymaktivitäten der verschiedenen GrdB-Varianten

Protein	relative Enzymakt. [nmol/min]
GrdB	6,2 \pm 0,4
GrdBU350C	3,7 \pm 0,7
GrdBC353A	2,7 \pm 0,1
GrdBC356A	2,5 \pm 0,2

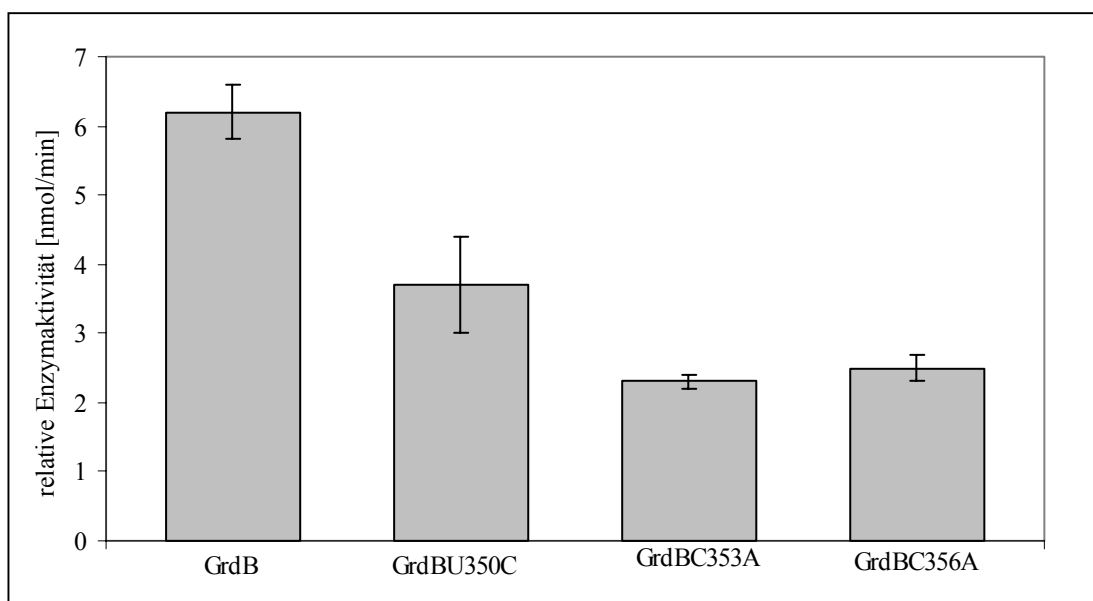


Abb. 16: Relative Enzymaktivitäten verschiedener GrdB-Varianten bezogen auf den optisch gleichen Gehalt des 47 kDa-Proteins (vgl. Abb. 15)

3.5.4. Bestimmung des Selenocysteingehaltes durch Massenspektroskopie

Der Einbau von Selenocystein in die Polypeptidkette von heterolog in *E. coli* exprimierten Genen von *E. acidaminophilum* ist zum einen von der Anwesenheit des Selenocystein-spezifischen. Elongationsfaktors SelB (Genprodukt von *selB*), der Selenocystein-spezifischen tRNA (Genprodukt von *selC*) aus *E. acidaminophilum* sowie der SECIS-Struktur (*selenocysteine insertion sequence*) der zu translatierenden mRNA abhängig (GURSINSKY, 2002). Diese Struktur befindet sich unmittelbar stromabwärts des für das Selenocystein codierenden UGA-Codons und umfaßt für das *grdB*-Gen 40 bp (einschließlich des UGA-Codons). Die Einführung der Mutationen C₃₅₃→A und C₃₅₆→A führten somit auch zum Austausch von je zwei Basen in der SECIS-Struktur. Durch die Mutation C₃₅₃→A kam es zu einem Paarungsverlust der Basen im unteren Bereich des SECIS-Stammes. Der Austausch C₃₅₆→A führte zu einem Verlust der Basenpaarung im oberen Stammabschnitt im Abstand von einer Paarung vor dem apikalen Loop (s. Abb. 17).

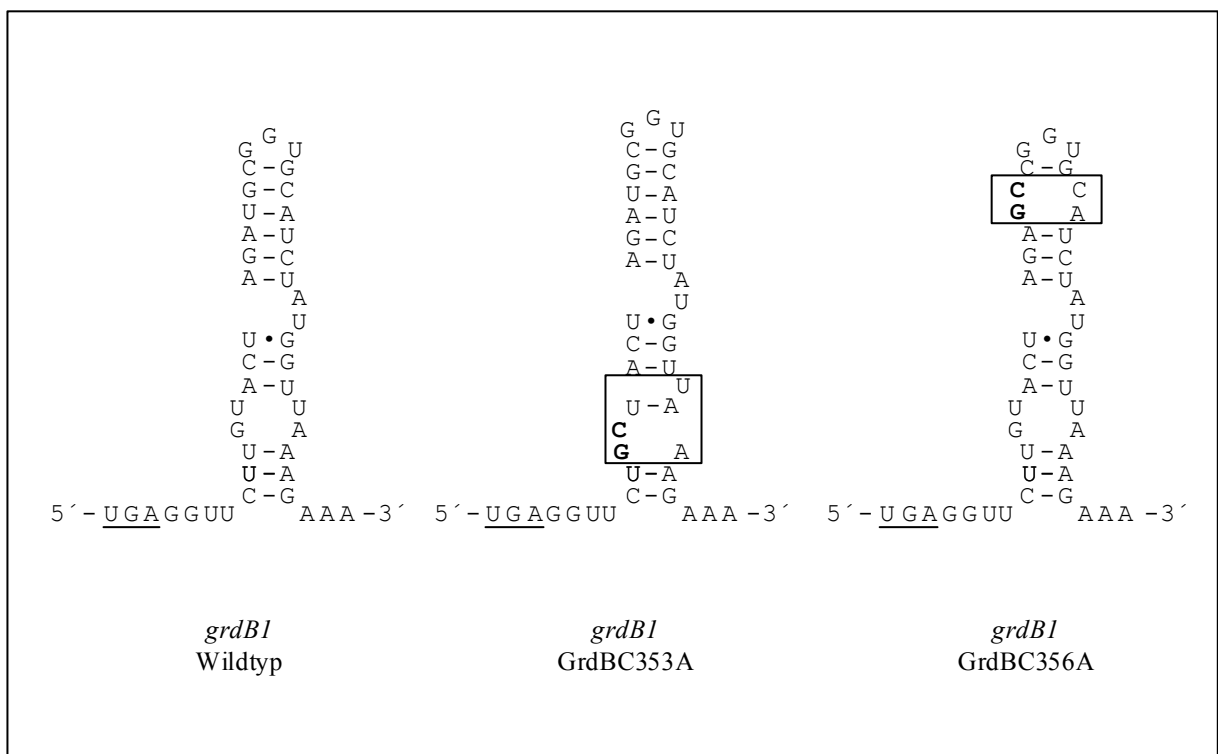


Abb. 17: Veränderung der SECIS-Struktur in *GrdB* durch Mutationen der Cystein-Codons stromabwärts des UGA-Codons

Die durch gerichtete Mutagenese eingeführten Basenaustausche sind hervorgehoben (fett). Der durch die Mutation veränderte Bereich der SECIS-Struktur ist eingrahmt. Das UGA-Codon ist unterstrichen.

Der Austausch von drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden im unteren Stamm-Bereich der SECIS-Struktur, welche zum Verlust der Basenpaarungen und somit zu einer Verkürzung der Haarnadelstruktur führen, können einen reduzierten Selenocysteineinbau in das Protein zur Folge haben. Das gleiche gilt für Veränderungen der Nukleotide im apikalen Loop der Struktur (GURSINSKY, 2002). Infolgedessen mußte für die mutierten Varianten von GrdB: GrdBC353A und GrdBC356A die Inkorporation von Selenocystein in die Proteine überprüft werden. Dazu wurden die

Cysteine bzw. Selenocysteine in den Proteinen GrdB, GrdBC353A und GrdB356A mit 4-Vinylpyridin zur Verhinderung der Bildung von unspezifischen Disulfidbrücke, die während der massenspektroskopischen Analyse gebildet werden können, markiert (s. 2.19.) und in einem SDS-PAG (s. 2.16.1.) aufgetrennt. Anschließend wurden die jeweiligen Proteinbanden bei 47 kDa (intaktes Protein) aus dem SDS-Gel ausgeschnitten. Die sich anschließende Proteinanalyse wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Institut für Biochemie, MLU Halle) durchgeführt. Die aus dem PAG herausgelösten Proteine wurden einem proteolytischen Verdau mit Trypsin unterzogen und die dabei entstandenen Peptide anschließend durch Massenspektroskopie analysiert (s. 2.21.). Der Nachweis des Selenocysteins erfolgte dabei über sein spezifisches Isotopenverteilungsmuster. Berücksichtigt man jedes Isotop aller im Peptid vorkommenden Elemente, so erhält man für das Gesamtmolekül verschiedene Massen mit geringfügigen Differenzen. Diese ergeben im Vergleich zur Häufigkeit der Isotope ein entsprechendes Verteilungsmuster, welches für Selenocystein aufgrund des natürlichen Vorkommens von 6 Isotopen charakteristisch ist (s. Abb. 18). Die theoretisch kalkulierten sowie die experimentell ermittelten Massen der jeweiligen Selenocystein-haltigen bzw. im Falle von Tryptophan-Suppression des UGA-Codons die entsprechenden kalkulierten Massen für die Tryptophan-haltigen Peptide sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Theoretische und experimentelle Massen der Selenocystein- und Tryptophan-haltigen GrdB-Peptide nach Trypsin-Verdau

Protein	Masse m/z $[M+H^+]$ des Sec-haltigen Peptids		Masse m/z $[M+H^+]$ des Trp-haltigen-haltigen Peptids (Suppression)	
	kalkuliert	ermittelt	kalkuliert	ermittelt
GrdB	2382	2382,33	2418	-
GrdBC353A	2245	2245,05	2281	-
GrdBC356A	2382	-	2418	-

Für das Protein GrdB konnte das Vorhandensein eines Peptids mit der Masse 2382,33 und für das Protein GrdBC353A ein Peptid mit der Masse 2245,05 nachgewiesen werden. Diese entsprach jeweils der kalkulierten Masse des entsprechenden Selenocystein-haltigen Peptids. Eine Auflösung dieses Signals ergab das für Selenocystein charakteristische Isotopenverteilungsmuster, so daß für GrdB und GrdBC353A von einem Einbau des Selenocysteins in die Polypeptidkette ausgegangen werden konnte (s. Abb. 18.). Im Fall von GrdBC356A wurde jedoch kein Peptid mit der kalkulierten Masse von 2382 detektiert, demnach wurde in dieses Protein offensichtlich kein Selenocystein eingebaut. Allerdings konnte in diesem Fall auch kein Peptid detektiert werden, dessen molekulare Masse einer Suppression des Selenocysteins durch Tryptophan entsprechen würden. In den Fällen GrdB und GrdBC353A konnte ebenfalls kein entsprechendes Tryptophan-haltiges Peptid analysiert werden (s. Tab. 16).

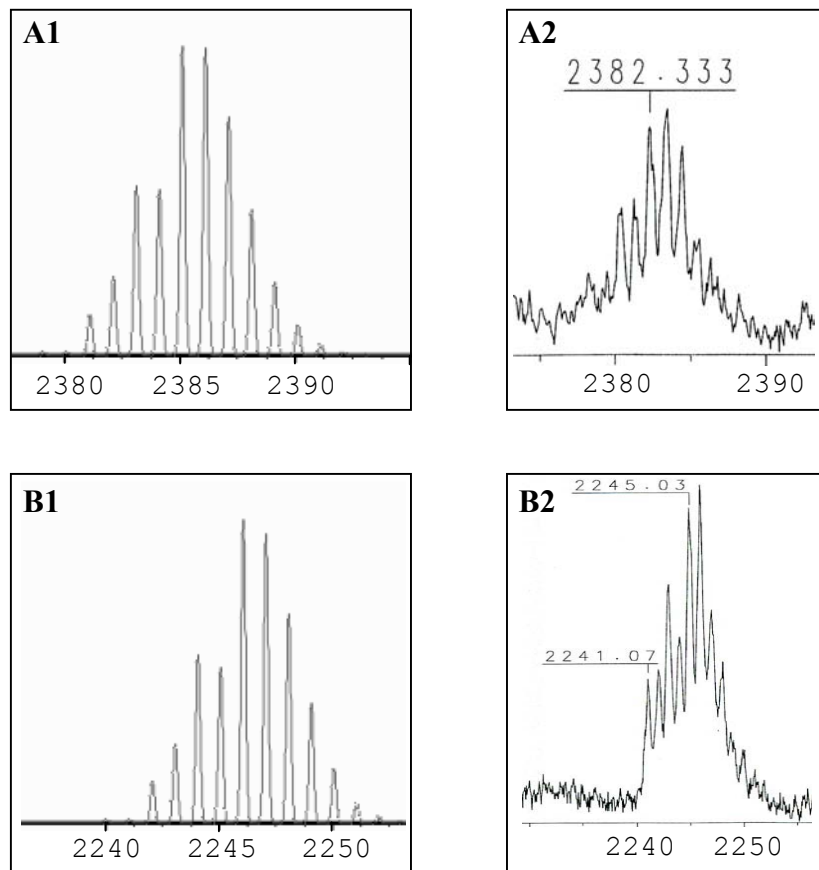


Abb. 18: Isotopenverteilung der Selenocystein-haltigen Peptide der Proteine GrdB und GrdBC353A

A: kalkulierte (A1) und ermittelte (A2) Isotopenverteilung des Peptids mit pyridylethyltem Selenocystein des Proteins GrdB; B: kalkulierte (B1) und ermittelte (B2) Isotopenverteilung des Peptids mit pyridylethyltem Selenocystein des Proteins GrdBC353A. Die kalkulierten Isotopenverteilungen wurden mit dem Programm Isopro 3.0 erstellt.

3.6. Simultane Expression von *grdB* und *grdE*

Wie bereits durch WAGNER, *et al.*, 1999 gezeigt werden konnte, besteht Protein B der Glycin-Reduktase aus drei Untereinheiten mit der nativen Struktur $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, wobei die 47 kDa große γ -Untereinheit dem Genprodukt von *grdB* entspricht. Die 25 kDa große α - und die 22 kDa große β -Untereinheit gehen aus einem gemeinsamen Proprotein, codiert durch *grdE*, hervor, das vermutlich durch Cysteinolyse unter Bildung eines putativen Pyruvylrestes am 22 kDa Protein in *E. acidaminophilum* gespalten wird (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998). Eine physiologische Funktion konnte für GrdE bzw. deren Spaltprodukte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden. Die Reinigung von rekombinanten, Strep-tagII fusionierten GrdB-Proteinen führte nur zu geringen Mengen an intaktem Protein (s. 3.5.2.). Im Zuge der Anreicherung von Protein B aus *E. acidaminophilum* wurde die Spaltung von GrdB und der damit fast vollständige Verlust des intakten Proteins jedoch nicht beobachtet (s. 3.3.), was einen stabilisierenden Einfluß von GrdE auf GrdB vermuten ließ. Durch eine simultane Expression von *grdB* und *grdE* in *E. coli* sollte nun geprüft werden, ob die Präsenz von GrdE ausreichte, den Anteil an intaktem rekombinanten GrdB350C zu erhöhen. Da eine Spaltung

des Proproteins GrdE aus *E. acidaminophilum* bislang *in vitro* nicht, bzw. für GrdE aus *C. sticklandii* nur unter unphysiologischen Bedingungen gelang (SONNTAG, 1998; BEDNARSKI, *et al.*, 2001), sollten die der 25 kDa (*grdE25*) sowie der 22 kDa (*grdE22*) Untereinheit entsprechenden Teilbereiche von *grdE* ebenfalls simultan mit *grdB* exprimiert und der Einfluß der produzierten Proteine auf die Stabilität von GrdBU350C untersucht werden. Abb. 19 zeigt dazu schematisch die theoretische Genanordnung des Klonierungsvorhabens.

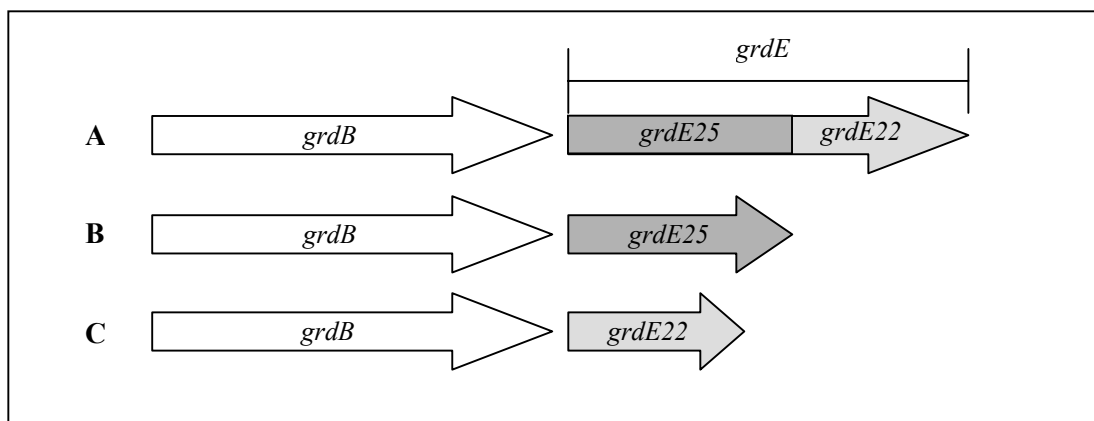


Abb. 19: Schematische Darstellung des Klonierungsvorhabens zur simultanen Expression von *grdB* und *grdE* bzw. der *grdE*-Teilbereiche

Gezeigt sind die Genanordnungen für die simultane Expression von *grdB1* und *grdE* (A), *grdB1* und *grdE25* (B), sowie *grdB1* und *grdE22* (C).

3.6.1.1. Klonierung von *grdB1* und *grdE*-Varianten in den Expressionsvektor pASK-IBA5

Für die Coexpression von *grdB* und den genannten *grdE*-Varianten wurden die Gene *grdB*, welches die Mutation des Selenocystein-Codons TGA zu TGC (Cystein) enthielt, und die entsprechenden *grdE*-Gene als Transkriptionseinheit (s. Abb. 20) in den Expressionsvektor pASK-IBA 5 (s. Tab. 2) kloniert. Die Fusion des plasmidkodierte Strep-tagII-Peptids erfolgte dabei mit dem N-Terminus von GrdBU350C. Die *grdB*- und die *grdE*-Gene wurden mittels PCR getrennt amplifiziert und über einen Linker, bestehend aus 16 nt, ligiert (2.6.2.). Diese Linkersequenz enthielt die plasmidkodierte Sequenz mit Ribosomenbindestelle, die sich zwischen dem TAG-Stopcodon des *tetA*-Repressorgens und dem Startcodon des klonierten Gens befindet.

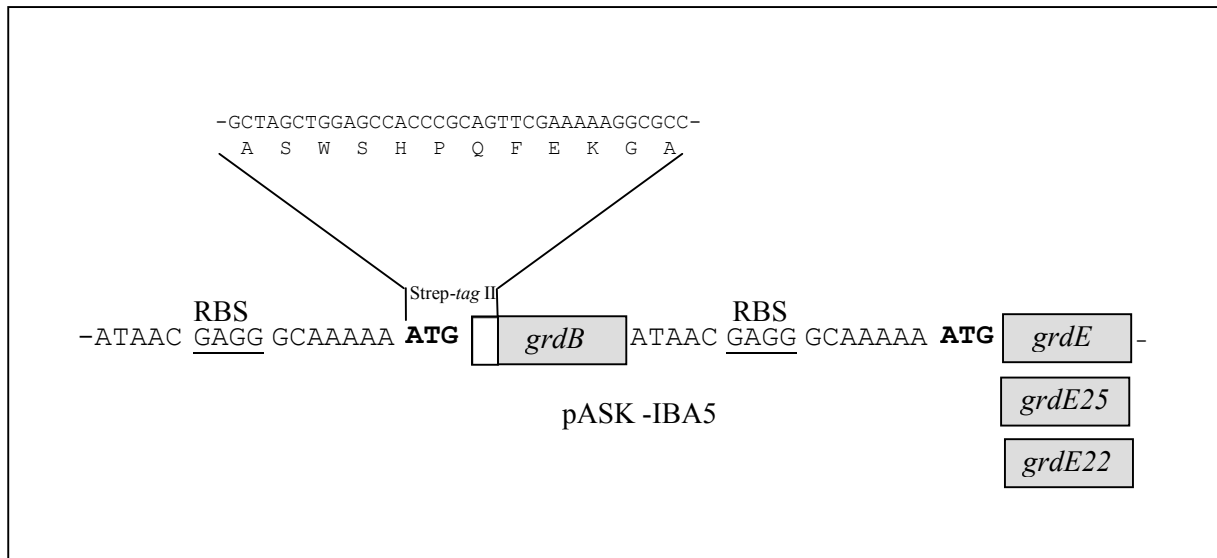


Abb. 20: Transkriptionseinheit aus *grdB* (codiert für GrdBU350C) und *grdE* kloniert in pASK-IBA5

Schematische Darstellung der als Transkriptionseinheit klonierten Gene *grdB* und *grdE* im Expressionsvektor pASK-IBA5. Die 16 nt Linkersequenz entspricht der Sequenz zwischen dem TAG-Codon des *tetA*-Repressorgens (nicht dargestellt) und dem ATG (fett) des Strep-tagII-Peptids (fusioniert mit dem *grdB*-Genprodukt) und enthält eine Ribosomenbindestelle (RBS). Das Startcodon von *grdE* ist ebenfalls fett hervorgehoben.

Die Gene *grdB*, *grdE*, *grdE25* und *grdE22* wurden mittels PCR unter Nutzung der Primerpaare GrdB1_BE F/GrdB1_E/Link, GrdE_B1/Link/GrdE_BE R, GrdE_B1/Link/GrdE25R und GrdE22F_Link/GrdE_BE R (s. Tab. 4) getrennt amplifiziert. Als Template dienten die Plasmide pIBA5MBU (*grdB*; s. Tab. 2) und pDS5 (*grdE*, *grdE25*, *grdE22*; s. Tab. 2). Die erhaltenen PCR-Fragmente entsprachen mit 1,3 kb für *grdB* und *grdE* sowie 0,7 kb für *grdE25* und 0,5 kb für *grdE22* den erwarteten Größen. Da die o.g. Primer eine *BsaI* Restriktionsschnittstelle besaßen, konnte eine gerichtete Ligation der mit *BsaI* verdauten PCR-Fragmente in den mit *BsaI* linearisierten Expressionsvektor pASK-IBA5 (N-terminale Strep-tagII-Fusion) erfolgen. Die erhaltenen Ligationsprodukte wurden zunächst in *E. coli* XL1-Blue-MRF' transformiert und die aus den Kolonien erhaltenen Plasmide mittels Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung auf das korrekte Insert überprüft. Die Plasmide wurden entsprechend mit pGrdBE, pGrdBE25 und pGrdBE22 (s. Tab. 2) bezeichnet. Wie bereits erwähnt, besitzt *E. coli* im Vergleich zu *E. acidaminophilum* einen höheren GC-Gehalt, wodurch eine andere Häufigkeit der Nutzung entsprechender Codons vorliegt (s. 3.4.2.1., DÖRING, *et al.*, 2001). Da das *grdE*-Gen 38 dieser seltenen Codons enthielt, wurden die erhaltenen Plasmide in den Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (s. Tab. 1) transformiert. Dieser Stamm enthält plasmidkodiert zusätzlich die für die bereits unter 3.4.2.1 genannten seltenen Codons entsprechenden tRNA-Gene.

3.6.2. Expression, Reinigung und Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die simultane Expression von *grdB* und den entsprechenden *grdE*-Varianten wurde in einem Kulturvolumen von 0,5 l bei 30 °C durchgeführt. Die Induktion des *tetA*-Promotors erfolgte bei einer OD_{550} von $>0,5$ mit 0,2 µg/ml AHT in einem Zeitraum von 3 h. Zur Überprüfung der Expression wurde anschließend ein Zellaufschluß unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt und die Rohextrakte in einem 12,5%igen SDS-PAG analysiert. Im Falle der simultanen Expression von *grdB* und Gesamt-*grdE* konnte nach 3 h Induktion eine starke Proteinbande einer Größe von ca. 47 kDa detektiert werden, die zum Zeitpunkt $t=0$ der Induktion nicht vorhanden war. Entsprechend traten nach 3stündiger Induktion der Expression von *grdB* und der *grdE*-Teilbereiche zusätzliche Proteinbanden bei 25 kDa (*grdE25*) und 22 kDa (*grdE22*) auf. Eine zusätzliche Bande bei 47 kDa, die dem intakten GrdBU350C entsprach, war in beiden Fällen nicht sichtbar (s. Abb. 21).

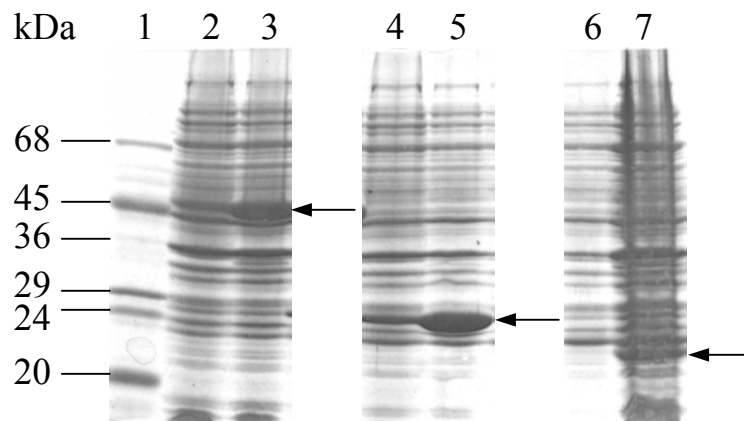


Abb. 21: Simultane Expression von *grdB* und *grdE*-Abschnitten in *E. coli*

12,5%iges SDS-Gel; Spur 1: 10 µl Größenstandard $\Sigma 7$, Spur 2: 10 µl Zellsuspension pGrdBE vor Induktion; Spur 3: 10 µl Zellsuspension pGrdBE nach 3 h Induktion; Spur 4: 10 µl Zellsuspension pGrdBE25 vor Induktion; Spur 5: 10 µl Zellsuspension pGrdBE25 nach 3 h Induktion; Spur 6: 10 µl Zellsuspension pGrdBE22 vor Induktion; Spur 7: 10 µl Zellsuspension pGrdBE22 nach 3 h Induktion.

Anschließend wurden die Zellen aerob aufgeschlossen (s. 2.11.2.1.) und die rekombinanten Proteine mittels Affinitätsreinigung an Streptactin-Sepharose (s. 2.14.4.1.) isoliert. Wie in Abb. 22 gezeigt, konnten nach der simultanen Expression von *grdB* und Gesamt-*grdE* zwei Proteine mit einer Größe von 47 und 46 kDa angereichert werden, die den Proteinen GrdBU350C und GrdE (unprozessiert) entsprachen. Ein 22 kDa großes Spaltprodukt von GrdBU350C, wie es für die alleinige Expression von GrdB erhalten wurde, war nicht vorhanden. Die Probe wies jedoch schwache Verunreinigungen auf. Die aus 0,5 l Kulturvolumen erhaltene Menge an rekombinantem Protein war sehr gering. Sie betrug 50 µg. Nach der simultanen Expression von *grdB* und *grdE25* konnte ein 47 kDa großes Protein mit hohem Reinheitsgrad isoliert werden, das wiederum größenmäßig GrdBU350C entsprach (s. Abb. 22). Die Menge an rekombinantem Protein betrug 150 µg/0,5 l Kulturvolumen. Die Reinigung nach simultaner Expression von *grdB* und *grdE22* führte zu einem stark verunreinigten, 47 kDa großen Protein. Von diesem wurden ca 100 µg/0,5 l Kulturvolumen gebildet (s. Abb. 22).

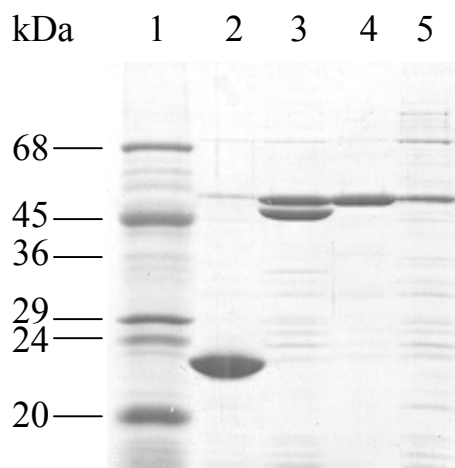


Abb. 22: Reinigung der rekombinanten Proteine nach simultaner Expression von *grdB1* und *grdE*-Varianten

12,5%iges SDS-PAG; Spur 1: 10 µl Größenstandard Σ 7; Spur 2: 9 µg GrdB350C; Spur 3: 10 µg GrdB350C~GrdE; Spur 4: 5 µg GrdB350C~GrdE25; Spur 5: 3 µg GrdB350C~GrdE22.

Zur Messung von Enzymaktivitäten wurden die Proteinlösungen im Anschluß an die Reinigung zur Entfernung des Elutionsmittels Desthiobiotin über PD10-Säulen entsalzt, über Centricon-Konzentratoren (s. 2.15.3.) eingengt und konnten nun im Peroxidasetest nach (LIM, *et al.*, 1993) (s. 2.13.3.2.) eingesetzt werden. Als Substrat diente 0,5 mM Cumolhydroperoxid. Es konnte jedoch auch unter Einsatz von ca. 70 µg Protein und einer Inkubationszeit von 7 min bei 37 °C keine signifikante Enzymaktivität für die drei Proteinproben gemessen werden. Als Vergleich dienten 70 µg rekombinantes GrdB350C (s. 3.5.2.), welches eine Peroxidase-Aktivität von ca. 50 U/g aufwies.

3.6.3. Bindung von 2-¹⁴C-Glycin an die GrdB-Varianten

Wie im Kapitel 3.6.2. beschrieben, wiesen die bei der Co-Expression mit *grdE* erhaltenen intakten Proteine GrdB350C~GrdE, GrdB350C~GrdE25, GrdB350C~GrdE22 im Gegensatz zu GrdB350C keine Peroxidase-Aktivität auf. Um zu untersuchen, ob der Verlust dieser Aktivität auf eine prinzipielle Inaktivierung zurückzuführen war, sollte geprüft werden, ob diese Proteine in der Lage sind, ihr natürliches Substrat Glycin zu binden. Im aktiven Zentrum von GrdB wird eine Carbonylgruppe postuliert, die mit Glycin unter Ausbildung einer Schiff'schen Base reagiert (MEYER, 1993; WAGNER, 1997), welche durch Reduktion mit NaBH₄ kovalent gebunden werden kann (MEYER, 1993). Die Markierung der GrdB-Proteine erfolgte mit 2-¹⁴C-Glycin. Dazu wurden jeweils 50 µl der rekombinanten Proteine GrdBWT (30 µg), GrdB350C (35 µg), GrdB350C~GrdE (15 µg), GrdB350C~GrdE25 (15 µg) und GrdB350C~22 (15 µg), sowie aus *E. acidaminophilum* gereinigtes Protein B (40 µg) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle dienten 500 µl (15 mg) Rohextrakt aus *E. acidaminophilum*. Die Proteinlösungen wurde anschließend mit 72 µM 2-¹⁴C-Glycin (4 µCi) und 200 mM (Endkonzentration) NaBH₄ versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Für jede Probe wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Zum einen wurde die jeweilige Proteinlösung für 5 min mit Substrat ohne

Zugabe von NaBH₄ bei RT inkubiert, zum anderen erfolgte vor der Substratbindung eine Inaktivierung der Carbonylgruppe durch Zugabe von 1,5 M (Endkonzentration) Hydroxylamin und 30 minütige Inkubation bei RT (Umwandlung der katalytisch aktiven Carbonylgruppe in ein katalytisch inaktives Oxim) (HORMANN & ANDREESEN, 1989). 20 µl jeder Probe wurden anschließend mit 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 20 µl im 12,5%iges SDS-PAG (s. 2.16.1.) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Nach Trocknung der Gele wurde zur Detektion der mit 2-¹⁴C-Glycin markierten Proteine ein Phosphor-Screen (Kodak, Rochester/USA) aufgelegt und für 7 Tage exponiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit einem Phosphor-Imager Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Mit 2-¹⁴C-Glycin und NaBH₄ behandelter Rohextrakt zeigte eine deutliche Bande bei 47 kDa. Gereinigtes Protein B, sowie die untersuchten rekombinanten GrdB-Varianten wiesen keine Markierung auf (Daten nicht gezeigt).

3.7. Untersuchungen zu PrxU

3.7.1. Molekularbiologische Untersuchungen der *prxU*-Genregion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Isolierung des Gens *prxU* auf dem Plasmid pPX2 mit einem Insert von 4123 bp (PARTHER, 1998). Dieses wurde unter Einbeziehung der Inserts der durch Subklonierung erhaltenen Plasmide pPX2-1, pPX2-2 und pPX2-3 (PARTHER, 1998) mittels *primer-walking* doppelsträngig sequenziert. Aus den erhaltenen Sequenzdaten ergab sich eine Genanordnung, welche von der innerhalb der vorangegangenen Diplomarbeit beschriebenen (PARTHER, 1998) abwich. Die korrigierte Anordnung, die unter (SÖHLING, *et al.*, 2001) veröffentlicht wurde, ist in Abb. 23 schematisch dargestellt.

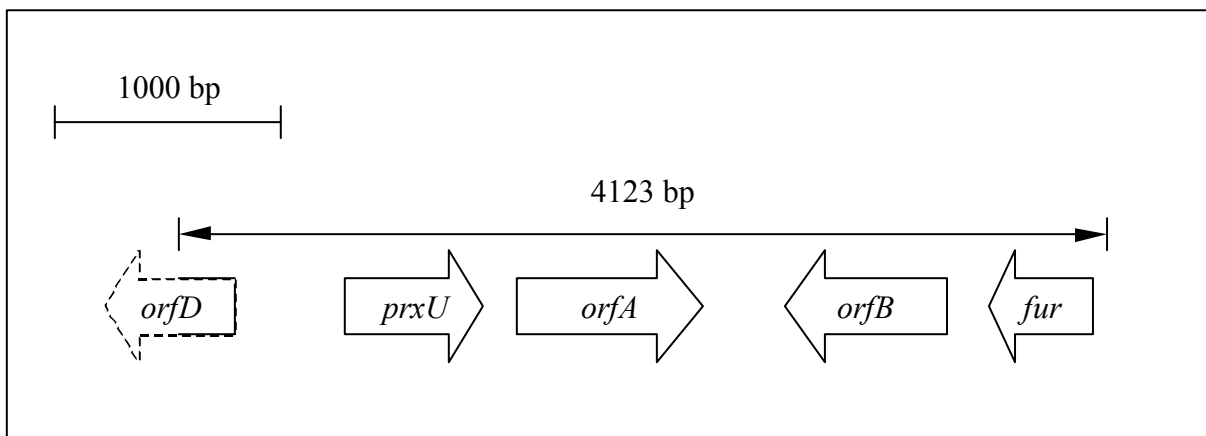


Abb. 23: Schematische Darstellung der offenen Leserahmen auf dem Plasmid pPX2

Gezeigt ist die auf dem Insert des Plasmides pPX2 vorliegende Genregion. Die Lage der identifizierten offenen Leserahmen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung an.

3.7.1.1. Analyse der offenen Leserahmen

Die aus den doppelsträngigen Sequenzdaten (Anhang A1) ermittelten Eigenschaften der identifizierten Gene, codierten Proteine und intergenen Bereiche sind in Tab. 17 zusammengefasst. Für die Bestimmung offener Leserahmen galten als Kriterien eine Länge des *orfs* von mindestens 200 bp, das Vorhandensein der Startcodons ATG, TTG oder GTG bzw. der Stopcodons TGA, TAA oder TAG (GOLD, 1988) sowie das Vorhandensein einer Shine-Dalgarno-Sequenz (SHINE & DALGARNO, 1974) im Bereich von 6-12 bp stromaufwärts des entsprechenden *orfs*.

Tab. 17: Eigenschaften der identifizierten Gene, hypothetischen Proteine und intergenen Bereiche

Genbezeichnung/ <i>orf</i>	<i>orfD</i>	<i>prxU</i>	<i>orfA</i>	<i>orfB</i>	<i>fur</i>
Leseraster	-1	+2	+1	-3	-1
Anzahl der Basen	251	609	825	717	459
GC-Gehalt [mol%]	46,2	44,9	40,1	44,5	37,3
Startcodon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
Stopcodon	-	TAG	TAG	TAA	TAA
Genprodukt	OrfD	PrxU	OrfA	OrfB	Fur
Anzahl der Aminosäuren	83	203	274	238	152
Theoretische Molekulare Masse [kDa]	-	22,4	30,4	27,0	18,0
Intergene Regionen	<i>orfD/prxU</i>	<i>PrxU/orfA</i>	<i>orfA/orfB</i>	<i>orfB/fur</i>	>55
Anzahl der Basen	487	140	368	209	
GC-Gehalt [mol%]	35,7	34,2	41,0	36,8	

Anhand von Sequenzvergleichen mit Proteinen aus Genbanken (vgl. 2.10.2) zeigte das aus *orf 2* (*prxU*) abgeleiteten Protein die höchsten Homologien zur Thioredoxin Peroxidase aus *Ascaris suum* mit 45,6% Identität. Das Genprodukt des direkt stromabwärts befindlichen *orf 3* (*orfA*) wies mit 43,6% Identität die höchste Homologie zu einem hypothetischen Protein (Nukleotid-bindend) aus *Desulfitobacterium hafniense* auf. Ähnlichkeiten zu einem hypothetischen Protein, das im Rahmen der Genomsequenzierung von *Aquifex aeolicus* postuliert wurde (DECKERT, *et al.*, 1998), konnten für das Genprodukt des *orf 4* (*orfB*) erhalten werden. Das Translationsprodukt des *orf 5* (*fur*) zeigte mit 29,4% Identität die höchste Homologie zum *ferric-uptake*-Regulatorprotein aus *Clostridium acetobutylicum*. Das aus dem auf pPX2 unvollständig kloniertem *orf 1* (*orfD*) abgeleitete N-terminale Protein-Fragment wies hohe Homologie zu einem hypothetischen Protein aus *D. hafniense* auf. Tab. 18 zeigt einen Überblick über weitere aus dem Vergleich mit Sequenzdatenbanken erhaltenen Daten.

Tab. 18: Vergleich der aus den *orf1-5* abgeleiteten Proteinsequenzen mit Proteinen aus Genbanken

<i>orf</i>	Genprodukt	Organismus	Identität [%] ¹	Accession no.
<i>orfD</i>	Hypothetisches Protein	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	68,3 ²	ZP_00098148
	Hypothetisches Protein	<i>Methanococcus jannaschii</i>	64,9 ²	NP_247429
	Konserviertes hypothetisches Protein	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	62,1 ²	NP_662223
	Hypothetisches Protein	<i>Clostridium thermocellum</i>	56,1 ²	ZP_00060173
	Hypothetisches Protein	<i>Geobacter metallireducens</i>	50,6 ²	ZP_00081548
<i>prxU</i>	Thioredoxin-Peroxidase	<i>Ascaris suum</i>	45,6	BAA90476
	Peroxiredoxin	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BPI	45,3	NP_682244

Fortsetzung Tab. 18

	Peroxiredoxin	<i>Prochlorococcus marinus str MIT 9313</i>	44,2	ZP_00113173
	Hypothetisches Protein	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	44,0	ZP_00074689
	Peroxiredoxin	<i>Nostoc spec.</i> PCC7120	43,9	NP_488681
<i>orfA</i>	Hypothetisches Protein	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	43,6	ZP_00098523
	Nukleotid-bindendes Protein	<i>Archeoglobus fulgidus</i>	40,5	NP_071094.1
	ATPase (MinD-Familie)	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	40,7	NP_349583
	ATPase (MRP-Familie)	<i>Clostridium tetani</i> E88	37,5	NP_780962
	ATPase	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	30,2	NP_621819
<i>orfB</i>	Hypothetisches Protein	<i>Aquifex aeolicus</i>	28,6	NP_213604
	Hypothetisches Protein	<i>Pyrococcus abyssi</i>	26,3	NP_126277
	287 AS großes Protein	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	25,4	NP_143432
	Hypothetisches Protein	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	24,7	ZP_00128911
	Konserviertes hypothetisches Protein	<i>Thermotoga maritima</i>	23,4	NP_227991
<i>fur</i>	Fur	<i>C. acetobutylicum</i>	29,4	NP_348308
	Fe ²⁺ /Zn ²⁺ -uptake-Regulator	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	27,7	NP_623436
	Transkriptionsregulator (Fur-Familie)	<i>Listeria innocua</i>	26,4	NP_471404
	Transkriptionsregulator (Fur-Familie)	<i>Listeria monocytogenese</i> EGD-e	26,1	NP_465480
	Fe ²⁺ -uptake-Regulator homologes Protein	<i>Staphylococcus aureus</i> Mu 50	26,1	NP_372022

¹Die Identitäten wurden mit dem Programm LALIGN (www.expasy.org) berechnet.

²Die Identitäten beziehen sich nur auf die vom klonierten Genbereich abgeleiteten Proteinsequenz.

3.7.1.2. Transkriptions- und Translationssignale

Innerhalb der AT-reichen intergenen Regionen der Gene *prxU*, *orfA*, *orfB* und *orfD* konnten jeweils stromaufwärts Bereiche identifiziert werden, die hohe Homologien zu der Konsensussequenz von σ^{70} -abhängigen *E. coli*-Promotoren (5'-TTGACA_{-17±1bp}-TATAAT-3') (HARLEY & P., 1987) bzw. von σ^A -abhängigen *Bacillus subtilis*-Promotoren (HELLMANN, 1995) aufwiesen (s. Anhang A1). Über eine putative Promotor-Region des Gens *fur* konnte keine Aussage gemacht werden, da sich diese Struktur offenbar außerhalb der klonierten Genregion befand. Experimentelle Untersuchungen zum Transkriptionsstartpunkt erfolgten ausschließlich an dem Gen *prxU*, auf das in den Kapiteln 3.7.1.3. und 3.7.1.4. näher eingegangen wird. Bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit (PARTHER, 1998) konnte für das Gen *prxU* 15 bp stromabwärts des Stopcodons TAG eine putative mRNA-Sekundärstruktur identifiziert werden, der eine Funktion als Rho-unabhängige Terminationsstruktur zugesprochen werden kann (s. Abb. 24). Dafür spricht das Vorhandensein einer für diese Terminationssignale typischer Uracil-reichen Sequenz im 3'-Bereich (PLATT, 1986). Für die anderen Gene innerhalb des klonierten Bereiches konnten auch nach Korrektur der Sequenzdaten innerhalb der vorliegenden Arbeit keine weiteren Rho-unabhängigen Terminationssignale identifiziert werden. Alle innerhalb der untersuchten Genregion identifizierten Gene wiesen als Startcodon ATG auf. Als Stopcodons dienen TAG (*prxU*, *orfA*) bzw. TAA (*orfB*, *fur*). Purinreiche Region im Abstand

von 6-8 Basen stromaufwärts der Startcodons der jeweiligen Gene mit den Sequenzen 5'-AACGAG-3' (*orfD*), 5'-AGGAGA-3' (*prxU*), 5'-GGGGCG-3' (*orfA*), 5'-GAAAAA-3' (*orfB*), 5'-AAAGGG-3' (*fur*) könnten als mögliche Ribosomen-Bindungsstellen (SHINE & DALGARNO, 1974) genutzt werden.

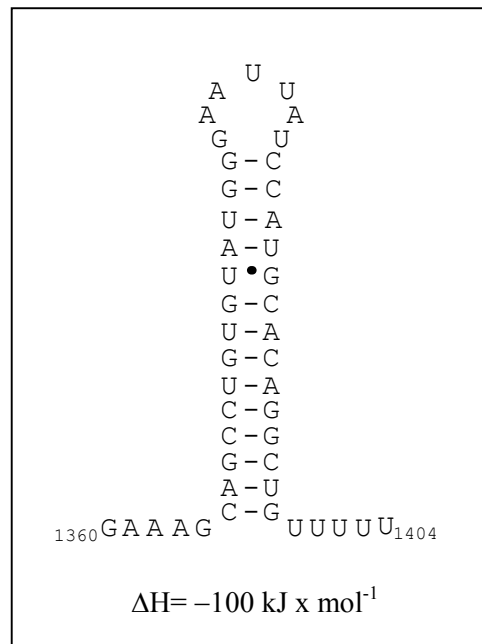


Abb. 24: Putative mRNA-Sekundärstruktur stromabwärts von *prxU* (Termination)

Die Änderung der Freien Enthalpie wurde mit dem Programm *mfold* (WALTER, *et al.*, 1994) berechnet.

3.7.1.3. Transkriptnachweis durch Northern-Hybridisierung

Peroxiredoxin-codierende Gene bilden zusammen mit den Genen, die die elektronenübertragenden Komponenten des Peroxidase-Systems codieren, oft ein Gen-Cluster (POOLE & ELLIS, 1996; MATHIEU, *et al.*, 1992). Da anhand der Sequenz-Analysen der *prxU*-Genregion von *E. acidaminophilum* kein Hinweis auf die Codierung einer Elektronendonator-Proteinkomponente gefunden werden konnte (s. 3.7.1.1.), sollte nun mittels Northern Hybridisierung unter Nutzung einer *prxU*-spezifischen Sonde die postulierte alleinige Transkription von *prxU* bestätigt werden. Zur Bereitstellung der Sonde wurde ein 0,5 kb großes PCR-Fragment mit den Primern TPXF und TPXR (s. Tab. 4) an dem Plasmid pPX2 (s. Tab. 2) amplifiziert (s. 2.7.1.) und anschließend mit Digoxigenin markiert (s. 2.6.3.). Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* und die anschließende Hybridisierung erfolgte wie unter 2.9. beschrieben bei einer Hybridisierungstemperatur von 68°C. Mit der *prxU*-Sonde konnte ausschließlich ein Signal bei ca. 0,8 kb erhalten werden (Abb. 25), welches bei einer ermittelten Gengröße von 609 bp (s. 3.7.1.1.) für eine monocistronische Transkription des *prxU*-Gens sprach.

