

**Das Selenoprotein PrpU als Vermittler zwischen
oxidativem und reduktivem Glycin-Metabolismus von
*Eubacterium acidaminophilum***



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Anja Poehlein

geb. am 26.09.1978

in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. J. R. Andreesen

2. Prof. G. Sawers

3. Prof. M. Hagemann

Tag der Verteidigung: 10.09.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014460

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014460>]

Inhaltsverzeichnis

I

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	1
2. Material & Methoden	12
2.1. Organismen und Plasmide.....	12
2.2. Kultivierung von Bakterien	16
2.2.1. Vollmedien für <i>E. coli</i>	16
2.2.2. M9-Minimalmedium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989).....	16
2.2.3. Medium für die Anzucht von <i>E. acidaminophilum</i>	17
2.2.3. Medienzusätze	18
2.2.4. Zellanzucht	19
2.2.5. Messung des Bakterienwachstums	19
2.2.6. Lagerung von Bakterienkulturen.....	19
2.3. Isolierung von Nukleinsäuren.....	19
2.3.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>E. acidaminophilum</i> (SAITO and MIURA 1963), mod.	19
2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA	20
2.3.2.1. Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (BIRNBOIM and DOLY 1979).....	20
2.3.2.2. Plasmidisolation mit dem QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden).....	20
2.3.2.3. Plasmid Midipräparation.....	21
2.3.3. Isolierung von RNA	21
2.4. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	21
2.4.1. Behandlungen von Geräten und Lösungen	21
2.4.2. Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren.....	21
2.4.3. Fällung von Nukleinsäuren	22
2.4.4. Auftrennung von Nukleinsäuren	22
2.4.4.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	22
2.4.4.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	22
2.4.5. Größenbestimmung von Nukleinsäuren	23

2.4.6. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	23
2.4.7. Reinigung von PCR-Produkten	24
2.4.8. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	24
2.4.9. Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen	24
2.4.10. Dephosphorylierung von DNA.....	24
2.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.4.12. Mikrodialyse von DNA-Lösungen (MARUSYK and SERGEANT 1980)	25
2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.5.1. Standard-PCR.....	25
2.5.2. Identifikation unbekannter Genomabschnitte mittels Vektorette-PCR (RILEY <i>et al.</i> , 1990)	26
2.6. Herstellung und Selektion rekombinanter <i>E. coli</i>-Klone.....	27
2.6.1. Transformation durch Elektroporation (DOWER <i>et al.</i> , 1988)	27
2.6.1.1. Herstellung kompetenter Zellen.....	27
2.6.1.2. Übertragung von DNA in <i>E. coli</i> durch Elektroporation	27
2.7. Hybridisierung von Nukleinsäuren.....	27
2.7.1 Herstellung von DIG-markierten Sonden.....	27
2.7.2. DNA-Hybridisierung (SOUTHERN 1975)	28
2.7.4. Dot-Blot-Hybridisierung	28
2.7.5 Kolonie-Hybridisierung.....	28
2.8. Methoden zur DNA-Analyse.....	29
2.8.1. DNA-Sequenzierung am ABI377-Sequencer	29
2.8.2. Auswertung von Sequenzdaten.....	29
2.9. Methoden zur RNA-Analyse.....	30
2.9.1. Reverse Transkription (RT-PCR)	30
2.9.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels <i>primer extension</i>	30
2.10. Proteinchemische Methoden.....	30
2.10.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (BRADFORD 1976).....	30
2.10.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI 1970)	30
2.10.3. Denaturierende Tris-Tricine-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SCHÄGGER 2006)	31
2.10.4. Coomassie-Färbung von Proteinen	31
2.10.5 Trocknung von Protein-Gelen	31
2.10.6. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen und Western-Blot Analyse	32
2.10.6.1. Nachweis von <i>Strep</i> -tag® II-Fusionsproteinen	32
2.10.7. Heterologe Synthese von Proteinen mit Hilfe des <i>Strep</i> -tag® II-Expressionssystems.....	32