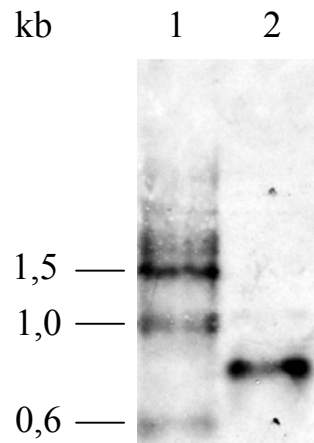


Abb. 25: Northern-Hybridisierung von Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* mit einer *prxU*-spezifischen DNA-Sonde

Spur 1: Digoxigenin-markierter Längenstandard I (Roche, Mannheim), Spur 2: 20 µg RNA hybridisiert mit *prxU*-spezifischer DNA-Sonde

3.7.1.4. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *primer extension*

Um den Transkriptionsstartpunkt von *prxU* zu bestimmen, wurde eine *primer-extension*-Analyse (s. 2.7.3.) durchgeführt. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte *prxU*-spezifische Primer (PrxU734, s. Tab. 4) wurde komplementär zum 5'-Bereich des entsprechenden Gens beginnend mit dem 13. Nukleotid stromabwärts des Startcodons gewählt. Durch Analyse des *primer-extension*-Ansatzes mit dem ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems, Langen) konnte ein 174 bp großes Fluoreszenz-markiertes cDNA-Fragment identifiziert werden (s. Abb. 19 und Abb. 26), von dem auf einen Transkriptionsstart in einer Entfernung von 158 bp stromaufwärts des Startcodons geschlossen werden konnte. In einem Abstand von sieben Nukleotiden in 5'-Richtung des so ermittelten Adenin-Nukleotids befand sich eine mögliche Promotor-Sequenz 5'-TTGTTT_{18bp}TATAAG-3', die hohe Homologien zur Konsensus-Sequenz 5'-TTGACA_{-17±1}-TATAAT-3' σ^{70} -abhängiger *E. coli*- bzw. σ^A -abhängiger *B. subtilis*-Promotoren (HARLEY & P., 1987; HELLMANN, 1995) aufwies (s. Anhang A1).

Tab. 19: Fragmentgrößen der ROX- und cDNA-Signale

Signalnr. ¹	Länge [bp]	Peakhöhe
R 6	75,00	777
R 7	100,00	839
R 9	139,00	751
R 11	150,00	759
R 13	160,00	768
cDNA-Probe	173,73	517
R 14	200,00	766
R 15	250,00	512
R 16	300,00	677
R 17	340,00	771
R 18	350,00	930
R 19	400,00	1044
R 20	450,00	838
R 21	490,00	941
R22	500,00	926

¹R: Signale des verwendeten ROX-Längenstandards, die Signalnr. korrespondieren mit Abb. 26.

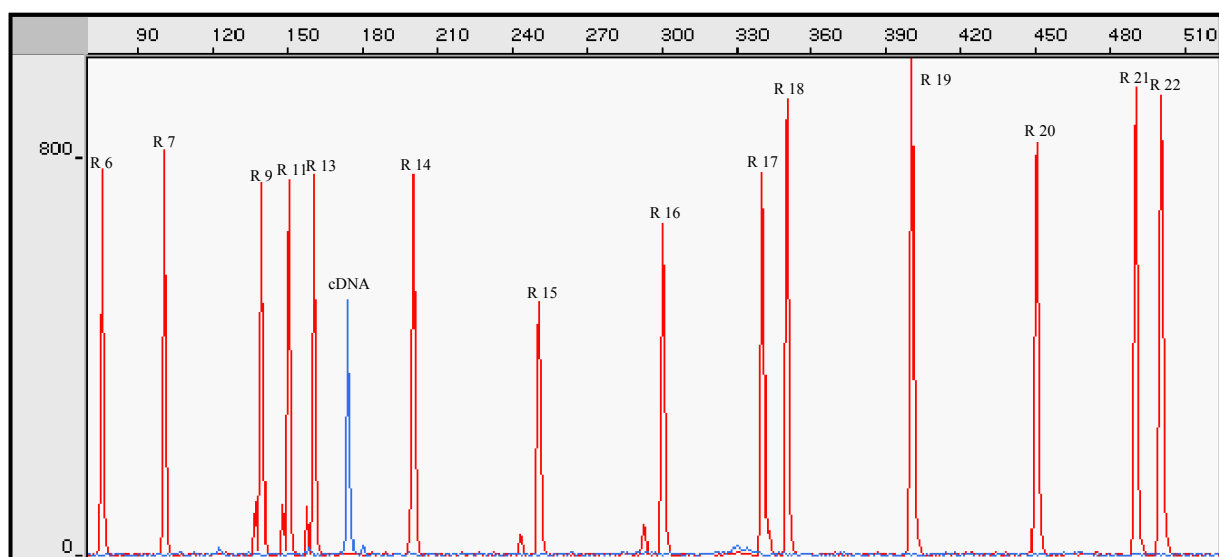


Abb. 26: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *prxU*-Gens

Dargestellt sind die am ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems, Langen) erhaltenen Signale des Größenstandards ROX (rot) und das Signal des *prxU*-spezifischen cDNA-Fragmentes (blau). Die Y-Achse gibt die Signal-Intensität, die X-Achse die Fragmentlänge in bp an.

3.7.2. Heterologe Expression und Reinigung von PrxU und PrxU47C als Strep-tagII-Fusionsproteine

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das von (WAGNER, 1997) identifizierte Seleno-Peroxiredoxin aus *E. acidaminophilum* zu reinigen. Wie im Kapitel 3.3. gezeigt, wurde jedoch Protein B der Glycin-Reduktase anhand einer Peroxiredoxin-Aktivität angereichert. Um dennoch das PrxU-Protein charakterisieren zu können, sollte das entsprechende Gen als Strep-tagII-Fusionsprotein heterolog in *E.coli* überexprimiert und gereinigt werden. Dieses war jedoch zu Beginn dieser Arbeiten für Gene, die für ein Selenocystein-haltiges Protein codierten nicht möglich. Wie bereits erwähnt (s. 3.5.), erfolgt der Einbau von Selenocystein in die Polypeptidkette in *E. acidaminophilum* co-

translational und ist unter anderem von dem Vorhandensein der Selenocystein-spezifischen-tRNA sowie dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB abhängig. Für die SelB-Erkennung ist eine SECIS-Struktur notwendig, die stromabwärts des für Selenocystein codierenden UGA-Codons lokalisiert ist. Da *E. coli*-SelB nicht in der Lage ist, die SECIS-Strukturen in Genen von *E. acidaminophilum* zu erkennen, kommt es bei der heterologen Expression der entsprechenden Gene nicht zum Einbau von Selenocystein, sondern entweder zur Suppression des UGA-Codons durch Tryptophan (EGGERTSON & SÖLL, 1988; HIRSH & GOLD, 1971) oder zum Abbruch der Polypeptidkette (SCOLNIK, *et al.*, 1968, vgl. Kapitel 3.5.). Um PrxU dennoch als funktionsfähiges Protein in *E. coli* zu produzieren, wurde das *prxU*-Gen zunächst in die Strep-tagII-Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 kloniert und anschließend das *in frame* TGA-Codon durch gerichtete Mutagenese zu dem Cystein-Codon TGC umgewandelt. Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit war es durch Anwendung einer von GURSINSKY, 2002 etablierten Methode möglich, auch Gene aus *E. acidaminophilum*, die für Seleno-Proteine codieren, in *E. coli* zu exprimieren (s. 3.5.). Somit konnte neben PrxU47C auch das Selenocystein-haltige PrxU als rekombinantes Protein in *E. coli* produziert werden.

3.7.2.1. Klonierung von *prxU* in die Strep-tagII-Vektoren pASK-IBA3 und 5

Die Klonierung von *prxU* in die Vektoren pASK-IBA3 (C-terminaler Strep-tagII) und pASK-IBA5 (N-terminaler Strep-tagII) erfolgte nach Angaben des Herstellers (IBA, Göttingen). Zunächst wurde *prxU* mit den Primerpaaren PRXA3F/PRXA3R (s. 2.7.4.) (Klonierung in pASK-IBA3) bzw. PRXA5F/PRXA5R (Klonierung in pASK-IBA5), die jeweils eine *BsaI*-Schnittstelle enthielten, amplifiziert (s. 2.7.). Als Template für die PCR diente das Plasmid pPX2-1 (s. 2.1.). Es wurde jeweils ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 0,6 kb erhalten (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden sowohl die Vektoren pASK-IBA3 und 5 als auch die gereinigten PCR-Produkte einem Restriktionsverdau (2.6.1.) mit dem Restriktionsenzym *BsaI* unterzogen, entsprechend gerichtet ligiert (s. 2.6.2., vgl. 3.4.2.1) und das Produkt in *E. coli* XL1-Blue-MRF' transformiert (s. 2.8.1.). Die isolierten Plasmide der Transformanten enthielten das korrekt *in frame* klonierte *prxU*-Gen. Jeweils ein Plasmid wurde ausgewählt und entsprechend mit pPrxU5 (N-terminale Strep-tagII-Fusion) und pPrxU (C-terminale Strep-tagII-Fusion) bezeichnet.

3.7.2.2. Gerichtete Mutagenese des UGA-Codons von PrxU zu UGC

Ausgangspunkt für die gerichtete Mutagenese bildete das in 3.7.2.1. erhaltene Plasmid pPrxU (C-terminale Strep-tagII-Fusion). Die Punktmutation von TGA zu TGC erfolgte anhand des Mutagenese-Protokolls der Fa. Stratagene (Heidelberg). Das Plasmid pPrxU wurde mit den Primern PXMUF und PXMUR, die die gewünschte Mutation enthielten, vollständig amplifiziert (s. 2.7.2.). Um die Template-DNA spezifisch aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (s. 2.6.1.) unterzogen und anschließend in *E. coli* XL1-Blue-MRF'

transformiert. 4 von 5 getesteten Transformanten enthielten das Plasmid pPrxU mit der gewünschten Mutation, im folgenden als pPrxU47C bezeichnet.

3.7.2.3. Heterologe Expression von *prxU* und *prxU47C* in *E. coli*

Zur Expression des mutierten *prxU*-Gens in *E. coli* XL1-Blue-MRF' wurden 500 ml LB-Medium (125 µg/ml Ampicillin) mit einer Übernachtskultur 2%ig angeimpft und bis zu einer $OD_{550} > 0,5$ bei 37°C kultiviert. Durch Zugabe von 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (AHT) wurde die Expression induziert und die Zellen nach 3 h geerntet. Die nach der Induktion auftretende Protein-Bande mit einer molekularen Masse von ca. 24 kDa (Daten nicht gezeigt) entsprach der aus der Protein-Sequenz abgeleiteten Masse des PrxU47C-Fusionsproteins von 23 kDa. Die mitgeführte Vektorkontrolle (*E. coli* XL1-Blue-MRF' mit pASK-IBA3) zeigte kein zusätzliches Protein dieser Größe. Im Gegensatz dazu konnte eine schwache Expression von *prxU* in der zweiten Kontrolle (*E. coli* XL1-Blue-MRF' mit pPrxU) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 27). Wie bereits erwähnt, besitzt dieses Gen ein *in-frame* UGA-Codon, welches wie in den Kapiteln 3.5.2. und 3.7.2. bereits näher beschrieben in *E. coli* entweder den Abbruch der Translation (SCOLNIK, *et al.*, 1968) oder die Suppression mit Tryptophan (EGGERTSON & SÖLL, 1988; HIRSH & GOLD, 1971) induzieren kann. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Expression von *prxU* ebenfalls auf eine Suppression des UGA-Codons zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pASK-IBA3, pPrxU und pPrxU47C in die $\Delta selC$ -Mutante *E. coli* MN1 (s. Tab. 1) transformiert. Dieser Stamm enthält kein Gen für die Selenocystein-spezifische-tRNA und ist somit generell nicht in der Lage, Selenocystein in die Polypeptidkette einzubauen. Die entsprechenden Gene wurden anschließend sowohl in *E. coli* MN1 als auch in *E. coli* XL1-Blue-MRF' unter oben genannten Bedingungen exprimiert und anschließend im SDS-Gel analysiert (Abb. 27). Der immunologische Nachweis der Strep-tagII-Fusionsproteine (2.22.2.) machte einen direkten Vergleich der Expressionsraten von PrxU und PrxU47C in den beiden Stämmen möglich. Wie aus Abb. 27 zu entnehmen ist, wurden beide Proteine in *E. coli* MN1 schwächer exprimiert als in *E. coli* XL1-Blue-MRF'. Das Verhältnis der Proteinmengen von PrxU im Vergleich zu PrxU47C war jedoch gleich, so daß auf eine Suppression des UGA-Codons im Falle von PrxU geschlossen werden konnte.

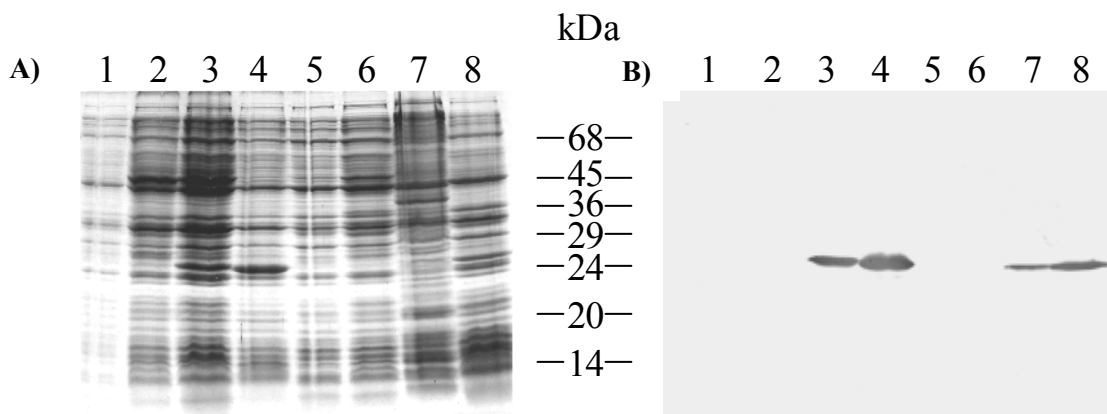


Abb. 27: Expression von PrxU und PrxU47C in *E. coli* XL1-Blue-MRF' bzw. *E. coli* MN1

A) 12,5%ige SDS-PAGE; B) Western Blot und immunologischer Nachweis von Strep-tagII-Fusionsproteinen mit Streptactin-HRP-Konjugat.

Spur 1-4: *E. coli* XL1-Blue-MRF'; pPrxU vor Induktion (1); pASK-IBA3 nach Induktion (2); pPrxU in nach Induktion (3); pPrxU47C nach Induktion (4); Spur 5-8: *E. coli* MN1; pPrxU vor Induktion (5); pASK-IBA3 nach Induktion (6); pPrxU nach Induktion (7); pPrxU47C nach Induktion (8)

Wie bereits erwähnt war es durch Arbeiten von (GURSINSKY, 2002) zu einem späteren Zeitpunkt dieser Untersuchungen möglich, auch die Gene Selenocystein-haltiger Proteine von *E. acidaminophilum* heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Zur Überproduktion von PrxU-Wildtyp-Protein wurde demnach das Plasmid pPrxU in den Stamm *E. coli* XL1-Blue-MRF' mit dem Plasmid pASBC4 (GURSINSKY, 2002, s. Tab. 2) transformiert (vgl. 3.5.). Zur anschließenden Expression von *prxU* wurden 500 ml LB Medium (125 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml Chloramphenicol) mit einer Vorkultur 2%ig angeimpft und bis zu einer $OD_{550} > 0,5$ bei 30°C kultiviert. Die Induktion der Expression erfolgte mit 0,2 µg/ml AHT und einer weiteren 3stündigen Inkubation bei 30 °C. Zum Zeitpunkt der Induktion wurde der Kultur zusätzlich 1 µM Na_2SeO_3 (Endkonzentration im Medium) zugesetzt. Auch in diesem Fall konnte ein zum Zeitpunkt der Induktion nicht auftretendes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 24 kDa identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Unter den genannten Bedingungen konnte durch (GURSINSKY, 2002) eine Inkorporation von Selenocystein durch ^{75}Se -Markierung des rekombinanten PrxU nachgewiesen werden.

3.7.2.4. Reinigung von PrxU und PrxU47C an Streptactin-Sepharose

Für weitere proteinchemischen Untersuchungen, speziell für die Messung von Enzymaktivitäten, mußten die Proteine im gereinigten Zustand vorliegen. Dazu wurden zunächst die induzierten Zellen (s. 3.7.2.3.) geerntet und aufgeschlossen (2.11.). Alle Schritte wurden mit 2,5 mM DTT enthaltendem Puffer durchgeführt. Die Reinigung des Strep-tagII-Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie erfolgte an Streptactin-Sepharose wie unter 2.14.4.1. beschrieben. Nach Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin lagen PrxU und PrxU47C bereits in reiner Form vor. (Abb. 28). Die erhaltene Gesamtproteinmenge an PrxU betrug 0,9 mg. Das entsprach einem Anteil von ca. 1% am *E. coli*-

Gesamtprotein. Für PrxU47C konnte eine Proteinmenge von 3,4 mg erhalten werden, welches ca. 3,5% im Vergleich zum *E. coli*-Gesamtprotein ausmachte.

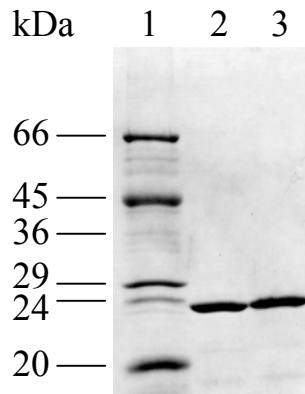


Abb. 28: Reinigung von PrxU und PrxU47C an Streptactin-Sepharose

12,5%ige SDS-PAGE; Spur 1: 10 µl Größenstandard $\Sigma 7$; Spur 2: 10 µg PrxU (*prxU* exprimiert in *E. coli* XL1-Blue-MRF' mit pASBC4); Spur 3: 10 µg PrxU47C.

3.7.2.5. Enzymatische Charakterisierung von PrxU und PrxU47C

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von PrxU und PrxU47C kam zunächst der Enzymtest nach (LIM, *et al.*, 1993) zur Anwendung. Wie bereits in den Kapitel 3.1. und 3.3. beschrieben, besitzen Peroxiredoxine die Fähigkeit, Peroxide unter Nutzung eines Thiol-haltigen Elektronendonors, beispielsweise DTT, zu reduzieren. Für Rohextrakt von *E. acidaminophilum* sowie für das gereinigte Protein B der Glycin-Reduktase konnte eine entsprechende Aktivität für die Substrate H_2O_2 , Cumolhydroperoxid sowie *t*-Butylhydroperoxid nachgewiesen werden (s. 3.1. und 3.3.4.3.). Die Messung der enzymatischen Aktivitäten der PrxU-Proteine erfolgte wie unter 2.13.3.2. beschrieben. Als Substrate dienten H_2O_2 , *t*-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid in den Konzentrationen 0,5 und 0,25 mM, sowie 0,25 mM Linolsäurehydroperoxid (Herstellung s. 2.13.3.1.). Die Anwendung niedriger Substratkonzentrationen sollte dabei eine irreversible Oxidation des redoxaktiven Cysteins bzw. Selenocysteins, wie es bereits für einige Peroxiredoxine beschrieben wurde (DIETZ, *et al.*, 2002; YANG, *et al.*, 2002), verhindern. Für die Substrate H_2O_2 , *t*-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid konnte für die Proteine PrxU und PrxU47C auch unter Einsatz von bis zu 200 µg Protein und einer Inkubationszeit von 7 min keine signifikante enzymatische Aktivität beobachtet werden. Im Gegensatz dazu betrug der Umsatz von Linolsäurehydroperoxid durch 12 µg PrxU ca. 0,6 U/mg. Als Kontrolle diente hitzeinaktiviertes Protein (10 min, 100°C), welches keine entsprechende Peroxidreduktion mehr aufwies. Die Cystein-Mutante PrxU47C zeigte auch unter Einsatz von 200 µg Protein keine enzymatische Aktivität mit Linolsäurehydroperoxid. Zur Charakterisierung der Peroxiredoxin-Aktivität von PrxU wurde zunächst der Umsatz von 100 µM Linolsäurehydroperoxid in Abhängigkeit von der Proteinmenge bestimmt. Wie in Abb. 29 ersichtlich ist, zeigte PrxU Abweichungen von der erwarteten Extraktproportionalität. So konnten für 1,5 und 3 µg Protein keine Aktivität festgestellt werden. Weiterhin wurden bei höheren

Proteinkonzentrationen ab ca. 15 μg Abweichungen von der Linearität erhalten, die möglicherweise auf eine Limitierung durch die Substrat-Konzentration zurückzuführen sein könnten.

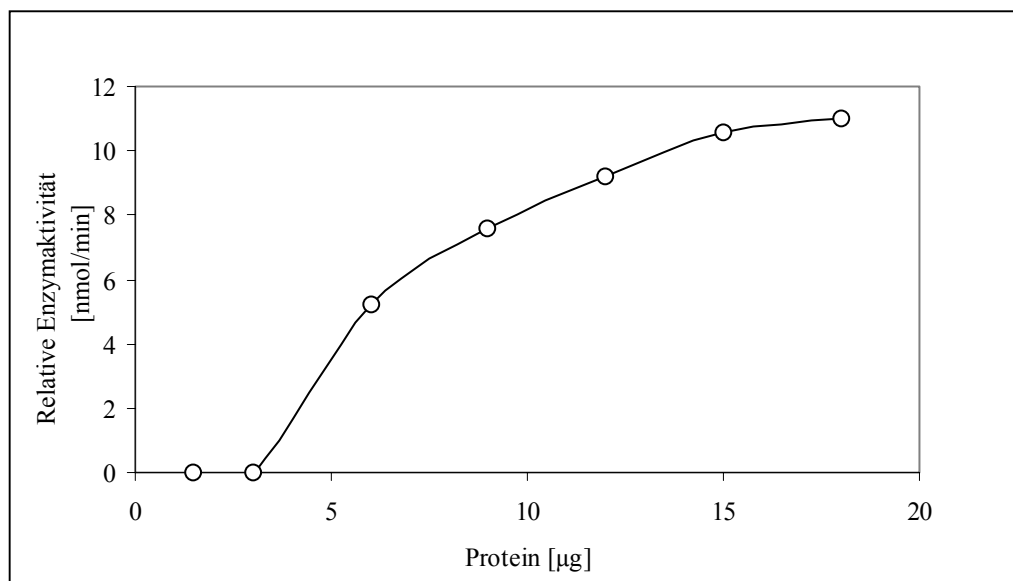


Abb. 29: Linolsäurehydroperoxid-Reduktion durch PrxU in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der kinetischen Daten k_m und V_{max} war nicht möglich, da die Substratsättigung bereits bei einer Linolsäurehydroperoxid-Konzentration von 40 μM erreicht war. Der empfohlene Meßbereich zur k_m -Wert-Berechnung von mindestens $k_m/3$ bis $10 \times k_m$ erforderte demnach Messungen bei einer abgeschätzten Substratkonzentrationen von höchstens 10 μM . Die Extinktionsänderung innerhalb dieses Konzentrationsbereiches war jedoch durch die angewendete Methode (s. 2.13.3.2.) nicht mehr meßbar bzw. wäre mit zu hohen Ungenauigkeiten behaftet, so daß auf die Ermittlung der kinetischen Daten verzichtet wurde.

Interessant war es nun, ob PrxU neben der DTT-abhängigen auch eine Thioredoxin-abhängige Peroxidase-Aktivität, wie es erstmals für ein Peroxiredoxin aus Hefe (CHAE, *et al.*, 1994) beschrieben wurde, sowie eine Peroxinitrit-Reduktase-Aktivität besaß, wie es für AhpC aus *S. typhimurium* gezeigt werden konnte (BRYK, *et al.*, 2000). Um zunächst zu prüfen, ob in *E. acidaminophilum* eine NADPH-abhängige Reduktion von Linolsäurehydroperoxid existiert, wurde der unter 2.13.3.4. beschriebene Enzymtest mit Rohextrakt durchgeführt. Die ermittelte Enzymaktivität betrug 0,25 U/mg und war proportional zur eingesetzten Extraktmenge, wobei wie bereits für rekombinantes PrxU gezeigt, eine Enzymaktivität erst ab Einsatz von 3 μg gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Entsprechend wurde anschließend versucht, die NADPH-abhängige Reaktion durch PrxU und das Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-System zu komplementieren. Dazu wurde die unter 2.13.3.4. beschriebene Messung unter Nutzung der gereinigten und entsalzten rekombinanten Proteine Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase (s. 3.4.2.1.) durchgeführt. Die enzymatische Aktivität beider Proteine wurde zunächst mit dem Komplementationstest nach (MEYER, *et al.*, 1991) (s. 2.13.2.) überprüft. Als Substrat für die Peroxidase-Aktivität diente 250 μM Linolsäurehydroperoxid. Unter Einsatz von 14 μg PrxU (0,6 nmol) und äquimolaren Mengen Thioredoxin und Thioredoxin-

Reduktase konnte jedoch keine NADPH-abhängige Peroxidreduktion beobachtet werden. Da PrxU keine Thioredoxin-abhängige Peroxidase-Aktivität aufwies, erfolgte die Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimus für die durch PrxU katalysierte Reaktion unter Nutzung des unphysiologischen Elektronendonors DTT.

3.7.2.5.1. Bestimmung des Temperatur-Optimums

Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums der DTT-abhängigen Linolsäurehydroperoxid-Reduktion betrug die eingesetzte Proteinmenge 12 μg PrxU. Die Messung erfolgte in einem Zeitraum von 30 s im Anschluß an eine 3minütige Vorinkubation des Testansatzes (ohne Peroxid) bei der entsprechenden Temperatur. Die Reaktion wurde mit 100 μM Linolsäurehydroperoxid gestartet. Da ab einer Temperatur von 35°C eine leichte Abnahme des Substrates auch ohne Zugabe von Protein zu beobachten war, wurde eine entsprechende Blindreaktion bestimmt und von der ermittelten Enzymaktivität subtrahiert. Das Temperaturoptimum betrug ca. 35°C (Abb. 30), was im Bereich der optimalen Wachstumstemperatur von 34 °C von *E. acidaminophilum* lag. Zur Berechnung der Aktivierungsenergie (E_A) wurde der dekadische Logarithmus der jeweiligen spezifischen Enzymaktivität gegen den reziproken Wert der Inkubationstemperatur in Kelvin (Arrhenius-Plot, vgl. 3.3.4.1) aufgetragen. Der Anstieg im linearen Bereich betrug -2032 K , so daß eine Aktivierungsenergie von ca. $40 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ für die von PrxU katalysierte Reaktion berechnet werden konnte.

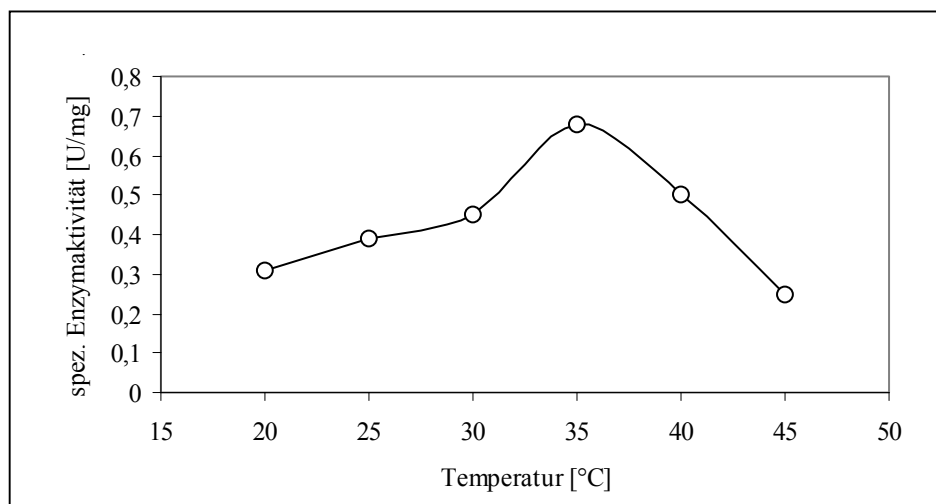


Abb. 30: Temperatur-Optimum der Linolsäurehydroperoxid-Reduktion durch PrxU

3.7.2.5.2. Bestimmung des pH-Optimums

Für die Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums wurden 14 μg PrxU und 100 μM Linolsäurehydroperoxid eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 30 s, die Reaktionstemperatur 37°C. Das pH-Optimum befand sich im schwach alkalischen Bereich bei 8,0 (s. Abb. 31). Es fiel auf, daß unter Verwendung von K-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 das Protein nur 35% der im Tris-

Puffer (pH7,5) erhaltenen Aktivität aufwies, was eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Art des Puffers vermuten ließ. Das Protein besaß auch in HEPES-Puffer mit pH6,5 und pH7,0 keine enzymatische Aktivität. In HEPES-Puffer pH7,5 konnte für PrxU eine spez. Enzymaktivität von 0,2 U/mg ermittelt werden (Daten nicht gezeigt), die mit der in K-Phosphat-Puffer pH7,5 erhaltenen, korrelierte.

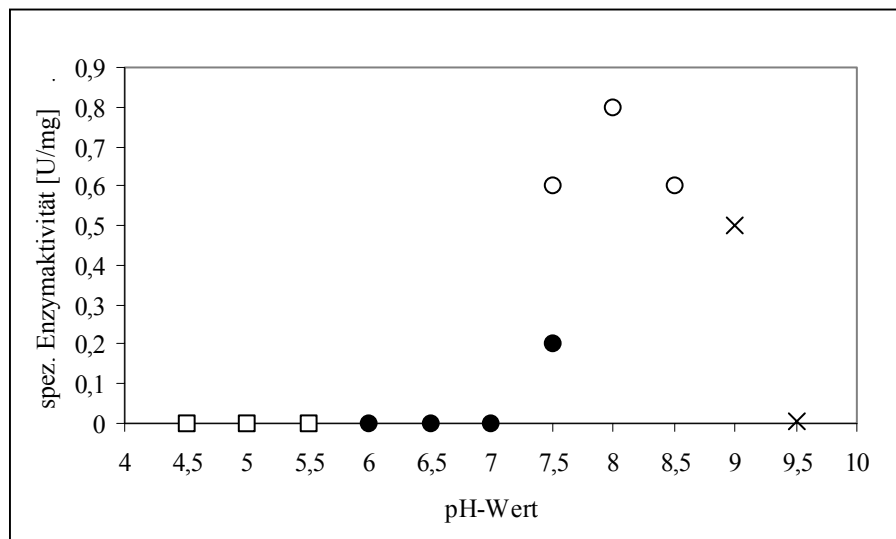


Abb. 31: pH-Optimum der Linolsäurehydroperoxid-Reduktion durch PrxU

□: 50 mM K-Acetat; ●: 50 mM K-Phosphat; ○: 50 mM Tris/HCl; ×: 50 mM NaHCO₃

3.7.2.5.3. Untersuchungen zur nativen Struktur von PrxU und PrxU47C

2-Cys-Peroxiredoxine liegen im allgemeinen als Homodimere (α_2) vor und oligomerisieren in Lösung zu Dekameren der Struktur (α_2)₅ (SCHRÖDER, *et al.*, 2000; KITANO, *et al.*, 1999; CHAUHAN & MANDE, 2001; HIROTSU, *et al.*, 1999; SCHRÖDER, *et al.*, 1998). Dabei wurde beobachtet, daß nur das reduzierte Enzym zur Aggregation befähigt ist, und daß das Protein im oxidierten Zustand zur Dissoziation in Dimere neigt (WOOD, *et al.*, 2002). Eine Dimerisierung konnte ebenfalls für das menschliche 1-Cys-Peroxiredoxin PrxVI nachgewiesen werden (CHOI, *et al.*, 1998). Es wurde postuliert, daß die Aktivität der Peroxiredoxine von der Ausbildung dieser Strukturen abhängig ist. Interessant war es nun, ob das Seleno-Peroxiredoxin aus *E. acidaminophilum* ebenfalls zur Ausbildung von Dimeren bzw. Dekameren in der Lage ist und ob der Austausch des Selenocysteins zu Cystein in dem PrxU47C-Protein einen Einfluß auf die native Struktur des Proteins besitzt. Zunächst wurden jeweils 3 µg PrxU und PrxU47C mit reduzierendem (700 mM Mercaptoethanol), nicht-reduzierendem (ohne Mercaptoethanol) und oxidierendem (250 µM Linolsäurehydroperoxid) SDS-Probenpuffer behandelt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend im SDS-Gel (s. 2.16.1.) aufgetrennt. Unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen wiesen beide Proteine ein Bande bei 24 kDa auf, welches die monomere Form des Proteins darstellte. Ein theoretisches Dimer würde entsprechend bei etwa 48 kDa erwartet werden. Die Oxidation durch Linolsäurehydroperoxid führte jedoch in beiden

Fällen nur zu einer Verschiebung der Bande auf ca. 26 kDa (Abb. 32). Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch erhalten, wenn 700 mM H₂O₂ zur Oxidation eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

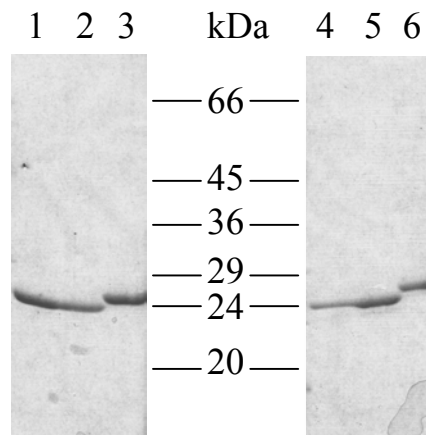


Abb. 32: Verhalten von PrxU und PrxU47C unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen
12,5% SDS-PAG; Spur 1: 3 µg PrxU reduziert (700 mM Mercaptoethanol); Spur 2: 3 µg PrxU nicht reduziert, Spur 3: PrxU oxidiert (250 µM Linolsäurehydroperoxid); Spur 4: 3 µg PrxU47C reduziert (700 mM Mercaptoethanol); Spur 5: 3 µg PrxU47C nicht reduziert, Spur 6: PrxU47C oxidiert (250 µM Linolsäurehydroperoxid);

Für die Analyse der Tertiärstruktur wurden jeweils 3 µg PrxU und PrxU47C in einem nativen Gradienten-PAG mit einem Konzentrationsbereich von 5-27% Acrylamid aufgetrennt (s. Abb. 33).

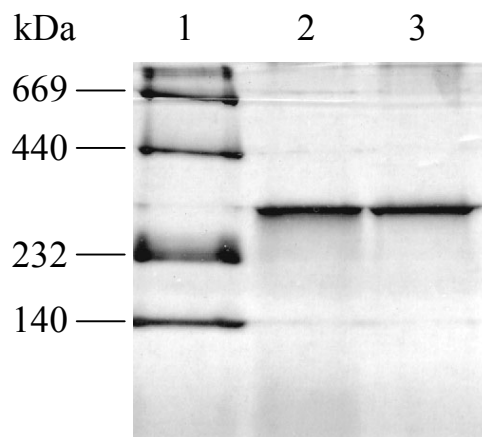


Abb. 33: Native Größe der Proteine PrxU und PrxU47C
Natives Gradienten-PAG (5-27%); Spur 1: 10 µl HMW-Größenstandard; Spur 2: 3 µg PrxU; Spur 3: 3 µg PrxU47C.

Mit Hilfe der aus der halblogarithmischen Auftragung der Proteingrößen des Markers gegen deren Laufstrecke im Gel abgeleiteten Formel ließ sich eine Größe beider PrxU-Proteine von ca. 288 kDa berechnen, was bei einer kalkulierten Größe des einzelnen Proteinmoleküls von ca. 24 kDa rein rechnerisch der Struktur eines Dodekamers, und nicht wie erwartet, eines Dekamers entsprechen würde.

3.7.2.6. Charakterisierung von nativem PrxU (PrxU_{Ea}) aus *E. acidaminophilum*

3.7.2.6.1. Immunologischer Nachweis von PrxU_{Ea} im Rohextrakt

Zum Zeitpunkt dieser hier folgenden Untersuchungen war noch nicht bekannt, daß PrxU eine DTT-abhängige Peroxidase-Aktivität für Linolsäurehydroperoxid besitzt. Aufgrund der Anreicherung von Protein B anhand einer Peroxidase-Aktivität wurde angenommen, daß eine Reinigung von PrxU aus *E. acidaminophilum* (im folgenden mit PrxU_{Ea} bezeichnet) anhand einer enzymatischen Aktivität nicht möglich war. Deshalb wurde auf eine Antigen/Antikörper-Affinitätschromatographie mit gegen PrxU gerichteten Antikörpern zurückgegriffen. Die dafür benötigten polyklonalen affinitätsgereinigten AK wurden von der Fa. Davids Biotechnologie (Regensburg) bereitgestellt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte dabei wie unter 2.22.1. beschrieben unter Einsatz von 100 µl gereinigter PrxU47C-Lösung (s. 3.7.2.3.) mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml (dialysiert gegen 50 mM Tris/HCl pH 8,0, s. 2.15.1). Ein Viertel der erhaltenen AK-Menge wurden zur Nutzung für Western Blot-Analysen mit HRP konjugiert. Durch den immunologischen Nachweis sollte nun zunächst die Lokalisation von PrxU in *E. acidaminophilum*-Zellen bestimmt werden. Dazu wurden sowohl 200 µg Protein des Rohextrakt als auch 200 µg Protein der Membranfraktion (aus Ultrafiltration (s. 2.11.3.) gewonnen, in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl resuspendiert) im SDS-PAG (s. 2.16.1.) aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 2.17.). Um nach anschließender Behandlung des Blottes mit Anti-PrxU-AK/HRP (s. 2.22.2.) ein Signal detektieren zu können, mußte der AK in einer 1:2000-Verdünnung eingesetzt werden. Jedoch reichte die Signalstärke nicht aus, um eine Farbreaktion direkt auf der PVDF-Membran zu erhalten. Deshalb wurde auf die sensitivere Chemilumineszenz-Detektion (s. 2.22.2.) zurückgegriffen. Wie in Abb. 34 gezeigt, konnten mit den AK zwei Proteinbanden der Größen 23 und 29 kDa im Rohextrakt nachgewiesen werden. Erstere repräsentierte größenmäßig das PrxU_{Ea}-Protein. Im suspendierten Membranpellet konnte keine Bande detektiert werden, was eine cytosolische Lokalisation des PrxU-Proteins vermuten ließ.

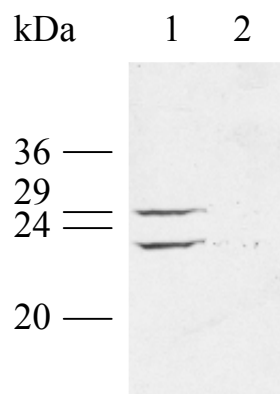


Abb. 34: Immunologischer Nachweis von PrxU im Rohextrakt von *E. acidaminophilum*

Western Blot nach Anti-PrxU-AK/HRP-Behandlung. Spur 1: 200 µg Rohextrakt; Spur 2: 200 µg resuspendierte Membranfraktion.

3.7.2.6.2. Reinigung von PrxU an Anti-PrxU-ProteinA-Sepharose

Zunächst wurde 1 mg unkonjugierter Anti-PrxU-AK, wie unter 2.14.4.2. beschrieben, an 50 mg ProteinA-Sepharose-*beads*, gekoppelt. Anschließend erfolgte die Präparation von Rohextrakt aus 3 g auf Glycin angezogenen *E. acidaminophilum*-Zellen (s. 2.11.2.1.). Nachfolgend wurden 75 mg Rohextrakt für 1 h zusammen mit den AK-Sepharose-*beads* bei RT inkubiert und dieser Schritt einmal mit weiterem Rohextrakt (75 mg) wiederholt. Nach der Entfernung von ungebundenen Proteinen wurde PrxU mit 3,5 M MgCl₂ (in 20 mM Tris/HCl pH7,5) innerhalb der Fraktionen 2-4 (je 200 µl) eluiert. Die Elution durch hohe Salzkonzentrationen wurde gewählt, da diese im Gegensatz zu den meisten in Frage kommenden Elutionsbedingungen die schonendste Variante für das Protein darstellte. Die Elutionsfraktionen wiesen einen sehr geringen Proteingehalt von 55 bzw. 22 µg/ml auf. Wie in Abb. 35 A gezeigt, wurden nach der Elution drei Proteine der Größen 23, 29 und 55 kDa erhalten. Dabei entsprach das kleinste Protein größenmäßig dem PrxU-Protein und das 29 kDa Protein dem durch immunologischen Nachweis von PrxU im Rohextrakt erhaltenen zusätzlichen Signal. Das Vorhandensein einer ca. 55 kDa großen Bande ist möglicherweise auf eine Ablösung des F_C-Fragmentes des Antikörpers von der ProteinA-Sepharose zurückzuführen. Zur Überprüfung der vollständigen Bindung von PrxU_{Ea} an den Antikörper wurden 200 µg Rohextrakt vor und nach Bindung an Anti-PrxU-ProteinA-Sepharose auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und das Vorhandensein von PrxU_{Ea} durch immunologischen Nachweis mit HRP-konjugierten AK überprüft (s. Abb. 35 B). Da nach Behandlung des Rohextraktes mit den AK kein PrxU_{Ea} detektiert werden konnte, wurde von einer vollständigen Immunopräzipitation ausgegangen. Demnach ließ sich unter Berücksichtigung des Anteils am F_C-Frament ein Anteil an PrxU von weniger als 0,06% am Gesamtprotein von *E. acidaminophilum* kalkulieren.

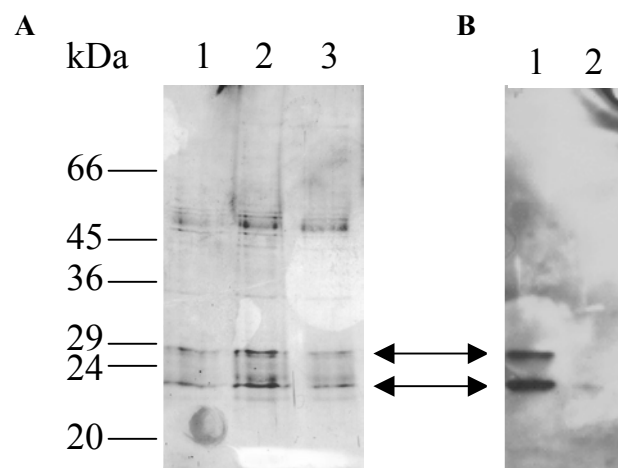


Abb. 35: Reinigung von PrxU_{Ea} aus *E. acidaminophilum* durch Antigen/Antikörper Affinitätschromatographie

A: 12,5%iges SDS-PAG; Silberfärbung. Spur 1: 0,2 µg Protein der 2. Elutionsfraktion; Spur 2: 0,6 µg Protein der 3. Elutionsfraktion; Spur 3: 0,2 µg Protein der 4. Elutionsfraktion.

B: Western Blot; immunologischer Nachweis mit Anti-PrxU-AK; Spur 1: 200 µg Rohextrakt vor Reinigung an Anti-PrxU-ProteinA-Sepharose; Spur 2: 200 µg Protein im Rohextrakt nach Anti-PrxU-ProteinA-Sepharose.

Zur eindeutigen Identifizierung der 23 und 29 kDa großen Proteine sollten jeweils die N-terminalen Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Dazu wurden die aus der Antigen/Antikörper-Affinitätschromatographie erhaltenen PrxU-haltigen Fraktionen über Centricon Konzentratoren eingengt (s. 2.15.3.) und 2 µg Protein wie unter 2.18.3. beschrieben für die Analyse vorbereitet. Für beide Fälle konnten jedoch keine Signale erhalten werden, was möglicherweise auf eine unzureichende Menge an Protein zurückzuführen war. Mehrfache Versuche, einen höheren Gehalt an gereinigtem Protein zu erhalten, schlugen fehl, da unter Verwendung von größeren Rohextraktmengen (bis zu 1000 mg, 30 g Zellen als Ausgangsmaterial) trotz sorgfältigen Waschens der Antigen/Antikörper-Affinitätschromatographie-Säule mit 20 SV Waschlösung bzw. Vorreinigung an Anionenaustauschmaterialien (s. 2.14.1.) erhebliche Verunreinigungen vor allem im Bereich von 20-30 kDa zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt) und somit eine Aminosäureanalyse unter diesen Bedingungen nicht möglich war.

Auch die Messung von Enzymaktivität von PrxU_{Ea} gelangen nicht, da bei der Anreicherung nur geringe Proteinmengen erhalten werden konnten, die zudem noch erhebliche Verunreinigungen aufwiesen. Wie bereits im Kapitel 3.3.7. beschrieben, wurde durch spezifische immunologische Ausfällung von PrxU_{Ea} indirekt nachgewiesen, daß dieses Protein nicht an der NADPH-abhängigen Reduktion von Cumolhydroperoxid beteiligt ist.

3.7.2.6.3. Bestimmung der nativen Struktur

Aufgrund der bereits erwähnten niedrigen Ausbeuten und hohen Verunreinigungen des angereicherten PrxU_{Ea}-Proteins wurde auch für strukturelle Untersuchungen der immunologische Nachweis des Proteins im Rohextrakt angewendet. Im Rahmen dieser Experimente war es interessant, welchen Einfluß verschiedene reduzierende und oxidierende Bedingungen auf das im Rohextrakt detektierte, PrxU-Antikörper-bindende 29 kDa-Protein ausübten. Dazu wurden zunächst je 170 µg Protein von anaerob präpariertem Rohextrakt mit nicht-reduzierendem (ohne 2-Mercaptoethanol), reduzierendem (700 mM Mercaptoethanol, 700 mM DTT oder 700 mM Na-Dithionit) und oxidierendem (880 mM H₂O₂) SDS-Probenpuffer behandelt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend im SDS-Gel (s. 2.16.1.) aufgetrennt. Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 2.17.) und PrxU_{Ea} immunologisch mit Anti-PrxU-AK/HRP nachgewiesen (2.22.2.). In allen Proben wurden jedoch nur zwei Banden der Größe 23 und 29 kDa nachgewiesen. Eine Verschiebung der 23 kDa-Bande, wie es für PrxU und PrxU47C nachgewiesen wurde (s. 3.7.2.5.3.), konnte demnach nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zur Bestimmung der nativen Größe von PrxU_{Ea} wurden 170 µg Rohextrakt von *E. acidaminophilum* in einem nativen Gradienten-PAG, welches einen Acrylamidkonzentrationsbereich von 5-27% umfaßte, aufgetrennt (s. 2.16.3.) und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch den immunologischen Nachweis von PrxU_{Ea} mittels Anti-PrxU-AK/HRP konnte eine Bande identifiziert werden, die im Vergleich mit dem

HMW-Größenstandard eine Größe zwischen 232 kDa und 440 kDa besaß (s. Abb. 36). Anhand der aus der halblogarithmischen Auftragung der Proteingrößen des Markers gegen deren Laufstrecke im Gel abgeleiteten Formel wurde in diesem Fall eine native Größe von 290 kDa berechnet. Dies entsprach dem für die rekombinanten Proteine PrxU und PrxU47C ermittelten Wert von 288 kDa und ließ ebenfalls auf ein Dodekamer des 23 kDa Protein schließen.

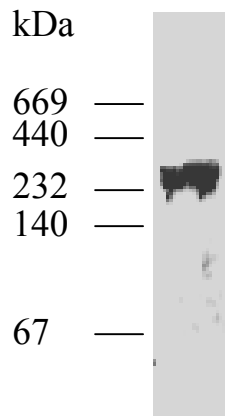


Abb. 36: Native Größe von PrxU_{Ea}

Natives Gradienten-PAG (5-27% Acrylamid): Spur: 170 µg Rohextrakt transferiert auf PVDF-Membran, immunologischer Nachweis mit Anti-PrxU-AK/HRP.

4. DISKUSSION

4.1. Eine Seleno-Protein-abhängige Peroxidase-Aktivität im Rohextrakt

Eine NADPH-abhängige Peroxidase-Aktivität für die Substrate Cumolhydroperoxid, *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ im Rohextrakt des strikt anaeroben Organismus *E. acidaminophilum* konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden (PARTHER, 1998). Bislang wurde vermutet, daß für diese Reaktion ein von WAGNER, 1997 anhand von ⁷⁵Se-Markierung isoliertes 22 kDa Seleno-Protein mit Sequenzhomologien zu Peroxiredoxinen (s. Einleitung) verantwortlich war. Dieses gehörte zu einer Familie von Proteinen, die in der Lage sind, Hydroperoxide unter Nutzung von Thioredoxin oder NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktasen zu reduzieren (CHA & KIM, 1995; CHAE, *et al.*, 1994; KWON, *et al.*, 1994; POOLE, *et al.*, 2000). Die zentrale Stellung des Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-Systems im Stoffwechsel von *E. acidaminophilum* (DIETRICH, *et al.*, 1991b; (LÜBBERS, 1993) ließ eine Beteiligung dieses Systems an der NADPH-abhängigen Peroxidreduktion vermuten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gelang eine Reinigung des Seleno-Peroxiredoxins anhand einer durch Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase komplementierten NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität jedoch nicht (PARTHER, 1998).

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde gezeigt, daß Rohextrakt von *E. acidaminophilum* in der Lage ist, die DTT/Fe³⁺/O₂-vermittelte Inaktivierung der Glutamin-Synthetase aus *E. coli* zu verhindern (s. 3.1.). Diese Fähigkeit wurde für Peroxiredoxine, Glutathion-Peroxidasen und Katalasen beschrieben (KIM, *et al.*, 1988; KANG, *et al.*, 1998; SEO, *et al.*, 2000; JEONG, *et al.*, 1999). Die genannten Proteine reduzieren unter Nutzung von DTT bzw. disproportionieren das bei der durch Fe³⁺ und DTT katalysierte Reduktion des Sauerstoffs entstandene H₂O₂. Damit verhindern sie die Bildung von Hydroxylradikalen (Reaktion von H₂O₂ mit dem an Glutamin-Synthetase gebundenen Fe²⁺) sowie die damit einhergehende Oxidation und Inaktivierung des Proteins (KIM, *et al.*, 1985). Da *E. acidaminophilum* keine Katalase (PARTHER, 1998) und kein Glutathion (B. SÖHLING, persönliche Mitteilung) besitzt, konnte das Vorhandensein eines aktiven Peroxiredoxins im Rohextrakt vermutet werden. Dafür sprach auch die bei Anwesenheit von DTT gemessene zeitabhängige Umsetzung von Cumolhydroperoxid durch Rohextrakt von *E. acidaminophilum* (s. 3.1). Diese Aktivität wurde erstmals von (LIM, *et al.*, 1993) für ein Peroxiredoxin aus *S. cerevisiae* ermittelt und erlaubte im Gegensatz zum Glutamin-Synthetase-Assay die Bestimmung von Enzymaktivitäten. Rohextrakt von *E. acidaminophilum* besaß eine spezifische Aktivität von ca. 150 U/g für die Substrate H₂O₂, Cumolhydroperoxid, *t*-Butylhydroperoxid. Dieser Wert lag somit 10fach höher als die für die NADPH-abhängige Peroxidasereaktion ermittelten Aktivität von 15-17 U/g (PARTHER, 1998). In *S. typhimurium* und den meisten anderen bakteriellen Peroxiredoxin-Systemen wird die Reduktion dieser Proteine wie bereits erwähnt durch NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktasen (EC 1.6.4.-) katalysiert. Zu dieser Enzymfamilie gehören die zu Thioredoxin-Reduktasen homologen Flavoproteine AhpF, NADH-Oxidasen (POOLE, *et al.*, 2000) bzw. NADH-Dehydrogenasen (KOITABASHI, *et al.*, 2000).

Sowohl für die NADH-Oxidase aus *A. xylanus* (NIIMURA, *et al.*, 1995) als auch für AhpF aus *S. typhimurium* (POOLE, *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Peroxiredoxin-Reduktion durch die Übertragung der Elektronen von NADH auf FAD repräsentiert wird. Die in *E. acidaminophilum* gemessene DTT-abhängige Reduktion von Cumolhydroperoxid ist nach (LIM, *et al.*, 1993) auf die Katalyse eines einzelnen Proteins zurückzuführen. Unter der Voraussetzung, daß dieses Protein auch Bestandteil des für die NADPH-abhängige Peroxidreduktion verantwortlichen Enzymsystems ist, könnte es sich bei der Übertragung der Elektronen vom NADPH auf den FAD-Co-Faktor einer ebenfalls an dieser Reaktion beteiligten NADPH-Oxidoreduktase (z. B. Thioredoxin-Reduktase) um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katalyse handeln, was die Unterschiede hinsichtlich der spezifischen Aktivitäten für beide Enzymmessungen erklären würde.

Die Behandlung von Rohextrakt von *E. acidaminophilum* bei einem pH-Wert von 6,8 mit EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin führte zu einer Verringerung der DTT-abhängigen Peroxidreduktion auf 20% für die Substrate Cumolhydroperoxid, *t*-Butylhydroperoxid und H₂O₂ (s. 3.2.). Brom- und Jodacetat-Derivate stellen elektrophile Reagentien dar, die die nukleophilen Selenol- und Thiol-Gruppen in Proteinen alkylieren. Die Selenol-Gruppe des Selenocysteins mit einem pK_A-Wert von 5,2 besitzt eine höhere Nukleophilie als die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins und liegt daher bereits bei physiologischen Bedingungen als unprotonierte Selenol-Gruppe vor. Bis auf wenige Ausnahmen weisen Cystein-Reste in Proteinen einen pK_A Wert von 8,5 auf und sind demnach bei pH 7,0 protoniert (HATFIELD, *et al.*, 1999; STADTMAN, 1996; WU, *et al.*, 1998). Daher ist es möglich, Selenocystein-haltige Proteine bei pH-Werten < 7,0 selektiv mit Iodacetat oder Bromacetat irreversibel zu alkylieren. So führte beispielsweise die Behandlung von Selenocystein-haltiger menschlicher Thioredoxin-Reduktase mit Brom[1-¹⁴C]acetat zur fast vollständigen Inhibierung ihrer NADPH:Disulfid Oxidoreduktase-Aktivität durch spezifische Alkylierung des für die Reaktion essentiellen Selenocystein-Restes (GORLATOV & STADTMAN, 1998). Im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* konnten aufgrund des Biotin-Linkers 9 markierte Proteine der Größen 47, 45, 30, 23, 22, 19, 17, 10 und 9 kDa mit Streptactin-Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden (s. 3.2). Durch GURSINSKY, 2002 wurden bereits Selen-haltige Makromoleküle in *E. acidaminophilum* durch *in vivo*-Inkorporation von ⁷⁵Se detektiert. Das auf diese Weise erhaltene Bandenmuster entsprach weitestgehend dem mit Biotin markierten Proteinen. Demnach konnten auf Grund der Größe und Intensität des Signals das Seleno-Protein A (16 kDa) und die selenocysteinhaltige Untereinheit GrdB des Seleno-Protein B (47 kDa) der Glycin-Reduktase, sowie ein 10 kDa Seleno-Protein mit bislang unbekannter Funktion zugeordnet werden. Ein im Gegensatz zu (GURSINSKY, 2002) stark markiertes Protein bei 22 kDa könnte dem Seleno-Peroxiredoxin entsprechen. Durch beide Markierungen nachgewiesene Proteine der Größen 30 und 45 kDa konnten bislang keinem bekannten Seleno-Protein von *E. acidaminophilum* zugeordnet werden (GURSINSKY, 2002). Möglicherweise handelt es sich bei dem erstgenannten Protein um das beim immunologischen

Nachweis von PrxU_{Ea} zusätzlich detektierte Protein (beschrieben als 29 kDa-Protein, s. 3.7.2.6.1.). Drei der mittels ^{75}Se detektierten Proteine wurden durch Behandlung mit EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin nicht nachgewiesen. Es handelte sich dabei um ein unbekanntes 12 kDa Protein, die Selenophosphat-Synthetase und die Formiat-Dehydrogenase (GURSINSKY, 2002). Diese Proteine wiesen nur schwache Signale im Autoradiogramm auf, was auf deren geringe Konzentration im Rohextrakt zurückzuführen ist, die möglicherweise für eine immunologische Detektion nicht ausreichte. Drei Proteine der Größen 9, 19 und 23 kDa, die im Autoradiogramm nicht auftraten, konnten mit Biotin markiert werden. Möglicherweise handelt es sich bei diesen nicht um Seleno-Proteine, sondern um Proteine, die ein Cystein mit niedrigem pK_{A} , wie es z.B. für Tyrosin-Phosphatasen oder Cystein-Proteasen beschrieben wurde, enthalten und damit der Alkylierung bei niedrigem pH-Wert zugänglich sind (WU, *et al.*, 1998). Die erhaltenen Ergebnisse legten nahe, daß die Katalyse der DTT-abhängigen Peroxidreduktion in *E. acidaminophilum* durch ein Seleno-Protein erfolgte.

4.2. Die Peroxidase-Aktivität von Protein B

Die Versuche zur Reinigung der im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* beobachteten DTT-abhängigen Peroxidase-Aktivität resultierten in der Anreicherung von drei Proteinen, die eindeutig als Untereinheiten des Protein B_{Glycin} der Glycin-Reduktase dieses Organismus identifiziert wurden. *E. acidaminophilum* ist in der Lage, Glycin sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor in einer internen Sticklandreaktion (STICKLAND, 1934) zu nutzen. Die für die Reduktion von Glycin benötigten Reduktionsäquivalente werden dabei aus der Oxidation eines Teils des Glycins durch die Glycin-Decarboxylase gewonnen (FREUDENBERG & ANDREESEN, 1989a; FREUDENBERG, *et al.*, 1989b), als Überträger dient das Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-System (DIETRICH, *et al.*, 1991b). Bei der Glycin-Reduktase handelt es sich um ein komplexes Enzymsystem, bestehend aus dem substratspezifischen Protein B, dem Seleno-Protein A und dem Protein C (DIETRICH, *et al.*, 1991b). Das substratbindende Protein setzt sich aus mehreren Untereinheiten der Größen 47 kDa (γ), 25 kDa (β) und 22 kDa (α) zusammen (MEYER, *et al.*, 1995; WAGNER, *et al.*, 1999). Dabei stellt das 47 kDa Protein (GrdB) ebenfalls ein Seleno-Protein dar (WAGNER, *et al.*, 1999). Weiterhin verfügt dieses Protein über eine Carbonylgruppe, an dem zunächst Glycin über eine Schiff'sche Base gebunden wird. Der daraus resultierende Carboxymethylrest wird anschließend auf die Selenol-Gruppe des Selenocysteins übertragen und auf Protein A transferiert (WAGNER, *et al.*, 1999). Die 25 kDa und 22 kDa Untereinheit von Protein B entstammen einem Proprotein, dem Genprodukt des *grdE*-Gens, welches durch posttranslationale Spaltung (vermutlich durch Cysteinolyse) unter Ausbildung einer Carbonylgruppe am N-Terminus des 22 kDa Proteins prozessiert wird (WAGNER, *et al.*, 1999; BEDNARSKI, *et al.*, 2001). Überraschend war nun, daß Protein B neben seiner Funktion innerhalb der Glycin-Reduktion signifikante

Enzymaktivität als DTT-abhängige Peroxidase aufwies und anhand dieser angereichert werden konnte (s. 3.3.4.).

4.2.1. Vergleich der Reinigungsschemen für Protein B

Protein B_{Glycin} (im folgenden nur Protein B genannt) aus *E. acidaminophilum* wurde bereits im Rahmen anderer Arbeiten anhand seiner Glycin-Reduktase-Aktivität gereinigt (MEYER, 1993; WAGNER, 1997). Da das hier vorgestellte Reinigungsschema eine neue Variante zur Anreicherung von Protein B darstellt, sollen an dieser Stelle die einzelnen Reinigungsschritte mit den von WAGNER, 1997 aktualisierten Daten verglichen und diskutiert werden. Ein prinzipieller Unterschied bestand im Gegensatz zu WAGNER, 1997 darin, daß die Anreicherung der Peroxidase-Aktivität unter anaeroben Bedingungen, sowie unter Einsatz von 3 mM DTT in allen Puffersystemen durchgeführt wurde. Ein weitere Unterschied umfaßte die Lokalisierung Protein B-haltiger Fraktionen während der Reinigung, die bei WAGNER, 1997 durch den Protein B-Komplementationstest in Anlehnung an den Standard-Test der Glycin-Reduktase nach MEYER, *et al.*, 1995 erfolgte.

Die Reinigung von Protein B durch WAGNER, 1997 umfaßte drei Chromatographieschritte an zwei unterschiedlichen Materialien. Der erste Anreicherungsschritt erfolgte ebenso wie im Rahmen dieser Arbeit an Q-Sepharose, allerdings unter Anwendung unterschiedlicher Puffersysteme (WAGNER, 1997: 25 mM Imidazol/HCl, pH 6,7, 1 mM DTT; diese Arbeit: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 3 mM DTT). Gebundenes Protein wurde in beiden Fällen mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert. Das Elutionsverhalten der Peroxidase-Aktivität unterschied sich geringfügig von dem der Glycin-Reduktase-Aktivität von Protein B (WAGNER, 1997). Demnach eluierte die Peroxidase-Aktivität erst innerhalb von 0,3-0,4 M NaCl, die Glycin-Reduktase-Aktivität jedoch bereits zwischen 0,2 und 0,3 M NaCl. Weiterhin wurde Protein B im Durchlauf detektiert (WAGNER, 1997), was für die Peroxidase-Aktivität nicht der Fall war. Diese Unterschiede sind vermutlich auf den Einfluß der verschiedenen Puffersysteme zurückzuführen. Als zweiter Reinigungsschritt wurde in beiden Fällen eine Chromatographie an hydrophoben Materialien (WAGNER, 1997: Phenyl-Sepharose; diese Arbeit: Butyl-Sepharose) durchgeführt. Die eingesetzten Puffer unterschieden sich dabei hauptsächlich in der zur Bindung des Proteins eingesetzten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration, die bei WAGNER, 1997 ca. 2fach höher lag als die in dieser Arbeit verwendete von 1,5 M. Protein B (Glycin-Reduktase-Aktivität) eluierte dabei innerhalb eines fallenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten bei 0,05-0 M, was zusätzlich den Einsatz eines ansteigenden Ethylenglykoll-Gradienten bzw. einen zusätzlichen Waschschrilles mit niedermolekularen Puffer erforderlich machte. Die Peroxidase-Aktivität eluierte von Butyl-Sepharose innerhalb des abfallenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten bereits bei 0,15-0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vollständig, so daß eine Nach-Elution unter diesen Bedingungen nicht nötig war und der Reinigungsschritt vereinfacht wurde. Durch (WAGNER, 1997) wurde anschließend eine Re-Chromatographie an Q-Sepharose mit 30 mM Imidazol/HCl, pH 6,7, 1 mM DTT entsprechend des 1. Schrittes, allerdings unter Anwendung eines größeren Gradientenvolumens, durchgeführt, was zu einer weitestgehenden Reinigung von

Protein B führte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gelfiltration als letzter Anreicherungsschritt gewählt, wodurch eine effektive Abtrennung der nach Butylsepharose noch aufgetretenen Verunreinigungen von Protein B erzielt werden konnte.

Die Analyse von 8 µg der nach Gelfiltration erhaltenen Proteinlösung zeigte drei Hauptproteinbanden bei ca. 47 kDa, 25 kDa und 22 kDa, wie sie für Protein B durch MEYER, *et al.*, 1995 und WAGNER, *et al.*, 1999 erhalten wurden. Weiterhin wies diese Proteinlösung ca. sechs weitere schwache Proteinbanden auf, die vermutlich auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Bei einer Auftrennung von 25 µg des gereinigten Protein B traten neben den drei genannten Hauptprotein-Banden ca. 15 zusätzliche Proteine auf, die jedoch bei Einsatz von 1-2 µg Protein im SDS-Gel nicht nachweisbar waren (WAGNER, 1997). Demnach ist der Reinheitsgrad von Protein B, das durch das in dieser Arbeit vorgestellte Reinigungsschema angereichert wurde, mit dem von WAGNER, 1997 vergleichbar. Ein von WAGNER, 1997 und MEYER, 1993 beschriebenes 36 kDa großes Protein, welches als N-terminales Spaltprodukt der 47 kDa Untereinheit identifiziert werden konnte (WAGNER, 1997), wurde innerhalb dieser Arbeit nicht detektiert. Möglicherweise hängt die durch WAGNER, 1997 beobachtete Proteolyseanfälligkeit von Protein B mit der Exposition des Proteins an Luftsauerstoff zusammen. Von WAGNER, 1997 wurde eine relativ schnelle Inaktivierung von Protein B im Hinblick auf die Glycin-Reduktase-Aktivität beschrieben, die eine möglichst schnelle Reinigung erforderlich machte. Unter anaeroben Bedingungen und unter Einsatz von 3 mM DTT konnte Protein B jedoch über Monate bei -80°C ohne signifikanten Verlust der Peroxidase-Aktivität gelagert werden, was auf den ersten Blick in Bezug auf die von WAGNER, 1997 gemachte Beobachtung auf eine oxidative Inaktivierung des Proteins deutet. Der Einfluß der anaeroben Bedingungen auf die Stabilität der Glycin-Reduktaseaktivität wurde jedoch nicht weiter untersucht. Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, daß die 47 kDa Untereinheit des aus *E. acidaminophilum* gereinigten Protein B nicht mit 2-¹⁴C-Glycin markiert werden konnte, was vermutlich auf den Verlust der für die Ausbildung der Schiff'schen Base verantwortlichen Carbonylgruppe zurückzuführen war. Die Fähigkeit, Glycin zu binden, ging dabei bereits nach dem zweiten Anreicherungsschritt an Butyl-Sepharose verloren (J. Jäger, persönliche Mitteilung). Eine Glycin-Reduktase-Aktivität des nach dem hier vorgestellten Reinigungsschema erhaltenen Protein B ist demnach unwahrscheinlich.

Durch gringfügige Modifikationen des Protokolls, beispielsweise die Durchführung des zweiten Anreicherungsschrittes an einem anderen hydrophoben Material, wie es durch (WAGNER, 1997) verwendet wurde, sollte jedoch eine effiziente Anreicherung von aktiven Protein B auch hinsichtlich seiner Glycin-Reduktase-Aktivität möglich sein. Hilfreich ist dabei der relativ einfach durchzuführenden Enzymtest der Peroxidase-Aktivität zur Lokalisierung von Protein B während der einzelnen Reinigungsschritte. Erschwerend stellt sich allerdings die Durchführung der Reinigung unter anaeroben Bedingungen dar, insbesondere bei der Dialyse und beim Einengen von Proteinlösungen. Die anaerobe Verfahrensweise ist im Hinblick auf den damit verbundenen sehr geringen Verlust der

Peroxidase-Aktivität dennoch empfehlenswert und trägt möglicherweise zum Erhalt der Glycin-Reduktase-Aktivität bei.

4.2.2. Der Reaktionsmechanismus der Peroxidase-Aktivität

Neben seiner Aktivität als DTT-abhängige Peroxidase konnte Protein B ebenfalls die Beteiligung an der im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* existierenden NADPH-abhängigen Reduktion von Cumolhydroperoxid zugeordnet werden, die nach der spezifischen Ausfällung von GrdB mit Anti-GrdB-Antikörpern nahezu vollständig verloren ging (s. 3.3.7.). Im Zusammenhang mit den Enzymaktivitäten, die für die rekombinanten Proteine GrdB und GrdBU350C ermittelt werden konnten (s. 3.5.3.), läßt sich die Peroxidase-Aktivität demnach auf die Katalyse durch die 47 kDa große γ -Untereinheit von Protein B zurückführen. Dies steht im Einklang mit der aus der Hemmung der Peroxidase-Aktivität im Rohextrakt durch Iodoacetyl-LC-Biotin resultierenden Annahme, daß ein Seleno-Protein an dieser Reaktion beteiligt ist (vgl. 4.1.). Proteine, die Selen in Form von Selenocystein enthalten, sind im allgemeinen in Oxidations-Reduktions-Prozesse involviert (STADTMAN, 1996). Ein gut untersuchtes Beispiel dafür stellen die Glutathion-Peroxidasen aus Säugern dar, die verschiedene Peroxide in Abhängigkeit von Glutathion oder Thioredoxin reduzieren (URSINI, *et al.*, 1995; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999; TAKEBE, *et al.*, 2002). Glutathion-Peroxidasen existieren in verschiedenen Formen, die sich innerhalb ihrer Primärstruktur, Lokalisation und Substratspezifität unterscheiden (vgl. Einleitung, 4.4.3.). Die Präsenz eines reaktiven und zugänglichen Selenocystein-Restes ist dabei essentiell für die enzymatische Aktivität (URSINI, *et al.*, 1995), welche in dem niedrigen pK_a -Wert (5,2) des Selenocysteins und der hohen Polarisierbarkeit der Selenol-Gruppe begründet ist. Aus diesen Eigenschaften heraus resultiert auch die Fähigkeit anderer Seleno-Proteine, als Peroxidasen zu fungieren. Demnach konnte für das Seleno-Protein P, ein humanes Plasmaprotein, welches bis zu 10 Selenocysteine enthält, sowie die Se-haltige Thioredoxin-Reduktase aus Säugern Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden (SAITO, *et al.*, 1999; BJÖRNSTEDT, *et al.*, 1995; ZHONG & HOLMGREN, 2000b). Zur Nachahmung einer solchen Aktivität durch Proteine, die als Wildtyp keine Peroxidase-Aktivitäten aufweisen, genügt dabei der Einbau eines Selenocystein-Restes in das aktive Zentrum des Enzyms unter der Voraussetzung, daß das Selenol in reaktiver und zugänglicher Form vorliegt und das aktive Zentrum eine Bindung des Substrates gestattet (BOSCHI-MULLER, *et al.*, 1998). Demnach hatte die Einführung eines Selenocystein-Restes in das aktiven Zentrum von Subtilisin (BELL, *et al.*, 1993), eines monoklonalen Antikörpers (DING, *et al.*, 1998), sowie der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus *Bacillus stearothermophilus* (BOSCHI-MULLER, *et al.*, 1998) eine signifikante Peroxidase-Aktivität dieser Proteine zur Folge.

Betrachtet man die dem Selenocystein benachbarte Sequenz von GrdB1, so fällt ein Motiv mit $-U_{xx}C_{xx}C-$ (LÜBBERS & ANDREESEN, 1993; WAGNER, *et al.*, 1999) auf, welches in GrdB-

Proteinen verschiedener Organismen hoch konserviert ist (*E. acidaminophilum*: WAGNER, *et al.*, 1999; *Clostridium litorale*: KREIMER & ANDREESEN, 1995; *C. sticklandii*: GRÄNTZDÖRFFER, 1997), über dessen enzymatische Relevanz jedoch bislang nur spekuliert werden konnte (WAGNER, 1997). Vom Aufbau erinnert dieses Motiv an die redoxaktiven Sequenzen von Protein A mit –CxxU– (KREIMER & ANDREESEN, 1995), bzw. die –CxxC–Motive der Thioredoxine und Thioredoxin-Reduktasen (HOLMGREN & BJÖRNSTEDT, 1995). Bislang fehlten jedoch experimentelle Beweise für eine redoxaktive Funktion der beiden Cysteine (WAGNER, 1997). Enzymatische Untersuchungen der rekombinanten Proteine GrdB, GrdBU350C (REUTER, 2000), sowie der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten GrdB-Varianten GrdBC353A und GrdBC356A hinsichtlich ihrer Peroxidase-Aktivität ergaben erstmals Hinweise auf eine mögliche Funktion dieser Cysteine.

Das rekombinante Wildtyp-Protein GrdB zeigte gegenüber der Mutante GrdBU353C einen Aktivitätsverlust um 40%, der im Vergleich zu dem mit der Cystein-Substitution einhergehenden Aktivitätsverlust von Seleno-Proteinen von bis zu 300fach eher gering war (MAIORINI, *et al.*, 1995; ROCHER, *et al.*, 1992; AXLEY, *et al.*, 1991). Möglich wäre jedoch, daß die am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren so konzipiert sind, daß sie das Cystein durch Erhöhung seiner Nukleophilie aktivieren. Die Mutation des Cysteins an Position 353 zu Alanin hatte eine Verminderung der Peroxidase-Aktivität um 60 % zur Folge, was auf den ersten Blick eine Beteiligung dieses Cysteins an der Peroxidase-Aktivität vermuten ließ. Jedoch ist zu beachten, daß es durch die Einführung der Mutation direkt stromabwärts des für Selenocystein codierenden UGA-Codons zur strukturellen Veränderung der für den Einbau des Selenocysteins essentiellen SECIS-Struktur der zu translatierenden mRNA kam (s. 3.5.4.). Die Mutation des C₃₅₃ führte dabei zum Verlust einer Basenpaarung im unteren Stammbereich der Struktur (s. Abb. 17). Laut GURSINSKY, 2002 ist ein erheblich reduzierter Selenocysteineinbau jedoch erst ab einem Verlust der Basenpaarung von drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden zu beobachten. Durch massenspektroskopische Analysen konnten für GrdB und GrdBC353A Peptide nachgewiesen werden, die mit den entsprechenden theoretisch kalkulierten Massen korrespondierten und das typische Isotopenverteilungsmuster des Selens aufwiesen. Peptide, die anstelle des Selenocysteins ein durch Suppression des UGA-Codons eingebautes Tryptophan (EGGERTSON & SÖLL, 1988; HIRSH & GOLD, 1971) enthielten, konnten in beiden Fällen nicht detektiert werden. Auszuschließen ist jedoch nicht, daß eine Suppression durch eine andere Aminosäure erfolgte. Diese Möglichkeit wird durch den Nachweis eines Cysteins begründet, welches unter Suppressionsbedingungen co-translational in das heterolog in *E. coli* produzierte PrpU, ein vermutlich redoxaktives Seleno-Protein aus *E. acidaminophilum*, eingebaut wurde (GRÖBE, 2001). Dagegen spricht jedoch der Nachweis einer Tryptophan-Suppression in dem rekombinanten Protein A aus *E. acidaminophilum* (D. Gröbe, persönliche Mitteilung). Im Fall von GrdBC353A konnte jedoch auch kein entsprechendes auf die Suppression von Cystein zurückzuführendes Peptid nachgewiesen werden, so daß in diesem Fall unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze von einem nahezu vollständigen Einbau von Selenocystein in das Protein

ausgegangen werden kann. Im Fall des Wildtyp-Proteins GrdB ist hinsichtlich einer Cystein-Suppression keine Aussage möglich, da die Masse eines anderen Peptid-Fragments (Masse m/z $[M+H^+]=2334,48$, s. Anhang A2) mit der kalkulierten Masse des Cystein-haltigen Peptids (Masse m/z $[M+H^+]=2335,11$) korrelierte.

Die Mutation von Cystein₃₅₆ zu Alanin führte zur Veränderung von zwei Basenpaarungen im Bereich des apikalen Loops der SECIS-Struktur, die nach (GURSINSKY, 2002) ebenfalls die Verminderung des Einbaus von Selenocystein zur Folge haben. Für die SECIS-Struktur im *fdhF*-Gen aus *E. coli* konnte gezeigt werden, daß Veränderungen des dritten oder vierten Nukleotids vor dem apikalen Loop zum vollständigen Verlust der Selenocystein-Inkorporation in das Genprodukt führte (LIU, *et al.*, 1998). Entsprechend dieser Aussagen war für GrdBC356A durch Massenspektroskopie kein Selenocystein-haltiges Peptid detektierbar. Es fehlte jedoch das erwartete Tryptophan-haltige Peptid, was in Bezug auf das Vorhandensein einer intakten Polypeptidkette unwahrscheinlich erscheint. Möglich wäre auch hier, daß die Suppression durch Cystein erfolgte, jedoch bestand in diesem Fall das gleiche Problem der Detektion dieser Peptids wie für die andere GrdB-Variante (s. Anhang A4). Eine Quantifizierung des Selenocysteingehaltes ist über die hier angewendete Methode, besonders im Hinblick auf die nur relativ bestimmten Proteinkonzentrationen (s. 3.5.3.) nicht möglich. Da jedoch, wie bereits erwähnt, bei der GrdBC353A-Mutante offenbar von einem vollständigen Selenocystein-Einbau ausgegangen werden kann, läßt der für dieses Protein beobachtete Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf eine Beteiligung des Cysteins an Position 353 an der Peroxidase-Aktivität schließen. Eine Aussage in Bezug auf Cystein an Position 356 kann unter den gegebenen Umständen nicht gemacht werden.

Die von WAGNER, 1997 vorgeschlagenen Funktionen der beiden Cysteine beziehen einen redoxvermittelten Aktivierungs/Inaktivierungs-Prozeß des Selenocysteins ein (s.

Abb. 37). In Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann eine mögliche Schutzfunktion der Cysteine vor oxidativer Inaktivierung des Selenocysteins postuliert werden. Selenocysteine sind im allgemeinen sehr sauerstoffempfindlich und oxidieren schnell irreversibel zur selenigen-Säure. Die Ausbildung dieser Verbindung führt dabei zum Verlust der enzymatischen Aktivität dieser Proteine. Die in vorangegangenen Arbeiten beobachtete Sauerstoffempfindlichkeit der NADPH-abhängigen Peroxidreduktion im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* unter aeroben Bedingungen, in Abwesenheit von DTT (PARTHER, 1998), sowie der relativ schnelle Aktivitätsverlust der Glycin-Reduktase-Aktivität von Protein B (WAGNER, 1997) sprechen für eine oxidative Inaktivierung dieses Proteins.

Abb 37 zeigt einen möglichen Reaktionsmechanismus von GrdB in Anlehnung an den für Säuger-Thioredoxin-Reduktase und Glutathion-Peroxidase formulierten Reaktionsverlauf der Peroxidreduktion (ZHONG, *et al.*, 2000a; EPP, *et al.*, 1983). Zu Beginn des Reaktionszyklus liegen das Selenocystein sowie die beiden benachbarten Cysteine im reduzierten Zustand vor (Dabei ist zu

beachten, daß die Angaben für die Beteiligung von C₃₅₆ rein spekulativ sind). Anschließend erfolgt die Oxidation der Selenol-Gruppe zur selenigen Säure durch das Peroxid. Nach Wasserabspaltung entsteht möglicherweise ein gemischtes Selenyl-Sulfid und nachfolgend eine Disulfidbrücke zwischen C₃₅₃ und C₃₅₆, die durch DTT reduziert wird.

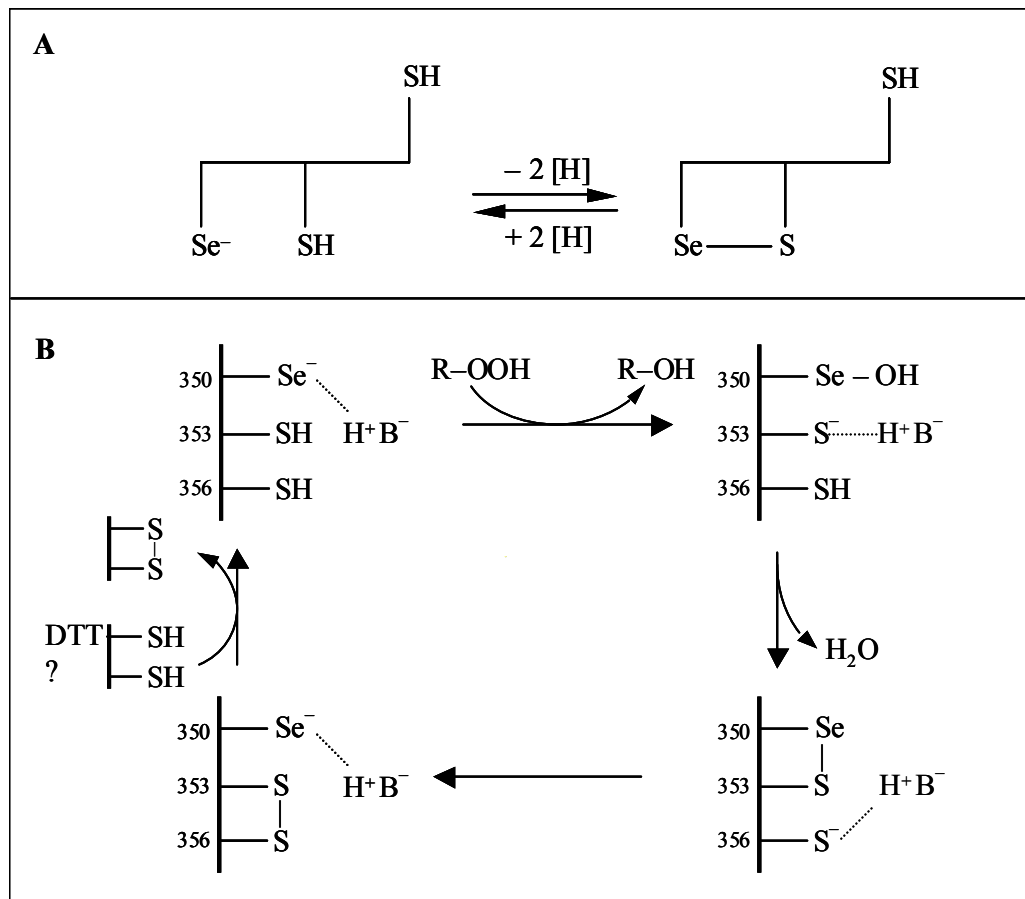


Abb. 37: Vereinfachter postulierter Reaktionsmechanismus der DTT-abhängigen Peroxidase-Aktivität von GrdB

A: Der von WAGNER, 1997 vorgeschlagene redoxaktive Aktivierungs/Inaktivierungs-Prozeß des Selenocysteins durch die benachbarten Cysteine.

B: Postulierter Reaktionsmechanismus der Peroxidreduktion durch GrdB und Involvierung der Cysteine in den Schutz des Selenocysteins vor oxidativer Inaktivierung. B⁻: Base.

Die Frage nach der Art des nativen Elektronendonors konnte bislang nicht geklärt werden. Im Hinblick auf den hier formulierten möglichen Reaktionsmechanismus ließe das Vorliegen einer Disulfid-Brücke die Beteiligung einer Komponente vermuten, die ein redoxaktives Motiv (–CxxC–) ähnlich dem der Thioredoxine und Thioredoxin-Reduktasen (HOLMGREN & BJÖRNSTEDT, 1995) enthält. Die aus *E. acidaminophilum* bekannten Proteine, die ein solches Motiv aufweisen, sind die substratspezifischen Proteine B der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase (–UxxCxxC–) (LÜBBERS & ANDREESEN, 1993; WAGNER, *et al.*, 1999; SONNTAG, 1998), Protein A (–CxxU–) (KREIMER & ANDREESEN, 1995), Thioredoxin (–CxxC–), Thioredoxin-Reduktase (–CxxC–) (LÜBBERS, 1993) und PrpU (–CxxU–) (LECHEL, 1999). Unter Einbeziehung der vier letztgenannten Proteine in unterschiedlichen Kombinationen konnte jedoch die NADPH-abhängige Peroxidreduktion von Protein B nicht komplementiert werden. Untersuchungen mit verschiedenen

Thiol-haltigen niedermolekularen Elektronendonatoren deuteten auf einen Di-Thiol-Charakter des natürlichen Elektronendonors hin, da für DTT und DTE im Vergleich die höchsten Enzymaktivitäten erhalten wurden. Dabei scheint die Stereochemie des Moleküls eine Rolle zu spielen, da mit DTE, der *meso*-Form des DTT, im Gegensatz zu diesem eine deutlich geringere Aktivität verzeichnet wurde. Bei dem nativen Elektronendorer könnte es sich demnach um ein bislang unbekanntes redoxaktives Protein handeln, möglich wäre jedoch auch ein niedermolekulares redoxaktives Bio-Thiol, vergleichbar mit Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin), Trypanothion ($T(SH)_2$, N^1 , N^8 -bis(glutathionyl)spermidin) (FAIRLAMB, 1985) oder Mycothiol (1D-myo-inositol 2-(N-acetylcysteinyl)amido-2 deoxy- α -D-gluco-pyranosid) (NEWTON, *et al.*, 1996; NEWTON & FAHEY, 2002). Für das Vorkommen von besonderen Bio-Thiolen in *E. acidaminophilum* liegen bereits Hinweise vor, über die Art und die Struktur dieser putativen Verbindungen ist jedoch bislang noch nichts bekannt (D. GRÖBE, persönliche Mitteilung).

Anhand des postulierten Reaktionsmechanismus könnte auch der relativ geringe Aktivitätsverlust von GrdBC353A (-UxxAxxC-) im Vergleich zum Wildtyp-Protein erklärt werden. So könnte unter Einbeziehung einer weiteren, als Protonendonator fungierenden Aminosäure die Wasserabspaltung zu der Ausbildung einer Se_{350} - S_{356} -Brücke führen, die direkt von dem externen Elektronendorer reduziert wird. Überraschend war, daß für GrdBC356A ebenfalls eine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, die mit der für GrdBC353A erhaltenen vergleichbar war. Im Hinblick auf das fehlende Selenocystein und die Mutation des zweiten Cysteins zu Alanin wäre ein vollständiger Aktivitätsverlust dieses Proteins zu erwarten gewesen. Erklärbar wäre dieser Aspekt allerdings durch die vermutete, jedoch noch nicht bewiesene Suppression des UGA-Codons durch ein Cystein. Demnach würde das Sequenzmotiv -CxxCxxA- lauten, wobei eine, GrdBC353A entsprechende Reaktion erfolgen könnte.

4.2.3. Charakterisierung der Peroxidase-Aktivität von Protein B

Protein B besitzt eine geringfügig höhere Spezifität gegenüber den organischen Peroxiden *t*-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid, was sich in dem 3fach höheren K_m -Wert für H_2O_2 äußert. Der entsprechende K_m -Wert für Säuger-Thioredoxin-Reduktase (ZHONG & HOLMGREN, 2000b) beläuft sich mit 2,5 mM dabei auf etwa das 10fache des für Protein B erhaltenen, was auf eine effiziente Funktion von Protein B als Peroxidase deutet. Dafür sprechen auch die mit Cystein-haltigen Peroxiredoxinen vergleichbaren spezifischen Enzymaktivitäten dieses Proteins. Diese sind jedoch erheblich niedriger als die der Selen-haltigen Glutathion-Peroxidasen (Gpx 4: MAIORINI, *et al.*, 1995). Bei den biochemischen Vergleichen von Protein B mit anderen Enzymen ist zu beachten, daß die hier erhaltene Daten im Gegensatz zu den anderen Proteinen stets unter Anwendung eines artifiziellen Elektronendonors ermittelt wurden und damit nicht die Verhältnisse unter nativen Bedingungen widerspiegeln. Der Umsatz von H_2O_2 durch Protein B erklärt ebenfalls die Fähigkeit

dieses Proteins, die Glutamin-Synthetase vor der DTT/Fe³⁺/O₂-vermittelten Inaktivierung zu schützen (vgl. 4.1.). Im Gegensatz zu den oben genannten Peroxiden war Protein B nicht in der Lage, Linolsäurehydroperoxid umzusetzen, was möglicherweise mit der Größe des Substrates und der damit verbundenen Unzugänglichkeit für das aktive Zentrum zusammenhängt. Auch eine Peroxinitrit-Reduktase-Aktivität konnte für Protein B nicht nachgewiesen werden. Peroxinitrit gehört zu den reaktivsten chemischen Verbindungen (KOPPENOL, *et al.*, 1992; HUGHES, 1999) und führt zur Oxidation bzw. Nitrierung von biologischen Makromolekülen (LIPTON, *et al.*, 1993). Eine Umsetzung von Peroxinitrit durch Protein B wäre im Hinblick auf die Substratgröße theoretisch möglich. Vermutlich wird jedoch das Protein durch diese hochreaktive Spezies inaktiviert. Der optimale pH-Wert für die Peroxidase-Aktivität von Protein B wurde bei ca. 8,0 bestimmt und ist somit vergleichbar mit dem für Glutathion-Peroxidase (Gpx 4: MAIORINI, *et al.*, 1995) und für das Seleno-Peroxiredoxins aus *E. acidaminophilum* (s. 3.7.2.5.1.). Er wich jedoch geringfügig von dem für die DTT-abhängige Glycin-Reduktase erhaltenen pH-Optimum von 7,0 (MEYER, 1993) ab. Im Gegensatz dazu wich das Temperaturoptimum von 35°C für die Peroxidase-Aktivität von der für die Glycin-Reduktase-Aktivität von Protein B ermittelten 40°C (MEYER, 1993) ab, korrelierte jedoch mit der optimalen Wachstumstemperatur von *E. acidaminophilum* von 34°C (ZINDEL, *et al.*, 1988). Die anhand der Temperaturkurve berechnete Aktivierungsenergie von ca. 200 kJ/mol lag dabei um das 5fache höher als die des Seleno-Peroxiredoxins.

4.3. Die Funktion von GrdE

Wie bereits erwähnt, wird das substratspezifische Protein B_{Glycin} der Glycin-Reduktase aus der 47 kDa Untereinheit GrdB und den aus dem Proprotein GrdE hervorgehenden 25 und 22 kDa Untereinheiten gebildet. Gleiches gilt für das Sarkosin-spezifische Protein B_{Sarkosin}, welches sich aus GrdF und dem prozessierten GrdE-analogen Protein GrdG zusammensetzt. Ein den Proteinen GrdB und GrdF entsprechendes Protein existiert auch als Untereinheit des Proteins B_{Betain} (GrdH). Das ebenfalls vorhandene GrdE und GrdG-Homologe (GrdI) liegt in diesem Fall jedoch ungespalten vor (MEYER, 1993; WAGNER, 1997). Die Proteine GrdB, GrdF und GrdH verfügen über eine Carbonylgruppe, an der im Fall von GrdB und GrdF die Substratbindung über eine Schiff'sche Base postuliert wird (MEYER, 1993; WAGNER, 1997). Für die aus der Spaltung hervorgegangenen 22 kDa Untereinheiten von GrdE und GrdG konnte eine N-terminal lokalisierte Carbonylgruppe (postuliert wurde eine durch cysteinolytische Spaltung des Proproteins gebildete Pyruvyl-Gruppe) nachgewiesen werden, die offensichtlich nicht an der Bindung des jeweiligen Substrates beteiligt ist (WAGNER, 1997). Im Fall der Betain-spezifischen Untereinheit GrdI konnte keine Spaltung und somit keine Carbonyl-Funktion nachgewiesen werden. Hinsichtlich dieser hier aufgeführten Aspekte stellt sich die Frage nach der Funktion der Proproteine GrdE und GrdG sowie des Proteins GrdI.