2.10.7.1. Kultivierung, Induktion der Proteinsynthese und Ernte der Zellen.....	32
2.10.7.2. <i>rapid screening</i> von Expressionskulturen.....	32
2.10.7.3. Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes.....	33
2.10.7.4. Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose	33
2.11. Bestimmung von Enzymaktivitäten	33
2.11.1. Thioredoxin-System-Test mit DTT und NADP (MEYER <i>et al.</i> , 1991), mod.	33
2.11.2. Thioredoxin-System-Test mit NADPH und Lipoamid (MEYER <i>et al.</i> , 1991), mod.....	34
2.11.3 Test auf Diaphorase-Aktivität nach KLEIN and SAGERS (1967)	34
2.11.4 Glycin-Decarboxylase, lichtoptischer Test nach KLEIN and SAGERS (1967)	35
2.11.5. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität (MILLER 1992), mod.	36
2.11.5.1. Zellanzucht	36
2.11.5.2. Aktivitätsbestimmung	36
2.12. Geräte und Chemikalien	37
3. Experimente und Ergebnisse	38
3.1. Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase-Gencluster in <i>E. acidaminophilum</i>.....	38
3.1.1. Vollständige Klonierung des Gencluster I der Glycin-Reduktase	38
3.1.2. Vollständige Klonierung des Gencluster VI der Betain-Reduktase	40
3.1.3. Vollständige Klonierung des Gencluster V/II der Betain-Reduktase.....	41
3.1.4. Verknüpfung der Gencluster	42
3.2. Das Glycin-Decarboxylase-Operon aus <i>E. acidaminophilum</i>	44
3.2.1. Vollständige Klonierung des Glycin-Decarboxylase-Operons aus <i>E. acidaminophilum</i>	44
3.2.2. Transkriptionsanalysen des Glycin-Decarboxylase-Operons durch RT-PCR.....	47
3.2.3. <i>primer-extension</i> Experimente zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte	48
3.2.4. Putative Transkriptions- und Translationssignale des Glycin-Decarboxylase-Operons.....	49
3.2.5. Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Wachstumsbedingungen	52
3.2.5.1. Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Wachstumsphasen.....	52
3.2.5.2. Transkriptionsanalysen bei der Kultivierung mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	54
3.3. Interaktionsstudien von PrpU mit Hilfe von bakteriellen <i>two-hybrid</i>-Systemen	55
3.3.1. Einführung in das BacterioMatch [®] Two-Hybrid-System	56
3.3.2. Einführung in das bakterielle <i>lexA</i> -basierende <i>two-hybrid</i> -System (DMITROVA <i>et al.</i> , 1998).....	57
3.3.3. Klonierung in die Plasmide pBT und pTRG des BacterioMatch [®] Two-Hybrid-Systems	58
3.3.4. Klonierung in die Plasmide pMS604 und pDP804 des <i>lexA</i> -basierende <i>two-hybrid</i> -Systems.....	60
3.3.5 Transformation der konstruierten Hybrid-Plasmide in die Reporterstämme	61
3.3.6. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivitäten.....	62
3.3.7. Detektion der PrpU-Derivate mittels Western-Blot.....	64

3.3.8. Auswertung der Interaktionsstudien aller untersuchten Proteine	66
3.3.9. Identifikation von Homodimeren im Reporterstamm <i>E. coli</i>-SU101	68
3.4. Synthese von Proteinen aus <i>E. acidaminophilum</i> in <i>E. coli</i>	70
3.4.1. Synthese der Komponenten der Glycin-Decarboxylase als <i>Strep-tag</i>[®] II-Fusionsprotein	70
3.4.1.1. Klonierung in die Expressionsvektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5	70
3.4.1.2. Testexpression von <i>gcvP1α</i> , <i>gcvP1β</i> , <i>gcvP2</i> und <i>gcvP4</i> als <i>Strep-tag</i> [®] II-Translationsfusion in <i>E. coli</i>	71
3.4.1.3. Reinigung der heterolog synthetisierter Proteine	72
3.4.1.4. Coexpression der Gene der α - und β -Untereinheit des P1-Proteins von <i>E. acidaminophilum</i>	73
3.4.1.5. Konstruktion eines Vektors zur simultanen Reinigung der α - und β -Untereinheit des P1-Proteins	75
3.4.1.6. Klonierung des <i>gcvP1</i> -Gens von <i>E. acidaminophilum</i> in den Expressionsvektor pASK-IBA53ke	76
3.4.2. Lipoylierung des P2-Proteins der Glycin-Decarboxylase von <i>E. acidaminophilum</i>	79
3.4.2.1. Synthese des P2-Proteins in Gegenwart von Liponsäure	79
3.4.3. Expression der Gene des Thioredoxin-Systems von <i>E. acidaminophilum</i> als <i>Strep-tag</i>[®] II-Fusionsproteine	80
3.4.3.1. Klonierung von <i>trxB</i> und <i>trxA</i> in den Expressionsvektor pASK-IBA3	80
3.4.3.2. Synthese und Reinigung von heterologer Thioredoxin-Reduktase und heterologem Thioredoxin	81
3.4.4. Expression der Gene der Selenoproteine PrpU und GrdA und deren Cystein-Mutanten in <i>E. coli</i>	82
3.4.4.1. Klonierung von <i>grdA3</i> und <i>prpU</i> in das Expressionsplasmid pASK-IBA3plus	82
3.4.4.2. Testexpression der Gene der Selenoproteine PrpU und GrdA als <i>Strep-tag</i> [®] II-Translationsfusion in <i>E. coli</i>	83
3.4.4.3. Synthese und Reinigung von Wildtyp-PrpU und -GrdA und deren Cystein-Varianten	84
3.5. pull-down Experimente	85
3.6. Aktivitätstests zur Bestimmung der Funktion von PrpU	87
3.6.1. Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase	87
3.6.2. Glycin-Decarboxylase-Test	89
4. Diskussion	91
4.1. Die Transkription des Glycin-Decarboxylase-Operons	91
4.2. Die Glycin-Decarboxylase - ein Komplex, der normalerweise aus vier Proteinen besteht	102
4.2.1. Das P1-Protein der Glycin-Decarboxylase-die eigentliche Decarboxylase	103
4.2.2. Das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase-das <i>hydrogen carrier</i> Protein	111
4.2.3. Das P4-Protein der Glycin-Decarboxylase-die Aminomethyl-Transferase	117
4.3. Interaktionsstudien mit Hilfe von bakteriellen <i>two-hybrid</i>-Systemen und <i>pull-down-assays</i>	121
4.3.1. Interaktionen der Komponenten der Glycin-Decarboxylase	122
4.3.2. Interaktionsstudien von PrpU und den Vertretern des Thioredoxin-Systems	124
4.4. Glycin-, Sarcosin- und Betain-spezifische Gencluster	128