Durch (REUTER, 2000) wurde bereits beschrieben, daß die rekombinanten Strep-*tagII*-Fusionen der 47 kDa Untereinheit GrdB (GrdBU350C) über Affinitätschromatographie an Streptactin-Sepharose nicht homogen erhalten werden konnten. Demnach waren stets unabhängig von der Position, an welcher der Strep-*tagII* fusioniert war, zwei weitere Proteine vorhanden, die sich jedoch kaum in ihrem Molekulargewicht unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses auch für die Selenocystein-haltigen rekombinanten N-terminal fusionierten Proteine GrdB (Wildtyp) und GrdBC353A, sowie für das Protein GrdBC356A (enthielt kein Selenocystein) beobachtet. Im SDS-Gel konnte jedoch im Gegensatz zu REUTER, 2000 nur eine zusätzliche Bande bei 22 kDa detektiert werden. Dieses galt ebenfalls für das C-terminal fusionierte GrdBU350C, die Größe des Fragmentes betrug hier ca. 30 kDa. Zur Bestätigung der bereits ermittelten Spaltstelle (REUTER, 2000) wurden von dem 30 kDa GrdBU350C-Fragment der C-terminalen Strep-*tagII*-Fusion die ersten 5 Aminosäuren der N-Termini bestimmt. Dabei konnten zwei Signale detektiert werden, die auf Protein-Fragmente mit einem berechneten Molekulargewicht von 28,2 und 27,4 kDa zurückzuführen waren. Demnach kann auch hier vom Vorliegen zweier Spaltprodukte ausgegangen werden, die sich hinsichtlich ihrer molekularen Masse nur geringfügig unterschieden, was im Einklang mit der von (REUTER, 2000) gemachten Beobachtung stand. Die Sequenz der N-Termini wich jedoch von den durch (REUTER, 2000) ermittelten geringfügig ab (s. Tab. 14). Mögliche Ursachen für die Entstehung dieser GrdB-Fragmente sind bereits durch (REUTER, 2000) ausführlich diskutiert worden. Nach (REUTER, 2000) könnte demzufolge die Entstehung des 28 kDa-Fragmentes auf das Vorhandensein eines internen Translationsstartes zurückzuführen sein. Eine weitere Möglichkeit zur Bildung der 28 und 29 kDa-Fragmente besteht in der Spaltung von GrdB durch eine Endoprotease. Eine autokatalytische Fragmentierung des Proteins wird von (REUTER, 2000) jedoch ausgeschlossen. Die in dieser Arbeit ermittelten Fragmente von 27 und 28 kDa können nicht von dem Vorhandensein eines internen Translationsstartes abgeleitet werden, da keine für diesen Vorgang notwendigen Strukturen der DNA-Sequenz (Startcodon, bzw. Ribosomenbindestelle) vorhanden waren. Vielmehr würde eine spezifische proteolytischen Spaltung von GrdBU350C durch Endoproteasen, wie es durch (REUTER, 2000) bereits postuliert wurde, in Frage kommen. Für diese Theorie sprechen die unterschiedlichen N-Termini der erhaltenen Spaltprodukte. Der in dieser Arbeit als Expressionsstamm verwendete *E. coli* XL1-Blue-MRF' weist andere Endoproteasen auf, als der von REUTER, 2000 genutzten *E. coli* BL21 (Produktinformation der Fa. Stratagene, Heidelberg), wodurch eine abweichende Spezifität der Protein-Spaltung möglich wäre.

Im Zusammenhang mit der Anreicherung von Protein B_{Glycin} wurden zwei Proteine der Größen 30 und 36 kDa beobachtet, deren N-terminale Aminosäuresequenzen zum N-Terminus der 47 kDa-Untereinheit von Protein B korrespondierten und auf dessen Spaltung zurückgeführt wurden (WAGNER, 1997). Proteine dieser Größe traten auch bei der Reinigung der rekombinanten GrdB-Varianten auf (s. 3.5.2.). Da GrdB in diesem Fall N-terminal mit dem Strep-*tagII* fusioniert war, könnten diese Fragmente den von WAGNER, 1997 beobachteten Spaltprodukten entsprechen. Laut

WAGNER, 1997 existierte weiterhin ein mit ^{75}Se -markiertes 30 kDa Protein, welches sich aufgrund des Selenocysteins an Position 350 nicht vom N-Terminus der 47 kDa Untereinheit ableiten ließ. Nach (REUTER, 2000) könnte dieses Fragment einem der rekombinanten GrdB-Fragmente mit C-terminalen Strep-tagII entsprechen.

Der Gehalt der Spaltprodukte, die bei der Anreicherung von Protein B_{Glycin} beobachtet wurden, war im Vergleich zu dem 22 kDa-Fragment der rekombinanten GrdB-Varianten gering, so daß eine stabilisierende und schützende Funktion des prozessierten GrdE-Proteins vermutet wurde. Um einen entsprechenden Einfluß nachzuweisen, wurde das Gen *grdE* sowie die Gen-Fragmente *grdE25* und *grdE22*, die für die entsprechenden Prozessierungsprodukte codierten, jeweils als Transkriptionseinheit mit *grdB* (Translationsprodukt: GrdBU350C) kloniert und simultan exprimiert. Nach 3stündiger Expression konnten im Rohextrakt jeweils zusätzliche Proteine der Größe 46 kDa (*grdE*), 25 kDa (*grdE25*) und 22 kDa (*grdE22*) detektiert werden, die in etwa den jeweiligen Größen der GrdE-Varianten entsprachen. Nach Reinigung der Translationsprodukte an Streptactin-Sepharose (s. 3.6.), konnte in allen drei Fällen eine Hauptbande bei 47 kDa, die zu dem intakten GrdBU350C korrespondierte, erhalten werden. Die Probe bei der Gesamt-*grdE* simultan mit *grdB* exprimiert wurden, enthielt zusätzlich ein Protein der Größe 46 kDa, welches dem unprozessierten GrdE entsprach. Neben zum Teil erheblichen Verunreinigungen konnten jedoch in keiner der drei untersuchten Proben zusätzliche Proteinbanden detektiert werden, die auf eine definierte Spaltung von GrdBU350C zurückzuführen waren. Diese Beobachtung bestätigte die Vermutung einer stabilisierenden Funktion von GrdE. Der Schutz vor der Spaltung des GrdBU350C-Proteins schien dabei in erster Linie auf einer nicht-kovalenten Bindung von GrdE an GrdB zu beruhen, die vermutlich die Zugänglichkeit einer Endoprotease verhinderte. Die Affinität dieser Bindung schien dabei für Gesamt-GrdE, sowie für das nativ prozessierte GrdE höher zu sein, als für die Fragmente GrdE25 und GrdE22, da diese Proteine nicht zusammen mit GrdBU350C an Streptactin-Sepahrose co-eluierten. Für GrdE wäre daher in diesem Zusammenhang eine Chaperon-ähnliche Aktivität denkbar.

Chaperone verhindern in erster Linie die Bildung von unlöslichen intra- und intermolekularen Proteinaggregaten, indem sie ungefaltetes bzw. partiell gefaltetes Protein stabilisieren. Gut untersuchte Beispiele für bakterielle cytoplasmatische Chaperone sind das GroEL/S-System, das DnaK/JGrpE-System, Hsp90 und Hsp33 (JAKOB, *et al.*, 1999) aus *E. coli*. Weitere Beispiele sind die prokaryotischen periplasmatisch lokalisierten Dsb-Proteine (*disulphide bond*), die in die korrekte Ausbildung der Disulfid-Bindungen in Proteinen involviert sind (BARDWELL, *et al.*, 1991; KAMITANI, *et al.*, 1992). Das zu dieser Familie gehörende DsbA besitzt korrespondierend zu einer Vielzahl von Oxidoreduktasen zwei aktive Cystein-Reste im katalytischen Zentrum (RAINA & MISSIAKAS, 1997), die im oxidierten Zustand schnell mit dem zu faltenden Protein unter Ausbildung einer korrekten Disulfid-Bindung reagieren (COLLET, 2002). Neben diesem existieren weitere Dsb-Proteine (DsbC und DsbG), die die Disulfid-Isomerisation in Proteinen, die multiplen S-S-Bindungen

ausbilden, katalysieren (ZAPUN, *et al.*, 1993; BADER, *et al.*, 2000; BESSETTE, *et al.*, 1999; SHAO, *et al.*, 2000). Die Aminosäure-Sequenzen der Proteine GrdE, GrdG und GrdI aus *E. acidaminophilum* (SONNTAG, 1998) weisen keine Ähnlichkeiten zu molekularen Chaperonen auf, so daß eine Funktion der GrdE-homologen Proteine hinsichtlich einer 'klassischen' Chaperon-Aktivität ausgeschlossen werden kann. Gegen eine allgemeine Funktion als Chaperon spricht auch in diesem Zusammenhang, daß das gereinigte intakte GrdBU350C keine enzymatische Aktivität als Peroxidase aufwies (s. 3.6.2.). Ebenso konnten diese Proteine nicht mit 2-¹⁴C-Glycin (s. 3.6.3.) markiert werden, was auf das Fehlen einer aktiven Carbonylgruppe zurückzuführen war. Diese Verbindung scheint sehr empfindlich zu sein, da die Bindung von 2-¹⁴C-Glycin an GrdB nur im Rohextrakt und nach dem ersten Anreicherungsschritt von Protein B an Q-Sepharose beobachtet werden konnte (J. Jäger, persönliche Mitteilung). Daher ist eine Inaktivierung einer möglicherweise vorhandenen Carbonylgruppe in rekombinanten GrdB-Proteinen nicht auszuschließen. Möglich wäre jedoch auch, daß ein Zusammenhang zwischen der aktiven Carbonylgruppe der 22 kDa Untereinheit des nativ prozessierten GrdE und der Ausbildung einer entsprechenden Struktur in der 47 kDa Untereinheit GrdB besteht.

Aus der Deblockierungsreaktion mit oPDA, sowie aus der positiven Reaktion mit Fluorescein-Thiosemicarbazid (FTSC) ergab sich ein Hinweis auf das Vorliegen einer reaktiven Carbonylgruppe am N-Terminus der 22 kDa Untereinheit von Protein B_{Glycin} und Protein B_{Sarkosin} (WAGNER, 1997). Auf Grund der hohen Reaktivität wurde ein Pyruvylgruppe postuliert (WAGNER, 1997), die durch Cysteinolyse in Anlehnung an die Entstehung von N-terminalen Pyruvylgruppen in Decarboxylasen (Serinolyse) (van POELJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998), gebildet werden könnte (SONNTAG, 1998; WAGNER, 1997). Die Aminosäure-Sequenz der putativen Spaltstelle ist in den Proproteinen GrdE und GrdG aus *E. acidaminophilum* (SONNTAG, 1998) sowie dem GrdE aus *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER, 1997) mit dem Motiv –SGNCV– hoch konserviert. Für die Sulfhydrylgruppe des gezeigten Cysteins wird dabei ein nukleophiler Angriff am C-Atom einer Carbonylgruppe der Peptidbindung unter Bildung eines Thioesters postuliert. Die β -Eliminierung des Thioesters würde dabei zur Entstehung eines Dehydroalanins führen, das zur Pyruvylgruppe hydrolysieren kann (SONNTAG, 1998). Der Nachweis einer entsprechenden autokatalytischen Spaltung gelang für rekombinantes His-tag fusioniertes GrdE aus *E. acidaminophilum* auch unter Zusatz von katalytischen Mengen an Rohextrakt nicht (SONNTAG, 1998). Eine erfolgreiche Prozessierung von rekombinanten GrdE aus *C. sticklandii* erfolgte nur unter unphysiologischen Bedingungen unter Einsatz von 200 mM NaBH₄. Außerdem konnte für dieses Protein gezeigt werden, daß die Spaltung N-terminal eines Cysteins erfolgt, was die Theorie einer Prozessierung durch Cysteinolyse unterstützte (BEDNARSKI, *et al.*, 2001).

Über die Entstehung einer Carbonylgruppen im der 47 kDa Untereinheit GrdB wurden bereits verschiedene Theorien diskutiert. Demnach wurde von REUTER, 2000 die Bildung einer Carbonylgruppe durch posttranslationale Modifikation eines Peptidylarginins vorgeschlagen. Ein

dafür in Frage kommender Aminosäure-Rest stellt ein in GrdB-homologen Proteinen konserviertes Arginin an Position 355 dar, dessen Modifikation hinsichtlich seiner Nähe zum katalytisch aktiven Selenocystein an Position 350 sinnvoll erscheint (s. Abb. 38). Von REUTER, 2000 wurde das Vorhandensein einer Peptidylarginin-Deiminase (PAD) in *E. acidaminophilum* postuliert, die die Umwandlung von Arginin zu Citrullin katalysiert. Beispiele für bakterielle PAD's sind jedoch bislang nicht bekannt.

GrdB1_Ea	GVDAVILTSTUGTCTRCGASM	360
GrdF_Ea	GVGAVILTSTUGTCTRCGATM	360
GrdH_Ea	GVDGVIMTSTUGTCTRCGATM	359
GrdB_Cl	GVDAVILTSTUGTCTRCGATM	360
GrdB_Cs	KVDAVILTSTUGTCTRCGATM	360
	* ** ***** *	

Abb. 38: Sequenzvergleich verschiedener GrdB-homologer Proteine (Ausschnitt)

GrdB1_Ea: 47 kDa-Untereinheit von Protein B_{Glycin} aus *E. acidaminophilum* (SONNTAG, 1998); GrdF_Ea: 47 kDa-Untereinheit von Protein B_{Sarkosin} aus *E. acidaminophilum* (SONNTAG, 1998), GrdH_Ea 45 kDa-Untereinheit von Protein B_{Betain} aus *E. acidaminophilum* (SONNTAG, 1998); GrdB_Cl bzw. GrdB_Cs: 47 kDa-Untereinheit von Protein B_{Glycin} aus *C. litorale* (KREIMER & ANDREESEN, 1995) bzw. *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER, 1997). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Aminosäuren U₃₅₀, C₃₅₃ und C₃₅₆ des -UxxCxxC-Motives sind fett hervorgehoben. Ein für eine Modifizierung postulierter Argininrest ist rot gekennzeichnet.

Im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus von Pyruvyl-haltigen Enzymen wäre eine Beteiligung der 22 kDa Untereinheit an einer entsprechenden Deiminierungsreaktion möglich. Bei Pyruvyl-haltigen Enzymen handelt es sich meist um Decarboxylasen, z. B. für Histidin, S-Adenosylmethionin, Phosphatidylserin, Aspartat und Arginin (van POELJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998; GRAHAM, *et al.*, 2002). Der Decarboxylierungsprozeß umfaßt vier Schritte: Bildung einer Schiff'schen Base durch den nukleophilen Angriff der Carbonylgruppe auf eine Aminogruppe; Abspaltung von CO₂; Abspaltung eines Protons und Hydrolyse der Schiff'schen Base. Die Reprotonierung des α -Kohlenstoffs des Co-Faktors führt dabei zur Decarboxylierungs-abhängigen Transaminierung (HACKERT & PEGG, 1998). In Anlehnung an diesen Mechanismus kann eine theoretische Katalyse der Arginin-Deiminierung durch die 22 kDa Untereinheit formuliert werden. Durch die N-terminale Pyruvylgruppe des prozessierten GrdE-Proteins könnte ein nukleophiler Angriff auf die Aminogruppe des Arginins unter Ausbildung einer Schiff'schen Base erfolgen. Eine Protonierung des α -Kohlenstoffs der Carbonylgruppe der 22 kDa Untereinheit könnte anschließend die Transaminierung des Arginins bewirken (s. Abb. 39).

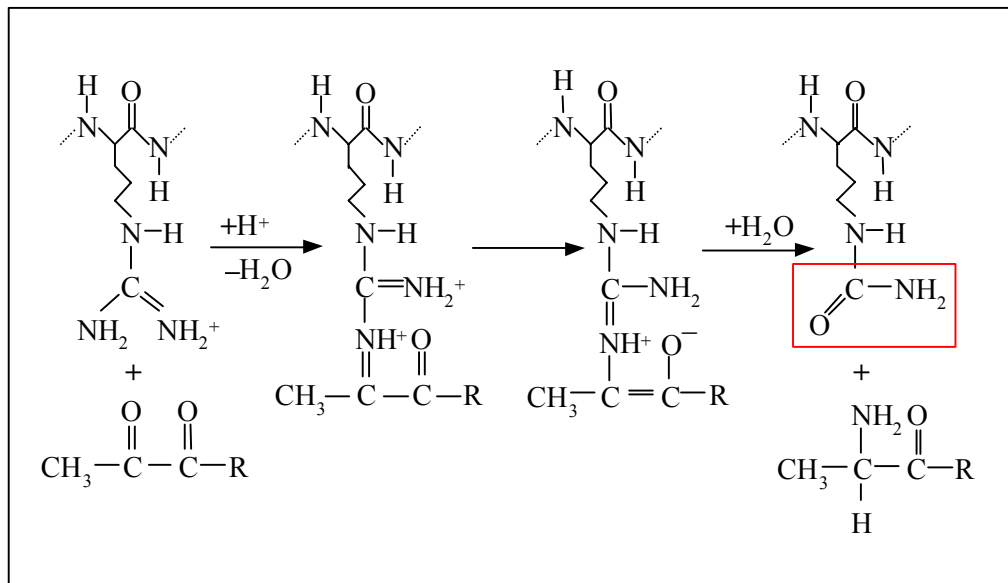


Abb. 39: Mögliche Entstehung einer Carbonylgruppe in GrdB durch die Deiminierung eines Argininrestes durch die Katalyse einer Carbonylgruppe der 22 kDa Untereinheit von Protein B
Die durch die Katalyse entstandene Ureido-Gruppe ist rot eingerahmt.

Eine weitere von REUTER, 2000 angedachte Theorie erlaubt die autokatalytische Imidazolion-Bildung, die in Anlehnung an SCHWEDE, *et al.*, 199 mit der Zyklisierung, Kondensierung und Dehydratisierung einer Tripeptidsequenz innerhalb eines Proteins erfolgt. Dabei werden die autokatalytisch ablaufenden Reaktionsschritte durch das N-Atom eines reaktiven Glycins eingeleitet, welches sich im C-terminalen Teil des Tripeptids befindet. Der Angriff erfolgt auf das Carbonyl-C-Atom der Peptidbindung, welches sich von der Aminosäure im N-terminalen Bereich des Tripeptids ableitet. Entsprechende Mechanismen sind beispielsweise für die Histidin-Ammonium Lyase aus *Pseudomonas putida* (SCHWEDE, *et al.*, 1999), sowie für die Ausbildung der fluorophoren Gruppe des grün fluoreszierenden Proteins (CODY, *et al.*, 1993; MARTYNOV, *et al.*, 2001) beschrieben worden. Für eine mögliche Zyklisierung innerhalb von GrdB würde das, in direkter Nachbarschaft des Selenocystein lokalisierte, hochkonservierte Tripeptid $-T_{347}S_{348}T_{349}-$ in Frage kommen (s. Abb. 38). An der Carbonylgruppe des daraus entstandenen 4-Hydroxyethyl-imidazol-5-on wäre die Bindung von Glycin bzw. Sarkosin unter Ausbildung einer Schiff'schen Base möglich (s. Abb. 40). Die Übertragung des Carboxymethylrestes könnten anschließend auf das direkt benachbarte Selenocystein erfolgen.

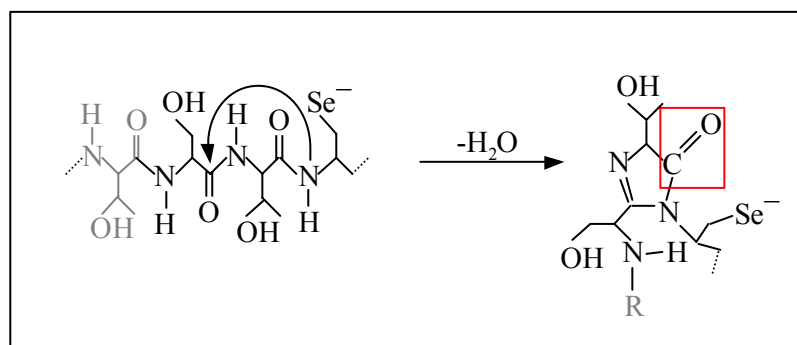


Abb. 40: Mögliche autokatalytische Bildung einer Carbonylgruppe als Bestandteil eines Imidazolons in GrdB.

Die gebildete Carbonylgruppe ist rot eingerahmt. R entspricht dem links mit grau gekennzeichneten Rest.

Für einen rein autokatalytischen Mechanismus spricht das Vorliegen einer Carbonylgruppe in dem Betain-spezifischen GrdH, da das entsprechende GrdE-Homologe GrdI unprozessiert vorliegt und durch FTSC nicht markiert werden konnte (WAGNER, 1997). Es bleibt jedoch fraglich, warum GrdH eventuell eine Carbonylgruppe besitzt, da die Hemmversuche mit Hydroxylamin (MEYER, 1993) die Beteiligung einer solchen Gruppe an der Betain-Reduktion, im Unterschied zu Protein B_{Glycin} und Protein B_{Sarkosin}, ausschließen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, daß die putative Carbonylgruppe in GrdH nicht mit der für die Substratbindung essentielle Verbindung in GrdB und GrdF identisch ist. Der hier postulierte autokatalytische Mechanismus zur Ausbildung einer Substratbindenden Carbonylgruppe wäre jedoch für alle drei Proteine gleich, da der dafür vorgeschlagenen Sequenzbereich in GrdB, GrdF und GrdH hochkonserviert ist. Denkbar wäre jedoch ein aktivierender Einfluß von prozessiertem GrdE bzw. GrdG auf die autokatalytische Bildung der Carbonylgruppe. Im Gegensatz dazu könnte unprozessiertes GrdI einen entsprechenden Mechanismus in GrdH verhindern.

Ein weiteres Beispiel einer katalytisch aktiven Carbonylverbindung in Proteinen stellt das α -Formylglycin dar. Eine solche Struktur konnte bislang nur in Arylsulfatasen nachgewiesen werden, die die Hydrolyse von Kohlenwasserstoffen und nicht-aromatischen Sulfateestern katalysieren (SELMER, 2002). Ein in diesen Proteinen konserviertes Motiv mit $-C/SxPxRxxxx(T)G-$ umfaßt einen Cystein /bzw. Serin-Rest, der posttranslational zu einem α -Formylglycin-Rest umgewandelt wird (SCMIDT, *et al.*, 1995; SELMER, 2002). Über die Bildung dieser Gruppe aus Cystein ist bislang nur wenig bekannt. Diskutiert wird zum einen die direkte Oxidation der Thiolgruppe zum Thioaldehyd (in wäßriger Lösung Thioaldehydhydrat). Die spontane Freisetzung von H_2S würde anschließend zur Bildung von α -Formylglycin führen. Zum anderen wäre eine Spaltung des Cysteins durch eine spezifische Oxidase/Hydrolase denkbar (SELMER, 2002). Für die Bildung des α -Formylglycin aus Serin ist ein zusätzliches Protein (AtsB) notwendig, welches zu der Superfamilie der S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Radikal-generierenden Proteine gehört (SOFIA, *et al.*, 2001). AtsB oxidiert das Serin unter Bildung eines Oxyradikals, die anschließende Abstrahierung eines H-Atoms könnte zum α -Formylglycin führen (SELMER, 2002).

In dem, das Selenocystein umfassende, hochkonservierte Sequenzmotiv der GrdB-homologen Proteine finden sich ein Serin-Rest (Position 348 bzw. 347, s. Abb. 38), sowie zwei Cystein-Reste (Position 353 und 356), die für eine Umwandlung in einen α -Formylglycin-Rest prinzipiell in Frage kommen könnten (s. Abb. 38,). Im Hinblick auf die Cysteine wurde bereits im vorangegangenen Kapitel eine Schutzfunktion im Zusammenhang mit der oxidativen Inaktivierung des Selenocysteins diskutiert (vgl. 4.2.2). Die Umwandlung des Serin-Restes würde wie bei Arylsulfatsen vermutlich eine weitere Proteinkomponente erforderlich machen und könnte daher spezifisch nur bei GrdB und GrdF erfolgen. Eine Beteiligung der prozessierten GrdE-Fragmente an einer solchen Modifikation ist jedoch unwahrscheinlich, da keinerlei Ähnlichkeit dieses Proteins zu dem bereits erwähnten AtsB-Proteinen besteht. Das Fehlen eines unbekanntem für eine Prozessierung notwendigen Faktors könnte jedoch die Ergebnisse hinsichtlich der $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin-Markierung von GrdB erklären. Diese erfolgte nur im Rohextrakt und nicht an den mit GrdE bzw. GrdE-Fragmenten simultan überexprimiertem Protein.

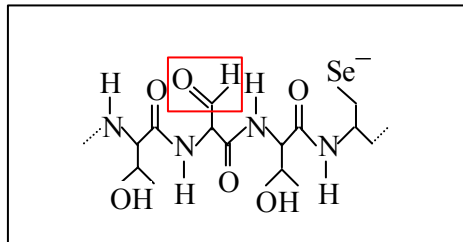


Abb. 41: Putatives α -Formylglycins an Position 348 bzw. 347 der GrdB-homologen Proteine
Die Carbonylgruppe ist rot eingerahmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß GrdE einen stabilisierenden und schützenden Einfluß auf GrdB ausübt. Die Ausbildung katalytisch inaktiver GrdE-Varianten (keine Carbonylgruppe) ist dabei möglicherweise für den Verlust der Peroxidase-Aktivität von GrdBU350C (simultane Überexpression von GrdBU350C und GrdE-Varianten, s. 3.6.2.) verantwortlich. Möglicherweise kommt es durch die Bindung von inaktivem GrdE zur inkorrekten Faltung der GrdBU350C-Polypeptidkette und damit zur verminderten Zugänglichkeit des katalytischen Cysteins. Im Hinblick auf das native Protein B kann dieses jedoch als einen ersten Hinweis auf eine Chaperon-Aktivität des nativ prozessierten GrdE-Proteins gedeutet werden, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Ausbildung einer für die Substratbindung essentiellen Carbonylverbindung steht. Beweise liegen jedoch für diese Theorie bislang nicht vor. Erste Schritte zur Klärung dieses Aspektes würden dabei im Nachweis von Carbonylgruppen in den rekombinanten GrdB-Proteinen mit FTSC liegen. Als Negativ-Kontrolle würde sich die FTSC-Markierung mit Hydroxylamin behandeltem Protein anbieten.

4.4. Das Selen-Peroxiredoxin

4.4.1. Charakterisierung des *prxU*-Genproduktes

Aus *E. acidaminophilum* konnte das Gen eines Peroxiredoxins kloniert werden, dessen abgeleitete N-terminale Aminosäuresequenz (M₁VSVGKKAPDFEMAGFYKGE₂₀) mit der von WAGNER, 1999 ermittelten N-terminalen Sequenz eines 22 kDa Selen-Proteins identisch war (PARTHER, 1998). Die Charakterisierung des *prxU*-Genproduktes in der vorangegangenen Diplomarbeit erlaubte die Einordnung dieses Proteins in die Familie der Peroxiredoxine (PARTHER, 1998). Da zum damaligen Zeitpunkt die klonierte Genregion nur einzelsträngig sequenziert wurde, soll nun mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit korrigierten Sequenzdaten eine erneute Charakterisierung des *prxU*-Genproduktes erfolgen.

Peroxiredoxine wurden in allen Organismengruppen identifiziert und stellen eine phylogenetisch alte Gruppe von Enzymen mit katalytischer Funktion innerhalb der Entgiftung von toxischen Peroxiden dar (CHAE, *et al.*, 1993; STORZ, *et al.*, 1989; LIM, *et al.*, 1993; PROSPERI, *et al.*, 1993). Sie sind in der Lage, Alkylhydroperoxide, H₂O₂ und Peroxinitrit unter Nutzung eines Thiol-haltigen Elektronendonors, wie Thioredoxin, Glutaredoxin, Tryparedoxin oder NADH:Peroxiredoxin Oxidoreduktasen zu H₂O und dem entsprechenden Alkohol zu reduzieren (JACOBSON, *et al.*, 1989; BRYK, *et al.*, 2000; NOGOCEKE, *et al.*, 1997; CHAE, *et al.*, 1994; ROUHIER, *et al.*, 2001). Sie enthalten keine Co-Faktoren wie z. B. Metall-Ionen oder Hämgruppen, ihre einzigen redoxaktiven Reste sind Cysteine. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erfolgt die Einteilung dieser Proteine in 1-Cys-Peroxiredoxine (1-Cys-Prx) und 2-Cys-Peroxiredoxine, wobei innerhalb der letztgenannten Gruppe nochmals zwischen typischen und atypischen 2-Cys-Peroxiredoxinen unterschieden wird (WOOD, *et al.*, 2003). Alle diese Proteine enthalten im N-terminalen Bereich der Polypeptidkette ein Cystein, das essentiell für die enzymatische Aktivität ist (CHAE, *et al.*, 1993; JEONG, *et al.*, 1999; KONG, *et al.*, 2000; HOFMANN, *et al.*, 2002). Typische 2-Cys-Peroxiredoxine besitzen im Gegensatz zu 1-Cys-Peroxiredoxinen einen zweiten, an der Katalyse beteiligten Cystein-Rest, der im C-terminalen Abschnitt der Polypeptidkette lokalisiert ist. Beide Gruppen weisen untereinander hohe Sequenz-Homologien auf (CHAE, *et al.*, 1993; JACOBSON, *et al.*, 1989; WOOD, *et al.*, 2003). Die zu der Gruppe der atypische 2-Cys-Peroxiredoxine gehörenden Bcp-homologen Proteine besitzen ebenfalls zwei Cysteine, die sich beide im N-terminalen Bereich der Polypeptidkette in einem Abstand von vier Aminosäuren befinden und erforderlich für die Thioredoxin-abhängige Peroxidase-Aktivität sind (KONG, *et al.*, 2000). Auch bei den Vertretern der Typ II-Prx ist das N-terminale Cystein konserviert (vgl. Einleitung). Für bisher bekannte Proteine dieses Clusters existiert innerhalb der Polypeptidkette ebenfalls ein zweites Cystein, dessen Position jedoch nicht mit dem entsprechenden Cystein der 2-Cys-Peroxiredoxine bzw. Bcp-homologen Proteine korrespondiert, für die enzymatische Aktivität jedoch essentiell ist (JEONG, *et al.*, 1999). In Abb. 42 sind die, das katalytisch aktive,

N-terminale Cystein umfassenden Sequenzmotive der verschieden Peroxiredoxin-Formen vergleichend dargestellt.

typisches 2-Cys-Prx (AhpC_St)	PADFTFVCPTELGDV	54
1-Cys-Prx (PrxVI_Hs)	PRDFTFVCTTELGRA	54
atypisches 2-Cys-Prx (Bcp_Ec)	PKAMTPGCTRQACGL	52
TypII-Prx (TypII_Sc)	PAAFSPCTVSHIPG	69

Abb. 42: Vergleichende Darstellung des, das katalytisch essentiellen, N-terminalen Cystein umfassende Sequenzmotiv der verschiedenen Peroxiredoxin-Formen.

Prx: Peroxiredoxin; AhpC_St: Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C aus *S. thyphimurium* (STORZ, *et al.*, 1989), PrxVI_Hs: Peroxiredoxin VI aus *Homo sapiens* (KANG, *et al.*, 1998); Bcp_Ec: Bacterioferritin-assoziiertes Protein aus *E. coli* (JEONG, *et al.*, 2000); TypII_Sc: TypII-Peroxiredoxin aus *S. cerevisiae* (JEONG, *et al.*, 1999). Die katalytisch aktiven Cysteine sind rot dargestellt, identische Aminosäuren innerhalb der Sequenzen sind grau unterlegt.

Das *prxU*-Gen aus *E. acidaminophilum* codiert für ein Protein mit einer Länge von 203 AS und einer theoretischen molekularen Masse von 22,4 kDa (*accession*: EMBL CAB71140.1; SÖHLING, *et al.*, 2001). In Tab. 20 sind mit dem Datenbank-Programm BLAST (ALTSCHUL, *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov.) erhaltene Proteine mit signifikanter Homologie zu der AS-Sequenz des *prxU*-Genprodukts zusammengefaßt. Die höchsten Identitäten wurden dabei mit 45,6 % für ein Peroxiredoxin aus dem Nematoden *A. suum*, sowie mit 45,1% für ein Prx-Protein aus dem Cyanobakterium *T. elongatus* mit 45,1% Identität erhalten. Desweiteren zeigten die jeweiligen PDX2-Proteine aus *M. musculus* und *H. sapiens* ebenfalls hohe Homologien zum *prxU*-Genprodukt. Die Ähnlichkeit zu verschiedenen bakteriellen Peroxiredoxinen war dagegen geringer. Eine ähnliche Beobachtung wurde für das Peroxiredoxin Cp20 aus *C. pasteurianum* gemacht. Dieses Protein zeigte höhere Homologien zu dem menschlichen Prx II mit 58% Identität als zu denen der meisten Eubakterien (REYNOLDS, *et al.*, 2002). Auch das entsprechende Enzym aus dem humanpathogenen Organismus *C. difficile* (die DNA-Sequenzdaten wurden der Veröffentlichung unter www.sanger.ac.uk entnommen), der ebenso wie *E. acidaminophilum* in das Cluster XI der Clostridien eingeordnet wird, wies nur eine vergleichsweise geringe Identität von 34,1 % gegenüber PrxU auf. Diese Angabe kann jedoch nur unter Vorbehalt diskutiert werden, da zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen (11.02.2003 bzw. 27.04.2003) das Genomprojekt von *C. difficile* noch nicht vollständig abgeschlossen war. Homologien zu PrxU zeigte der 5'-Bereich eines offenen Leserahmens mit 2127 bp, der damit 1515 bp länger als das *prxU*-Gen aus *E. acidaminophilum* war. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz des 3'-Bereiches dieses Leserahmens zeigte hohe Homologien zu Chitinase-Proteinen, so daß von einer, aus einem Sequenzierfehler resultierenden Leseraster-Verschiebung ausgegangen werden konnte. Da dadurch die exakte Länge des, für das putative Peroxiredoxin codierenden offenen Leserahmens nicht festgelegt werden konnte, wurde eine dem *prxU*-Gen entsprechenden Größe von 609 bp angenommen und die davon abgeleitete Aminosäure-Sequenz für die Untersuchungen herangezogen.

Tab. 20 Vergleich von PrxU aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken

Organismus	Protein	accession no.	Referenz	Identität [%] ¹
<i>A. suum</i>	Prx	BAA90476	(TSUJI, <i>et al.</i> , 2000)	45,6
<i>T. elongatus</i>	Prx	NP_682244	(NAKAMURA, <i>et al.</i> , 2002)	45,1
<i>Mus musculus</i>	PDX2	Q61171	(ICHIMIYA, <i>et al.</i> , 1997)	43,5
<i>H. sapiens</i>	PDX2	NP_005800	(SHAU, <i>et al.</i> , 1994)	42,5
<i>Pyrococcus furiosus</i>	AhpC	NP_578451	(ROBB, <i>et al.</i> , 2001)	42,0
<i>C. perfringens</i>	AhpC	NP_561698	(SHIMIZU, <i>et al.</i> , 2002)	40,0
<i>S. cerevisiae</i>	TSA 1	A47362	(CHAE, <i>et al.</i> , 1993)	39,7
<i>B. subtilis</i>	AhpC	NP_391889	(KUNST, <i>et al.</i> , 1997)	38,4
<i>S. typhimurium</i>	AhpC	P19479	(STORZ, <i>et al.</i> , 1989)	37,9
<i>E. coli</i>	AhpC	P26427	(SMILLIE, <i>et al.</i> , 1992)	37,9
<i>C. pasteurianum</i>	Cp20	P23161	(MATHIEU, <i>et al.</i> , 1992)	37,7
<i>Crithidia fasciculata</i>	TXNPx	AAC15095	(NOGOCEKE, <i>et al.</i> , 1997)	36,1
<i>C. difficile</i>	Prx	–	www.sanger.ac.uk	34,1
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	TDXH	P95895	(SHE, <i>et al.</i> , 2001)	34,8
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2C-Prx	AAM62760	(HAAS, <i>et al.</i> , 2002)	32,1
<i>Spinacia oleracea</i>	Bas 1	CAA63910	(BAIER & DIETZ, 1996)	31,3
<i>Archeoglobus fulgidus</i>	TDXH	O29969	(KLENK, <i>et al.</i> , 1997)	28,4
<i>Homo sapiens</i>	PrxVI	NP_004896	(KANG, <i>et al.</i> , 1998)	28,3

¹ Die Identitäten wurden unter Nutzung des Programmes LALIGN (www.expasy.org) berechnet

² zum Zeitpunkt der Untersuchungen (11.02.2003) war das Genomprojekt noch nicht abgeschlossen. Durch das Vorhandensein einer Leserasterverschiebung ergeben sich vermutlich Abweichungen von den erhaltenen Daten.

Verwendete Abkürzungen: Prx: Peroxiredoxin; PDX: Peroxidase; AhpC: Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C; TSA: Thiol-spezifisches Antioxidant; Cp20: Genprodukt des *cp20*-Gens; TXNPx: Tryparedoxin-Peroxidase; TDXH: Thioredoxin-abhängige Peroxidase; 2C-Prx: 2-Cys-Peroxiredoxin, Bas1: Genprodukt des *bas1*-Gens.

Abb. 43 zeigt ein Alignment der in Tab. 20 aufgeführten Proteine im Vergleich zu PrxU aus *E. acidaminophilum*. Es wird ersichtlich, daß nur einige wenige Aminosäurereste innerhalb der hier aufgeführten 1-Cys- und 2-Cys-Peroxiredoxine streng konserviert sind. Zu diesen gehört das hochkonservierte V₄₆CP(T)-Sequenz-Motiv (angegeben ist stets die Position der entsprechenden Aminosäure in PrxU aus *E. acidaminophilum*) im N-terminalen Bereich der Polypeptid-Kette, dessen Cystein-Rest für die enzymatische Aktivität essentiell ist (CHAE, *et al.*, 1993; ELLIS & POOLE, 1997a; MONTEMARTINI, *et al.*, 1999; FLOHÉ, *et al.*, 2002a). PrxU aus *E. acidaminophilum* besitzt anstelle dieses katalytisch aktiven Cysteins ein Selenocystein, das durch ein *in-frame* UGA-Codon codiert wird und stellt damit das bislang einzige bekannte Selenocystein-haltige Peroxiredoxin dar. PrxU besitzt zwar kein weiteres Cysteins im C-terminalen Bereich des Proteins, kann aber auf den ersten Blick nicht eindeutig einem Peroxiredoxin-Cluster zugeordnet werden. 1-Cys-Peroxiredoxine scheinen generell an der Position nach dem Cystein ein Threonin aufzuweisen. Im Gegensatz dazu besitzen typische 2-Cys-Peroxiredoxine ein Prolin an dieser Position. Im Fall von PrxU aus *E. acidaminophilum* ist ein Alanin an dieser Stelle lokalisiert, das mit dem Unterschied der atomaren Größe des Selens im Vergleich zum Schwefel im Zusammenhang stehen könnte. So besitzt beispielsweise die zyklische Aminosäure (bzw. Iminosäure) Prolin durch ihren Pyrrolidinring eine relative starre Konformation und übt dadurch einen deutlichen Einfluß auf die Architektur des Proteins

aus. Ein Selenocystein würde möglicherweise in der entsprechenden Konformation zu sterischen Behinderungen aufgrund seiner durch das Selen-Atom bedingten atomaren Größe führen.

Untersuchungen der Kristallstruktur von einem 2-Cys-Peroxiredoxin (TPx-B) aus menschlichen Erythrocyten haben gezeigt, daß die Aminosäure-Reste P₄₄, T₄₈, R₁₂₇, R₁₅₀, die zu den Aminosäuren P₄₀, T₄₈, R₁₂₃, sowie R₁₄₆ in PrxU aus *E. acidaminophilum* korrespondieren, direkt an der Ausbildung des katalytisch aktiven Zentrums beteiligt sind (SCHRÖDER, *et al.*, 2000). Ähnliches wurde auch für das menschliche 1-Cys-Peroxiredoxin PrxVI postuliert, indem die Interaktion des R₁₃₂ (in PrxU R₁₂₃) zu einer Absenkung des pK_a des katalytischen C₄₇ und damit zur Erhöhung seiner Nukleophilizität führt (CHOI, *et al.*, 1998), was mit der postulierten Bildung einer katalytischen Triade durch C₅₂, R₁₂₈ und T₄₉ (in PrxU C₄₇, R₁₂₃ und T₄₄) im TXNPx aus dem Trypanosomen *Leishmania donovani* (FLOHÉ, *et al.*, 2002b) im Einklang steht.

AhpC_St	-----MSLINTKIKPFKNQAFK--NGEFIEVTEKDTEG-RWSVFFFYP	40
AhpC_Ec	-----MSLINTKIKPFKNQAFK--NGEFIEITEKDTEG-RWSVFFFYP	40
AhpC_Bs	-----MSLIGKEVLPFEAKAFK--NGEFIDVTNEDLKG-QWSVFCFYP	40
Prx_Cp	-----MQMSLINKKVLDFKVQAYQ--NGEFKEVTSEDLKG-HWSVVFVYP	42
Prx_Pf	-----MIRVGEVVPDFEADAYFPEKDEIGKLRI SDYRG-KWVVLAFYP	42
PrxU_Ea	-----MVSVGKKAPDFEMAGFY--KGEFKTFRLESEYLG-KWVVLCFYP	40
PDX2_Mm	-----MASGNAQIGKSAPDFTATAV--DGAFKEIKLSDYRG-KYVVLFFYP	44
PDX2_Hs	-----MASGNARIGKPAPDFKATAV--DGAFKEVKLSDYKG-KYVVLFFYP	44
Prx_As	-----MS--KAMIGKPAPEFTATAV--DGDFKSI SLSDYKG-KYVVLFFYP	42
Tsa1_Sc	-----MV---AQVQKQAPTFFKKTAV--DGVFDEVSLDKYKG-KYVVLAFIP	41
TXNPx_Cf	-----MSCGAAKLNHPAPEFDDMALMP--NGTFKKVSLSSYKG-KYVVLFFYP	45
2CPrx_At	SRSASRRNFAVKAQADDLPLVGNKAPDFEAEAVF--DQEFIKVKLSEYIGKKYVILFFYP	117
Bas1_So	--STSRRSFAVKAQADDLPLVGNKAPDFEAEAVF--DQEFIKVKLSYIGKKYVILFFYP	112
Prx_Te	-----MSECLRVGQPAPDFEAVAVY--DQEFKTIKLSDYRG-KYVVLFFYP	43
cp20_Cpa	-----MERLVGKPAPEFEMKAVKGDGRGFTEVKLGDYKG-KWLVMFFYP	43
TDXH_Ss	-----MSEERIPLIGERFPEMEVIT TQG-----RIKLPDDYKGRWVFLFSHP	42
TDXH_Af	-----MSEERIPLIGERFPEMEVIT TQG-----MKLPEAFKWKVFLFSHP	18
Prx_Cd	-----MPNLPSLGSKAPDFKANTTNG-----PIRLSD-YKGNWIVLFSHP	39
PrxVI_Hs	-----MPGGLLLGDVAPNFEANTTVG-----RIRFHDFLGDWSGILFSHP	40
	. . . : :: *	

AhpC_St	ADFTFVCPTELGVDVADHYEELQKLGVDVYSVSTDTHFTHKAWHSS--SETIA----KIKY	94
AhpC_Ec	ADFTFVCPTELGVDVADHYEELQKLGVDVYAVSTDTHFTHKAWHSS--SETIA----KIKY	94
AhpC_Bs	ADFSFVCPTELEDLQEYAAALKEVGVEVYSVSTDTHFVHKGWHDS--SEKIS----KITY	94
Prx_Cp	ADFTFVCPTELGELADNYESFKEIGCEVYSISTDTHFVHKAWADA--SDTIG----KIKY	96
Prx_Pf	ADFTFVCPTELEELAEYEEFFKKEGAEIISVSTDYVHKAWHDT--SPAIK----KVRP	96
PrxU_Ea	GDFTFVUATEVSAVAEKYPEFQKLGVEVLSVSVDSVVFVHKMWNDNELSKMVEG---GIPF	97
PDX2_Mm	LDFTFVCPTEIIAFSDHAEDFRKLGCEVLGVSVD SQFTHLAWINTPRKEGGLG---PLNI	101
PDX2_Hs	LDFTFVCPTEIIAFSTTVKRTSAKLGCEVLGVSVD SQFTHLAWINTPRKEGGLG---PLNI	101
Prx_As	MDFTFVCPTEIIAFSEHVGEFFKLGVEVLAASTDSQFSLHAWINTPRKQGGGLG---EMKI	99
Tsa1_Sc	LAFTFVCPTEIIAFSEAAKKFEEQGAQVLFASDSEYSLAWTNI PRKEGGLG---PINI	98
TXNPx_Cf	MDFTFVCPTEIIQFSDDAKRFAEINTEVISCS CDSEYSHLQWTSVDRKGGGLG---PMAI	102
2CPrx_At	LDFTFVCPTEITAFSDRYEEFEKLNTEVLGVSVD SVFSLHAWVQTDKRS GGGLG---DLNY	174
Bas1_So	LDFTFVCPTEITAFSDRHSEFEKLNTEVLGVSVD SVFSLHAWVQTDKRS GGGLG---DLNY	169
Prx_Te	LDFTFVCPTEIVAFSDRYDEFKLNTEILGVSVD SQFSLHAWTQTDKRS GGGLG---DLKY	100
cp20_Cpa	LDFTFVCPTEITGFSKRAEEFRDLKAE LLAVSCDSQYSHETWINQDIKQGGGLG---KINF	100
TDXH_Ss	GDFTPVCTTEFYSAFKYEEFFKLNTE LIGLSVDSNISHIEWIMWIEKNLKV E----IPF	98
TDXH_Af	ADFTPVCTTEFVAFQNRIDEFRKLNCELIGLSIDQVFSHIK WIEWIEKLDIE----IEF	74
Prx_Cd	GDFTPVCTTEFLCFAYYDEFKRNTE LIGLSVDSNSSHLAWMYNISLLT GVE----IPF	95
PrxVI_Hs	RDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRN VKLIALSIDSVEDHLAWSKDINAYNSE EPTKLPF	100
	*: *.** . . : * * * * :	

AhpC_St	AMIGDPTGALTRNFDNMREDEGLAD-----RATFVVDPQGIIQAIEVTAEGIGRDASDL	148
AhpC_Ec	AMIGDPTGALTRNFDNMREDEGLAD-----RATFVVDPQGIIQAIEVTAEGIGRDASDL	148
AhpC_Bs	AMIGDPSQTISRNFVDLDEETGLAD-----RGTFIIDPDGVIQTVEINAGGIGRDASNL	148
Prx_Cp	PMLADPTGKLARDFEVMIEEEGLAL-----RGSFVINPEGEIKAYEIHONGIGRNAEEL	150
Prx_Pf	PMLADPAGKICRLFPTYIEDEGISW-----RATFIIIDPDGKVVHMEMHDNSIGRSAKEI	150
PrxU_Ea	PMLSDGGGNVGTLYGVYDPEAGVEN-----RGRFLIDPDGIIQGYEVLILPVGRNVSET	151
PDX2_Mm	PLLADVTKLSLQNYGVLKNDEGIAY-----RGLFIIIDAKGVLRQITVNDLVPGRSVDEA	155
PDX2_Hs	PLLADVTRRLSEYDGYLKNDEGIAY-----RGLFIIIDGKGVLRQITVNDLVPGRSVDEA	155
Prx_As	PIISDNNHQISRDYGVLKEDDGIAY-----RGLFIIIDPKGILRQITVNDLVPGRSVTET	153
Tsa1_Sc	PLLADTNHSLSRDYGVLEIEEGVAL-----RGLFIIIDPKGVIRHITINDLVPGRNVDEA	152
TXNPx_Cf	PMLADKTKGIARAYGVLEDEDSGVAY-----RGVFIIDPNGKLRQIIINDMPIGRNVEEV	156
2CPrx_At	PLVSDITKSISKSFGVLIIPDQGIAL-----RGLFIIIDKEGVIQHSTINNLGIGRSVDET	228
Bas1_So	PLISDVTKSISKSFGVLIHDQGIAL-----RGLFIIIDKEGVIQHSTINNLGIGRSVDET	223
Prx_Te	PLVSDLKKDISTAYNVLT-EEGVAL-----RGLFIIIDKEGIIQHATINNLAFGRSVDET	153
cp20_Cpa	PIASDKTTEVSTKYGIQIEEEGISEL-----RGLFIIIDPEGIVRYSVVHDLNVGRSVDET	154
TDXH_Ss	PIIADPMGNVAKRLGMIH-AQSSTA----TVRAVFVDDKGVVRLILLYPMEIGRNIDEI	153
TDXH_Af	PVIADDTGRVAEMGLLIH-PAKGTN----TVRAVFIVDPEAVIRAVIYYPQELGRNMDEI	129
AhpC_Cd	PIIEDRDMRIAKLYGMISKPMSDTS----TVRSVFIIDNNQILRTLILYPLTTGRNIPEI	151
PrxVI_Hs	PIIDDRNRELAILLGMLDPAEKDEKMPVTARVVFVFGPDKKLLKSILYPATTGRNFDEI	160
	.: * : * *... : ** :	
AhpC_St	LRKIKAAQYVAHPG-EVCPAKWKE----GEATLAPSLDLVGKI-----	187
AhpC_Ec	LRKIKAAQYVASHPG-EVCPAKWKE----GEATLAPSLDLVGKI-----	187
AhpC_Bs	VNKVQAAQYVRQNPGEVCPAKWEE----GGETLTPSLDLVGKI-----	187
Prx_Cp	LRKVQAAQFVAEHGD-QVCPAKWKP----GEETLAPSLDLIGKL-----	189
Prx_Pf	LRRLRRAAKFVRENPG-VVCPASWEP----GKEALKVSLDLVGKI-----	189
PrxU_Ea	LRQIQAFQLVRETKGAEVAPSGWKP----GKKTLLKPGPLVGNVYKEWSVKEAFED----	203
PDX2_Mm	LRLVQAFQYTD-EHG-EVCPAGWKP----GSDTIKPNVDDSKEYFSKHN-----	198
PDX2_Hs	LRLVQAFQYTD-EHG-EVCPAAWKP----GRDTIKPNVDDSKEYFSKHN-----	198
Prx_As	LRLVQAFQFVD-KHG-EVCPAGWTP----GADTIKPGVKESKAYFEKH-----	195
Tsa1_Sc	LRLVEAFQWTD-KNG-TVLPONWTP----GAATIKPTVEDSKEYFEAANK-----	196
TXNPx_Cf	IRLVEALQFVE-EHG-EVCPANWKK----GDAKKK-----EGH-----	188
2CPrx_At	MRTLQALQYVQENPD-EVCPAGWKP----GEKSMKDPKLSKEYFSAI-----	271
Bas1_So	MRTLQALQYTG-NPD-EVCPAGWKP----GEKSMKDPKLSKEYFSAI-----	265
Prx_Te	LRVLQAIQYVQTHPD-EVCPAGWHP----GDKTMNPDVKSKEYFEAVG-----	197
cp20_Cpa	LRVLKAFQTGG-----MCALDWHE----GDDNL-----	178
Prx_Ss	LRAIRALQLVD--KAGVVTPANWPNNELIGDKVINPAPRTIKDAKMLRGQP-----	FD 204
Prx_Af	LRAVKALQVSD--QNGVAMPANWPNNELVGDVAVIIPPISEAEAKERLEKAKAGDISCYD	187
Prx_Cd	LRIVDALQTS--RDNIVTPANW----FPGMPVILPYPKNYKELKNRVNSCN-KKYSKM	203
PrxVI_Hs	LRVVISLQLTA--EKR VATPVDWKD----GDSVMVLPTIPEEEAKLFPKG-----	VFT 208
	.. : : : . * *	

Abb. 43: Ausschnitt aus dem Alignment von PrxU aus *E. acidaminophilum* und anderen Peroxiredoxinen
 St: *S. typhimurium*; Ec: *E. coli*; Bs: *B. subtilis*; Cp: *C. perfringens*; Pf: *P. furiosus*; Ea: *E. acidaminophilum*; Mm: *M. musculus*; Hs: *H. sapiens*; As: *A. suum*; Sc: *S. cerevisiae*; Cf: *C. fasciculata*; At: *A. thaliana*; So: *S. oleracea*; Te: *T. elongatus*; Cpa: *C. pasteurianum*; Ss: *S. solfataricus*; Af: *A. fulgidus*; Cd: *C. difficile*.

Die Bezeichnungen der Vertreter der 2-Cys-Peroxiredoxine sind dunkelgrau, die der 1-Cys-Peroxiredoxine hellgrau unterlegt. Die AS-Sequenz des PrxU aus *E. acidaminophilum* ist fett hervorgehoben. Die redoxaktiven Cysteine sind dunkelgrau unterlegt. Weitere an der enzymatischen Reaktion beteiligten konservierten Aminosäure-Reste sind hellgrau unterlegt.

Das Fehlen eines für 2-Cys-Peroxiredoxine typischen in die Katalyse involvierten Cysteins im C-terminalen Bereich der Polypeptidkette in PrxU aus *E. acidaminophilum* läßt eine Zugehörigkeit zum Cluster der 1-Cys-Peroxiredoxine vermuten. Die Sequenzidentitäten zu 2 Cys-Peroxiredoxinen sind jedoch höher als zu 1-Cys-Peroxiredoxinen (s. Tab. 20), welches besonders für den, das Selenocystein-umgebenden, Sequenz-Bereich (F₃₈ bis E₅₀) gilt. Weiterhin fällt auf, daß PrxU ein Cystein an Position 37 aufweist, welches auch das 2-Cys-Peroxiredoxin AhpC aus *B. subtilis* besitzt. Über eine mögliche Involvierung diese Cysteins in die Peroxiredoxin-Reduktion ist jedoch bislang nicht bekannt. Im Phylogramm (erstellt mit dem Programm ClustalW; www.expasy.ch; Matrix:

Blossum, Gap distances: on) wird PrxU jedoch zusammen mit dem menschlichen 1-Cys-Peroxiredoxin PrxVI und dem putativen 1-Cys Peroxiredoxin aus *C. difficile* in ein Cluster eingeordnet, welches einen höheren Verwandtschaftsgrad zu den AhpC-Proteinen (2-Cys-Peroxiredoxine) aus *E. coli*, *S. typhimurium* und *B. subtilis* als zu den archaealen 1-Cys-Peroxiredoxinen aus *S. solfataricus* und *A. fulgidus* besitzt. Aus diesen Gründen läßt sich PrxU nicht eindeutig in eines der Peroxiredoxin-Cluster einordnen. Möglicherweise stellt es eine neuartige Form von Peroxiredoxinen dar. Dafür spricht auch der Selenocysteingehalt dieses Proteins sowie das Vorkommen eines Alanins anstelle der hochkonservierten Prolins bzw. Threonins in direkter Nachbarschaft des katalytischen Selenocysteins (s. o.).

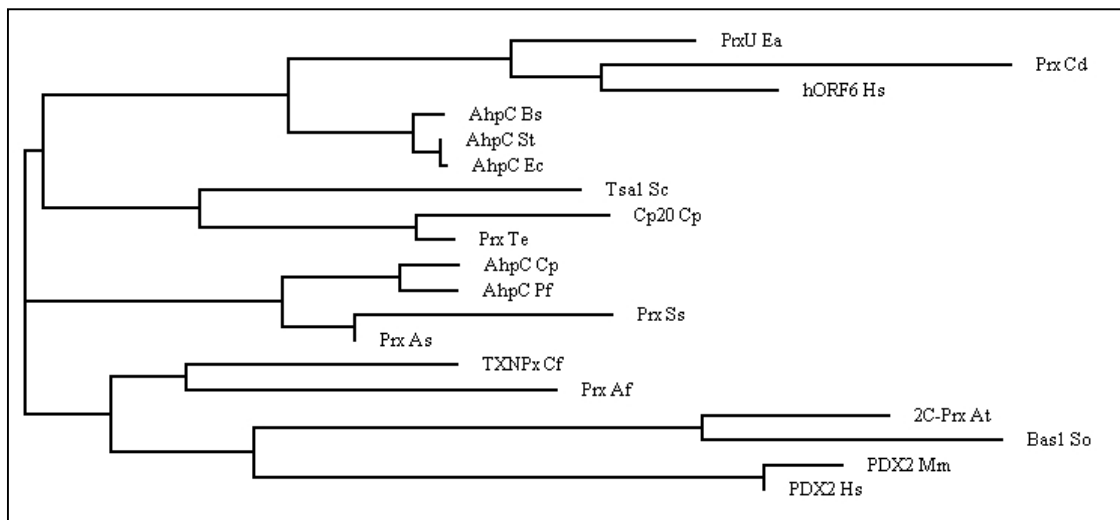


Abb. 44: Phylogramm ausgewählter Peroxiredoxine

Erstellt mit dem Programm ClustalW (www.expasy.org); Matrix: blossom, Gap distances :on.

Die für die Erstellung des Phylogramms verwendeten Peroxiredoxine sind identisch mit denen, die in Tab. 20 aufgeführt sind und deren Sequenzen im Alignment in Abb. 43 dargestellt sind (hORF6 ist die alte Bezeichnung für PrxVI aus *H. sapiens*).

4.4.2. Charakterisierung der *prxU*-Genregion aus *E. acidaminophilum*

Für das *prxU*-Genprodukt aus *E. acidaminophilum* wurde im Rahmen dieser Arbeit eine DTT-abhängige Linolsäurehydroperoxid-Reduktase-Aktivität nachgewiesen. Der natürliche Elektronendonator des Peroxiredoxins konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden. Durch die Korrektur der Sequenzdaten ergab sich eine Organisation der Genumgebung des *prxU*-Gens aus *E. acidaminophilum*, die von der in der vorangegangene Diplomarbeit beschriebenen (PARTHER, 1998) abwich. Die aktuellen, korrigierten Daten sind unter SÖHLING, *et al.*, 2001 veröffentlicht. An dieser Stelle soll nun geprüft werden, ob sich anhand der neuen, aus molekularbiologischen Analysen abgeleiteten Erkenntnisse unter Einbeziehung aktueller Literaturdaten Hinweise auf den nativen Elektronendonator von PrxU bzw. auf das Vorhandensein anderer an der antioxidativen Funktion von PrxU beteiligter Proteine ergeben. So sind beispielsweise in einer Vielzahl von bakteriellen Genomen, dazu gehören *S. typhimurium*, *E. coli*, *Streptococcus mutans* und *Thermus aquaticus* die Gene des

Peroxiredoxins (AhpC, Prx) und der entsprechenden NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktase (AhpF, Nox1, PrxR) als Operon organisiert, wobei das Gen für die Reduktasekomponente direkt stromabwärts des Peroxiredoxin-Gens lokalisiert ist (STORZ, *et al.*, 1989; REYNOLDS, *et al.*, 2002). Eine entsprechende Anordnung findet man auch in *Bacillus subtilis* (BSAT, *et al.*, 1996) und *Xanthomonas campestris* (MONKOLUSK, *et al.*, 1997)). *C. pasteurianum* verfügt über ein aus zwei Komponenten bestehendes Peroxiredoxin-Reduktase-System, dessen Gene stromaufwärts des Peroxiredoxin-Gens lokalisiert sind (MATHIEU, *et al.*, 1992; REYNOLDS, *et al.*, 2002).

Das *prxU*-Gen aus *E. acidaminophilum* stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein einzelnes Strukturgen dar, da eine monocistronische Transkription dieses Gens nachgewiesen werden konnte (s. 3.7.1.3.). Innerhalb der *prxU*-Genregion konnte auch kein entsprechender offener Leserahmen ermittelt werden, der für eine mögliche NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktase codiert. In einer Vielzahl bakterieller Genome, in denen ebenfalls das Gen für ein solches Protein fehlt, sind Gene für Proteine, die an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt sind, in der direkten Genumgebung eines Peroxiredoxin-Gens lokalisiert. Beispielsweise konnte in *Campylobacter jejuni* stromaufwärts des *ahpC*-Gens ein Gen für ein Ferredoxin identifiziert werden, dessen Genprodukt als Elektronenüberträger innerhalb des Peroxidasystems diskutiert wird (BAILLON, *et al.*, 1999). *Mycobacterium tuberculosis* weist stromabwärts von *ahpC* ein Gen (*ahpD*) auf, dessen Produkt auch Alkylhydroperoxid-Reduktase-Aktivität zeigt, jedoch keine Sequenzhomologien zu bekannten Peroxiredoxinen besitzt (HILLAS, *et al.*, 2000; NUNN, *et al.*, 2002). In *M. jannaschii* ist *ahpC* in unmittelbarer Nähe der Gene für Ruberythrin sowie Rubredoxin lokalisiert (BULT, *et al.*, 1996). In *C. perfringens* befindet sich ein Thioredoxin-Reduktase-Gens stromabwärts von *ahpC* (SHIMIZU, *et al.*, 2002). Die Genome von *Thermotoga maritima* (NELSON, *et al.*, 1999), *Pyrococcus abyssi* (www.sanger.ac.uk), *P. horikoshii* (KAWARABAYASI, *et al.*, 1998), *P. furiosus* (ROBB, *et al.*, 2001), *Chlorobium tepidum* (EISEN, *et al.*, 2002) sowie von dem mit *E. acidaminophilum* nahe verwandten Organismus, *C. difficile* (www.sanger.ac.uk) wiesen jedoch weder Gene für NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktasen noch für bekannte, in die oxidative Stressantwort involvierte Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Peroxiredoxin-Gen auf, welches mit der Situation in *E. acidaminophilum* vergleichbar ist. So konnte direkt stromaufwärts von *prxU* ein offener Leserahmen in gleicher Transkriptionsrichtung identifiziert werden, der ein Nukleotid-bindendes Protein (Nbp) mit hohen Homologien zu Proteinen der Mrp-Familie (*multidrug resistance protein*) codiert (s. Tab. 21). Für dieses Gen konnte stromaufwärts des Startcodons im Abstand von 7 bp eine Ribosomenbindungsstelle, sowie eine Promotorstruktur im Abstand von 24 bp postuliert werden. Das abgeleitete Genprodukt besaß 274 AS und damit eine molekulare Masse von 30,4 kDa.

Aus der Literatur sind keine Hinweise auf einen Bezug von Mrp-Proteinen zu Peroxiredoxinen oder der Beteiligung an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies bekannt. Bei diesen Polypeptiden handelt es sich vielmehr um Nukleotid-bindende, membranständige Proteine, die innerhalb der ABC-

Transporter-Familie zu einer Gruppe von Proteinen gehören, die sich sowohl strukturell als auch funktionell unterscheiden (CAI, *et al.*, 2001). Zu ihnen gehören beispielsweise der Cadmium-Resistenz-Faktor YCF1 (SZCZYPKA, *et al.*, 1994, TOMMASINI, *et al.*, 1996) das Oligomycin-Resistenz-Protein YORI (KATZMANN, *et al.*, 1995) aus Hefe und die menschlichen Sulfonyl-Harnstoff-Rezeptoren SUR1 und SUR2 (AGUILAR-BRYAN, *et al.*, 1995, INAGAKI, *et al.*, 1996). Als Beispiel für ein bakterielles Mrp-ähnliches Protein wäre das gut untersuchte MinD-Protein aus *E. coli* zu nennen. Dieses als ATPase fungierende Protein gehört zu einem aus drei Proteinen bestehenden System (MinC, MinD, MinE), welches die Zellteilung in *E. coli* steuert. Die entsprechenden Gene dieser Proteine sind in einem Operon organisiert (AKERLUND, *et al.*, 2002). Eine vergleichbare Funktion des Nbp-Proteins in *E. acidaminophilum* ist demnach unwahrscheinlich, da in dessen Genumgebung keine für MinC- oder MinE-ähnliche Proteine codierenden offenen Leserahmen vorhanden sind. Ein Alignment des Nbp-Proteins aus *E. acidaminophilum* mit den in Tab. 21 aufgeführten Mrp-Proteinen anderer Organismen (Abb. 45) zeigte das Vorhandensein einer hochkonservierten ATP-Bindungsstelle mit dem WALKER A-Motiv GxxGxGKS/T (WALKER, *et al.*, 1982; HAYASHI, *et al.*, 2001; WATANABE, *et al.*, 2002). Für *E. coli* MinD wurde eine zweite Nukleotid-Bindestelle (WALKER B-Motiv) an der Position 118-121 mit –DxPA– (s. Abb. 45) identifiziert (HAYASHI, *et al.*, 2001). Nbp aus *E. acidaminophilum*, sowie die weiteren in Abb. 45 gezeigten Mrp-Proteine weisen in dem entsprechenden Sequenzbereich ein modifiziertes putatives WALKER B-Motif mit –DxPP– auf.

Tab. 21: Vergleich des Nukleotid-bindenden Proteins (Nbp) aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken.

Organismus	Protein	accession no.	Referenz	Identität [%] ¹
<i>C. difficile</i>	Mrp	–	www.sanger.ac.uk	39,4
<i>C. perfringens</i>	Mrp	NP_563428	(SHIMIZU, <i>et al.</i> , 2002)	37,8
<i>M. jannaschii</i>	Mrp	NP_247256	(BULT, <i>et al.</i> , 1996)	37,3
<i>S. cerevisiae</i>	Mrp	CAA64779	(VITALE, <i>et al.</i> , 1996)	25,7
<i>E. coli</i>	MinD	P18197	(deBOER, <i>et al.</i> , 1989)	17,4

¹Die Identitäten wurden unter Nutzung des Programmes LALIGN (www.expasy.org) berechnet.

Mrp_Cd	-----MADCNSCPKGNCSQS-----N	18
MrP_Cp	-----MGSCASCANKDKCSSASKDGGCS	23
Nbp_Ea	-----	
Mrp_Mj	-----MAECDGKCDTCPKNTCPDTKK---LL	24
Mrp_Sc	MTEILPHVNDEVLPAEYELNQPEPEHCPGPESDMAGKSDACGGCANKEICESLPK---GP	57
MinD_Ec	-----	

WALKER A-Motiv

Mrp_Cd	CSIENPNPKFG---KIIGVMSGKGGVGKSTVTALLANKLNKMG-YKVGILDSDITGPSI	74
MrP_Cp	SSVPAKLGTYGNIGNIKNVIGVISGKGGVGKSTVTGILATQLAKKG-YKVGVLADITGPSM	82
Nbp_Ea	MDFEKANTNEYTNIKKVIAIMSGKGGVGKSSVTSLLAVSLIKKG-FKVGILDGDMGGT SI	59
Mrp_Mj	AQQDAKIRENMSKIKHKIVILSGKGGVGKSTVTVNLAALNLMG-KKVGVLADIIHGPN I	83
Mrp_Sc	SPDIPLITDNLSGIEHKILVLSGKGGVGKSTFAAMLSWALSADLQVGAMDLDICGPSL	117
MinD_Ec	-----MARIIVVTSKGGVGKTTSSAAIATGLAQKG-KKTVIDFDIGLRNL	46
	. * : *****: : : * : . : * * : . :	

Mrp_Cd	PRLMGVKN-----VKAYS DGS--YIYPVENSNNIKVMSINLMIDDENEPPVWRGPLLGGV	127
MrP_Cp	PRFFGINEKRADIVAMDSEGKQVKFVPVKTELGIKVISMNLLEVEDDPVIWRGPMVTGV	142
Nbp_Ea	PKIFGITG-----EKSNTSSK--GIEPVTTPSGIKVMSLSFLMEKEDSPVIWRGLLISKT	112
Mrp_Mj	PKMLGVEN-----TQPMAGPA--GIFPIVTKDGIKTM SIGYLLPDDKTPVIWRGPKVSGA	136
Mrp_Sc	PHMLGCIK-----ETVHESNS--GWTVPVYVTDNLATMSIQYMLPEDDSAI IWRGSKKNLL	170
MinD_Ec	DLIMG CER-----RVVYDFVNVIIQGDATLNQALIKDKR TENLYILPASQTRDKDAL TREG	101
	: : * . : : : .	
	WALKER B-Motiv	
Mrp_Cd	VKQFYTDVLWEEELDYLLIDMPPGTGDVALTVMQSIP---ISGIVMVSVP-----	173
MrP_Cp	LNQMFKDTDWEELDYLLIDMPPGTSDITLTVMQTFP---IKELVIVSTP-----	188
Nbp_Ea	LRQFYTDVFLWGDLDYLLIDFPPTGSDLPLTMIHSLPG-GWHNNCFVPARSCKPGYRARIR	171
Mrp_Mj	IRQFLSDVWVWGEELDYLLIDTPPGTGDEQLTIMQSI PD--IDGAIIVTTP-----	183
Mrp_Sc	IKKFLKDVWDKLDYLVIDTPPGTSDHEHISINKYMRESGIDGALVVTTP-----	219
MinD_Ec	VAKVLDDLKAMDFEFIVCDSPAGIETGALMALYFAD-----EAIIT TNP-----	145
	: : . * : : : : * * . * : . . .	
Mrp_Cd	-QDLVSMIVSKAVNMAKMNINVLGV IENMSYIQPCDCKKIKLFEG--ESTEKFLDDLD	230
MrP_Cp	-QDMVSMIVKKLVTMAHKMNV CVRGVVENMAYIEC-ECGKKMRVFSK--KSSEEHA EYLG	244
Nbp_Ea	NHGHSCMIVKKSADMAKRM DVPILGIIENMSYIECPDCKKRINIFGK--SKTEKISKEMR	229
Mrp_Mj	-EEVSVLDVKKSIMMAKMLNIPIIGI IENMSGFVCPYCNKVVDIFGR--GGGEKAAKELG	240
Mrp_Sc	-QEVALLDVRKEIDFCKKAGINILGLVENMSGFVCPNCKGESQIFKAT TGGGEALCKELG	278
MinD_Ec	-EVSSVRSDRILGILASKSRRAENG EPIKEHLLLTRYNPGRVSRGDMLSMEDVLEILR	204
	. : : . . * : : * . :	
Mrp_Cd	LELLGELPMTKEIIDITHNGVTEISDDLD SILT-----NVVEKIK-----	270
MrP_Cp	LPLIGELPINLDL TEALENGKAE EYVAENPLYS-----LIFEGLY-----	284
Nbp_Ea	IELIAHMPIDPKLAELCDEGAIEEY YNINRALVNLLSDEV LKKS-----	274
Mrp_Mj	VEFLGRIPLDIKAREASDKGIPMV--LLDCKAS-EEFKKIVKRIVEKVEGKKE-----	290
Mrp_Sc	IKFLGSVPLDPRIGKSCDMGESFLDNY PDSPAS-SAVLN VVEALRDAVG DV-----	328
MinD_Ec	IKLVGVIPEDQSVLRASNQGE PVILDINADAGK--AYADTVERLLGEERPFRFIEEEKKG	262
	: : : . * . * : : :	

Abb. 45: Ausschnitt aus dem Alignment des Nbp-Proteins aus *E. acidaminophilum* mit ausgewählten Mrp-Proteinen anderer Organismen.

Nbp_Ea: Nukleotid-bindendes Protein aus *E. acidaminophilum* (accession: EMBL CAB71140.1); Cd: *C. difficile*; Cp: *C. perfringens*; Ec: *E. coli*; Sc: *S. cerevisiae*; Mrp: *multi-drug resistance protein*. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern, ähnliche Aminosäuren mit Punkten gekennzeichnet. Das WALKER A- und das putative WALKER B-Motiv sind grau unterlegt.

Möglicherweise handelt es sich bei Nbp um eine in Transportprozesse involvierte ATPase. Dafür spricht, daß im Genom von *C. difficile* direkt stromabwärts eines für ein Mrp-homologes Protein codierenden Gens ein offener Leserahmen existiert, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu Na-abhängigen Transportproteinen aufweist. Das stromabwärts von *nbp* befindliche Gen codiert offenbar für ein Protein mit Ähnlichkeiten zu einem hypothetischen Protein, das in einer Vielzahl von Organismen vorkommt, dessen Funktion jedoch bislang nicht bekannt ist, weshalb auch kein eventueller Zusammenhang mit dem Nbp-Protein abgeleitet werden kann.

Ein in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung lokalisierter offener Leserahmen 2718 bp stromabwärts des *prxU*-Stopcodons codiert für ein Protein, welches starke Ähnlichkeiten zu *ferric uptake regulator*-Proteinen (Fur-Proteine) aufweist. Das korrespondierende Protein umfaßt eine Länge von 152 Aminosäuren und besitzt eine theoretische Masse von 18,0 kDa. Für dieses Gen konnte eine Ribosomenbindestelle 7 bp stromaufwärts des Startcodons identifiziert werden. Eine mögliche

Promotorsequenz lag außerhalb des klonierten Bereiches. Fur-Proteine gehören zu einer Familie von Metall-abhängigen Polypeptiden, die in *E. coli* und einer Reihe anderer Bakterien die intrazelluläre Fe^{2+} -Konzentration der Zelle durch Repression der Gen-Expression regulieren. Unter anaeroben Bedingungen und bei physiologischem pH-Wert ist Fe^{2+} löslich und kann von der Zelle leicht aufgenommen werden. In Gegenwart von Sauerstoff wird Fe^{2+} sehr schnell zu Fe^{3+} oxidiert, welches bei neutralem pH unlösliche Hydroxide bildet und der Zelle nicht mehr zur Verfügung steht. Unter Eisen-reichen Bedingungen bindet das Fur-Protein als Dimer die divalenten Fe^{2+} -Ionen. Die daraus resultierende Änderung der Proteinkonformation macht eine Bindung des Fur-Proteins an eine spezifische DNA-Sequenz (Fur-Box) möglich (POHL, *et al.*, 2003) und führt zur Inhibierung der Transkription der Eisen-regulierten Gene (ESCOLAR, *et al.*, 1999). Neben diesen Proteinen, die hauptsächlich in die Regulation der Fe^{2+} -Homöostase der Zelle involviert sind und für die auch eine Beteiligung sowohl an der Säure-Toleranz, als auch am Schutz vor oxidativem sowie NO-Streß postuliert wurde (HALL & FOSTER, 1996; CRAWFORD & GOLDBERG, 1998), existieren zwei weitere Gruppen von Fur-homologen Proteinen, die sich hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden. Zu der einen gehören die PerR-Proteine, die die an der oxidativen Streß-Antwort beteiligten Gene regulieren und Fe^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Ionen als Co-Repressor binden können (BSAT, *et al.*, 1998, HORSBURGH, *et al.*, 2001; FUAGTHONG, *et al.*, 2002, van VLIET, *et al.*, 1999). Bei der dritten Gruppe handelt es sich um Zn^{2+} bindende Proteine (Zur), die die Aufnahme von Zn^{2+} in die Zelle regulieren (PATZER & HANTKE, 1998; GABALLA & HELMANN, 1998).

In *B. subtilis* existieren ebenso wie in *Staphylococcus aureus* drei Fur-Homologe, die die Gen-Expression in Abhängigkeit von Eisen (Fur), Zink (Zur) und H_2O_2 (PerR) regulieren (BSAT, *et al.*, 1998; GABALLA & HELMANN, 1998; HORSBURGH, *et al.*, 2001). Zu den direkt von PerR negativ regulierten Genen in *B. subtilis* gehört neben *katA* (Katalase), *mrg* (Dps-ähnliches DNA-bindendes Protein), *hemAXCDBL* (Häm-Biosynthese-Operon, *zosA* (Zink-Aufnahme-System) *perR* und *fur* auch das *ahpCF*-Operon welches für Proteine des Alkylhydroperoxid-Reduktase-Systems codiert. Auch in *C. jejuni* wurde unter anderem ein PerR-homologes Regulatorprotein identifiziert, welches die Gene der Alkylhydroperoxidase AhpC, sowie der Katalase KatA in Abhängigkeit der Fe^{2+} -Konzentration reguliert (van VLIET, *et al.*, 1999). Die Transkriptionskontrolle durch ein Fur-ähnliches Protein wurde auch für das Gen des Virulenzfaktors KatG, einer Katalase-Peroxidase in *M. tuberculosis* nachgewiesen. In diesem Fall besitzt Fur jedoch im Gegensatz zu PerR keinen Einfluß auf die Transkription der Sauerstoffstreß-Gene *ahpC* und *sodA* dieses Organismus (PYM, *et al.*, 2001). Eine Beteiligung eines Fur-Proteins an der oxidativen Streßantwort ist auch für *E. coli* beschrieben worden, dessen *fur*-Gen durch den durch H_2O_2 induzierbaren Transkriptionsregulator OxyR gesteuert wird (ZHENG, *et al.*, 1999). Eine Regulation der Superoxid-Dismutase-Gene *sodA* und *sodB* dieses Organismus durch ein Fur-Protein wurde bereits 1990 von NIEDERHOFFER, *et al.*, 1990 nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Bindung der Fur-Proteine innerhalb der Promotor-Region des regulierten Gens an einer Fur-spezifischen Operator-Sequenz (FUAGTHONG, *et al.*,

2002; NIEDERHOFFER, *et al.*, 1990). Diese umfaßt in *E. coli* 19 bp und kann als palindromische Sequenz, bestehend aus zwei 9 bp großen *inverted repeats*, interpretiert werden (ESCOLAR, *et al.*, 1999, s. Abb. 46 B1). Die Sequenz-Abfolge kann jedoch auch als Kombination von drei aufeinanderfolgenden Hexameren (zwei gerichtete und ein invertiertes) verstanden werden, für die sich eine allgemeine Consensussequenz mit $\text{NAT}^{\text{A}}/\text{TAT}$ ableiten läßt (DALET, *et al.*, 1999, s. Abb. 46 B2). Eine entsprechende Operator-Sequenz für die Erkennung durch das Fur-homologe Protein PerR (Per-Box) konnte für eine Reihe von Gram-positiven Bakterien in Assoziation mit oxidativen Stress-Genen identifiziert werden (BSAT, *et al.*, 1998). Als Beispiel sei *B. subtilis* genannt, dessen 15 bp umfassende Per-Box-Consensussequenz TTATAATnATTATAA somit aus zwei gegenläufigen Heptameren (7-1-7) besteht (FUAGTHONG, *et al.*, 2002, s. Abb. 46). Trotz der hohen Ähnlichkeiten zwischen Fur- und Per-Box ist letztere für die Bindung von PerR spezifisch und wird vom Fur-Regulator-Protein nicht erkannt (BAICHO & HELMANN, 2002). Die Promotorregion von *prxU* aus *E. acidaminophilum* wies einen 17 bp umfassenden DNA-Bereich auf, der hohe Ähnlichkeit zu genannten Operator-Sequenzen besaß (s. Abb. 46 A). Aus dieser ließen sich ebenfalls zwei Heptamere ableiten, von denen jeweils 5 bp identisch waren und gegenläufig in der Anordnung 7-1-7 orientiert waren (s. Abb. 46 B). Die Sequenzabfolge $\text{ATTAAG}^{\text{G}}/\text{T}^{\text{A}}/\text{T}$ wies dabei eher eine Sequenzähnlichkeit zu der aus der *B. subtilis* Per-Box abgeleiteten Heptamersequenz als zu den entsprechenden Fur-Operatoren auf (s. Abb. 46 C).

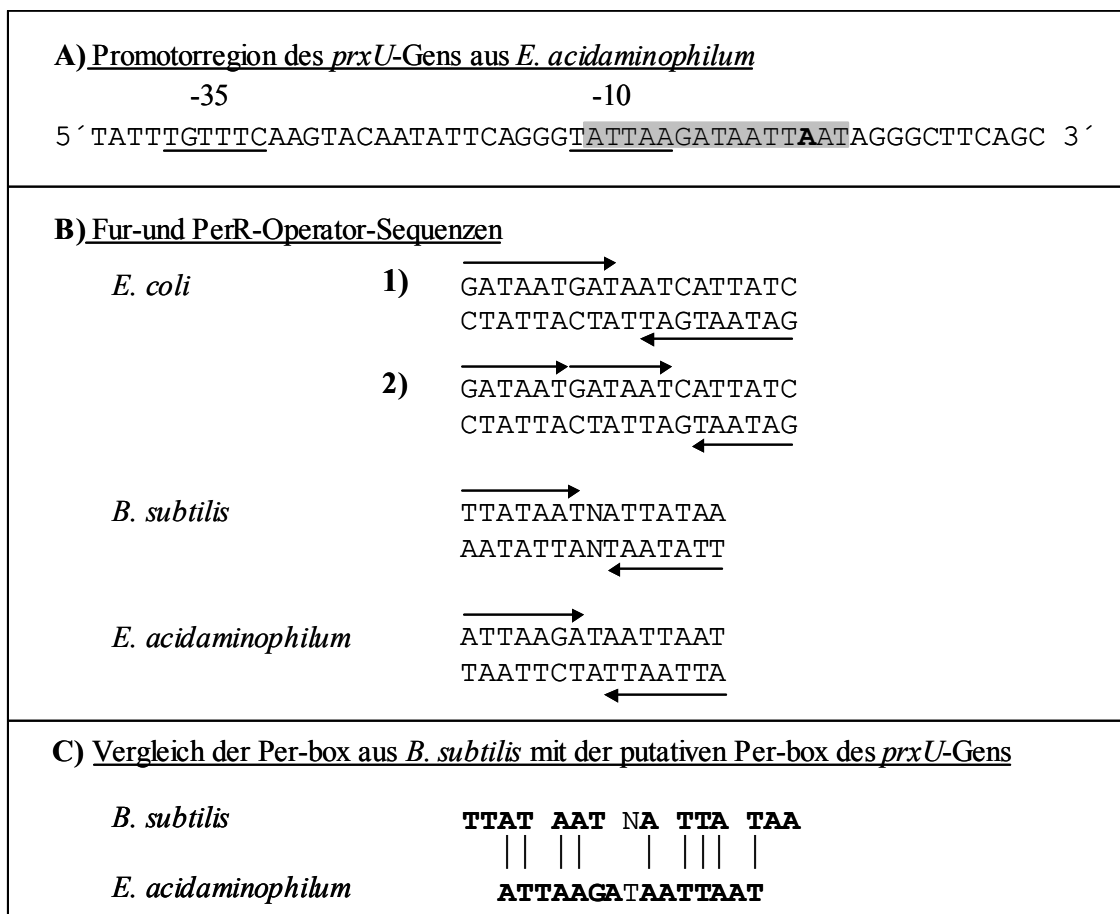


Abb. 46.: Putative Fur-Operator-Sequenz im Promotorbereich von *prxU*
Legende umseitig.

Legende Abb. 47:

A: Promotorbereich des *prxU*-Gens aus *E. acidaminophilum*: die -10 und -35 Region ist unterstrichen, der Transkriptionsstartpunkt fett gedruckt und die putative Per-Box-Sequenz grau unterlegt.

B: Vergleich der Fur-Consensussequenz aus *E. coli* (1): zwei entgegengesetzte *repeats*; 2): drei repeats; zwei gerichtet, eins entgegengesetzt) und der Per-Box aus *B. subtilis* mit einer putativen PerR-Operator-Sequenz des *prxU*-Gens aus *E. acidaminophilum*. Die repetitiven Sequenzen sind durch Pfeile gekennzeichnet, die Orientierung der Sequenzabfolge angeben.

C: Sequenzvergleich der putativen Per-Box des PrxU-Gens aus *E. acidaminophilum* mit der Per-Box Consensussequenz aus *B. subtilis*.

Das Vorhandensein einer putativen Per-Box stromaufwärts des *prxU*-Gens, sowie die für PrxU beobachtete Aktivität als Linolsäurehydroperoxid-Reduktase und damit dessen Involvierung in eine oxidative Streßantwort lassen eine Regulation durch ein PerR-Protein sinnvoll erscheinen. Ob es sich bei diesem Protein jedoch um das Genprodukt des stromabwärts von PrxU gelegenen *fur*-Gens handelt, kann anhand von Sequenzanalysen allein nicht geklärt werden. Für eine Beteiligung spricht die Tatsache, daß in *B. subtilis* und *M. tuberculosis* die entsprechenden Regulatorgene ebenfalls in unmittelbarer Genumgebung eines regulierten Gens, im Fall von *B. subtilis* des *ahpCF*-Operons (BSAT, *et al.*, 1998) und in Fall von *M. tuberculosis* des für den Virulenzfaktor kodierenden *katG*-Gens, lokalisiert sind (PYM, *et al.*, 2001). An den Beispielen von *E. coli*, *B. subtilis* und *C. jejuni*, sowie an einer Reihe mikrobieller Gesamtgenome wurde gezeigt, daß die Organismen mehr als eins der bereits erwähnten Fur-Homologen exprimieren können. Die Vertreter der Gruppen Fur, PerR und Zur weisen untereinander hohe Homologien in ihrer Primärstruktur auf, so daß eine funktionelle Zuordnung aufgrund ihrer Sequenzeigenschaften nicht möglich ist. Vergleicht man die abgeleitete Proteinsequenz des Fur-Proteins aus *E. acidaminophilum* mit ausgewählten Fur-, PerR- und Zur-Proteinen verschiedener Organismen, erhält man die höchsten Identitäten zu einem Fur-homologen Protein (Fur1) aus dem mit *E. acidaminophilum* nahe verwandten *C. difficile*, sowie zu dem bereits erwähnten Fur- und Zur-Protein aus *B. subtilis* (s. Tab. 22). Im Genom von *C. difficile* (www.sanger.ac.uk) konnte ein weiteres für ein Fur-homologes Protein (Fur2) codierendes Gen identifiziert werden, in dessen unmittelbarer Genumgebung ein Gen für Ruberythrin, ein H₂O₂-reduzierendes Protein und somit in die Antwort auf oxidativen Stress involviertes Protein (COULTER & KURTZ, 2001), lokalisiert ist. Dieses ist mit der Situation in *E. acidaminophilum* vergleichbar .

Tab. 22: Vergleich der Fur-Proteine aus *E. acidaminophilum* und anderen Organismen

Organismus	Protein	accession no.	Referenz	Identität [%] ¹
<i>C. difficile</i>	Fur1	–	www.sanger.aci.uk	25,9
<i>B. subtilis</i>	Fur	P54574	(BSAT, <i>et al.</i> , 1998)	25,6
<i>B. subtilis</i>	Zur	P54479	(GABALLA & HELMANN, 1998)	22,9
<i>C. jejuni</i>	Fur	NP_281590	(PARKHILL, <i>et al.</i> , 2000)	22,6
<i>B. subtilis</i>	PerR	P71086	(BSAT, <i>et al.</i> , 1998)	22,1
<i>C. difficile</i>	Fur2	–	www.sanger.aci.uk	21,7
<i>C. jejuni</i>	PerR	NP_281513	(PARKHILL, <i>et al.</i> , 2000)	20,1
<i>E. coli</i>	Fur	CAA26429	(ZHENG, <i>et al.</i> , 1999)	16,3

¹Die Identitäten wurden mit dem Programm LALIGN (www.expasy.ch) berechnet.

Fur_Bs	EG----DLLEDVEEIIERDWFKIKDHRLLTFHGI	CHRCNGK-ETE---	149
Fur1_Cd	KE----DLLDNIEKEIQSLYKFKILDHDVKFYGL	CDECNGVSDSEE--	152
Fur_Ec	-----	-----	
Fur_Cj	EN----PIIERQQALIAKEHGFKLTGHLMQLYGV	CGDCNNQKAKVKI-	157
Fur2_Cd	ES----EVLNQLQELISDETDIKITSYNISFKGI	CNNCKRCSQVG---	129
PerR_Bs	HY----PGLDEVEQLAAHVTFGFKVSHHRLIYGV	CQECSSKKENH----	145
PerR_Cj	SF----KDAKLYEYQEHLEKKIGNLVNHLVSVCAV	VDNCKKCH-----	136
Zur_Bs	ES----CPMD---KLCDDLGYQVSGHKFEIYGT	CPDCTAENQENTTA	145
Fur_Ea	NDRRIFKDMLMQRDYIEETYNVDVIDDVTVMRGV	CSSCKKDVNVA---	152

Abb. 47: Alignment des Fur-homologen Proteins aus *E. acidaminophilum* und anderer Fur-Proteine

Fur_Bs: Fur-Protein *B. subtilis*; Fur1_Cd: putatives Fur1-Protein *C. difficile*; Fur_Ec: Fur-Protein *E. coli*; Fur_Cj: Fur-Protein *C. jejuni*; Fur2_Cd: putatives Fur2-Protein *C. difficile*; PerR_Bs: PerR-Protein *B. subtilis*; PerR_Cj: PerR-Protein *C. jejuni*; Zur_Bs: Zur-Protein *B. subtilis*; Fur_Ea: putatives Fur-Protein *E. acidaminophilum*. Das *helix-turn-helix*-Motiv der Fur-homologen Proteine ist hellgrau unterlegt. Eine putative DNA-Bindedomäne im Fur-Protein von *E. acidaminophilum* ist dunkelgrau unterlegt. Die konservierten Sequenzmotive CxxCG, CxxC, sowie die Histidin-reiche Region sind eingerahmt.

Über die molekulare Wirkungsweise der Fur-homologen PerR-Proteine hinsichtlich ihrer Funktion als Peroxid-Sensor ist bislang noch nicht viel bekannt. Es wird postuliert, daß beispielsweise durch H_2O_2 die an der regulatorischen oder an der strukturellen Metallbindung beteiligten Cysteine zu Disulfid-Brücken oxidiert und damit die Bindungsaffinität zum regulatorischen Metallion gesenkt wird, was wiederum eine Änderung der Proteinkonformation und Dissoziation des Regulatorproteins von der DNA-Operator-Sequenz zur Folge hat (HERBIG & HELMANN, 2001; MONGKOLUSK & HELMANN, 2002). Die Änderungen des Redox-Status von Cysteinen als Sensor für Peroxide findet man auch in dem zur LysR-Familie gehörende Transkriptionsregulator OxyR, der in die Regulation Peroxid-induzierter Gene involviert ist. OxyR ist besonders in *E. coli* gut untersucht, in dem er unter anderem die Expression der Gene *katG*, *ahpC/F* und *dps*, sowie *grxA* (Glutaredoxin), *fur* und *oxyS* kontrolliert (ZHENG & STORZ, 2000; MONGKOLUSK & HELMANN, 2002). OxyR besitzt zwei redoxaktive Cysteine, die durch H_2O_2 zu einer Disulfid-Brücke oxidiert werden. Die aus der Oxidation resultierende Konformationsänderung führt zur Veränderung der DNA-Bindung von OxyR und damit zur Aktivierung der Gen-Expression (ZHENG, *et al.*, 1998; MONGKOLUSK & HELMANN, 2002). Als weiteres Beispiel in diesem Zusammenhang sind die OhrR-verwandten Proteine (*organic hydroperoxide resistance*) aus *Xantomonas campestris* und *B. subtilis* zu nennen. Diese Proteine sind ebenfalls in die Regulation Sauerstoff-Streß-induzierter Gene involviert, besitzen jedoch nur einen konservierten Cystein-Rest, dessen SH-Gruppe durch Peroxide zur Sulfen-Säure oxidiert wird. Die damit einhergehende Konformationsänderung führt zum Verlust der DNA-Bindung und damit der Repressorwirkung (FUANGTHONG & HELMANN, 2002; MONGKOLUSK & HELMANN, 2002). In Bezug auf die Wirkungsweise Fur-Homologer Proteine bestehen noch eine weitere Möglichkeit. Demnach wird auch die direkte Oxidation des regulatorisch gebundenen Metallions durch H_2O_2 diskutiert. Neben der daraus resultierenden Dissoziation des oxidierten Ions könnte eine lokale Produktion von Hydroxylradikalen (generiert durch die Reaktion von H_2O_2 mit gebundenem Fe^{2+}) zur Oxidation von mehreren Aminosäure-Resten in der Nähe der Metallbindungsstelle und damit zur Inaktivierung des Proteins und zur Derepression des regulierten Gens führen (MONGKOLUSK & HELMANN, 2002). Für diese Theorie spricht die durch AUTREAU, *et al.*, 2002 nachgewiesene

direkte Nitrosylierung des regulatorischen Fe^{2+} -Ions durch NO im Fur-Protein aus *E. coli*, welches vermutlich in die Regulation von NO-stressinduzierten Enzymen involviert ist.