4.5. Ausblick	138
5. Zusammenfassung	140
6. Literaturverzeichnis	142
7. Anhang	161
A.I. Verwendete Oligonukleotide	161
A.II. Sequenz des Glycin-Decarboxylase-Operons und der angrenzenden Bereiche	168
A.III. Sequenz eines neuen Ausschnittes des Glycin-Reduktase-spezifischen Gencluster I	176
A.IV. Sequenz eines erweiterten Ausschnittes des Glycin-Reduktase-spezifischen Gencluster III	180
A.V. Sequenz eines Ausschnittes des Sarcosin-Reduktase-spezifischen Gencluster IV	182
A.VI. Sequenz eines erweiterten und verbundenen Ausschnittes des Betain-spezifischen Gencluster II/V	184
A.VII. Sequenz eines neuen Ausschnittes des Creatin-Reduktase-spezifischen Gencluster VI-5'-Bereich	189
A.VIII. Sequenz des neuen Ausschnittes des Creatin-Reduktase-spezifischen Gencluster VI-3'-Bereich	191
A.IX. β-Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten <i>E. coli</i>-SU202 und <i>E. coli</i>-SU101 Stämme	193
A.IX.1. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP1 α -Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	193
A.IX.2. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP1 β -Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	194
A.IX.3. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP2-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	195
A.IX.4. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP4-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	196
A.IX.5. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSGrdA-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	197
A.IX.6. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSTR-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	198
A.IX.7. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSTRx-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten	199
A.IX.8. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP1 $\alpha\beta$ -Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten.....	200
A.IX.9. β -Galactosidase-Aktivitäten der pMSP604-Derivate im Stamm <i>E. coli</i> -SU202	201
A.IX.10. β -Galactosidase-Aktivitäten der pDP804-Derivate im Stamm <i>E. coli</i> -SU101	202
A.IX.11. β -Galactosidase-Aktivitäten der pDP804-Derivate im Stamm <i>E. coli</i> -SU202	203
A.IX.12. β -Galactosidase-Aktivitäten der Kontrollen	204
A.X. Absorptionsspektren von heterolog synthetisierter Thioredoxin-Reduktase und von GrdA	205
A.XI. mRNA-Sekundärstrukturen des potentiellen Glycin-Riboswitch aus <i>C. difficile</i> und <i>C. sticklandii</i>	206

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
G	Guanin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HABA	4'-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)

I	Inosin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Lysis-Broth
MALDI	<i>matrix-assisted laser-desorption ionization</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation)
mcs	<i>multiple cloning site</i>
MG	Molekulargewicht
mod.	modifiziert
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
N	beliebiges Nukleotid
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactosid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	<i>pounds per sqare inch</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (25 °C)
RT	Reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SLA	Spurenelementlösung A
SSC	Standard-Saline-Citrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uridin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5' -triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galactopyranosid

1. Einleitung

Das Wort Glycin leitet sich vom griechischen Adjektiv „glykys“ ab, was süß bedeutet. Glycin, auch als Aminoessigsäure bezeichnet, ist die kleinste und am einfachsten strukturierte proteinogene Aminosäure. Sie gehört zur Gruppe der hydrophilen Aminosäuren und ist als einzige nicht chiral und somit nicht optisch aktiv. Glycin gehört zu den nicht essentiellen Aminosäuren und ist ein wichtiger Bestandteil nahezu aller Proteine und übernimmt eine wichtige Position im Stoffwechsel aller Organismen. Es kann über die Wege der Serin-Hydroxymethyltransferase und der Glycin-Decarboxylase zur Energiekonservierung genutzt werden, stellt aber auch eine sehr wichtige Quelle für C₁-Einheiten für die Synthese von Purinen, aber auch von Häm-Vorstufen, Creatin, Porphyrinen und Glutathion dar. Im Zuge der Akzeptorregeneration bei der Photorespiration wird über Glyoxylat Glycin und Serin in den Mitochondrien gebildet, wo die Komponenten der Glycin-Decarboxylase 10 % der cytosolischen Proteine ausmacht. Der Anteil von Glycin in Proteinen kann, wie z. B. beim Kollagen oder der Spinnenseide (GOSLINE *et al.*, 1986) bis zu 35 % betragen. Mehr als 45 mol% beträgt der Anteil an Glycin am *antifreeze* Protein (AFP), was von *Hypogastrura haveyi* (Schneefloh) als Schutz vor Kälte bzw. Eiskristallen gebildet wird (GRAHAM and DAVIES 2005). Auf Grund seiner geringen Größe begünstigt es hier die Ausbildung der für dieses Protein charakteristischen Tripel-Helix-Struktur. Im Zentralnervensystem dient Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter. Glycinerge Neuronen kommen hauptsächlich im Rückenmark vor und hemmen dort die Motoneuronen des Vorderhorns, wodurch es zur Herabsetzung der Muskelaktivität der von diesen Zellen innervierten Muskeln kommt (LÖFFLER and PETRIDES 2003; STRYER 1996).

In die Gruppe der Firmicutes ist die heterogene Gattung der Clostridien einzuordnen, die mindestens 19 verschiedene Cluster umfasst (COLLINS *et al.*, 1994). *Eubacterium acidaminophilum* gehört wie *Clostridium difficile*, *Clostridium sticklandii* und *Clostridium litorale* zu diesen obligat anaeroben, Gram-positiven Organismen, die dem Cluster XI der Clostridien angehören (BAENA *et al.*, 1999). *E. acidaminophilum* ist z. B. in der Lage, Glycin und die Derivate Sarcosin (N-Methylglycin) und Betain (N, N, N-Trimethylglycin) in einer internen Stickland-Reaktion (STICKLAND 1934) zur Energiekonservierung zu nutzen (ZINDEL *et al.*, 1988). Auch Creatin und Hydantoine werden über Sarcosin verstoffwechselt. Die Stickland-Reaktion ist eine gekoppelte Oxidations-Reduktions-Reaktion, bei der meist Paare von Aminosäuren metabolisiert werden, eine als Elektronen-Donor, eine andere, meist Glycin, Prolin oder Leucin, als Elektronen-Akzeptor. Glycin kann bei dieser Art des Stoffwechselweges sowohl als Elektronen-Donor als auch als -Akzeptor fungieren, während Sarcosin und Betain von *E. acidaminophilum* nur reduziert werden können. Dieser Organismus ist in der Lage, alle drei Aminosäure-Derivate zu verstoffwechseln, dabei kann Glycin *E. acidaminophilum* nach Supplementierung mit Selenit auch als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle dienen (ZINDEL *et al.*, 1988). Im Fall der Reduktion von Sarcosin und Betain entstammen die bereitgestellten Reduktionsäquivalente der Oxidation von Formiat durch die Formiat-Dehydrogenase (GRÄNTZDÄRFFER *et al.*, 2003), während die für die Reduktion von Glycin notwendigen Elektronen der vollständigen Oxidation

von Glycin durch die Glycin-Decarboxylase ($2 e^-$), die Methylen-THF-Dehydrogenase ($\text{NADPH}+\text{H}^+$), und die Formiat-Dehydrogenase ($2 e^-$) entstammen und ebenfalls letztendlich in Form von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ über das Thioredoxin-System der Glycin-Reduktase zugeführt werden (ANDREESEN 1994a; 1994b; 2004; FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; GRÄNTZDÄRFFER *et al.*, 2003; ZINDEL *et al.*, 1988).

Die Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* sind Mehrkomponenten-Systeme, die aus jeweils drei Proteinen, dem Selenoprotein A, dem substratspezifischen Selenoprotein B ($\text{P}_{\text{BGlycin}}$, $\text{P}_{\text{BSarcosin}}$ und $\text{P}_{\text{BBetain}}$) und dem Protein C bestehen (Abb. 1), deren Bezeichnung sich historisch gesehen aus den einzelnen Protein-Fractionen während der Isolierung der einzelnen Komponenten ergibt (ANDREESEN 2004).

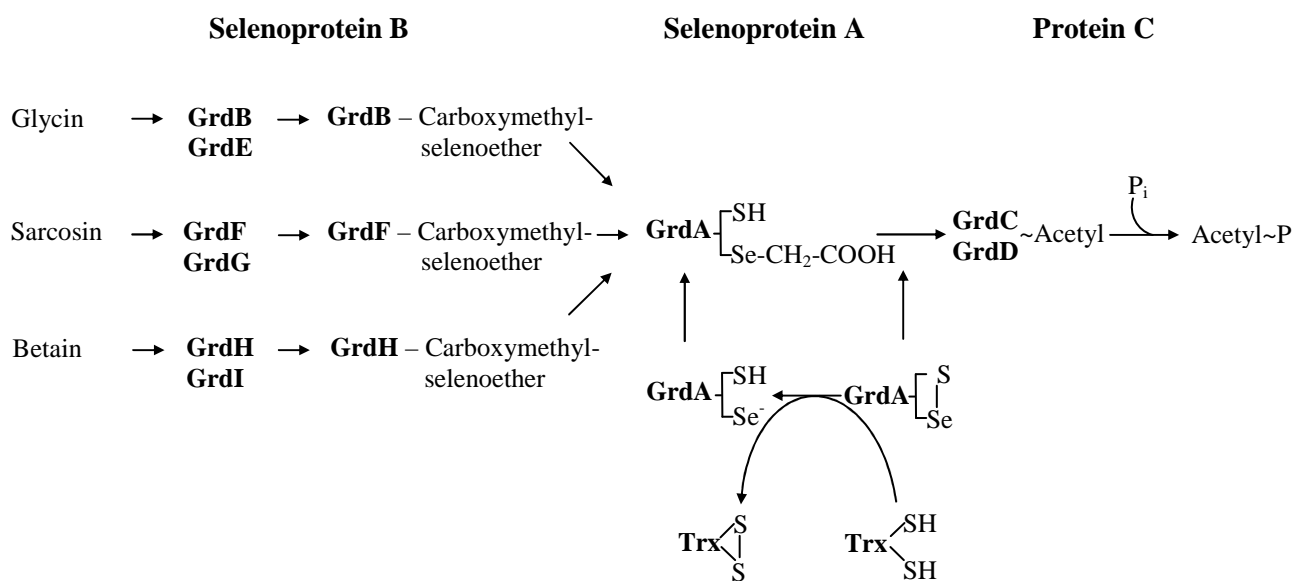


Abb. 1: Schematische Darstellung der Reduktion von Glycin, Sarcosin und Betain durch die Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase in *E. acidaminophilum* (ANDREESEN 2004): GrdB_47 kDa-Untereinheit des $\text{P}_{\text{BGlycin}}$, GrdE_Proprotein der 25- und 22 kDa-Untereinheiten von B_{Glycin} , GrdF_47 kDa-Untereinheit von $\text{B}_{\text{Sarcosin}}$, GrdG: Proprotein der 25- und 22 kDa-Untereinheiten von $\text{B}_{\text{Sarcosin}}$, GrdH_45 kDa-Untereinheit von Selenoprotein B_{Betain} , GrdI_48 kDa-Untereinheit von B_{Betain} , GrdA_Selenoprotein A, GrdC_57 kDa-Untereinheit von Protein C, GrdD_48 kDa-Untereinheit von Protein C, Trx_Thioredoxin.