4.4.3. PrxU-Eine Linolsäurehydroperoxid-Reduktase

Untersuchungen mit Rohextrakt von *E. acidaminophilum* zeigten das Vorhandensein einer NADPH-abhängigen Peroxidase-Aktivität für die Substrate H_2O_2 , Cumolhydroperoxid und *t*-Butylhydroperoxid (PARTHER, 1998; SÖHLING, *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine entsprechende Aktivität auch für das Fettsäure-Derivat Linolsäurehydroperoxid nachgewiesen werden. Diese betrug 0,25 U/mg im Rohextrakt und war um das ca. 16-fache höher als die Aktivitäten, die für die Substrate H_2O_2 , Cumolhydroperoxid und *t*-Butylhydroperoxid bestimmt wurden. Die DTT-abhängige Linolensäurehydroperoxid-Reduktase-Aktivität von Rohextrakt belief sich jedoch nur auf ca. 0,025 U/mg im Vergleich zu 0,15 U/mg für die Substrate H_2O_2 , *t*-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid, welches möglicherweise auf die niedrigere Affinität des artifiziellen Elektronendonors DTT im Vergleich zum bislang noch unbekanntem nativen Elektronendonoren zurückzuführen sein könnte. Die DTT-abhängige Reduktion von H_2O_2 , Cumolhydroperoxid und *t*-Butylhydroperoxid sowie die NADPH-abhängige Peroxidreduktion von Cumolhydroperoxid erfolgte dabei durch Protein B (bzw. dessen Selenocystein-haltige Untereinheit GrdB) des Glycin-Reduktase-Komplexes (s. 3.3.), auf dessen Reinigung und Charakterisierung hinsichtlich seiner Peroxidase-Aktivität bereits im Kapitel 4.2. näher eingegangen wurde. Das rekombinante Seleno-Peroxiredoxin PrxU zeigte jedoch im Hinblick auf die genannten Substrate keine enzymatische Aktivität. Im Gegensatz zu Protein B war es jedoch in der Lage, die DTT-abhängige Reduktion von Linolsäurehydroperoxid zu katalysieren.

Bei der Linolsäure (9,12-Octadecadiensäure), handelt es sich um eine 2fach ungesättigte, 18 C-Atome enthaltende Fettsäure. Die gezielte Peroxidation mittels der verwendeten 9-Lipoxygenase aus Sojabohnen erfolgte dabei am C_9 -Atom der Fettsäure. Lipidperoxide bzw. Fettsäureperoxide entstehen *in vivo* zum einen auf enzymatischem Wege ebenfalls durch die Reaktion von Lipoxygenasen oder α -Dioxygenasen (FEUSSNER, *et al.*, 2001 und zum anderen durch die nichtenzymatische Reaktion beispielsweise von Singulett-Sauerstoff, Ozon, HOO^\bullet - und OH^\bullet -Radikalen (FARR & KOGOMA, 1991; FEUSSNER & WASTERNAK, 2002). Diese Substanzen gelten als Initiatoren der Lipidperoxidation und führen dadurch zur oxidativen Schädigung von Zell-Membranen (FARR & KOGOMA, 1991; KIM, *et al.*, 2002). Die Lipidperoxidation umfaßt drei Schritte: Initiation, Verbreitung und Termination. Die bereits erwähnte Initiation der Reaktion resultiert in der Abstrahierung eines Wasserstoffatoms an einer C=C-Bindung, welches zur Ausbildung eines Fettsäure-Radikals führt. Diese Radikal ist in der Lage z. B. mit molekularem Sauerstoff unter Bildung eines Lipid-Peroxy-Radikals (ROO^\bullet) weiterzureagieren, welches wiederum als Initiator für die Peroxidation eines weiteren Fettsäure-Moleküls durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms (Bildung

von ROOH) fungieren kann (s. Abb. 48) (FARR & KOGOMA, 1991; FEUSSNER & WASTERACK, 2002). Auch die Übertragung eines Elektrons von NADH auf das Hydroperoxid resultiert in der Bildung von Lipid-Radikalen (KAPPUS, 1985; FARR & KOGOMA, 1991).

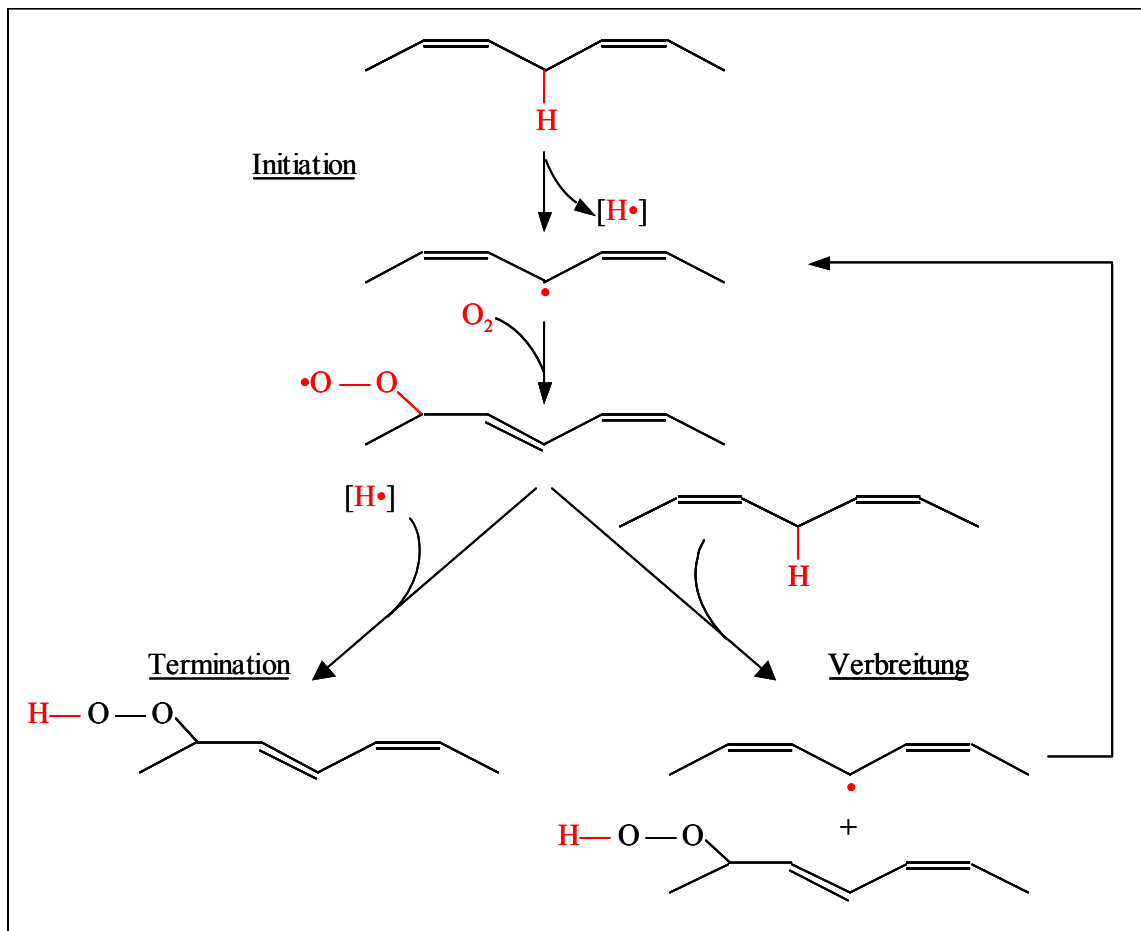


Abb. 48: Schematische Darstellung der Fettsäureperoxidation am Beispiel einer 1,4-Pentadien-Einheit

Lipid-Alkoxy-Radikale sind in der Lage, C–C-Bindungen unter Bildung von ungesättigten Fettsäure-Aldehyden und -Alkyl-Radikalen zu spalten. Diese Reaktion resultiert in kurz-kettigen Molekülen, sowie in der Bildung von Ketonen, Epoxiden und Alkanen (BENEDETTI, *et al.*, 1984; KAPPUS, 1985; MEAD, 1976; FARR & KOGOMA, 1991; YOON, *et al.*, 2002). Die Verkürzung der Fettsäure-Ketten bzw. die Zunahme der Ladung führt zur Veränderung der Beweglichkeit innerhalb der Membran und zu einem Verlust der strukturellen Integrität der Membran (MEAD, 1976; McELHANEY, 1985), die essentiell für Transportprozesse und die Aufrechterhaltung der osmotischen Balance ist (DILLS, *et al.*, 1990). Ein weiterer Punkt ist die Mutagenität der durch die Lipidperoxidation entstandenen Intermediate und Endprodukte. So resultiert beispielweise die direkte Reaktion von Epoxiden, 4-Hydroxyalkenalen und anderen Aldehyden mit DNA in der Alkylierung von Basen (SEGEBACK, 1983; FARR & KOGOMA, 1991; YOON, *et al.*, 2002), sowie in der Bildung von inter- bzw. intramolekularen Vernetzungen (SUMMERFEILD & TAPPEL, 1983; (FARR & KOGOMA, 1991). Auch kann es durch die Reaktion der genannten Produkte zur Inaktivierung von Proteinen kommen (CHIO & TAPPEL, 1969; YOON, *et al.*, 2002).

Aufgrund der massiven Schädigung durch Lipidperoxidation haben Zellen wirksame spezifische Mechanismen zur Entgiftung von Fettsäure- bzw. Phospholipidhydroperoxiden entwickelt, die hauptsächlich in eukaryotischen Systemen gut untersucht sind. Zu diesen gehören beispielsweise die vier Selenocystein-haltigen Säuger-Glutathion-Peroxidasen, von denen die cytosolischen Vertreter Gpx 1 und 2 ein breites Substrat-Spektrum von H_2O_2 bis zu Cholesterol- und längerkettigen Fettsäurehydroperoxiden besitzen (SUNDE, 1989; CHU, *et al.*, 1993). Bei Gpx 3 handelt es sich um ein Plasmaprotein mit ebenfalls antioxidativer Funktion (TAKAHASHI, *et al.*, 1987; ARTHUR, 2000). Gpx 4 oder meist auch als Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase bezeichnet, vermag im Gegensatz zu Gpx1-3 ein breites Spektrum an Lipidperoxiden umzusetzen und stellt dabei ein wichtiges Membran-Reparatursystem in Säuger-Organismen dar (URSINI, *et al.*, 1995). Die Fähigkeit zur Reduktion von organischen Peroxiden und Lipidhydroperoxiden in Säugern ist auch für Glutathion-S-Transferasen (HAYES & STRANGE, 1995; HAYES & Mc LELLAN, 1999) bzw. für die menschliche Thioredoxin-Reduktase beschrieben worden (BJÖRNSTEDT, *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu eukaryotischen sind bakterielle Zellmembranen hauptsächlich aus gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren aufgebaut, was die Bildung von Lipidperoxiden generell minimiert. Jedoch sprechen einige Beispiele für das Vorhandensein eines entsprechenden bakteriellen Reparatursystems, in das hauptsächlich Peroxiredoxine bzw. Peroxiredoxin-ähnliche Proteine involviert sind. Ein aus *E. coli* isoliertes Bacterioferritin-assoziiertes Protein, ein Vertreter der Peroxiredoxin-Familie, besaß die höchste enzymatische Aktivität für Linolsäurehydroperoxid im Vergleich zu den Substraten H_2O_2 und *t*-Butylhydroperoxid (JEONG, *et al.*, 2000). Dieses Protein besitzt ein redoxaktives Cystein, weist jedoch nur geringe Homologien zu den 'klassischen' 1-Cys-Peroxiredoxinen auf. Eine ebenfalls in *E. coli* identifizierte, periplasmatisch lokalisierte Thiol-Peroxidase (CHA & KIM, 1995) ist in der Lage, 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (15 HPETE), allerdings nur in Konzentrationen von 2-6 μM , umzusetzen (BAKER & POOLE, 2003). Das AhpC-Protein aus *M. tuberculosis* zeigte die höchste enzymatische Aktivität für Cholesterolhydroperoxid und für Cumolhydroperoxid, jedoch nur eine schwache Affinität zu H_2O_2 (HILLAS, *et al.*, 2000). PrxU aus *E. acidaminophilum* stellt neben genannten Proteinen ein weiteres Beispiel für eine bakterielle Fettsäureperoxid-Reduktase dar und spricht für die Existenz eines Lipid-Reparatur-Mechanismus in dem strikt anaeroben Organismus. Im Gegensatz zu den oben genannten Proteinen aus *E. coli* und *M. tuberculosis*, die ein breites Substrat-Spektrum besitzen, zeigte PrxU nur eine enzymatische Aktivität mit dem Fettsäurehydroperoxid und nicht wie üblicherweise erwartet mit H_2O_2 , Cumolhydroperoxid und *t*-Butylhydroperoxid. Möglicherweise ist für diese Substrate ebenfalls eine sehr geringe enzymatische Aktivität vorhanden, die jedoch innerhalb der verwendeten Substratkonzentrationen mit dem genutzten Enzymtest nicht detektierbar war. Die fehlende Aktivität könnte auf das Vorhandensein einer Substratbindestelle, die spezifisch für hydrophobe, aliphatische, organische Hydroperoxide ist, zurückzuführen sein.

PrxU enthält im Gegensatz zu den oben aufgeführten Peroxiredoxinen im katalytischen Zentrum ein Selenocystein, welches möglicherweise in Verbindung mit anderen Abweichungen in diesem Segment die Spezifität der Substratbindung beeinflusst (vgl. 4.4.1.). Die essentielle Bedeutung des Selenocysteins für die enzymatische Aktivität von PrxU wurde durch den vollständigen Verlust der Aktivität durch den Austausch des Selenocysteins zu Cystein gezeigt (s. 3.7.2.5.). Im allgemeinen ist stets ein erhebliches Absinken der Aktivität von Seleno-Proteinen nach Austausch der Selenol-Gruppe zu einer Thiol-Gruppe zu beobachten (AXLEY, *et al.*, 1991; (BERRY, *et al.*, 1991; ROCHER, *et al.*, 1992; URSINI, *et al.*, 1995) welches auf den geringeren nukleophilen Charakter, sowie die verminderte Dissoziationsfähigkeit der SH-Gruppe gegenüber der Selenol-Gruppe zurückzuführen ist. Demnach hätte man einerseits ein pH-Optimum im neutralen bzw. schwach sauren Bereich für das Seleno-Peroxiredoxin aus *E. acidaminophilum* erwarten können. Im Gegensatz dazu wurde jedoch die höchste enzymatische Aktivität bei einem pH Wert von ca. 8,0 erhalten (s. 3.7.2.5.2.). Ähnliches ist auch für die Selenocystein-haltige Gpx 4 und die entsprechende Cystein-Mutante durch MAIORINI, *et al.*, 1995 beschrieben worden. Beide Enzyme wiesen ein pH-Optimum bei 8,2 auf, welches nahelegt, daß die pH-Abhängigkeit dieser Enzyme nicht allein durch die Dissoziationsfähigkeit des Nukleophils, in diesem Fall des Selenocysteins begründet ist (ROCHER, *et al.*, 1992), sondern auch von dem Vorhandensein anderer Aminosäuren abhängt. So konnte für Gpx 4 gezeigt werden, daß innerhalb der katalytischen Triade (bestehend aus dem Selenocystein- bzw. Cystein-Rest, einem Glutamin- und einem Tryptophan-Rest) sowohl das Selenocystein, als auch das durch Mutation eingeführte Cystein bei intrazellulärem pH-Wert dissoziiert vorlagen (MAIORINI, *et al.*, 1995).

Ein direkter Vergleich der für PrxU erhaltenen Enzymaktivitäten mit aus der Literatur bekannten Daten ist nicht möglich, da die Aktivitäten der entsprechenden Proteine stets unter Einbeziehung des nativen Enzymsystems, des Thioredoxin-System oder des Glutathion-Systems bestimmt wurden (FISHER, *et al.*, 1999; JEONG, *et al.*, 2000; CHU, *et al.*, 1993). Die unterschiedlichen Enzymaktivitäten der DTT- bzw. der NADPH-abhängigen Reduktion von Linolsäurehydroperoxid im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* (DTT: 0,025 U/mg, NADPH: 0,25U/mg) verdeutlichen den Einfluß der unterschiedlichen Elektronendonatoren auf die Aktivität. Wie bereits erwähnt, benötigen Peroxiredoxine mindestens eine weitere Enzymkomponente, um das im Zuge der Enzymreaktion oxidierte Protein zu reduzieren und einem neuen Reaktionszyklus zuzuführen (JACOBSON, *et al.*, 1989). Die Übertragung der Elektronen von NAD(P)H erfolgt dabei entweder durch ein zur Familie der NADH:Peroxiredoxin Oxidoreduktasen gehörendes Protein, wie es erstmals für das AhpC/AhpF-System aus *S. typhimurium* beschrieben wurde (JACOBSON, *et al.*, 1989), oder durch das Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-System (CHAE, *et al.*, 1994). Für menschliche 1-Cys-Peroxiredoxine ist, vergleichbar mit Glutathion-Peroxidasen, das Glutathion als Elektronendonator identifiziert worden (FISHER, *et al.*, 1999; MANEVICH, *et al.*, 2002). Die Re-Reduktion der Tryparedoxin-Peroxidase erfolgt durch das für Trypanosomen spezifische Thioredoxin-ähnliche Tryparedoxin, das wiederum durch Trypanthionin und einer NADPH-abhängigen Trypanothionin-

Reduktase reduziert wird (d. h. das System zur Reduktion umfaßt drei Komponenten) (NOGOCEKE, *et al.*, 1997). Auch Glutaredoxin ist kürzlich als natürlicher Elektronendonator pflanzlicher und bakterieller Peroxiredoxine beschrieben worden (ROUHIER, *et al.*, 2001; REYNOLDS, *et al.*, 2002).

Das Vorhandensein einer NADPH-abhängigen Linolsäurehydroperoxid-Reduktase im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* sowie die Kenntnisse über die zentrale Stellung des Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-Systems im Stoffwechsel dieses Organismus (DIETRICH, *et al.*, 1991b; LÜBBERS & ANDRESEN, 1993) ließen eine Beteiligung der Proteine an dieser Reaktion vermuten. Die Reduktion von Linolsäurehydroperoxid durch PrxU konnte jedoch *in vitro* nicht mit aktivem, rekombinanten Thioredoxin, Thioredoxin-Reduktase und NADPH komplementiert werden (s. 3.7.2.5.). Ein möglicher Grund dafür könnte in der irreversiblen Oxidation einer oder mehrerer Protein-Komponenten durch das eingesetzte Peroxid (100 µM) bestehen. Möglich wäre auch das Fehlen eines zusätzlichen Faktors, beispielsweise eines niedermolekularen Bio-Thiols, vergleichbar mit dem Glutathion bei der Reduktion menschlicher 1-Cys-Peroxiredoxine (MANEVICH, *et al.*, 2002; FISHER, *et al.*, 1999) bzw. dem in Mycobakterien vorkommenden Myco-Thiol (NEWTON, *et al.*, 1996; NEWTON & FAHEY, 2002), dessen Beteiligung an der Reduktion von AhpC aus *M. tuberculosis* diskutiert wird (CHAUHAN & MANDE, 2001). Für eine solche Theorie spricht der postulierte, von 2-Cys-Peroxiredoxinen abweichende Reaktionsmechanismus der 1-Cys-Peroxiredoxine. Zunächst wird in beiden Fällen das N-terminale Cystein durch das Substrat zur Sulfen-Säure (-SOH) oxidiert (HIROTSU, *et al.*, 1999; SCHRÖDER, *et al.*, 2000; CHOI, *et al.*, 1998; POOLE, *et al.*, 1997). Im Falle der 2-Cys-Peroxiredoxine reagiert die SH-Gruppe des zweiten, C-terminalen Cysteins eines anderen Proteinmoleküls mit der -SOH-Gruppe unter Wasserabspaltung und Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbindung. Diese wird dann durch Di-Thiole wie z. B. Thioredoxin oder NADH:Peroxiredoxin Oxidoreduktasen reduziert (HOFMANN, *et al.*, 2002).

Die Mutation des distalen Cysteins zu Serin führte bei 2-Cys-Peroxiredoxinen zum Verlust der Thioredoxin-abhängigen Peroxidase-Aktivität (CHAE, *et al.*, 1993; MONTEMARTINI, *et al.*, 1999; FLOHÉ, *et al.*, 2002b; ELLIS & POOLE, 1997a). Die Fähigkeit, die durch Fe²⁺/DTT/O₂-vermittelte Inaktivierung der Glutamin-Synthetase zu verhindern, blieb in diesen Mutanten jedoch erhalten (CHAE, *et al.*, 1993; FLOHÉ, *et al.*, 2002b). Offensichtlich vermag, im Gegensatz zu einem niedermolekularen Elektronendonator wie DTT, das Thioredoxin nicht direkt mit der -SOH-Gruppe zu reagieren (HOFMANN, *et al.*, 2002). Dieses steht im Einklang mit dem für 1-Cys-Peroxiredoxine postulierten Reaktionsmechanismus. Auch hier erfolgt zunächst die Peroxidation über Ausbildung einer intermolekularen Disulfid-Bindung, jedoch im Gegensatz zu 2-Cys-Peroxiredoxinen nicht mit einem weiteren Peroxiredoxin-Molekül, sondern mit einem verfügbaren Thiol, welches dabei zusätzlich als reduzierende Komponente fungiert (HOFMANN, *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wurde für einige dieser Peroxiredoxine, ein niedermolekulares Thiol, das Glutathion als Elektronendonator nachgewiesen (FISHER, *et al.*, 1999; KAWAZU, *et al.*, 2000). Als

prokaryotisches Beispiel sei *Chromatium gracile* genannt. In diesem Organismus existiert ein Peroxiredoxin-Glutaredoxin-Chimärenprotein, welches das in diesen Spezies vorkommende Glutathionamid als Elektronendonator nutzt (VERGAUWEN, *et al.*, 2001).

Der 1-Cys-Peroxiredoxin-Charakter von PrxU aus *E. acidaminophilum* läßt vermuten, daß Thioeredoxin auch in diesem Fall nicht direkt mit dem Seleno-Peroxiredoxin reagieren kann, sondern möglicherweise eine bislang unbekannte, niedermolekulare Thiol-haltige Verbindung (Bio-Thiol) benötigt. *E. acidaminophilum* besitzt wie viele andere Gram-positive Bakterien kein Glutathion (B. SÖHLING, persönliche Mitteilung), jedoch gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von ähnlichen, niedermolekularen Verbindungen im Rohextrakt dieses Organismus (D. GRÖBE, persönliche Mitteilung). Abb. 49 zeigt einen möglichen Reaktionsmechanismus für das Seleno-Peroxiredoxin aus *E. acidaminophilum*. Demnach wird die Selenol-Gruppe des Selenocysteins von PrxU durch Linolsäurehydroperoxid (R-OOH) zur selenenigen Säure (-Se-OH) oxidiert. Durch die Reaktion mit einem geeigneten Elektronendonator, möglicherweise einem niedermolekularen Bio-Thiol (R-SH, bzw. HS-R-SH) kommt es zur H₂O-Abspaltung und zunächst zur Ausbildung eines Selenyl-Sulfids. Die Reduktion dieser Bindung kann anschließend durch ein weiteres Molekül des Thiols (im Fall eines Mono-Thiols) oder durch eine weitere SH-Gruppe desselben Moleküls (Di-Thiol) erfolgen. Die erstgenannte Möglichkeit korrespondiert mit dem Reaktionsmechanismus von Glutathion-Peroxidasen (EPP, *et al.*, 1983) und Glutathion-abhängigen Peroxiredoxinen (FISHER, *et al.*, 1999; MANEVICH, *et al.*, 2002).

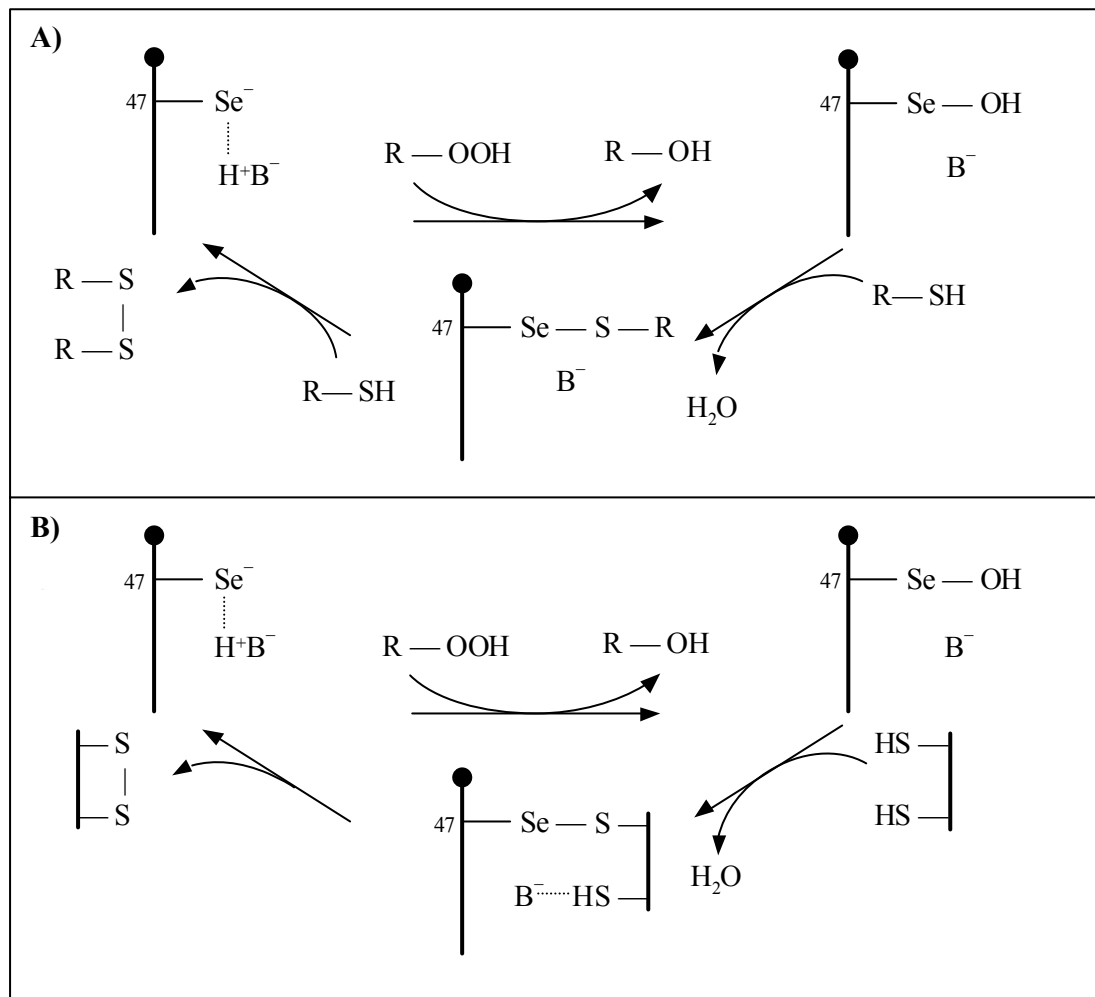


Abb. 49: Schematische Darstellung des postulierten Reaktionsmechanismus von PrxU in Anlehnung an HOFMANN *et al.* 2002

Die Reduktion der selenigen Säure durch A): eine Mono-Thiol-haltige Verbindung und B): einem Dithiol.
B : Base; R: Rest.

4.4.4. Die native Struktur von PrxU

Struktur und Reaktionsmechanismus sind inzwischen vor allem für Vertreter der 2-Cys-Peroxiredoxine gut untersucht. 2-Cys-Peroxiredoxine existieren stets als Homodimere, deren Monomere in einer *head to tail*-Anordnung lokalisiert sind und somit leicht eine Disulfid-Bindung zwischen dem N-terminalen Cystein der einen Untereinheit und dem C-terminalen Cystein der anderen Untereinheit ausbilden können (CHAE, *et al.*, 1994; HIROTSU, *et al.*, 1999; SCHRÖDER, *et al.*, 2000; ELLIS & POOLE, 1997a). Zu dieser Bindung kommt es wie bereits im Kapitel 4.4.3. beschrieben während des Reaktionszyklus, in dem zunächst die durch einen hochkonservierten Argininrest (vgl. 4.4.1.) aktivierte Sulfhydryl-Gruppe des proximalen Cysteins durch das Peroxid-Substrat zur Sulfen-Säure (–SOH) oxidiert wird (HIROTSU, *et al.*, 1999; SCHRÖDER, *et al.*, 2000; CHOI, *et al.*, 1998; ELLIS & POOLE, 1997b) und anschließend mit der Sulfhydryl-Gruppe des distalen Cysteins der anderen Untereinheit unter H₂O-Abspaltung eine Disulfid-Brücke ausbildet (HOFMANN, *et al.*, 2002). Nach Anzahl ihrer redoxaktiven Zentren sind die Homodimere der 2-Cys-

Peroxiredoxine in der Lage zwei Moleküle Peroxid-Substrat zu reduzieren und zwei Disulfid-Brücken auszubilden (DIETZ, *et al.*, 2002). Für das menschliche 1-Cys-Peroxiredoxin PrxVI (KANG, *et al.*, 1998) wurden durch Kristallstrukturanalysen ebenfalls fest assoziierte Dimere identifiziert, die jedoch nicht über kovalente Bindungen verfügen (CHOI, *et al.*, 1998). Für die rekombinanten Proteine PrxU und PrxU47C aus *E. acidaminophilum* konnte nur eine geringe Veränderungen der Proteinstruktur unter oxidierenden Bedingungen beobachtet werden. Die nach Oxidation erhaltene ca. 26 kDa große Bande ließ darauf schließen, das PrxU und PrxU47C keine Dimere, die auf kovalente Bindungen zurückzuführen sind, ausbilden, was mit dem 1-Cys-Peroxiredoxin-Charakter dieses Proteins im Einklang steht. In Bezug auf die Ursache der beobachtete geringfügigen Verschiebung der Protein-Bande kann jedoch keine Aussage gemacht werden.

An einer Reihe von Beispielen konnte gezeigt werden, daß Peroxiredoxine im nativen Zustand als Dekamere vorliegen (SCHRÖDER, *et al.*, 1998; HIROTSU, *et al.*, 1999; KITANO, *et al.*, 1999; CHAUHAN & MANDE, 2001; ALPHEY, 2000; WOOD, *et al.*, 2002). Ein Modell der Tryparedoxin-Peroxidase aus *C. fasciculata* beschreibt die Ausbildung eines aus fünf Dimeren bestehenden kondensierten Rings mit 10 Reaktionszentren (ALPHEY, 2000; HOFMANN, *et al.*, 2002). Für die rekombinanten Proteine PrxU und PrxU47C konnte durch Untersuchungen im nativen Gradienten-PAG eine native Struktur von 288 kDa ermittelt werden. Bei einer kalkulierten Monomergröße von 23,650 kDa (PrxU) bzw. 23,603 kDa (PrxU47C) entspricht dies der nativen Größe eines Dodecamers im Gegensatz zu der für 2-Cys-Peroxiredoxinen beschriebenen Dekamer-Struktur. Da für Vertreter der 1-Cys-Peroxiredoxine jedoch bislang keine nativen Strukturdaten bekannt sind, kann in dieser Hinsicht kein direkter Vergleich vorgenommen werden (Eine Ausnahme bildet das von CHOI, *et al.*, 1998 untersuchte 1-Cys-Peroxiredoxin PrxVI, für das jedoch keine Aussage hinsichtlich einer Dekamer-Struktur gemacht wurde). Für AhpC aus *A. xylophilus* konnte gezeigt werden, daß die Oligomerisierung des Proteins eine Voraussetzung für dessen enzymatische Aktivität ist (KITANO, *et al.*, 1999). Dieser Zusammenhang wurde auch für weitere Peroxiredoxine demonstriert. So führte beispielsweise die Verdünnung der Tryparedoxin-Peroxidase aus *C. fasciculata* und anderer TXNPx-Spezies zur Dissoziation der aktiven Dekamer-Struktur und zum Verlust der Enzymaktivität (FLOHÉ, *et al.*, 2002a). Die Zerstörung der Dekamerstruktur resultierte auch im Fall von AhpC aus *M. tuberculosis* in der Verminderung seiner Aktivität (CHAUHAN & MANDE, 2001). Dem entsprechend scheint die Ausbildung der oligomerisierten Struktur von PrxU aus *E. acidaminophilum* ebenfalls essentiell für dessen enzymatische Aktivität zu sein. So konnte für Proteinkonzentrationen von < 60 µg/ml im Enzymtest keine Peroxid-Reduktion durch PrxU beobachtet werden (s. 3.7.2.5.), was möglicherweise auf die aus der Verdünnung des Proteins resultierende Dissoziation der Oligomerstruktur zurückzuführen ist. Überraschenderweise konnte auch für das nicht-rekombinante PrxU_{Ea} eine native Größe von ca. 290 kDa detektiert werden, da der immunologische Nachweis von zwei mit Anti-PrxU-AK interagierenden Proteinen einer Größe von 23 und 29 kDa (s. 3.7.2.6.1.) ebenfalls zwei Banden unterschiedlicher Größe im nativen Zustand erwarten ließ. Die 29 kDa-Bande

konnte leider nicht näher analysiert werden (s. 3.7.2.6.2.), so daß über eine mögliche Bedeutung an dieser Stelle nur spekuliert werden kann. Im Hinblick auf das Vorhandensein nur einer Bande im nativen Zustand kann vermutet werden, daß es sich bei dem 29 kDa Protein um ein PrxU_{Ea}-Dimer handelt, welches allerdings von der erwarteten Größe von 46 kDa zu sehr abweicht. Für ein 2-Cys-Peroxiredoxin aus Gerste, dessen monomere Größe 28 kDa beträgt, wurden verschiedene Oxidationsstufen im denaturierenden SDS-PAG untersucht. Die Größe der entstandenen Dimere variierte, je nach Anzahl der ausgebildeten Disulfid-Bindungen zwischen 50-54 kDa. Diese Dimergrößen wichen allerdings nur geringfügig von der erwarteten Größe ab (DIETZ, *et al.*, 2002). Durch kovalente Interaktion der Protein-Monomere kann es jedoch offensichtlich zur Veränderung der Proteingröße kommen. Ein weiteres Indiz für einen möglichen Dimer-Charakter des 29 kDa-Proteins ist die Detektion dieser beiden Banden sowohl bei der pH-selektiven Markierung mit Iodoacetyl-LC-Biotin (s. 3.2.) als auch durch die radioaktive Markierung mit ⁷⁵Se (GURSINSKY, 2002). Gegen eine solche Theorie spricht jedoch die Beobachtung, daß keinerlei Veränderung des Bandenmusters auch bei Behandlung des Rohextraktes mit 700 mM Na-Dithionit eintrat (s. 3.7.2.6.3.), sowie das Fehlen der 29 kDa Bande bei der Oxidation von rekombinanten PrxU bzw. PrxU47C (s. 3.7.2.5.3.). Möglich ist auch das Vorhandensein eines weiteren Peroxiredoxin-Homologen (Bcp-Homolog oder Typ II-Peroxiredoxin) im Rohextrakt von *E. acidaminophilum*, welches mit dem gegen PrxU gerichteten Antikörper aufgrund der Ausbildung einer teilweisen ähnlichen Oberflächenstruktur kreuzreagiert und ebenfalls ein Selen-haltiges Protein darstellt. Das Vorkommen von mehreren Peroxiredoxin-Homologen ist für eine Reihe von Organismen beschrieben worden. So enthält z. B. *E. coli* ein AhpC (COSTA SEAVER & IMLAY, 2001), ein Typ II-Peroxiredoxin (VERDOUCQ, *et al.*, 1999), ein Bcp-Protein (JEONG, *et al.*, 2000) und eine periplasmatische Thiol-Peroxidase (CHA & KIM, 1995), die alle in die Familie der Peroxiredoxine einzuordnen sind. Das Vorhandensein eines zweiten, mit PrxU interagierendem, doch davon immunologisch verschiedenen Peroxiredoxins in *E. acidaminophilum* würde auch die im nativen Zustand erhaltene einzige Bande erklären. Unter der Voraussetzung, daß das postulierte zweite Peroxiredoxin eine Dekamerstruktur ausbildet, würde diese vermutlich in einer Größe von ca. 290 kDa resultieren, was der nativen Größe von PrxU und PrxU47C mit 288 kDa entspricht. Bislang sind in der Literatur jedoch keine Peroxiredoxine mit nativer Dodekamer-Struktur beschrieben worden. Da die Bestimmung der nativen Größe der PrxU-Proteine nur anhand eines Polyacrylamid-Gradienten-Geles erfolgte, ist eine Überprüfung dieser Daten durch weitere Experimente unbedingt erforderlich (vgl. 4.6.).

4.5. Abschließende Betrachtungen zur Entstehung und Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies in anaeroben Mikroorganismen

1971 postulierte (McCORD, *et al.*, 1971), daß das Fehlen von ROS-Entgiftungsmechanismen, wie z. B. SODs, Katalasen und Peroxidasen, in anaerob lebenden Mikroorganismen den Grund für deren Unfähigkeit darstellt, in Anwesenheit von O₂ zu wachsen. Einige Jahre später wurde durch

(POSTGATE, 1984) beschrieben, daß Sulfat-reduzierende, als anaerob eingestufte Bakterien zwar unfähig sind, sich unter Luftsauerstoff zu vermehren, die oxygenen Bedingungen jedoch überleben. In den letzten Jahren konnten eine Reihe von ROS-Entgiftungsenzymen auch in strikt anaeroben Lebewesen sowohl auf genetischer, als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Die anaerobe Lebensweise wird vielmehr in Abhängigkeit ihrer Antwort auf oxidativen Stress von extrem sauerstoffempfindlich (z. B. Methanogene) über aerotolerant (z. B. sulfatreduzierende Bakterien, *Desulfovibrio*) bis zu mikroaerophil (z. B. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough) (JENNEY, *et al.*, 1999), definiert. Im Gegensatz zu anaeroben Mikroorganismen nutzen aerob lebende Organismen sowie fakultativ anaerobe Bakterien in Anwesenheit von O₂ diesen als terminalen Elektronenakzeptor.

Aus der Übertragung von jeweils einem Elektronen innerhalb der Reduktionsschritte von O₂ zu H₂O resultiert die Bildung von H₂O₂, sowie des Superoxid-Anions O₂⁻ (FRIDOVICH, 1975; MORRIS, 1980; KWAN & VOELKER, 2003). Diese ROS reagieren innerhalb der Zelle zu weiteren toxischen Sauerstoffderivaten und führen so zur oxidativen Schädigung von Membranen, Proteinen und Nukleinsäuren (vgl. Einleitung). Auch wenn anaerobe Mikroorganismen O₂ innerhalb ihres Stoffwechsels nicht nutzen, so leben sie doch in Ökosystemen, die zeitweise dem Luftsauerstoff ausgesetzt sind (JENNEY, *et al.*, 1999). O₂ diffundiert durch die Zellmembranen und reagiert in der anaerob lebenden Zelle mit Thiolen, Flavinen und Fe-S-Proteinen zu reaktiven O₂-Derivaten. Auch durch die NAD(P)H-Oxidase-Aktivitäten einiger Flavin-haltiger Enzyme entsteht durch die Reduktion von Sauerstoff H₂O₂ (STORZ & IMLAY, 1999). Aus *E. acidaminophilum*, dem hier untersuchten Organismus, konnte ebenfalls eine NADPH-Oxidase gereinigt werden, die die Reduktion von O₂ unter Bildung von H₂O₂ katalysiert (s. 3.4.1. und 3.4.2.3.). Dieses Enzym war identisch mit der Thioredoxin-Reduktase dieses Organismus. Thioredoxin-Reduktasen gehören zu der Familie der Pyridinnukleotid:Disulfid-Oxidoreduktasen (WILLIAMS, 1992; MARTINEZ-GALISTEO, *et al.*, 1992), in die auch Glutathion-Reduktasen (WILLIAMS, 1976), Lipoamid-Dehydrogenasen (MATTEVI, *et al.*, 1991), Trypanothion-Reduktasen (KURIYAN, *et al.*, 1991), sowie NADH-Peroxidasen (STEHLE, *et al.*, 1993; CLAIBORNE, *et al.*, 1999) eingeordnet werden. Zu den ebenfalls mit Thioredoxin-Reduktasen verwandten Enzymen gehören die NADH:Peroxiredoxin-Oxidoreduktasen (POOLE, *et al.*, 2000). Eine Reihe dieser Proteine weist NADH-Oxidase-(NIIMURA, *et al.*, 1993; COCCO, *et al.*, 1988; HIGUCHI, *et al.*, 1993) bzw. NADH-Dehydrogenase-Aktivität (XU, *et al.*, 1989) auf.

E. acidaminophilum toleriert nur sehr geringe O₂-Konzentrationen. So führte bereits die Kultivierung in Medium ohne Reduktionsmittel zu einem erheblich verminderten Wachstum (RUDOLF, 2003). Jedoch konnte beobachtet werden, daß in der stationären Phase befindliche Zellen in der Lage waren, auch höheren O₂-Gehalt zu überleben und nach Überimpfen dieser Zellen in anaerobes Medium ein normales Wachstum stattfindet (allgemeine Beobachtungen bei der Kultivierung von *E. acidaminophilum*). Im Zusammenhang mit der Präsenz einer H₂O₂ produzierenden NADPH-

Oxidase ließe sich daraus bereits das Vorhandensein wirksamer Schutzmechanismen gegen ROS ableiten, welches im Rahmen dieser Arbeit auch bestätigt werden konnte (s. 4.2. und 4.4.). Dabei ist besonders zu beachten, daß bei den postulierten Reduktionen von Peroxiden sowohl durch Protein B, als auch durch das Selenoperoxiredoxin PrxU kein molekularer Sauerstoff entsteht, wie es bei den durch Katalase und SOD katalysierten Disproportionierungs-Reaktionen der Fall ist. Bezüglich der Entgiftung von reaktiven O₂-Spezies, speziell in anaeroben Organismen, ist dies ein wichtiger Punkt, da der dabei entstehende molekulare Sauerstoff zur Bildung von neuen ROS führt (JENNEY, *et al.*, 1999). Es konnte zwar in verschiedenen obligat anaeroben Mikroorganismen die Präsenz von Katalase und SOD nachgewiesen werden (BRIOUKHANOV, *et al.*, 2000; SHIMA, *et al.*, 1999; MEILE, *et al.*, 1995; AMANO, *et al.*, 1990; KITAMURA, *et al.*, 2001), die bedeutendste Rolle im Rahmen der oxidativen Streßantwort in Anaeroben wird jedoch den Superoxid-Reduktasen (SOR), zu denen Desulfoferrodoxine und Neelaredoxin gehören, zugeschrieben (JENNEY, *et al.*, 1999; FOURNIER, *et al.*, 2003). Dieses bislang ausschließlich in anaeroben Organismen detektierte Eisen-haltige Enzym katalysiert die Reduktion von O₂⁻ zu H₂O₂, als Elektronendonator dient Rubredoxin, ein monomeres Redox-Protein mit einem Eisen-Zentrum (s. Abb. 50). (ADAMS, *et al.*, 2002), das wiederum durch die NAD(P)H:Rubredoxin Oxidoreduktase (NROR) reduziert wird (JENNEY, *et al.*, 1999).

In *D. gigas* existieren zwei weitere Rubredoxin-abhängige Proteine: NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase (NRO) (CHEN, *et al.*, 1993a) und Rubredoxin:O₂-Oxidoreduktase (ROO) (CHEN, *et al.*, 1993b), die homolog zum Flavorubredoxin aus *E. coli* ist (GOMES, *et al.*, 2002). NRO reduziert dabei molekularen Sauerstoff zu H₂O₂, ROO reduziert O₂ zu H₂O. Eine Bedeutung innerhalb einer oxidativen Streßantwort ist bislang für diese Proteine jedoch nicht eindeutig bewiesen (ADAMS, *et al.*, 2002). Durch die SOR-katalysierte Reaktion entsteht kein molekularer Sauerstoff, jedoch H₂O₂, das ebenfalls zur Generation von ROS in der Zelle führt. Die Frage nach der Entgiftung dieser Substanz ist noch umstritten (ADAMS, *et al.*, 2002). Allerdings wird die Beteiligung von Rubrerythrin (bzw. Nigerythrin) in diesem Zusammenhang diskutiert. Dieses ebenfalls Fe-haltige Protein (ohne Häm) wird als Rubredoxin:Peroxid-Oxidoreduktase beschrieben (LUMPPPIO, *et al.*, 2001) und ist in die NADH-abhängige Peroxidreduktion in *D. gigas* involviert (COULTER, *et al.*, 2000; LUMPPPIO, *et al.*, 1997; PRICKRILL, *et al.*, 1991). Rubrerythrin besitzt außerdem die Aktivität einer O₂-Reduktase (GOMES, *et al.*, 2001) und einer Ferroxidase (COULTER, *et al.*, 2000). Die Beteiligung von Rubrerythrin an der Umsetzung des durch die SOR entstandenen H₂O₂ ist bislang nicht bewiesen. Denkbar wäre an dieser Stelle die Involvierung von Peroxiredoxinen und NADH-Peroxidasen (s. Abb. 50), für deren Vorhandensein die Präsenz entsprechender Gene, die im Rahmen der Genom-Sequenzierungen in einer Vielzahl von anaeroben Mikroorganismen entdeckt wurden, spricht (ADAMS, *et al.*, 2002). Auch das Genom des mit *E. acidaminophilum* nahe verwandten Organismus *C. difficile* (www.sanger.ac.uk) enthält neben einem putativen Peroxiredoxin-Gen (s. 4.4.1.) einen offenen 1332 bp umfassenden *orf*, der für eine NADH-Peroxidase codieren könnte.

Erste Hinweise für das Vorhandensein einer SOR wurden auch für *E. acidaminophilum* erhalten. So konnte im Rahmen eines Praktikums ein zu SOR-Genen homologer Genbereich von chromosomaler DNA aus *E. acidaminophilum* amplifiziert werden. Eine entsprechende SOR-Aktivität im Rohextrakt wurde ebenfalls beobachtet, konnte jedoch bislang nicht angereichert werden (BOS, 2002). Demnach wäre ein wie in Abb. 50 gezeigter, von JENNEY, *et al.*, 1999 vorgeschlagener ROS-Entgiftungsmechanismus in anaeroben Organismen auch für *E. acidaminophilum* denkbar. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten würden allerdings gegen eine Beteiligung des Seleno-Peroxiredoxins sprechen, da es offenbar nicht in der Lage ist, H_2O_2 umzusetzen.