Das Selenoprotein A (GrdA) der jeweiligen Reduktase ist nach der Aminosäurezusammensetzung ein saures Protein mit einer apparenten molekularen Masse zwischen 12-20 kDa, welches Selenocystein im redoxaktiven Motiv CxxU aufweist (ANDREESEN 2004; LÜBBERS and ANDREESEN 1993; SONNTAG 1998; STADTMAN 1966; WAGNER *et al.*, 1999). Die substratspezifischen Selenoproteine $\text{P}_{\text{BGlycin}}$ und $\text{P}_{\text{BSarcosin}}$ sind aus drei Untereinheiten mit Größen von 47, 25 und 22 kDa aufgebaut, während das $\text{P}_{\text{BBetain}}$ nur aus zwei Untereinheiten mit Größen von 45 und 48 kDa aufgebaut ist (MEYER *et al.*, 1995; WAGNER 1997; WAGNER *et al.*, 1999). Die 47 kDa-Untereinheiten der Glycin- und Sarcosin-Reduktase werden von den Genen *grdB* und *grdF* codiert, während die 22 und 25 kDa-Untereinheiten aus einer Proproteinspaltung der *grdE* und *grdG*-Genprodukte durch Cysteinolyse hervorgehen (BEDNARSKI *et al.*, 2001; EVERSMAAN 2004). Die 47 und 48 kDa-Untereinheit der Betain-Reduktase werden durch *grdH* und *grdI* codiert, wobei die 48 kDa-

Untereinheit nicht gespalten wird, da ihr das Spaltungsmotiv fehlt. Die 47 kDa-Untereinheit der Glycin- und der Sarcosin-Reduktase und die 45 kDa-Untereinheit der Betain-Reduktase enthalten jeweils ein Selenocystein, was Teil eines redoxaktiven Sequenzmotives (UxxCxxC) im aktiven Zentrum der Enzyme ist (WAGNER *et al.*, 1999). Das für Se-carboxymethyliertes GrdA spezifische Protein C besteht aus zwei Untereinheiten, die durch die Gene *grdC* und *grdD* codiert werden, die im Allgemeinen eine molekulare Masse von 54-60 kDa aufweisen (KOHLSTOCK 2001; KOHLSTOCK *et al.*, 2001; SCHRÄDER and ANDREESEN 1992). Die primären und sekundären Amine Glycin und Sarcosin werden kovalent unter Ausbildung einer Schiff'schen Base von einer noch unbekanntem Carbonylgruppe im C-terminalen Bereich der 47 kDa-Untereinheit des P_{BGlycin} bzw. $P_{\text{BSarcosin}}$ gebunden, während Betain als tertiäres Amin nur über ionische Wechselwirkungen an die 45 kDa-Untereinheit des P_{BBetain} gebunden wird (ANDREESEN 1994a; 1994b; 2004; WAGNER 1997; WAGNER *et al.*, 1999). Eine Polarisierung der N-C-Bindung der Substrate Glycin und Sarcosin wird durch die Ausbildung der Schiff'schen Base erreicht, während die positive Ladung des Stickstoffs im Betain eine ausreichende Polarisierung der N-C-Bindung dieses Substrates bedingt. Nach der Substratbindung erfolgt ein nucleophiler Angriff der dissoziiert vorliegenden Selenolgruppe des Selenocysteins an das α -Atom der polarisierten C-N-Bindung, was zur Spaltung dieser führt. Hierbei kommt es zur Freisetzung von NH_3 , Methylamin bzw. Trimethylamin bei Umsetzung der Substrate Glycin, Sarcosin und Betain und einem für alle drei Verbindungen identischen Protein B-gebundenen Carboxymethylselenoether (ANDREESEN 2004; WAGNER 1997; WAGNER *et al.*, 1999). Im nächsten Schritt erfolgt eine Umetherung, wobei ein Selenoprotein A (GrdA)-gebundener Carboxymethylselenoether entsteht, welcher durch gemeinsame Katalyse der Proteine A und C in einen Protein C-gebundenen Acetylthioester überführt wird (ANDREESEN 2004; ARKOWITZ and ABELES 1991). Das nach dieser Reaktion oxidiert vorliegende Selenid-Sulfid an Protein A (GrdA) wird durch Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ durch das Thioredoxin-System wieder zur Selenol-/Thiol Gruppe reduziert, wodurch das Protein A wieder zur Aufnahme eines neuen Carboxymethylselenoether bereit ist (DIETRICH *et al.*, 1991; LÜBBERS and ANDREESEN 1993; MEYER *et al.*, 1991). Der Acetylthioester, welcher letztendlich an dem Cys³⁵⁹ der kleinen Untereinheit (GrdD) des Protein C gebunden ist, wird durch Phosphorylyse zu Acetylphosphat freigesetzt und dieses durch die Aktivität der Acetat-Kinase zu Acetat und ATP umgesetzt (ANDREESEN 2004; KOHLSTOCK 2001; KOHLSTOCK *et al.*, 2001; SCHRÄDER and ANDREESEN 1992). Die Gene der Komponenten der jeweiligen Reduktasen sind mit den Genen des Thioredoxin-Systems und spezifischen Aminosäure-Transportern in Substrat-spezifischen Genclustern assoziiert (KOHLSTOCK 2001; LÜBBERS and ANDREESEN 1993; SONNTAG 1998; WAGNER *et al.*, 1999).