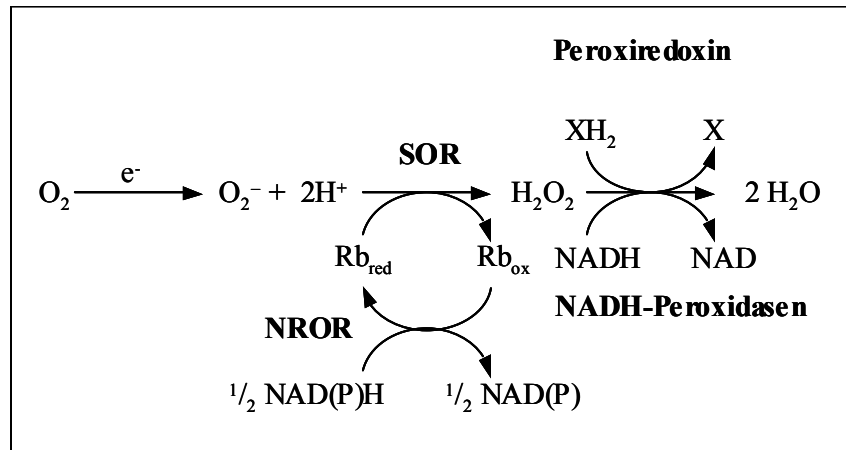


Abb. 50: Postulierter Mechanismus für die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in anaeroben Mikroorganismen (JENNEY, *et al.*, 1999).

SOR: Superoxid-Reduktase; NROR: NAD(P)H:Rubredoxin Oxidoreduktase; Rb: Rubredoxin; red: reduziert; ox: oxidiert; XH_2 : Elektronendonator

4.6. Ausblick

In vorliegender Arbeit sind erste Untersuchungen und Ergebnisse zu einer möglichen Antwort auf Sauerstoffstreß auf molekularer Ebene in dem anaeroben Organismus *E. acidaminophilum* dokumentiert. Um jedoch ein klares Verständnis hinsichtlich der Prozesse zur Entgiftung reaktiver Sauerstoff-Spezies zu erlangen, sind eine Reihe weiterer Untersuchungen in diese Richtung notwendig. Im Rahmen dieses Kapitels sollen daher einige weiterführende Experimente zu dieser Problematik vorgeschlagen werden.

Die ersten Charakterisierungen von PrxU bieten eine Reihe von Ansatzpunkte zu weiteren Untersuchungen. Hauptaugenmerk sollte dabei auf die Aufklärung des nativen Elektronendonors und damit auf die Rekonstitution der NADPH-abhängigen Reduktion von Linolsäurehydroperoxid des Rohextraktes von *E. acidaminophilum* durch die daran beteiligten Proteinkomponenten sein. Spezifische immunologische Ausfällungen mit gegen Thioredoxin, Thioredoxin-Reduktase sowie PrxU gerichteten Antikörpern sollten die Beteiligung dieser Proteinkomponenten an dieser Reaktion eindeutig zeigen. Weiterhin sollte der Einfluß verschiedener kommerziell erhältlichen Elektronendonatoren (Glutathion, DTE, Cystein, N-Acetyl-Cystein, usw.) auf die

Linolsäurehydroperoxid-Reduktion von PrxU untersucht werden, um auf prinzipielle Strukturmerkmale des nativen Elektronendonors schließen zu können. Parallel dazu wäre die Weiterführung der etablierten HPLC-Analysen zur Identifizierung von niedermolekularen Thiol-Verbindungen hilfreich. An die Aufklärung der Komponenten, die zur NADPH-abhängigen Reduktion des Peroxids notwendig sind, könnten sich eine Reihe biochemischer Untersuchungen (z. B. Kinetik) anschließen, da mit dem nativen System direkte Vergleiche mit Literaturdaten möglich wären.

Interessant wären auch Untersuchungen zum weiteren Peroxid-Substrat-Spektrum von PrxU, z. B. durch Einsatz von mehrfach ungesättigten Fettsäurehydroperoxiden sowie Phospholipidhydroperoxiden.

Interessant wäre weiterhin die Analyse der im immunologischen Nachweis von PrxU zusätzlich detektierte Bande von 29 kDa. Eine Auftrennung von Rohextrakt in einen 2D-Gel sollte eine hinreichende Auflösung der Spots erlauben. Die Lokalisation der gesuchten Proteine könnte dabei immunologisch erfolgen. Um jedoch für massenspektroskopische, oder N-terminale Aminosäure-Analysen notwendige Proteinmenge zu erhalten, müßte eine erhebliche Menge an Rohextrakt eingesetzt werden. Deshalb sollte zunächst die Menge an PrxU unter verschiedenen Sauerstoffstreß-Bedingungen im 2D-Gel untersucht werden.

Ein weiterer Punkt betrifft die native Struktur des PrxU-Proteins. Interessant wäre es, ob durch kristallographische Untersuchungen die in dieser Arbeit postulierte Dodekamerstruktur bestätigt werden kann. Lohnend wären Versuche zur Kristallisation prinzipiell deswegen, weil PrxU das bislang einzige bekannte Selenocystein-haltige Peroxiredoxin darstellt.

Die Identifizierung einer putativen Fur (bzw. PerR)-Operator-Sequenz im Promotor-Bereich des *prxU*-Gens lassen eine Regulation dieses Gens durch ein Fur-homologes Protein vermuten. Zunächst sollte der Einfluß von entsprechenden Streßfaktoren (z. B. Eisen- und Zink-Limitierung) auf die Expression von PrxU im 2D-Gel untersucht werden (Lokalisation durch immunologischer Nachweis). Lohnend wären auch Bindungsstudien (*footprinting*) des in der Genumgebung von *prxU* identifizierten *fur*-Genproduktes. Dafür wären zunächst die Klonierung dieses Gens in geeignete Expressionsvektoren sowie die funktionelle heterologe Expression in *E. coli* erforderlich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Rohextrakt von *E. acidaminophilum* wies eine DTT-abhängige Peroxidase-Aktivität für die Substrate H_2O_2 , *t*-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid mit einer spezifischen Enzymaktivität von 0,15 U/mg sowie für Linolsäurehydroperoxid mit 0,025 U/mg auf. Durch Zugabe von Rohextrakt konnte weiterhin die oxidative Fe^{3+} /DTT-vermittelte Inaktivierung der Glutaminsynthetase fast vollständig gehemmt werden. Die pH-selektive Markierung des Rohextraktes von *E. acidaminophilum* durch EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin resultierte in der Markierung von neun Proteinen, von denen 6 bekannten Seleno-Proteinen über die Masse zugeordnet werden konnten. Die Modifizierung bewirkte auch einem Verlust der DTT-abhängigen Peroxidase-Aktivität, die somit von einem Seleno-Protein katalysiert werden sollte.
2. Die Anreicherung der DTT-abhängigen Peroxidase-Aktivität aus auf Glycin angezogenen Zellen von *E. acidaminophilum* erfolgte in drei Chromatographieschritten an Q-Sepharose, Butyl-Sepharose und Sephadex 200HR. Die erhaltene Proteinlösung enthielt drei Hauptproteinbanden mit Molekulargewichten von 47, 25 und 22 kDa. Diese konnten durch N-terminale Aminosäure-Bestimmungen und Sequenzvergleiche den Untereinheiten des substratspezifischen Protein B der Glycin-Reduktase: GrdB (47 kDa) und den prozessierten GrdE-Untereinheiten von 25 und 22 kDa zugeordnet werden. Der Anreicherungsfaktor betrug 14.
3. Das über die Peroxidase-Aktivität gereinigte Protein B besaß eine spezifische Enzymaktivität für H_2O_2 von 0,6 U/mg, für Cumolhydroperoxid von 1,1 U/mg und für *t*-Buytylhydroperoxid von 0,7 U/mg. Linolsäurehydroperoxid (0,1mM) und Peroxnitrit (20 μM) wurden durch Protein B nicht umgesetzt. Die Affinitäten für die organischen Peroxide lagen dabei geringfügig höher als für H_2O_2 ($k_m(\text{CHP})$: 8×10^{-2} mM, $k_m(\text{BHP})$: 9×10^{-2} mM, $k_m(\text{H}_2\text{O}_2)$: 0,27 mM). Das für die Peroxidase-Aktivität erhaltenen pH-Optimum für Protein B betrug 8,0. Die optimale Temperatur betrug 35 °C, aus der Temperaturkurve konnte eine Aktivierungsenergie von 69 kJ/mol kalkuliert werden.
4. Das gereinigte Protein B war in der Lage, die Fe^{3+} /DTT/ O_2 -vermittelte vollständige Inaktivierung der Glutaminsynthetase zu verhindern. Durch Zugabe von 13 μg Protein B behielt die Glutaminsynthetase eine Restaktivität von 70%.

Die Immunopräzipitation von GrdB im Rohextrakt mit GrdB-spezifischen Antikörpern resultierte in dem vollständigen Verlust der NADPH-abhängigen Reduktion von Cumolhydroperoxid und bewies somit die Beteiligung von Protein B an dieser Reaktion. Der an dieser Katalyse beteiligte direkte natürliche Elektronendonator konnte nicht identifiziert werden. Aktives rekombinantes Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase, sowie die Zugabe der putativen redoxaktiven Proteine GrdA1U44C und PrpU33C komplementierten die für Protein B nachgewiesenen NADPH-abhängigen Peroxidreduktion *in vitro* nicht. Es wird ein noch unbekannter niedermolekularer Elektronendonator

postuliert, der in Anlehnung an die relativ hohen Enzymaktivitäten für DTE und DTT im Vergleich zu 2-Mercaptoethanol, Glutathion (red.) und L-Cystein vermutlich einen Di-Thiol-Charakter besitzt.

5. Zur Prüfung einer Beteiligung der beiden Cysteine-Reste in dem konservierten Sequenz-Motiv von GrdB –UxxCxxC– an der Peroxidase-Aktivität wurden die Cystein-Codons des in den Expressionsvektor pASK-IBA5 klonierten *grdB*-Gens durch *in vitro*-Mutagenese jeweils zu Alanin-Codons umgewandelt. Das Proteine GrdB, GrdBU350C, GrdBC353A und GrdBC356A in *E. coli* XL1-Blue-MRF' (im Fall der Selenocystein-haltigen Proteine enthielt dieser zusätzlich das Plasmid pASBC4) heterolog überexprimiert und über Affinitätschromatographie angereichert. Eine homogene Reinigung gelang jedoch nicht. Neben den jeweiligen intakten GrdB-Proteinen (47 kDa) wurde stets eine starke zusätzliche Bande bei ca. 22 kDa beobachtet. Die zwei Spaltstellen wurde in einem getrennten Experiment durch N-terminale Sequenzierung des bei C-terminal fusioniertem GrdBU350C erhaltenen ca. 30 kDa Spaltproduktes ermittelt und wiesen auf den gleichen Sequenzbereich hin, der bereits von REUTER, 200) ermittelt wurde.

Die im heterologen System erhaltene relative DTT-abhängige Peroxidaseaktivität für Cumolhydroperoxid betrug für GrdB 6,2 nmol/min und GrdBU350C 3,7 nmol/min. Die Mutanten GrdBC353A und GrdBC356 wiesen nur eine relative Aktivität von 2,7 nmol/min bzw. 2,5 nmol/min auf. Durch proteolytischen Verdau der Proteine mit Trypsin und anschließender massenspektroskopischer Analyse der Fragmente konnte für die Proteine GrdB und GrdBC353A der Einbau von Selenocystein in die Polypeptidkette nachgewiesen werden. Daraufhin wurde eine Beteiligung des Cysteins an Position 353 an der Peroxidase-Reaktion postuliert und ein möglicher Reaktionsmechanismus formuliert.

6. Da die Zerfallsprodukte hauptsächlich bei heterologer Expression beobachtet wurden, sollte ein Einfluß von GrdE-Produkten auf die Stabilität von GrdBU350C geprüft werden. Die Gene *grdB* und *grdE* bzw. *grdB* und die jeweiligen, den 22 kDa und 25 kDa Untereinheiten von Protein B entsprechenden *grdE*-Fragmenten wurden als Transkriptionseinheit in den Expressionsvektor pASK-IBA5 kloniert und simultan in *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL exprimiert. In allen drei Fällen war eine Anreicherung von ausschließlich intaktem GrdBU350C durch Affinitätsreinigung möglich. Nur Gesamt-GrdE co-eluierte mit GrdBU350C, eine Prozessierung in die beiden Untereinheiten erfolgte jedoch nicht. Die auf diese Weise erhaltenen GrdBU350C-Proteine wiesen keine Peroxidase-Aktivität auf und ließen sich auch nicht mit 2-¹⁴C-Glycin markieren.
7. Das Plasmid pPX2, dessen Insert die Genumgebung des *prxU*-Gens (Seleno-Peroxiredoxin) umfaßte, wurde doppelsträngig sequenziert. Es konnten drei vollständige Gene (*orfA*, *orfB* und *fur*) stromabwärts von *prxU* identifiziert werden, dessen Translationsprodukte Homologien zu Nukleotid-bindenden Proteinen der Mrp bzw. MinD-Familie (*orfA*), konservierten hypothetischen

- Proteinen (*orfB*) sowie Fur-(*ferric uptake regulator*) Proteinen (*fur*) aufwiesen. Für *prxU* wurde eine monocistronische Transkription nachgewiesen. Der Transkriptionsstartpunkt befand sich in einer Entfernung von 158 bp stromaufwärts des *prxU*-Startcodons, die Länge der mRNA betrug 0,8 kb. Innerhalb der Promotor-Region wurde eine palindromische Sequenz identifiziert, die hohe Homologien zur Konsensussequenz PerR- bzw. Fur-regulierter Operator-Sequenzen besaß und die Vermutung auf eine Regulation des *prxU*-Gens durch eine Fur-ähnliches Protein erlaubte.
8. Das Gen *prxU* wurde in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert und das für Selenocystein codierende *in frame* UGA-Codon durch gerichtete Mutation zu UGC (Cystein) umgewandelt. Beide Gene ließen sich in *E. coli* XL1-Blue-MRF' (enthielt bei *prxU* zusätzlich das Plasmid pASBC4) exprimieren und die Strep-tagII-fusionierten Proteine PrxU und PrxU47C mittels Affinitätschromatographie bis zur Homogenität anreichern. PrxU setzte Linolsäurehydroperoxid unter Nutzung von DTT mit einer spezifischen Enzymaktivität von 0,6 U/mg um. Für die Substrate H₂O₂, *t*-Butylhydroperoxid, Cumolhydroperoxid und Peroxinitrit wurde keine Aktivität beobachtet. Die Rekonstitution der NADPH-abhängigen Reduktion von Linolsäurehydroperoxid im Rohextrakt mit den rekombinanten Proteinen PrxU, Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase gelang nicht. Postuliert wird auch hier das Fehlen eines niedermolekularen Faktors. Die Mutante PrxU47C zeigte keine enzymatische Reaktion mit DTT und Linolsäurehydroperoxid. Die Oxidation von PrxU und PrxU47C mit 250 µM Linolsäurehydroperoxid bzw. 250 µM H₂O₂ führte zu einer Verschiebung der Proteinbande von 24 auf 26 kDa im denaturierenden SDS-PAG. Die native Größe beider Proteine betrug 288 kDa, was einer Dodekamerstruktur entsprechen würde.
 9. Immunologischen Untersuchungen mit gegen PrxU47C gerichteten Antikörpern ergaben eine cytoplasmatische Lokalisation von PrxU. Dabei wurden im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* zwei Proteine der Größe 23 und 29 kDa detektiert, die im nativen Gel in einer einzigen 290 kDa großen Bande resultierten. Diese entspricht einem Dodekamer des 23 kDa Proteins bzw. einem Dekamer des 29 kDa Proteins. Die Anreicherung beider Proteine aus *E. acidaminophilum* gelang kaum mittels Affinitätschromatographie mit gegen PrxU47C gerichteten polyklonalen Antikörpern. Aufgrund der erheblichen Verunreinigungen sowie der erhaltenen geringen Proteinmenge waren eine Bestimmung der N-Termini beider Proteine sowie enzymatische Messungen nicht möglich
 10. Die Anreicherung einer NADPH-Oxidase aus *E. acidaminophilum* erfolgte in zwei Chromatographieschritten an Q-Sepharose und Phenyl-Sepharose bis zur Homogenität. Das 36 kDa große Protein besaß eine spezifische Enzymaktivität von 3,6 U/mg und wurde als Thioredoxin-Reduktase identifiziert. Die spezifische NADPH-Oxidaseaktivität rekombinanter Strep-tagII fusionierter Thioredoxin-Reduktase betrug 1,1 U/mg. Die Reaktion erfolgte unter Bildung von H₂O₂.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, M. W. W., JENNEY Jr., F. E., CLAY, M. D., JOHNSON, M. K. (2002) Superoxide reductase: fact or fiction. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7: 647-652
- AGUILAR-BRYAN, L., NICHOLS, C. G., WECHSLER, S. W., CLEMENT, J. P. T., BOYD, A. E. I., GONZALEZ, G., HERRERA-SOSA, H., NGUY, K., BRYAN, J., NELSON, D. A. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426
- AKERLUND, T., GULLBRAND, B., NORDSTRÖM, K. (2002) Effects of the Min system on nucleoid segregation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148: 3213-3222
- ALMIRON, M., LINK, A. J., FURLONG, D., KOLTER, R. (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6: 2646-2654
- ALPHEY (2000) The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J. Mol. Biol.* 300: 903-916
- ALTSCHUL, F. S., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- AMANO, A., SHIZUKUISHI, S., TSUMAGAWA, H., IWAKURA, K., TSUNASAWA, S., TSUNEMITSU, A. (1990) Characterization of superoxide dismutase purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* 172: 1457-1463
- ANDREESEN, J. R. (1994) Acetate via glycine: A different form of acetogenesis. In: Acetogenesis, H. L. Drake (Hrsg.), Chapman & Hall, New York, S. 568-629
- ANTELMAN, H., ENGELMANN, S., SCHMID, R., HECKER, M. (1996) General and oxidative stress response in *Bacillus subtilis*: Cloning, expression and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J. Bacteriol.* 178: 6571-6578
- ARKOWITZ, R. A. & ABELES, R. H. (1991) Mechanism of action of clostridial glycine reductase: Isolation and characterization of a covalent acetyl enzyme intermediate. *Biochemistry* 30: 4090-4097
- ARTHUR, J. R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1825-1835

- AUTREAU, B. D., TOUATI, D., BERSCH, B., LATOUR, J. M., MICHAUD-SORET, I. (2002) Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16619-16624
- AXLEY, M. J., BÖCK, A., STADTMAN, T. (1991) Catalytic properties of an *E. coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8450-8454
- BADER, M. W., XIE, T., YU, C. A., BARDWELL, J. C. (2000) Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J. Biol. Chem.* 275: 26082-26088
- BAENA (1999) Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, '*Selenomonas acidaminophila*' and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Bacteriol.* 49: 969-974
- BAICHO, N. & HELMANN, J. D. (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* 184: 5826-5832
- BAIER, M. & DIETZ, K. J. (1996) Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol. Biol.* 31: 553-564
- BAILLON, M. L. A., van VLIET, A., H. M., KETLEY, J. M., CONSTANTINIDOU, C., PENN, C. W. (1999) An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 181: 4798-4804
- BAKER, L. M. S. & POOLE, L. B. (2003) Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278: 9203-9211
- BAKER, L. M. S., RAUDONIKIENE, A., HOFFMAN, P. S., POOLE, L. B. (2001) Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: Genetic and kinetic characterization. *J. Bacteriol.* 183: 1961-1973
- BARDWELL, J. C., McGOVERN, K., BECKWITH, J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* 67: 581-589

- BEDNARSKI, B., ANDREESEN, J. R., PICH, A. (2001) *In vitro* Processing of the proproteins GrdE of protein B of glycine reductase and PrdA of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii*. *Eur. J. Biochem.* 268: 3538-3544
- BELL, I. M., FISHER, M. L., WU, Z. P., HILVERT, D. (1993) Kinetic studies on the peroxidase activity of selenosubtilisin. *Biochemistry* 32: 3754-3762
- BENEDETTI, A., COMPETI, M., FULCERI, R., ESTERBAUER, H. (1984) Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 192: 172-181
- BERGMEYER, H. U. (1970) *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim
- BERRY, M. J., BANU, L., LARSEN, P. R. (1991) Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349: 438-440
- BERTRAM, M. J. & GASSEN, H. G. (1991) *Gentechnische Methoden*. Gustav Fischer Verlag, Jena
- BESSETTE, P. H., COTTO, J. J., GILBERT, H. F., GEORGIU, G. (1999) *In vivo* and *in vitro* function of the *Escherichia coli* periplasmatic cysteine oxidoreductase DsbG. *J. Biol. Chem.* 274: 7784-7792
- BIELSKI, B. H. (1985) Reactivity of HO₂/O₂⁻ radicals in aqueous solution. *Phys. Chem. Ref. Data* 14: 1041-1045
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523
- BJÖRNSTEDT, M., HAMBERG, M., KUMAR, S., XUE, J., HOLMGREN, A. (1995) Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocysteine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J. Biol. Chem.* 270: 11761-11764
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. (1987) Improved silver staining method of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- BOORSTEIN, W. R. & CRAIG, E. A. (1989) Primer extension analysis of RNA. *Methods Enzymol.* 180: 347-369
- BOS, R. (2002) *Proteine und Gene aus anaeroben Bakterien, die am Umsatz von Superoxid beteiligt sind*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle

- BOSCHI-MULLER, S., MULLER, S., Van DORSSELAER, A., BÖCK, A., BRANLANT, G. (1998) Substituting selenocysteine for active site cysteine 149 of phosphorylating glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase reveals a peroxidase activity. *FEBS Letters* 439: 241-245
- BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- BREEN, A. P. & MURPHY, J. A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 1033-1077
- BREIMER, I. H. & LINDAHL, T. (1984) Exsision of oxidized thymine from DNA. *J. Biol. Chem.* 259: 5543-5548
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol. Med.* 27: 951-965
- BRIOUKHANOV, A., NETRUSOV, A., SORDEL, M., THAUER, R. K., SHIMA, S. (2000) Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase. *Arch. Microbiol.* 174: 213-216
- BROWN-PETERSON, N. J. & SALIN, M. L. (1995) Purification and characterisation of a mesohali catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 177: 378-384
- BRYANT, M. P. (1972) Comentary for the hungate technique for anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328
- BRYK, R., GRIFFIN, P., NATHAN, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-215
- BSAT, N., CHEN, L., HELMANN, J. D. (1996) Mutation of the *B. subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes *J. Bacteriol.* 178: 6579-6586
- BSAT, N., HERBIG, A., CASILLAS-MARTINEZ, I., SETLOW, P., HELMAN, J. D. (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologous: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (Per R) repressor. *Mol. Microbiol.* 29: 189-198
- BULT, C. J., WHITE, O., OLSEN, G. J., ZHOU, L., FLEISCHMANN, R. D., SUTTON, G. G., BLAKE, J. A., FITZGERALD, L. M., CLAYTON, R. A., COCAYNE, J. D., KERLAVAGE, A. R., DOUGHERTY, B. A., TOMB, J. F., ADAMS, M. D., REICH, C. I., OVERBECK, R., KIRKNESS, E. F., WEINSTOCK, K. G., MERRICK, J. M., GLODEK, A., SCOTT, J. L.,

- GEOGHAGEN, N. S., VENTER, J. C. (1996) Complete Genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 23: 1058-1073
- CADET, J., BERGER, M., DOUKI, T., RAVANAT, J. L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 131: 1-87
- CAI, J., DAOUD, R., GEORGES, E., GROS, P. (2001) Functional expression of multidrug resistance protein 1 in *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 40: 8307-8316
- CHA, M. K. & KIM, I. H. (1995) Thioredoxin-linked peroxidase from human red blood cell: evidence for the existence of thioredoxin and thioredoxin reductase in human red blood cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 900-907
- CHAE, H. Z., CHUNG, S. J., RHEE, S. G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269: 27670-27678
- CHAE, H. Z., KIM, I. H., KIM, K., RHEE, S. G. (1993) Cloning, sequencing and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268: 16815-16821
- CHAE, H. Z., UHM, T. B., RHEE, S. G. (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7022-7026
- CHAUHAN, R. & MANDE, C. (2001) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. *Biochem. J.* 354: 209-215
- CHEN, L., LIU, M. Y., LEGALL, J., XAVIER, A. V. (1993a) Purification and characterization of an NADH-rubredoxin oxidoreductase involved in the utilization of oxygen by *Desulfovibrio gigas*. *Eur. J. Biochem.* 216: 443-448
- CHEN, L., LIU, M. Y., LeGALL, J., FARELEIRA, P., SANTOS, H., XAVIER, A. V. (1993b) Rubredoxin oxidase, a new flavo-hemo-protein, is the site of oxygen reduction to water by the "strict anaerobe" *Desulfovibrio gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 100-105
- CHIO, K. S. & TAPPEL, A. (1969) Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and malondialdehyde. *Biochemistry* 806: 2827-2832
- CHOI, H.-J., KANG, S. W., YANG, C.-H., RHEE, S. G., RYU, S.-E. (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5: 400-406

- CHU, F.-F., DOROSHOW, J. H., ESWORTHY, R. S. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI *J. Biol. Chem.* 268: 2571-2576
- CLAIBORNE, A., YEH, J. I., MALLETT, T. C., LUBA, J., CRANE, E. J., V., C., PARSONAGE, D. (1999) Protein-Sulfenic acids: Diverse roles for an unlike player in enzyme catalysis and redox rgulation. *Biochemistry* 38: 15407-15416
- COCCO, D., RINALDI, A., SAVINI, I., COOPER, J. M., BANNISTER, J. V. (1988) NADH-Oxidase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* YT-1. Purification and charcterization. *Eur. J. Biochem.* 174: 267-271
- CODY, C. W., PRASHER, D. C., WESTLER, W. M., PRENDERGAST, F. G., WARD, W. W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218
- COEHLO, A. V., MATIAS, P., FÜLOP, V., THOMSON, A., GONZALES, A., CARRONDO, M. A. (1997) Desulfoferrodoxin structure determined by MAD phasing and refinement to 1.9-Å resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS₄ centre with a square pyramidal FeSN₄ centre *J. Biol. Inorg. Chem.* 2: 680-689
- COLLET (2002) Oxidativ Protein folding in bacteria. *Mol. Microbiol.* 44: 1-8
- COSTA SEAVER, L. & IMLAY, J. A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 7173-7181
- COULTER, E. D. & KURTZ, D. M. (2001) A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase *Arch. Biochem. Biophys.* 394: 76-86
- COULTER, E. D., SHENVI, N. V., BEHARRY, Z. M., SMITH, J. F., PRICKRIL, B. C., KURTZ, D. M. (2000) Rubrerythrin catalyzed substrate oxidation by dioxygen and hydrogen peroxide. *Inorg. Chim. Acta* 297: 231-241
- COY, M. & NEILANDS, J. B. (1991) Structural dynamics and functional domains of the Fur Protein. *Biochemistry* 30: 8201-8210
- CRAWFORD, M. J. & GOLDBERG, D. E. (1998) Regulation of the *Salmonella typhimurium* Flavohemoglobin Gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 273: 34028-34032

- DALET, K., GOUIN, E., CENATIEMPO, Y., COSSART, P., HECHARD, Y. (1999) Characterization of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zink permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 111-116
- deBOER, P. A., CROSSLEY, R. E., ROTHFIELD, L. I. (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* 56: 641-649
- DECKERT, G., WARREN, P. V., GAASTERLAND, T., YOUNG, W. G., LENOX, A. L., GRAHAM, D. E., OVERBEEK, R. S., M. A., KELLER, M., AUJAY, M., HUBER, R., FELDMAN, R. A., SHORT, J. M., OLSEN, G. J., SWANSON, R. V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 535-558
- DIETRICH, D., BAHNWEIG, M., MAYER, F., ANDREESSEN, J. R. (1991a) Peripheral localization of the dihydrolipoamide dehydrogenase in the purinolytic anaerobe *Clostridium cylindrosporium*. *Arch. Microbiol.* 155: 412-414
- DIETRICH, D., MEYER, M., RIETH, M., ANDREESSEN, J. R. (1991b) Interaction of selenoprotein P_A by and the thioredoxin system, components of the NADPH-dependent reduction of glycine in *Eubacterium acidaminophilum* and *Clostridium litorale*. *J. Bacteriol.* 173: 5983-5991
- DIETZ, K. J., HORLING, F., KÖNIG, J., BAIER, M. (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in the peroxide detoxification and its regulation. *J. Experim. Bot.* 53: 1321-1329
- DILLS, S. S., APPERSON, A., SCHMIDT, M. R., SAIER, M. H. (1990) Carbohydrate transport in bacteria. *Microbial Rev.* 44: 385-418
- DING, L., LIU, Z., ZHU, Z., LUO, G., ZHAO, D., NI, J. (1998) Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem. J.* 332: 251-255
- DÖRING, V., MOOTZ, H. D., NANGLE, L. A., HENRICKSON, T. L., de CRECY-LAGARD, V., SCHIMMEL, P., MARLIERE, P. (2001) Enlarging the amino acid set of *Escherichia coli* by infiltration of the valine coding pathway. *Science* 292: 501-504
- DOWER, W. J., MILLER, J. F., RAGSDALE, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* 16: 387-395
- EADIE (1942) The inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine. *J. Biol. Chem.* 146: 85-93

- EGGERTSON, G. & SÖLL, D. (1988) Transfer ribonucleic acid mediated suppression of termination codons in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 52: 354-374
- EISEN, J. A., NELSON, K. E., PAULSEN, I. T., HEIDELBERG, J. F., WU, M., DODSON, R. J., DEBOY, R., GWINN, M. L., NELSON, W. C., HAFT, D. H., HICKEY, E. K., PETERSON, J. D., DURKIN, A. S., KOLONAY, J. L., YANG, F., HOLT, I., UMayAM, L. A., MASON, T., BRENNER, M., SHEA, T. P., PARKSEY, D., NIERMAN, W. C., FELDBLYUM, T. V., HANSEN, C. L., CRAVEN, M. B., RADUNE, D., VAMATHEVAN, J., KHOURI, H., WHITE, O., GRUBER, T. M., KETCHUM, K. A., VENTER, J. C., TETTELIN, H., BRYANT, D. A., FRASER, C. M. (2002) The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9509-9514
- ELLIS, H. R. & POOLE, L. B. (1997a) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36: 13349-13356
- ELLIS, H. R. & POOLE, L. B. (1997b) Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 36: 15013-15018
- ENGLER-BLUM, G., MEIER, M., FRANK, J., MÜLLER, G. A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem.* 210: 235-44.
- EPP, O., LADENSTEIN, R., WENDEL, A. (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0,2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* 133: 51-69
- ESCOLAR, L., PEREZ-MARTIN, J., deLORENZO, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181: 6223-6229
- ESTABROOK, R. & PETERSON, J. A. (1990) Cytochrome P-450 and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 9: 161
- FAIRLAMB (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227: 1485-1487
- FARR, S. B. & KOGOMA, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55: 561-585

- FEDORCSAK, I. & EHRENBERG, L. (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand.* 20: 107-112
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13
- FEUSSNER, I., KÜHN, H., WASTERNAK, C. (2001) The lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* 6: 262-267
- FEUSSNER, I. & WASTERNAK, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 275-297
- FISHER, A. B., DODIA, C., MANEVICH, Y., CHEN, J. W., FEINSTEIN, S. I. (1999) Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 274: 21326-21334
- FLOHÉ, L. (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. In: Chemical, biochemical, and medical aspects-Part A, D. Dolphin & R. Poulson & O. Avramovic (Hrsg.), John Wiley & Sons, S. 643-731
- FLOHÉ, L., STEINERT, P., HECHT, H. J., HOFMANN, B. (2002a) Tryparedoxin and Tryparedoxin Peroxidase. *Methods Enzymol.* 347: 244-248
- FLOHÉ, L., BUDDE, H., BRUNS, K., CASTRO, H., CLOS, J., HOFMANN, B., KANSALKALAVAR, S., KRUMME, D., MENGE, U., PLANK-SCHUMACHER, K., SZTAJER, H., WISSING, J., WYLEGALLA, C., HECHT, H. J. (2002b) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity and catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 324-335
- FOOTE, C. S. (1982) Light, oxygen and toxicity. In: Pathology of oxygen., Academic Press, Inc., New York, S. 21-44
- FORSTROM, H. J., ZAKOWSKI, J. J., TAPPEL, A. L. (1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* 17: 2639-2644
- FOURNIER, M., ZHANG, Y., WILDSCHUT, J. D., DOLLA, A., VOORDOUW, J. K., SCHRIEMER, D. C., VOORDOUW, G. (2003) Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris hildenborough*. *J. Bacteriol.* 185: 71-79

- FRAAIJE, M. W., ROUBROEKS, H. P., HAGEN, W. R., VAN BERKEL, W. J. H. (1996) Purification and characterisation of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimus*. *Eur. J. Biochem.* 235: 192-198
- FRELON, S., DOUKI, T., FAVIER, A., CADET, J. (2003) Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 191-197
- FREUDENBERG, W. & ANDREESEN, J. R. (1989a) Purification and partial characterization of the glycine decarboxylase multienzyme complex from *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Bacteriol.* 171: 2209-2215
- FREUDENBERG, W., DIETRICH, D., LEBERTZ, H., ANDREESEN, J. R. (1989b) Isolation of an atypically small lipoamide dehydrogenase involved in the glycine decarboxylase complex from *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Bacteriol.* 171: 1346-1354
- FRIDOVICH, I. (1975) The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutase provide an important defense. *Science* 202: 875-880
- FRIDOVICH, I. (1989) Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 264: 7761-7764
- FUAGTHONG, M., HERBIG, A. F., BSAT, N., HELMAN, J. D. (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by PerR: Not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.* 184: 3276-3286
- FUANGTHONG, M. & HELMANN, J. D. (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6690-6695
- FUKUZAWA, K. (2000) Singlet Oxygen Scavenging in phospholipid membranes. *Methods Enzymol.* 319: 101-110
- GABALLA, A. & HELMANN, J. D. (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory Protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 5815-5821
- GARDNER, P. & FRIDOVICH, I. (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* 266: 1478-1483
- GOLD, L. (1988) Posttranscriptional regulatory mechanism in *Escherichia coli* *Ann. Rev. Biochem.* 57: 199-233

- GOMES, C. M., GIUFFRE, A., FORTE, E., VICENTE, J. B., SARAIVA, L. M., BRUNORI, M., TEIXEIRA, M. (2002) A novel type of nitric-oxide reductase-*Escherichia coli* flavorubredoxin. *J. Biol. Chem.* 277: 25273-25276
- GOMES, C. M., LeGALL, J., XAVIER, A. V., TEIXERA, M. (2001) Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? *Chem-Biochem.* 7/8: 583-587
- GORLATOV, S. N. & STADTMAN, T. C. (1998) Human thioredoxin reductase from HeLa cells: selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences affinity to heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 8520 - 8525
- GOYER, A., HASLEKAS, C., MIGINAC-MASLOW, M., KLEIN, U., Le MARECHAL, P., JACQUOT, J. P., DECOTTIGNIES, P. (2002) Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 269: 272-282
- GRAHAM, D. E., XU, H., WHITE, R. H. (2002) *Methanococcus jannaschii* uses a pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase in polyamine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277: 23500-23507
- GRÄNTZDÖRFFER, A. (1997) Molekularbiologische Analyse von Genen der Glycin-Reduktase und des Thioredoxin-Systems aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle
- GRÖBE, D. (2001) Analyse zur Translation von Seleno-Proteinen aus *Eubacterium acidaminophilum* in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther Universität, Halle
- GURSINSKY, T. (2002) Selenoprotein-codierende mRNAs aus *Eubacterium acidaminophilum*: Erkennung durch den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB und Translation in *Escherichia coli*. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle
- HAAS, B. J., VOLFOVSKY, N., TOWN, C. D., TROUKHAN, M., ALEXANDROV, N., FELDMANN, K. A., FLAVELL, R. B., WHITE, O., SALZBERG, S. L. (2002) Full-length messenger RNA sequence greatly improve genome annotation. *Genome Biol.* 3: 2901-2912
- HACKERT, M. L. & PEGG, A. E. (1998) Pyruvoyl-dependent enzymes. In: Comprehensive biological catalysis., M. J. Sinnott (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 201-216
- HALL, H. K. & FOSTER, J. W. (1996) The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* 178: 5683-5691

- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14
- HANES (1932) Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentrations upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated Barley. *Biochem. J.* 26: 1406-1421
- HARLEY, C. B. & P., R. R. (1987) Analysis of *Escherichia coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15: 2343-2361
- HARMS, C., MEYER, M. A., ANDREESSEN, J. A. (1998) Fast purification of thioredoxin reductases and of thioredoxins with an unusual redox-active centre from anaerobic, amino-acid-utilizing bacteria. *Microbiology* 144: 793-800
- HATFIELD, D. L., GLADYSHEV, V. N., PARK, J., PARK, S. I., CHITTUM, H. S., BAEK, H. J., CARLSON, B. A., YANG, E. S., MOUSTAFA, M. E., LEE, B. J. (1999) *Comprehensive Natural Products Chem.* 4: 353-380
- HAYASHI, I., OYAMA, T., MORIKAWA, K. (2001) Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus. *EMBO J.* 20: 1819-1828
- HAYES, J. D. & Mc LELLAN, L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31: 273-300
- HAYES, J. D. & STRANGE, R. C. (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 22: 193-207
- HELLMANN, J. D. (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* λ -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA-polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 2351-2360
- HERBETTE, S., LENNE, C., LEBLANC, N., JULIEN, J. L., DREVET, J. R., ROECKEL-DREVET, P. (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur. J. Biochem.* 269: 2414-2420
- HERBIG, A. F. & HELMANN, J. D. (2001) Roles of metal ion and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* 41: 849-859

- HIGUCHI, M., SHIMADA, M., YAMAMOTO, Y., HAYASHI, T., KOGA, T., KAMIO, Y. (1993) Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H₂O₂-forming oxidase and H₂O-forming oxidase induced in *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* 239: 2343-2351
- HILL, O. & ALLEN, H. (1978) The chemistry of dioxygen and its reduction products. In: Oxygens free radicals and tissue damage., D. W. Fitzsimons (Hrsg.), Elsevier Science, New York, S. 5-12
- HILLAS, P. J., del ALBA, F. S., OYARZABAL, J., WILKS, A., de MONTELLANO, P. R. O. (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 275: 18801-18809
- HIROTSU, S., ABE, Y., OKADA, K., NAGAHARA, N., HORI, H., NISHINO, T., HAKOSHIMA, T. (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12333-12338
- HIRSH, D. & GOLD, L. (1971) Translation of the UGA triplet *in vivo* by tryptophan transfer RNAs. *J. Mol. Biol.* 58: 459-468
- HOFMANN, B., HECHT, H. J., FLOHÉ, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383: 347-364
- HOLMGREN, A. & BJÖRNSTEDT, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252: 199-208
- HORMANN, K. & ANDREESEN, J. R. (1989) Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Arch. Microbiol.* 153: 50-59
- HORSBURGH, M. J., CLEMENTS, M. O., CROSSLEY, H., INGHAM, E., FOSTER, S. J. (2001) PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69: 3744-3754
- HUGHES, M. N. (1999) Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxinitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 263-272
- ICHIMIYA, S., DAVIS, J. G., O'ROURKE, D. M., KATSUMATA, M., GREENE, M. I. (1997) Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA Cell. Biol.* 16: 311-321
- IDE, H., KOW, Y. W., WALLACE, S. S. (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks *in vitro*. *Nucleic Acid Res.* 13: 8035-8042

- IMLAY, J. A. & FRIDOVICH, I. (1991) DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240: 640-642
- IMLAY, J. A. & LINN, S. (1986) Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 166: 797-799
- INAGAKI, N., GONOI, T., CLEMENT, J. P., WANG, C. Z., AGUILAR-BRYAN, L., BRYAN, J., SEINO, S. (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16:
- JACOBSON, F. S., MORGAN, R. W., CHRISTMAN, M. F., AMES, B. N. (1989) An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 264: 1488-1496
- JAKOB, U., MUSE, W., ESER, M., BARDWELL, J. C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96: 341-352
- JENNEY, F. E., VERHAGEN, M. F. J. M., CUI, X., ADAMS, M. W. W. (1999) Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science* 286: 306-309
- JEONG, J. S., KWON, S. J., KANG, S. W., RHEE, S. G., KIM, K. (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (Type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38: 776-783
- JEONG, W., CHA, M. K., KIM, I. H. (2000) Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of Bacterioferritin Comigratory Protein (BCP) as a new member of the Thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem.* 275: 2924-2930
- KAMITANI, S., AKIYAMA, Y., ITO, K. (1992) Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *EMBO J.* 11: 57-62
- KANG, S. W., BAINES, I. C., RHEE, S. G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273: 6303-6311
- KAPPUS, H. (1985) Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance. In: *Oxidative Stress*, H. Sies (Hrsg.), Acad. Press, New York, S. 273-310
- KATZMANN, D. J., HALLSTROM, T. C., VOET, M., WY SOCK, W., GOLIN, J., VOLCKAERT, G., MOYE-ROWLEY, W. S. (1995) Expression of an ATP-binding cassette transporter-

- encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6875-6883
- KAWARABAYASI, Y., SAWADA, M., HORIKAWA, H., HAIKAWA, Y., HINO, Y., YAMAMOTO, S., SEKINE, M., BABA, S., KOSUGI, H., HOSOYAMA, A., NAGAI, Y., SAKAI, M., OGURA, K., OTSUKA, R., NAKAZAWA, H., TAKAMIYA, M., OHFUKU, Y., FUNAHASHI, T., TANAKA, T., KUDOH, Y., YAMAZAKI, J., KUSHIDA, N., OGUCHI, A., AOKI, K., KIKUCHI, H. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3 (supplement) *DNA Res.* 5: 147-155
- KAWAZU, S., TSUJI, N., HATABU, T., KAWAI, S., MATSUMOTO, Y., KANO, S. (2000) Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109:
- KIM, E. J., KIM, H. P., HAH, Y. C., ROE, J. H. (1996) Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* 241: 178-185
- KIM, K., KIM, I. H., LEE, K.-Y., RHEE, S. G., STADTMAN, E. R. (1988) The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system *J. Biol. Chem.* 263: 4704-4711
- KIM, K., RHEE, S. G., STADTMAN, E. R. (1985) Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J. Biol. Chem.* 260: 15394-15397
- KIM, S. Y., KIM, E. J., PARK, J. W. (2002) Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. *Biochem. Mol. Biol.* 35: 353-357
- KITAMURA, M., NAKANISHI, T., SHUICHI, K., KUMAGAI, I., HIDEO, I. (2001) Cloning and Expression of the catalase gene from the anaerobic bacterium *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)1. *J. Biochem.* 129: 357-364
- KITANO, K., NIIMURA, Y., NISHIYAMA, Y. M., K. (1999) Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC Protein from *Amphibacillus xylanus*. *J. Biochem (Tokyo)* 126: 313-319
- KLENK, H. P., CLAYTON, R. A., TOMB, J. F., WHITE, O., NELSON, K. E., KETCHUM, K. A., DODSON, R. J., GWINN, M., HICKEY, E. K., PETERSON, J. D., RICHARDSON, D. L., KERLAVAGE, A. R., GRAHAM, D. E., KYRPIDES, N. C., FLEISCHMANN, R. D., QUACKENBUSH, J., LEE, N. H., SUTTON, G. G., GILL, S., KIRKNESS, E. F.,

- DOUGHERTY, B. A., MCKENNEY, K., ADAMS, M. D., LOFTUS, B., PETERSON, S., REICH, C. I., McNEIL, L. K., BADGER, J. H., GLODEK, A., ZHOU, L., OVERBEEK, R., GOCAYNE, J. D., WEIDMAN, J. F., McDONALD, L., UTTERBACK, T., COTTON, M. D., SPRIGGS, T., ARTIACH, P., KAINE, B. P., SYKES, S. M., SADOW, P. W., D'ÁNDREA, K. P., BOWMAN, C., FUJII, C., GARLAND, S. A., MASON, T. M., OLSEN, G. J., FRASER, C. M., SMITH, H. O., WOESE, C. R., VENTER, J. C. (1997) The complete genome of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archeon *Archeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-370
- KOITABASHI, T., SATOH, T., KOYAMA, N. (2000) Peroxide reductase activity of NADH Dehydrogenase in the presence of endogenous 20-kDa component of an alkaliphilic bacillus. *Curr. Microbiol.* 41: 388-391
- KONG, W., SHIOTA, S., NAKAYAMA, H., NAKAYAMA, K. (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp) *Biochem J.* 351: 107-114
- KOPPENOL, W. H., MORENO, J. J., PRYOR, W. A., ISCHIROPOULOS, H., BECKMAN, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 834-842
- KREIMER & ANDREESEN (1995) Glycine reductase of *Clostridium litorale*. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *grdAB* operon that contains two *in-frame* TGA codons for selenium incorporation. *Eur. J. Biochem.* 234: 192-199
- KRYUKOV, G. V., KUMAR, R. A., KOC, A., SUN, Z., GLADISHEV, V. N. (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Am. Sci. USA* 99: 4245-4250
- KUMAR, A. & LINDBERG, U. (1972) Characterization of messenger ribonucleoprotein and messenger RNA from KB cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 681-685
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A. M., ALLONI, G., AZEVEDO, V., BERTERO, M. G., BESSERIES, P., BOLOTIN, A., BORCHERT, S., BORRISS, R., BOURSIER, L., BRANS, A., BRAUN, M., BRIGNELL, S. C., BRON, S., BRUSCHI, C. V., CALDWELL, B., CAPUANO, V., CARTER, N. M., CHOI, S. K., CODANI, J. J., CONNERTON, I. F., DANCHIN, A., *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256
- KURIYAN, J., KONG, X. P., KRISHNA, T. S. R., SWEET, R. M., MURGOLO, N. J., FIELD, H., CERAMI, A., HENDERSON, G. B. (1991) X-Ray Structure of Trypanothione Reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4-Å Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8764-8768