Die Reduktionsäquivalente zur Reduktion entstammen u. a. der Oxidation von Glycin durch die Glycin-Decarboxylase, einem Multienzymkomplex, der fast immer aus vier Komponenten besteht, die in Bakterien meist mit P1, P2, P3 und P4 bezeichnet werden (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; FREUDENBERG *et al.*, 1989b; GARIBOLDI and DRAKE 1984) Die eukaryotischen Proteine werden entsprechend mit P, H, L und T bezeichnet (KIKUCHI and HIRAGA 1982; MOTOKAWA and KIKUCHI 1971; SATO *et al.*, 1969). Die

Bezeichnung ergibt sich dabei jeweils aus der Funktion der einzelnen Komponenten. Das P- bzw. P1-Protein ist ein Pyridoxalphosphat (PLP) abhängiges Enzym und wird als eigentliche Decarboxylase angesehen. Die meisten aus Prokaryoten isolierten P1-Proteine liegen als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vor (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; GARIBOLDI and DRAKE 1984), während die Proteine aus *Escherichia coli* (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993) und *Synechocystis sp.* Stamm PCC 6803 (HAGEMANN *et al.*, 2005; HASSE *et al.*, 2007) genau wie die aus Eukaryoten isolierten Proteine durch Genfusionen und somit als gleich großes Homodimer vorliegen (ANDREESEN 1994a; ENGELMANN *et al.*, 2008; KOPRIVA and BAUWE 1994a; KUME *et al.*, 1991; MOTOKAWA and KIKUCHI 1972). Die Bindung des Cofaktors PLP erfolgt nichtkovalent an der β -Untereinheit der Tetrameren bzw. im C-terminalen Bereich der dimeren Proteine. Diese Domäne des Proteins ist durch eine Glycin-reiche Sequenz und ein stark konserviertes tetrameres Glycin-Motiv gekennzeichnet. Das P- bzw. P1-Protein katalysiert aber nur zusammen mit dem H- bzw. P2-Protein, dem Elektronen-übertragenden Protein (*hydrogen carrier protein*), die oxidative Abspaltung der Carboxylgruppe des Glycins in Form von CO_2 . Das H- bzw. P2-Protein ist ein kleines, hitzestabiles Protein, das als funktionelle Gruppe α -Liponsäure (6,8-Dithioloctansäure) trägt, welche über eine Amidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eines ebenfalls ubiquitär stark konservierten Lysin-Restes verbunden ist (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; FUJIWARA *et al.*, 1979; MOTOKAWA and KIKUCHI 1969; PARES *et al.*, 1994; PARES *et al.*, 1995). Dieses Protein stellt den zentralen Drehpunkt des Enzymsystems dar, da es mit seiner funktionellen Gruppe mit den drei übrigen Komponenten des Komplexes in Wechselwirkung treten kann (Abb. 2) (COHEN-ADDAD *et al.*, 1995; NAKAI *et al.*, 2003a; OLIVER *et al.*, 1990). Auf das durch Reduktion freie distale Schwefelatom der Liponsäure-Gruppe wird die bei der gemeinsamen Katalyse beider Proteine frei werdende Aminomethylgruppe übertragen, welche damit später zum Substrat des T- bzw. P4-Proteins wird. Diese auch als Aminomethyl-Transferase bezeichnete Komponente ist Tetrahydrofolat (THF)-abhängig und katalysiert die Spaltung der an der Liponsäuregruppe des H- bzw. P2-Protein gebundenen Aminomethylgruppe, was zur Freisetzung von NH_3 und der Übertragung der entstandenen Methylengruppe auf THF führt. Als Ergebnis dieser Reaktion entsteht 5,10-Methylen-THF. Das L- bzw. P3-Protein (Dihydrolipoamid-Dehydrogenase) katalysiert die Reoxidation der reduziert vorliegenden Dithiole der Liponsäuregruppe des H- bzw. P2-Proteins, wodurch dieses Protein als Disulfid zu einer erneuten Aufnahme einer weiteren Aminomethylgruppe zur Verfügung steht (ANDREESEN 1994a; 1994b; HIRAGA and KIKUCHI 1980b; KIKUCHI 1973; KIKUCHI and HIRAGA 1982). Durch die Reaktion dieser Komponente werden zwei Elektronen über P3-gebundenes FAD auf NAD^+ bzw. NADP^+ übertragen (ANDREESEN 1994a; 1994b; FAURE *et al.*, 2000; NEUBURGER *et al.*, 2000).

Das L-Protein, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase ist nicht nur ein Bestandteil der Glycin-Decarboxylase, sondern auch der Pyruvat-Dehydrogenase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, der Verzweigtketten- α -Ketosäure-Dehydrogenase und der Acetoin-Dehydrogenase (CRONAN and LA PORTE 1996; OPPERMANN *et al.*, 1991; STEIERT *et al.*, 1990; TURNER *et al.*, 1992b).

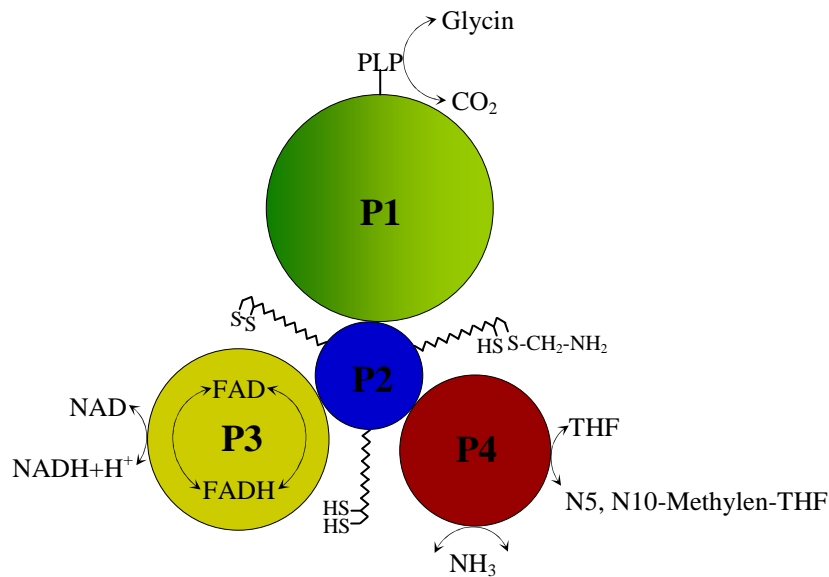


Abb. 2: Reaktionsmechanismus der Glycin-Decarboxylase (PARES *et al.*, 1994, mod.): Dargestellt ist die reversible Decarboxylierung von Glycin durch die Glycin-Decarboxylase: P1_P1- bzw. P-Protein; P2_P2- bzw. H-Protein, P3_P3- bzw. L-Protein; P4_P4- bzw. T-Protein.

Die Glycin-Decarboxylase ist ein ubiquitär verbreiteter Enzymkomplex und stellt das Schlüsselenzym des Glycin-Metabolismus dar. Dieser dient in Bakterien hauptsächlich der Energiekonservierung und der Bereitstellung von C₁-Einheiten für die Synthese von Serin, Purinen, Methionin, Thymin und anderen methylierten Verbindungen (MUDD and CANTONI 1964; NEIDHARDT 1996). In Eukaryoten sind als Teil der Regenerierung des bei der Photosynthese entstehenden Glyoxylats die Komponenten der Glycin-Decarboxylase in den Mitochondrien lokalisiert, wo sie bei Pflanzen bis zu 10 % des löslichen Proteins ausmachen (BOURGUIGNON *et al.*, 1988) und mit einem stöchiometrischen Verhältnis von 2 P-Protein-Dimeren : 27 H-Protein-Monomeren : 1 L-Protein-Dimer : 9 T-Protein-Monomeren bestimmt wurden (NEUBURGER *et al.*, 1989; OLIVER *et al.*, 1990; OLIVER and RAMAN 1995). Hier ist dieser Enzymkomplex maßgeblich am Abbau des Glycins beteiligt, das in großen Mengen während der Photorespiration durch die Transaminierung von Glyoxylat entsteht (BERRY *et al.*, 1978; MAREK and STEWART 1983). Die ebenfalls mitochondrial lokalisierte Serin-Hydroxymethyltransferase katalysiert die Synthese von Serin aus Glycin und 5,10-Methylen-THF, das aus der Oxidation eines zweiten Glycins durch die Glycin-Decarboxylase entstanden ist (NEUBURGER *et al.*, 1989; PETERSON 1982). Bei C₄-Pflanzen wird das P-Protein nur in den Leitbündel-Zellen gebildet, wo eine Photorespiration ablaufen kann (ENGELMANN *et al.*, 2008).

Im Menschen führt eine Mutation in einem der vier für die Komponenten der Glycin-Decarboxylase codierenden Gene zu einer Störung des Glycin-Metabolismus. Diese Erkrankung wird Nonketotische Hyperglycinämie (NKH) genannt. Diese wird autosomal rezessiv vererbt und ist neben der Phenylketonurie die am häufigsten auftretende Erbkrankheit, die einen Defekt des Aminosäure-Stoffwechsels verursacht. Betroffene Patienten haben einen stark erhöhten Glycin-Spiegel im Plasma und der Cerebrospinalflüssigkeit, was u. a. zu Lethargie, mentaler Retardierung und Muskelhypotonie führt (KURE *et al.*, 1997; TADA 1993;

TADA *et al.*, 1969). Bei 85 % aller NKH-Erkrankungen ist eine Mutation des Gens des P-Proteins zu finden, während 15 % aller Mutationen hauptsächlich das Gen des T-Proteins betreffen (DINOPOULOS *et al.*, 2005; TOONE *et al.*, 2001; TOONE *et al.*, 2002).