- KWAN, W. P. & VOELKER, B. M. (2003) Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like system. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1150-1158
- KWON, S. J., PARK, J. W., CHOI, W. K., KIM, I. H., KIM, K. (1994) Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 8-15
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LECHEL, A. (1999) Klonierung, Sequenzierung und Analyse des 10 kDa Selenoproteins codierenden Gen *prpU* und seiner angrenzenden Genregion aus *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle
- LECLERE, V., BOIRON, P., BLONDEAU, R. (1999) News & notes: diversity of superoxide-dismutases among clinical and soil isolates of *Streptomyces* species. *Curr. Microbiol.* 39: 365-365
- LIM, Y. S., CHA, M. K., KIM, H. K., UHM, T. B., PARK, J. W., KIM, K., KIM, I. H. (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 273-289
- LINEWEAVER & BURK (1934) The determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-660
- LIPTON, S. A., CHOI, Y. B., PAN, Z. H., LEI, S. Z., CHEN, H. S., SUCHER, N. J., LOSCALZO, J., SINGEL, D. J., STAMLER, J. S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632
- LIU, Z., RECHES, M., GROISMA, I., ENGELBERG-KULKA, H. (1998) The nature of the minimal selenocysteine insertion sequence (SECIS) in *Escherichia coli*. *Nucl. Acid. Res.* 26: 896-902
- LOEWEN, P. (1996) Probing the structure of catalase HPII of *Escherichia coli*-a review. *Gene* 179: 39-44
- LOPEZ, J. A., CARVALHO, T. U., De SOUZA, W., FLOHÉ, L., GUERRERO, S. A., MONTEMARTINI, M., KALISZ, H. M., NOGOCEKE, E., SINGH, M., ALVES, J. M., COLLI, W. (2000) Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 767

- LÜBBERS, M. (1993) Klonierung, Sequenzierung und Analyse von Genen des Thioredoxin-Systems und der Glycin-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Georg-August Universität, Göttingen
- LÜBBERS, M. & ANDREESEN, J. R. (1993) Components of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Cloning, sequencing and identification of the genes for thioredoxin reductase, thioredoxin and selenoprotein P_A. *Eur. J. Biochem.* 15: 791-798
- LÜDEMANN, H., DORMEYER, M., STICHERLING, C., STALLMANN, D., FOLLMANN, H., KRAUTH-SIEGEL, R. L. (1998) *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett.* 431: 381
- LUMPPPIO, H. L., SHENVI, N. V., GARG, R. P., SUMMERS, A. O., VOORDOUW, G., KURTZ, D. M. (1997) A rubrerythrin-operon and nigerythrin gene in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *J. Bacteriol.* 179: 4607-4615
- LUMPPPIO, H. L., SHENVI, N. V., SUMMERS, A. O., VOORDOUW, G., KURTZ, D., M. (2001) Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J. Bacteriol.* 183: 101-108
- MAIORINI, M., AUMANN, K.-D., BRIGELIUS-FLOHE', R., DORIA, D., VAN DEN HEUVEL, J., McCARTY, J., ROVERI, A., URSINI, F., FLOHÉ, L. (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phosphohydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 367: 651-660
- MANEVICH, Y., SWEITZER, T., PAK, J. H., FEINSTEIN, S. I., MUZYKANTOV, V., FISHER, A. B. (2002) 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11599-11604
- MARTINEZ-GALISTEO, E., GARCIA-ALFONSO, C., PADILLA, A. C., BARCENA, A. J., LOPEZ-BAREA, J. (1992) NADPH and oxidized thioredoxin mediate redox interconversion of calf-liver and *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Mol. Cell Biochem.* 109: 61-69
- MARTYNOV, V. I., SAVITSKY, A. P., MARTYNOVA, N. Y., SAVITSKY, P. A., LUKYANOV, K. A., LUKYANOV, S. A. (2001) Alternative cyclization on GFP-like proteins family. *J. Biol. Chem.* 276: 21012-21016
- MARUSYK, R. & SEARGEANT, A. (1980) A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal. Biochem.* 105: 403-404

- MASSEY, V., STRICKLAND, S., MAYHEW, S. G., HOWELL, L. G., ENGEL, P. C., MATHEWS, R. G., SHUMAN, M., SULLIVAN, P. A. (1969) O²⁻ generation from flavins by photolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36: 891-897
- MATHIEU, I., MEYER, J., MOULIS, J.-M. (1992) Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the rubredoxin gene from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. J.* 285: 255-262
- MATTEVI, A., SCHIERBEEK, A. J., HOL, W. G. J. (1991) Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 220: 975-994
- McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055
- McCORD, J. M., KEELE, B. B., FRIDOVICH, I. (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1024-1027
- McELHANEY, R. (1985) The effect of membrane lipids on permeability and transport in prokaryotes. In: Structure and properties of cell membranes., G. Benga (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, Fla, S. 75-91
- MEAD, J. (1976) Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes. In: Free radicals in biology. W. Pryor (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 51-68
- MEILE, L., FISCHER, K., LEISINGER, T. (1995) Characterization of the superoxide dismutase gene and its upstream region from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *FEMS Lett.* 128: 247-253
- MELANDER, W. & HORVATH, C. (1977) Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Arch Biochem Biophys* 183: 200-215
- MENZEL, D. B. (1984) Ozone: an overview of its toxicity in man and animals. *J. Toxicol. Environ. Health* 13: 183-204
- MESSNER, K. R. & IMLAY, J. A. (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 10119-10128

- MEYER (1993) Beziehungen des Thioredoxin-Systems zur Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase in anaeroben, Aminosäure verwertenden Bakterien. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen
- MEYER, M., DIETRICH, D., SCHMIDT, B., ANDREESEN, J. R. (1991) Thioredoxin elicits a new dihydrolipoamide dehydrogenase activity by interaction with the electron-transferring flavoprotein in *Clostridium litoralis* and *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Bacteriol.* 173: 1509-1513
- MEYER, M., GRANDERATH, K., ANDREESEN, J. R. (1995) Purification and characterization of protein PB of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 234: 184-191
- MILLS, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189-197
- MONGKOLUSK, S. & HELMANN, J. D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* 45: 9-15
- MONKOLUSK, S., LOPRASERT, S., WHANGSUK, W., FUANGTHONG, M., ATICHARTPONKUN, S. (1997) Characterization of transcription organization and analysis of unique expression patterns of an alkyl hydroperoxide reductase C gene (*ahpC*) and the peroxide regulator operon *ahpF-oxr-orfX* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaesoli*. *J. Bacteriol.* 179: 3950-3955
- MONTEMARTINI, M., KALISZ, H. M., HECHT, H. J., STEINERT, P., FLOHE, L. (1999) Activation of active-site cysteine residue in the peroxiredoxin-type trypanothione peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur. J. Biochem.* 264: 516-524
- MORRIS, J. G. (1980) Oxygen tolerance/intolerance of anaerobic bacteria. In: Anaerobes and anaerobic infections. Symposia held at the XII International Congress of Microbiology in Munich, September 3-8, 1978, G. Gottschalk & N. Pfenning & H. Werner (Hrsg.), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, S. 7-15
- MOSKOVITZ, J., BERLETT, B. S., POSTON, J. M., STADTMAN, E. R. (1999) Methionine sulfoxide reductase in antioxidant defense. *Methods Enzymol.* 300: 239-244
- MOSKOVITZ, J., POSTON, J. M., BERLETT, B. S., NOSWORTHY, N. J., SZCZEPANOWSKI, R., STADTMAN, E. R. (2000) Identification and characterization of a putative active site for

- peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J. Biol. Chem.* 275: 14167-14172
- NAKAMURA, Y., KANEKO, T., SATO, S., IKEUCHI, M., KATOH, H., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IRIGUCHI, M., KAWASHIMA, K., KIMURA, T., KISHIDI, Y., KIYOKAWA, C., KOHARA, M., MTSUMOTO, M., MATSUNO, A., NAKAZAKI, N., SHIMPO, S., SUGIMOTO, M., TAKEUCHI, C., YAMADA, M., TABATA, S. (2002) Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP1. *DNA Res.*
- NELSON, K. E., CLAYTON, R. A., GILL, S. R., GWINN, M. L., DODSON, R. J., HAFT, D. H., HICKEY, E. K., PETERSON, J. D., NELSON, W. C., KETCHUM, K. A., McDONALD, L., UTTERBACK, T. R., MALEK, J. A., LINHER, K. D., GARRETT, M. M., STEWART, A. M., COTTON, M. D., PRATT, M. S., PHILIPS, C. A., RICHARDSON, D., HEIDELBERG, J., SUTTON, G. G., FLEISCHMANN, R. D., EISEN, J. A., FRASER, C. M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome of *Thermotoga maritima*. *nature* 399: 323-329
- NEWTON, G. L., ARNOLD, K., PRICE, M. S., SHERILL, C., DELCARDAYRE, S. B., AHARONOWITZ, Y., COHEN, G., DAVIES, J., FAHEY, R. C., DAVIS, C. (1996) Distribution of thiols in microorganisms: Mycothiol is a major thiol in most Actinomycetes. *J. Bacteriol.* 178: 1990-1995
- NEWTON, G. L. & FAHEY, R. C. (2002) Mycothiol biochemistry. *Arch. Microbiol.* 178: 388-394
- NIEDERHOFFER, E. C., NARANJO, C. M., BRADLEY, K. L., FEE, J. A. (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* 172: 1930-1938
- NIIMURA, Y., NISHIYAMA, Y., SAITO, D., TSUJI, H., HIDAKA, M., MIYAJI, T., WATANABE, T., MASSEY, V. (2000) A hydrogen Peroxide-Forming NADH Oxidase That Functions as an Alkyl Hydroperoxide Reductase in *Amphibacillus xylanus*. *J. Bacteriol.* 182: 5046-5051
- NIIMURA, Y., OHNISHI, K., YARITA, Y., HIDAKA, M., MASAKI, H., UCHIMURA, T., SUZUKI, H., KOZAKI, M., UOZUMI, T. (1993) A flavoprotein functional as NADH oxidase from *Amphibacillus xylanus* Ep01: purification and characterization of the enzyme and structural analysis of its gene. *J. Bacteriol.* 175: 7945-7950
- NIIMURA, Y., POOLE, L. B., MASSEY, V. (1995) *Amphibacillus xylanus* NADH Oxidase and *Salmonella typhimurium* Alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the

- presence of *Salmonella typhimurium* alkylhydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J. Biol. Chem.* 270: 25645-25650
- NISHIYAMA, Y., MASSEY, V., TAKEDA, K., KAWASAKI, S., SATO, J., WATANABE, T., NIIMURA, Y. (2001) Hydrogen peroxide-forming NADH oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: existence and physiological role in bacteria. *J. Bacteriol.* 183: 2431-2438
- NOGOCEKE, E., GOMMEL, D. U., KIESS, M., KALISZ, H. M., FLOHE, L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* 378: 827-836
- NUNN, C. M., DJORDJEVIC, S., HILLAS, P. J., NISHIDA, C. R., deMONTELLANO, P. R. O. (2002) The crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* alkylhydroperoxidase AhpD, a potential target for antitubercular drug design. *J. Biol. Chem.* 277: 20033-20040
- PARKHILL, J., WREN, B. W., MUNGALL, K., KETLEY, J. M., CHURCHER, C., BASHAM, D., CHILLINGWORTH, T., DAVIES, R. M., FELTWELL, T., HOLROYD, S., JAGELS, K., KARLYSHEV, A. V., MOULE, S., PALLAN, M. J., PENN, C. W., QUAIL, M. A., RAJANDREAM, M. A., RUTHERFORD, K. M., van VLIET, A. H., WHITEHEAD, S., BARRELL, B. G. (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariabl sequences. *Nature* 403: 665-668
- PARTHER, T. (1998) Charakterisierung einer selenhaltigen Peroxidase des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle
- PATZER, S. I. & HANTKE, K. (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28: 1199-1210
- PEARSON, W. R. & LIPMAN, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444-2448
- PIERLOT, C., AUBRAY, J., BRIVIBA, K., SIES, H., Di MASCIO, P. (2000) Naphtalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods Enzymol.* 319: 3-20
- PLATT, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 339-372
- POGOZELSKI, W. K. & TULLIUS, T. D. (1998) Oxidative strand scission of nucleic acids: route initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chem. Rev.* 98: 1089-1107

- POHL, E., HALLER, J. C., MIJOVILOVICH, A., MEYER-KLAUCKE, W., GARMAN, E., VASIL, M. L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis crystal structure and a spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiology* 47: 903-915
- POOLE, L. B., CHAE, H. Z., FLORES, B. M., REED, S. L., RHEE, S. G., TORIAN, B. E. (1997) Peroxidase activity of a TSA-like antioxidant protein from a pathogenic amoeba. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 955-999
- POOLE, L. B. & ELLIS, H. R. (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* 35: 56-64
- POOLE, L. B., REYNOLDS, C. M., WOOD, Z. A., KARPLUS, P. A., ELLIS, H. R., CALZI, M. L. (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low M_r thioredoxin reductase *J. Biochem.* 267: 6126-6133
- POSTGATE, J. R. (1984) The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press, Cambridge
- PRICKRILL, B. C., KURTZ, D. M., LeGALL, J., VOORDOUW, G. (1991) Cloning and sequencing of the gene for rubrerythrin from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Biochemistry* 30: 11118-11123
- PROSPERI, M. T., FERBUS, D., KARCZINSKI, I., GOUBIN, G. (1993) A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 16296-16301
- PYM, A. S., DOMENECH, P., HONORE, N., SONG, J., DERETIC, V., COLE, S. T. (2001) Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by *furA* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 40: 879-889
- RADCHAUDRI, S., REDDY, M. M., RAJKUMAR, N. R., RAJASEKHARAN, R. (2003) Cytosolic superoxide dismutase is a part of triacylglycerol biosynthetic complex in oleaginous yeast. *Biochem. J.* in press
- RAINA, S. & MISSIAKAS, D. (1997) Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 179-202
- RAVANAT, J. L., SAINT-PIERRE, C., Di MASCIO, P., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H., CADET, J. (2001) Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. *Helv. Chim. Acta* 84: 3702-3709

- REUTER, M. (2000) Funktion von Thiolen und Zink in den Untereinheiten des Proteins C der Glycin-Reduktase von *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle
- REYNOLDS, C. M., MEYER, J., POOLE, L. B. (2002) An NADH-Dependent bacterial thioredoxin reductase-like protein in conjunction with glutaredoxin homologue form a unique peroxiredoxin (AhpC) reducing system in *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* 41: 1990-2001
- ROBB, F. T., MAEDER, D. L., BROWN, J. R., DiRUGGIERO, J., STUMP, M. D., YEH, R. K., WEISS, R. B., DUNN, D. M. (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods Enzymol.* 330: 134-157
- ROCHA, E. R. & SMITH, C. J. (1997) Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. *J. Bacteriol.* 179: 7033-7039
- ROCHER, C., LALANNE, J. I., CHAUDIERE, J. (1992) Purification and properties of a recombinant sulphur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 205: 955-960
- ROMAO, C. V., LIU, Y. M., Le GALL, J., GOMES, C. M., BRAGA, V., PACHECO, I., XAVIER, A. V., TEIXEIRA, M. (1999) The superoxide dismutase activity of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 *Eur. J. Biochem.* 261: 438-443
- ROUHIER, N., GELHAYE, E., SAUTIERE, P. E., BRUN, A., LAURENT, P., TAGU, D., GERARD, J., de FAY, E., MEYER, Y., JAQUOT, J. P. (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 127: 1299-1309
- RUDOLF, J. (2003) Klonierung einer weiteren Kopie des Selenoprotein A aus *Eubacterium acidaminophilum* und vergleichende 2-D Elektrophorese Stress-induzierter cytoplasmatischer Proteine verschiedener Clostridien. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle
- SAITO, Y., HAYASHI, T., TANAKA, A., WATANABE, Y., SUZUKI, M., SAITO, E., TAKAHASHI, K. (1999) Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 274: 2866-2871
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
- SANGER (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379
- SCHRÄDER, T. & ANDREESEN, J. R. (1992) Purification and characterization of protein PC, a component of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 206: 79-85
- SCHRÖDER, E., LITTLECHILD, J. A., LEBEDEV, A. A., ERRINGTON, N., VAGIN, A. A., ISUPOV, M. N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* 8: 605-615
- SCHRÖDER, E., WILLIS, A. C., PONTING, C. P. (1998) Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1383: 279-291
- SCHWEDE, F. T., RETEY, J., SCHULZ, E. G. (1999) Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry* 38: 5355-5361
- SCMIDT, B., SELMER, T., INGEDOHL, A., FIGURA, K. (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82: 271-278
- SCOLNIK, E., TOMPKINS, R., CASKEY, T., NIRENBERG, M. (1968) Release factor differing in specificity for termination codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 768-774
- SEGEBACK, D. (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. *Chem. Biol. Int. Ed. Engl.* 45: 135-151
- SELMER, T. (2002) Post-translationale Modifikationen proteinogener Aminosäuren im aktiven Zentrum von Enzymen. Habilitationsschrift, Philipps-Universität, Marburg
- SEO, M. S., KANG, S. W., KIM, K., C., B. I., LEE, T. H., RHEE, S. G. (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulphide as a reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* 275: 20346-20354
- SHAO, F., BADER, M. W., JAKOB, U., BARDWELL, J. C. (2000) DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J. Biol. Chem.* 275: 13349-13352
- SHAROV, V. S., FERRINGTON, D. A., SQUIER, T. C., SCHONEICH, C. (1999) Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* 455: 247-250

- SHAU, H., BUTTERFIELD, L. H., CHIU, R., KIM, A. (1994) Cloning and sequence analysis of candidate human natural killer-enhancing factor genes. *Immunogenetics* 40: 129-134
- SHE, Q., SINGH, R. K., CONFALONIERI, F., ZIVANOVIC, Y., ALLARD, G., AWAYEZ, M. J., CHAN-WEIHER, C. C., CLAUSEN, I. G., CURTIS, B. A., DeMOORS, A., ERAUSO, G., FLETSCHER, C., GORDON, P. M., HEIKAMP-deJong, I., JEFFRIES, A. C., KOZERA, C. J., MEDINA, N., PENG, X., THI-NGOC, H. P., REDDER, P., SCHENK, M. E., THERIAULT, C., TOLSTRUP, N., CHARLEBOIS, R. L., DOOLITTLE, W. F., DUGUET, M., GAASTERLAND, T., GARRETT, R. A., RAGAN, M. A., SENSEN, C. W., Van der OOST, J. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus sulfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7835-7840
- SHIMA, S., NETRUSOV, A., SORDEL, M., WICKE, M., HARTMANN, G. C., THAUER, R. K. (1999) Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* 171: 317-323
- SHIMIZU, T., OHTANI, K., HIRAKAWA, H., OHSHIMA, K., A., Y., SHIBA, T., OGASAWARA, N., HATTORI, M., KUHARA, S., HAYASHI, H. (2002) Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 996-1001
- SHINE, J. & DALGARNO, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1342-1346
- SIES, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25: 1058-1071
- SINGH, A. & SINGH, H. (1982) Time scale and nature of radiation biological damage. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 69-107
- SMILLIE, D. A., HAYWARD, R. S., SUZUKI, T., FUJITA, N., ISHIAMA, A. (1992) Locations of genes encoding alkyl hydroperoxide reductase on the physical map of the *Escherichia coli* K-12 genome. *J. Bacteriol.* 174: 3826-3827
- SMITH, M. W. & DOOLITTLE, R. F. (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J. Mol. Evol.* 34: 175-184
- SOFIA, H. J., CHEN, G., HETZLER, B. G., REYES-SPINDOLA, J. F., MILLER, N. E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* 29: 1097-1106

- SÖHLING, B., PARTHER, T., WAGNER, M., ANDREESSEN, J. R. (2001) A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism *Eubacterium acidaminophilum*. *Biol. Chem.* 382: 979-986
- SONNTAG (1998) Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Molekulare Organisation der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase-spezifischen Gensätze. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle
- SQUADRITO, G. L., SALGO, M. G., FRONCZEK, F. R., PRYOR, W. A. (2000) Synthesis of inflammatory signal transduction species formed during ozonation and/or peroxidation of tissue lipids. *Methods Enzymol.* 319: 570-582
- STADTMAN, T. C. (1996) Selenocysteine. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 83-100
- STEHLE, T., CLAIBORNE, A., SCHULZ, G. E. (1993) NADH binding site and catalysis of NADH peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 211: 221-226
- STICKLAND, L. H. (1934) Studies on the metabolism of strict anaerobes (genus *Clostridium*). I. The chemical reactions by which *Clostridium sporogenes* obtains its energy. *Biochem. J.* 28: 1746-1759
- STOJILKOVICH, I. & HANDTKE, K. (1995) Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* 247: 199-205
- STORZ, G. & IMLAY, J. A. (1999) Oxidative Stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 188-194
- STORZ, G., JACOBSON, F. S., TARTAGLIA, L. A., MORGAN, R. W., SILVEIRA, L. A., AMES, B. N. (1989) An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: Genetic characterization and cloning of *ahp*. *J. Bacteriol.* 171: 2049-2055
- SUMMERFEILD, F. W. & TAPPEL, A. L. (1983) Determination by fluorescence quenching of the environment of DNA-crosslinks made by malondialdehyde. *Biochim. Biophys. Acta* 740: 185-189
- SUN, Q., WU, Y., ZAPPACOSTA, F., JEANG, T., BYEONG, J. L., HATFIELD, L., D., GLADISHEV, N. (1999) Redox regulation of cell signalling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.* 274: 24522-24530
- SUNDE, R. A. (1989) Selenium. In: Handbook of nutritionally essential mineral elements., O'Dell, R. A. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, S. 493-556

- SZCZYPKA, M. S., WEMMIE, J. A., MOYE-ROWLEY, W. S., THIELE, D. J. (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269:
- TAKAHASHI, K., AVISSAR, N., WHITIN, J., COHEN, H. J. (1987) Purification and characterization of human plasma glutathion peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 256: 677-686
- TAKEBE, G., YARIMIZU, J., SAITO, Y., HAYASHI, T., NAKAMURA, H., YODOI, J., NAGASAWA, S., TAKAHASHI, K. (2002) A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 277: 41254-41258
- TERZENBACH, D. P. & BLAUT, M. (1998) Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch. Microbiol.* 169: 503-508
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680
- TOMMASINI, R. E., R., VOGT, E., MORNET, C., ZAMAN, G. J., SCHINKEL, A. H., BORST, P., MARTINOIA, E. (1996) The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6743-6748
- TORMAY, P., WILTING, R., HEIDER, J., BÖCK, A. (1994) Genes coding for the selenocysteine-inserting tRNA species from *Desulfomicrobium baculatum* and *Clostridium thermoaceticum*: structural and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 176: 1268-1274
- TOUATI, D. (2000) Iron and oxidative Stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 1-6
- TOVEY, E. R. & BALDO, B. A. (1989) Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 19: 169-184
- TSUJI, N., KASUGA-AOKI, H., ISOBE, T., YOSHIHARA, S. (2000) Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.* 30: 125-128
- UESUGI, I. & YAJIMA, M. (1978) Oxygen and "strictly anaerobic" intestinal bacteria *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 18: 593-601

- URSINI, F., MAIORINO, M., BRIGELIUS-FLOHE', R., AUMANN, K. D., ROVERI, A., SCHOMBURG, D., FLOHE', L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 252 B: 38-53
- van POELJE, P. D. & SNELL, E. E. (1990) Pyruvoyl-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 29-59
- van VLIET, A. H. M., BAILLON, M. L. A., PENN, C., KETLEY, J. M. (1999) *Campylobacter jejuni* contains two fur homologs: Characterization of Iron-Responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR Repressor. *J. Bacteriol.* 181: 6371-6376
- VERDOUCQ, L., VIGNOLS, F., JACQUOT, J.-P., CHARTIER, Y., MEYER, Y. (1999) In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* 274: 19714-19722
- VERGAUWEN, B., PAUWELS, F., JACQUEMOTTE, F., MEYER, T. E., CUSANIVICH, M. A., BARTSCH, R. G., Van BEEUMEN, J. J. (2001) Characterization of glutathione amide reductase from *Chromatium gracile*. *J. Biol. Chem.* 276: 20890-20897
- VIEIRA, A. J. S. C., TELO, J. P., DIAS, R. M. B. (1999) Generation of Hydroxyl radical by photolysis of mercaptopyridine N-oxides: Application to redox chemistry of purines. *Methods Enzymol.* 300: 194-201
- VITALE, G., FABRE, E., HURT, E. C. (1996) NBP35 encodes an essential and evolutionary conserved protein in *Saccharomyces cerevisiae* with homology to superfamily of bacterial ATPases. *Gene* 178: 97-106
- WAGNER, M. (1997) Untersuchungen zu Proteinkomponenten der substratspezifischen Untereinheit der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle
- WAGNER, M., SONNTAG, D., GRIMM, R., PICH, A., ECKERSKOM, C., SÖHLING, B., ANDREESEN, J. R. (1999) Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 260: 38-49
- WALKER, J. E., SARASTE, M., RUNSWICK, M. J., GAY, N. J. (1982) Distantly related sequence in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO* 8: 945-951

- WALTER, A. E., TURNER, D. H., KIM, J., LYTTLE, M. H., MULLER, P., MATTHEWS, D. H., ZUKER, M. (1994) Coaxial stacking of helices enhances binding of oligonucleotides and improves prediction of RNA-folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9218-9222
- WATABE, S., HIROI, T., YAMAMOTO, Y., FUJIOKA, Y., HASEGAWA, H., YAGO, N., TAKAHASHI, S. Y. (1997) SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 249: 52-60
- WATANABE, Y., MOTOHASHI, K., YOSHIDA, M. (2002) Roles of the two ATP binding sites of ClpB from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277: 5804-5809
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412
- WESSEL, D. & FLÜGGE, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143
- WILLIAMS, C. H. J. (1976) *The enzymes*, 3rd edn Academic Press, New York
- WILLIAMA, C. H. J. (1992) Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase-a family of flavoenzymes transhydrogenases. In: *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* Vol. 3; Müller, F. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton
- WOOD, Z. A., POOLE, L. B., HANTGAN, R. R., KARPLUS, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41: 5493-5504
- WOOD, Z. A., SCHRÖDER, E., HARRIS, J. R., POOLE, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28: 32-40
- WU, Y., KWON, K. S., RHEE, S. G. (1998) Probing cellular protein targets of H₂O₂ with fluorescein-conjugated iodoacetamide and antibodies to fluorescein *FEBS Letters* 440: 111-115
- XU, X., KANAYA, S., KOYAMA, N., SEKIGUCHI, T., NOSOH, Y., OHASHI, S., TSUDA, K. (1989) Tryptic digestion of NADH dehydrogenase from alkalophilic *Bacillus*. *J. Biochem.* 105: 626-632
- YANG, K. S., KANG, S. W., WOO, H. A., HWANG, S. C., CHAE, H. Z., KIM, K., RHEE, S. G. (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J. Biol. Chem.* 277: 38029-38036

- YOON, S. J., PARK, J. E., JANG, J. H., PARK, J. W. (2002) *OxyR* regulon controls lipid peroxidation-mediated oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochem. Mol. Biol.* 35: 297-301
- YOUN, H. D., KIM, E. J., ROE, J. H., HAH, Y. C., KANG, S. O. (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318: 889-896
- ZAPUN, A., BARDWELL, J. C., CREIGHTON, T. E. (1993) The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* 32: 5083-5092
- ZHENG, M., ASLUND, F., STORZ, G. (1998) Activation of the *OxyR* transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-1721
- ZHENG, M., DOAN, B., SCHNEIDER, T. D., STORZ, G. (1999) *OxyR* and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181: 4639-4643
- ZHENG, M., DOAN, B., SCHNEIDER, T. D., STORZ, G. (1999) *OxyR* and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181: 4639-4643
- ZHENG, M. & STORZ, G. (2000) Redox sensing by procaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* 59: 1-6
- ZHONG, L., ARNÉR, E. S. J., HOLMGREN, A. (2000a) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5854-5859
- ZHONG, L. & HOLMGREN, A. (2000b) Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J. Biol. Chem.* 275: 18121-18128
- ZINDEL, U., FREUDENBERG, W., RIETH, M., ANDREESEN, J. R., SCHNELL, J., WIDDEL, F. (1988) *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino-acid degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. Description and enzymatic studies. *Arch. Microbiol.* 150: 254-266

ANHANG

Abb. A1: DNA-Sequenz des Plasmides pPX2

orfD (N-Terminus)-hypothetisches Protein; *prxU*-Seleno-Peroxiredoxin; *orfA*-MRP-homologes Protein; *orfB*-hypothetisches Protein; *fur*-Fur.

Die Startcodonen sind einfach, putative Ribosomenbindestellen doppelt und postulierte Promotorsequenzen gepunktet unterstrichen. Die Pfeile nach der Genbezeichnung geben die Transkriptionsrichtung an. Eine Rho-unabhängige Terminationsstruktur stromabwärts des *prxU*-Gens ist mit >>> <<<. gekennzeichnet, der Transkriptionsstartpunkt für *prxU* ist fett hervorgehoben. Eine putative Fur- (bzw. PerR-) Operator-Sequenz ist eingerahmt.

Abb. A2: Massenspektroskopische Analyse des Proteins GrdB

Abb. A3: Massenspektroskopische Analyse des Proteins GrdBC353A

Abb.A4: Massenspektroskopische Analyse des Proteins GrdBC356A

1921 TTCATTCCCT ACCGGGTGGA TGGCATAATA ATTGTTTCGT CCCCAGCAAGA TCTTGTAAC CCGGGTACCG AGCTCGAATT
I H S L P G G W H N N C F V P A R S C K P G Y R A R I 170
2001 CGTAATCATG GTCATAGCTG TATGATAGTC AAAAAATCTG CAGACATGGC CAAAAGAATG GATGTTCCAA TTCTTGGGAT
R N H G H S C M I V K K S A D M A K R M D V P I L G 196
2081 AATAGAAAAC ATGAGCTATT ATGAATGTCC TGATTGCAAA AAACGAATCA ACATATTCGG AAAAAAGCAAA ACAGAAAAGA
I I E N M S Y Y E C P D C K K R I N I F G K S K T E K 223
2161 TTTCAAAGGA AATGAGAATT GAACTCATTG CTCACATGCC TATAGATCCA AAAGTAGCGG AATTATGTGA CGAGGGCGCA
I S K E M R I E L I A H M P I D P K L A E L C D E G A 250
2241 ATTGAAGAGT ATTACAACAT AAACAGGGCG CTGTAAATT TACTTTCTGA TGAGGTTTTA AAAAAATTA GTTAGTTTTA
I E E Y Y N I N R A L V N L L S D E V L K K L S -AAAAT 274
2321 ATTGCCATA TTACATTAAT ATTGTACGAG ACCTTTGCAA AGCTAGTAAA AAGCCTGTGA CACTCTGTGT TCAAATGTCA
TAACGGGTAT AATGTAATTA TAACATGCTC TGAAACGTT TCGATCATTT TTCGGACACT GTGAGAACAA AGTTTACAGT
2401 CAGGCTGCTT TTATTTTTTCG ACTGTTCTGC CGCAAGCGGC GTCATTCAAT CTATTATACA ATTCATCCAA ACTCACACTC
GTCCGACGAA AATAAAAAGC TGACAAGACG GCGTTCGCCG GAGTAAGTTA GATAATATGT TAAGTAGGTT TGAGTGTGAG
2481 CGCTCCTTTT CAATGTCCCT AATGATTGG AAAAGGAAGC TGCACATTAT GCAAGTACCA AGCATGCTGT CGTATCTCG
GCGAGGAAAA GTTACAGGAG TTAACATAAC TTTTCTTCG ACGTGTAAATA CGTTCATGGT TCGTACGACA GCATAAGAGC
2561 GAATATTGCC TCTGTTTCGG GATACCGCTC AACTATATAT CTAGCAATAT CATCTGTCGG TAACCCATAT CTCACCTCGT
CTTATAACGG AGACAAAGCC CTATGGCGAG TTGATATATA GATCGTTATA GTAGACAGCC ATTTGGGTATA GAGTGGAGCA
2641 CGGATAGATT TTTCTGCGAC ATCGACCTAA TCAGGCAAGC CAT- S N N E V C V C K L N P 238
GCCTATCTAA AAAGACGCTGTTAGCTGGATT AGTCCGTTCG GTAAATTGAC AACAAAAGTT GTGTATGCGT AAAGTTCAAT
V G I Y D S I V P C K A M L V F F L G D R K I D S L 226
2721 CCGTGAGGTT ACATCAGACT ATAGTGGCCT GTAAAACGGT ACTCGTGCTT CTTTTCTGGT AGGGAAAAC ATAGTGATTC
G E Y N G T R Q C Y R S G I R R F H A Q I M R R Q P L 200
2801 TGGGAGTATC AAGGGACAGG AAACCGTTAT TGCTCTAGGC TAGGCAGCTT TTACGCGGAC TTAGTAGGCT GCGACCCCGT
V T V P A E T G D D I I I A L D G M G V Q L A D D S T 173
2881 TCTGGCAATG TCCTCGAAGC CAAGGCAGTA GATATTAATA CCGATTAGA GGGTAAGGAT GGACGTCACG CAGTAGGCTT
V D N L V A K G R V S F Y I K I D S F E S R I R E I 146
2961 CAGTGTAGCA ACTCGTGCCG AAAAGGAGCG TCGGACTTTA TATAGAACTA TAGTGACTTA AGCGAAGAAT AGGAGAGATA
L L K D L V I E G C N D G I V L L Q K S V K L K E Y L 120
3041 TTCGTCGAAT AGGTCCTGTT AGAGAGGCGT TAACAGTGGC TAATGTTCGT CGACGAAACT CTGAAAATCG AAGAGTATGT
R R S H D I A F I D R S C L N C I K E Y C M E K D F Y 93
3121 CGGAGGACGA TACCAGATAA CGTTTATACA GGGAGCTTGT GTTTAATGTA TAAAAAGTA TCGTGTAAAG GAACAGCTTT
H N A G F D I I N G V A S L R L A E F F G E E G K S 66
3201 ATCACTAACC GTGGTTTTAG ATACTACAAC GGGTGGCGTC TATCGGAGTT CCGGAGTTTC TTCGGGAGGA GCGGAAAAC
L R S K L L G Y I Q L M D S N F R Q K E S K Y P D S E 40
3281 GTCGGAGCTG AAGTCCCTCTG GTATTTAGAC GTTGTACAGC GACAACCTCG CGACGAAAAG CGAGAATATA CCTAGACTGA
G L G D T I I R W T G S M GATTTCTGGA TTTTTCATTT TAAAATCTAT ATCCGCCAAG 13
3361 GAGGTTCAAG TAGACAATAA TAAGAGGTAC ACGGTGAGTA CTAAGACCT AAAAAGTAAA ATTTTAGATA TAGGCGGTT
3441 TGCTTCAGCA CATCCCTTAT CACGGGCTCC TTTGCACATT CTAGCGAGCA TTTATATGCC TGGACACCTT ATCGACTTGT
ACGAAGTCGT GTAGGGAATA GTGCCGAGG AAACGTGTAA GATCGCTCGT AAATATACGG ACCTGTGGAA TAGCTGAACA
3521 TCTATATTGC ACAGTAAACA CTTAAAATTA AATTCCATGA TTCATCCCTT GTTCCCGTCA AAATATTGTC CTGGTAAACA
AGATATAACG TGTCATTTGT GAATTTTAAAT TTAAGGTACT AAGTAGGGGA CAAGGGCAGT TTTATAACAG GACCATTGTT
3601 ATCAGCAAT- A V N V D K K C S S C V G R M V V T V D D I V 152
TAGTCGTTAA ATTCGATGCA AATGTAGAAA GAATGTCCCT GACGTATGGG GAGAGTAGTG ATGGCAGTGT AGTAGATAAT
D N Y T E E I Y D R Q M L M D K F I R R D N D E K I K 129
3881 GTAGTAACAT CCAAAGAAGT TATATCAGAG AAACGTATTC GTATAGGAAT TTTTAGGCGG ACAGTAACAG GAGGAACTAA
G C V S C Q F H S H F K K Q S F I S L E Y Y R E N N 102
3761 AATGGTGTAT GCGACGTAAC TTTCACTGAT ACTTTAAAGA AAACCGACTT TTACGATTCG AGCATTATAG AAAGTAACAA

Fortsetzung nächste Seite

I V V E K I I G I K F I E I S R D G T P I S V D E N R 76
3841 CTATTGCTGA AGAAAATAAT ACGGCTAAAA GAATTTTTAG AGATACGACG CCAGAGGGCA CCCCTACGAC TGTAGAAGTA

V K N Y Y I D E P K L H E S T Q V F L R V I V E R P H 49
3921 AGGACTGAAA TAATATATAT AGGAGCCCGA ATTCTACGAG CGATCAAAC TGT TTGTCGG AATGT TAGTG GAGAGATCCT
fur (←)

T L K Y G N S K L L E E I E F I K K E T E M GT TTTCACCCTT 22
4001 ACGCAGTCGA ATATCGGTAA TCTAAACTCG TTGAGAAGTT AGAGTTTTTA GAAAAAGAGT CAAAGGTACA AAAGTGGGAA

4081 TTCCTGGCCT TCGCCAGACA TGATCCTCTA GAGTCGACCT GCA
AAGGACCGGA AGCGGTCTGT ACTAGGAGAT CTCAGCTGGA CGT

Abb. A1: DNA-Sequenz des Plasmides pPX2

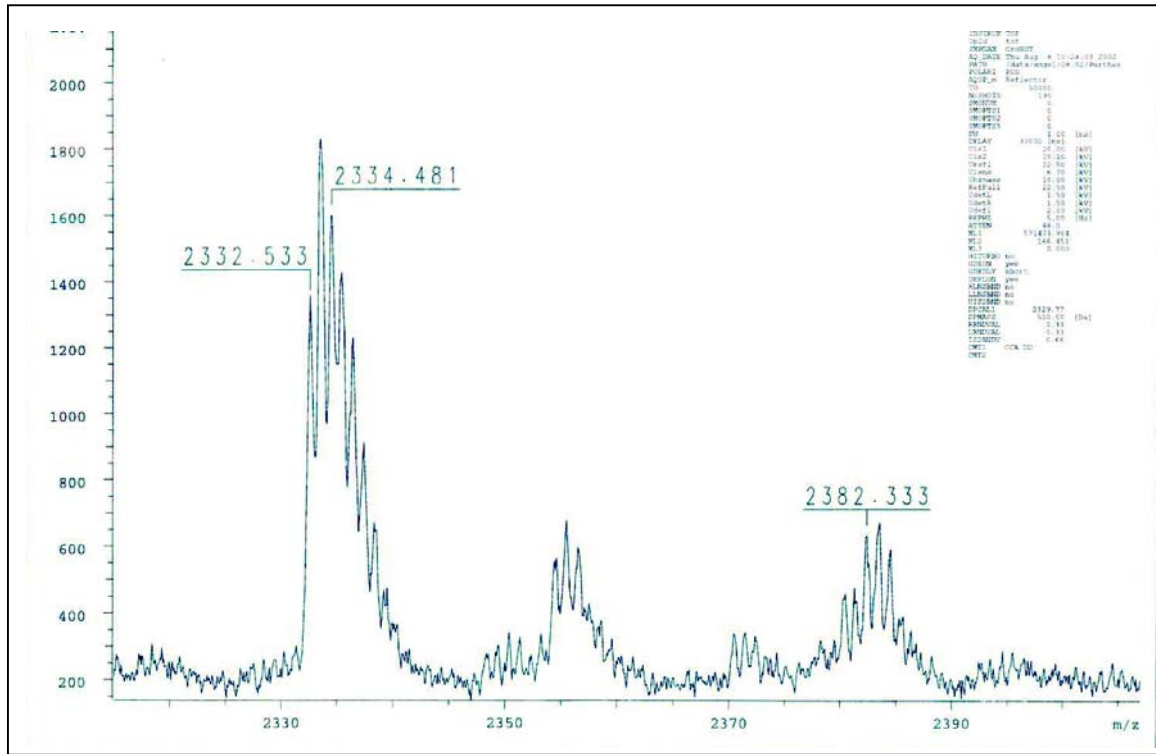


Abb. A2: Massenspektroskopische Analyse des rekombinanten Proteins GrdB

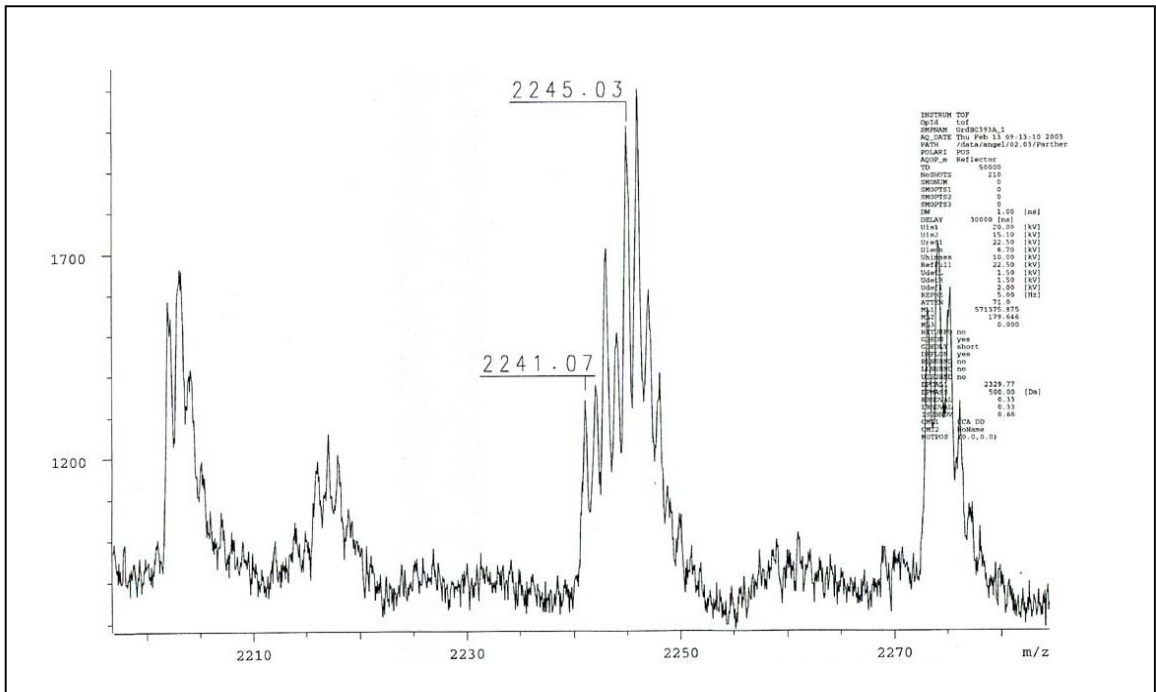


Abb. A3: Massenspektroskopische Analyse des rekombinanten Proteins GrdBC353A

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen, der mir die Tätigkeit an seinem Institut ermöglichte und mein Interesse an der Sauerstoff-Problematik in anaeroben Organismen geweckt hat. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser beigetragen.

Bei Frau Dr. Brigitte Söhling möchte ich mich für die Heranführung an das Thema und so manchen konstruktiven Ratschlag bedanken. Besonderem Dank gilt Ihrem Engagement für das Innovationskolleg, durch das die Finanzierung des Projektes gewährleistet wurde.

Die freundschaftliche (feucht-)fröhliche Atmosphäre im Labor 211 trug stets zur Motivation bei und half so manchen experimentellen Fehlschlag zu überwinden. An Claudia Hammerschmidt, Katrin Fritsche, Denise Sonntag, Martin Kohlstock, Torsten Gursinsky, Jana Jäger, Claudia Keil, Christoph Happe, Andre Lechel, Michael Reuter, Daniel Gröbe, Rüdiger Bos, Anja Poehlein, Jana Rudolf und Juliane Viezens geht mein Dank für ihr offenes Ohr, die zahlreichen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche sowie ihre ständigen Hilfsbereitschaft.

Ute Lindenstrauß danke ich für die vielen Sequenzierungen, Dr. Karl-Peter Rücknagel für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen einiger Proteine und Dr. Angelika Schierhorn für die massenspektroskopischen Analysen des Selenocystein-Einbaus.

Der AG von Prof. Wahle danke ich für die vielseitige wissenschaftliche Unterstützung und die „Verleihung“ kleinere und größerer Labor-Gerätschaften.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der AG Prof. Liebl des Instituts für Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen, sowie der AG Prof. Rudolph am Institut für Biotechnologie der MLU Halle, die mir die Nutzung der 100 l-Fermentatoren ermöglichten.

Allen hier nicht genannten Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie sei Dank gesagt für die nette Arbeitsatmosphäre und so manchen guten Rat.

Mein herzlicher Dank gilt Anke Grzam & Marie, Claudia Keil, Jörg Grzam & Sophia sowie Claudia Temme, die stets für mich da waren.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz lieb bei meinen Eltern, meiner Oma und ganz besonders bei Daniel für die vielfältige Unterstützung bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich anderen Werken entnommen sind, als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 05. 05. 2003

Tina Parther

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Parther
Vorname: Tina
Geburtsdatum: 16.07.1974
Geburtsort: Nordhausen

Schulbildung

09.1981-08.1990 allgemeinbildende polytechnische Oberschule „Ernst Thälmann“ in Nordhausen
09.1990-08.1991 Leistungsklasse 10 der G. E. Lessing-Schule in Nordhausen
Abschluß: 10. Klasse
09.1991-06.1993 J. G. Herder-Gymnasium Nordhausen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium und berufliche Tätigkeit

10.1993 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studiengang Biochemie/Biotechnologie
09.1995 Vordiplomprüfung in den Fächern Biochemie, Allgemeine und Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Naturstoffchemie, Allgemeine Biologie und Physik
11.1997 Diplomprüfung in den Fächern Allgemeine Biochemie, Enzymologie, Organische Chemie, Mikrobiologie und Technische Biochemie
01.1998-09.1998 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg zum Thema:
Charakterisierung einer Selen-haltigen Peroxidase des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum*
10.1998-05.2003 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der vorliegenden Dissertation

Halle, den 05. 05. 2003