Da *E. acidaminophilum* Glycin besser als Elektronen-Akzeptor nutzen kann (1 ATP pro aufgenommenen 2 Elektronen anstelle von 1 ATP pro 6 gebildeten Elektronen bei der Glycin-Decarboxylase), während andere Aminosäuren wie z. B. Serin, Alanin oder Aspartat als Elektronen-Donor fungieren (GRANDERATH 1988; ZINDEL *et al.*, 1988), ist eine spezifische Regulation des Glycin-Metabolismus, speziell auch der Glycin-Oxidation durch die Glycin-Decarboxylase essentiell für diesen Organismus. In der vorangegangenen Diplomarbeit (POEHLEIN 2003) wurde durch Northern-Blot-Analysen gezeigt, dass der Transkriptionsstartpunkt des Glycin-Decarboxylase-Operons von *E. acidaminophilum* ca. 1000 Nukleotide *upstream* des Startcodons von *gcvP4* gelegen sein muss. In *Bacillus subtilis* wird die Transkription des Glycin-Decarboxylase-Operons durch eine *upstream* des Operons gelegene mRNA-Sekundärstruktur reguliert, die als Riboswitch bezeichnet wird (MANDAL *et al.*, 2004; PHAN and SCHUMANN 2007). Diese, auch als cis-agierenden RNA-Elemente bezeichneten Strukturen, sind in der 5'-nichttranslatierten Region von Genen lokalisiert und beeinflussen die Transkription und Translation dieser direkt (KUBODERA *et al.*, 2003; WINKLER 2005; WINKLER and BREAKER 2003; 2005). Riboswitche sind im Allgemeinen aus zwei voneinander abhängigen, aber dennoch klar zu unterscheidenden Domänen aufgebaut. Zum einen ist das eine Aptamer-Domäne, welche auch bei kaum verwandten Organismen in Sequenz und der sich ergebenden Struktur stark konserviert ist. Durch Bindung eines Target-Moleküls kommt es zur Konformationsänderung dieses Aptamers, was eine Änderung der Struktur der direkt *downstream* gelegenen regulatorischen Domäne bewirkt, die auch als Expressions-Plattform bezeichnet wird (Abb. 3). Durch die Konformation dieser Domäne bedingt, kommt es so zu einer positiven oder negativen Beeinflussung der Transkription *downstream* lokalisierter Gene durch Ausbildung eines Rho-unabhängigen Terminators oder Maskierung der Shine-Dalgarno-Sequenz (SHINE and DALGARNO 1974; WINKLER 2005a; WINKLER and BREAKER 2003). Die Länge der Aptamer-Domäne aller bisher beschriebenen Riboswitche variiert zwischen ca. 70 bis 200 Nukleotiden, die sogenannte Expressionsplattform (Abb. 3) zeigt hingegen eine wesentlich größere Diversität in der Sequenz, der Struktur und vor allem in der Größe. Nicht selten können diese auch innerhalb einer Riboswitch-Klasse sehr verschieden sein (MIRONOV *et al.*, 2002). Die regulatorische Domäne bindet Metabolite und biologische Cofaktoren, wie z. B. Thiamin Pyrophosphat (TPP) (NOESKE *et al.*, 2006; WINKLER *et al.*, 2002a), Vitamin B₁₂ (NAHVI *et al.*, 2004), S-Adenosylmethionin (WINKLER *et al.*, 2003), Aminosäuren (MANDAL *et al.*, 2004; SUDARSAN *et al.*, 2003) und Purin-Derivate (FUJIWARA *et al.*, 1979; MANDAL and BREAKER 2004a; NOESKE *et al.*, 2007).

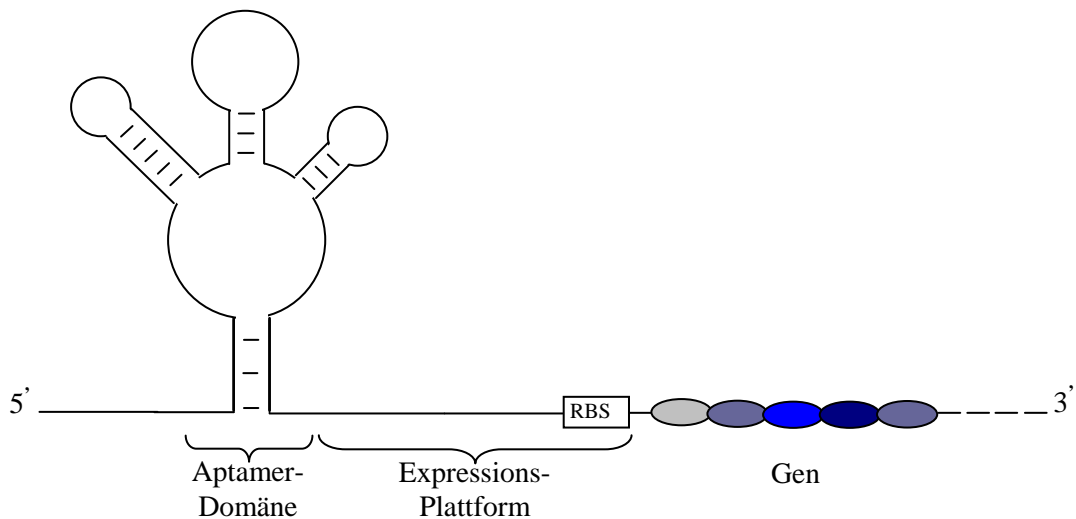


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Riboswitch-Struktur mit Aptamer-Domäne und Expressions-Plattform.

Der Glycin-Riboswitch, welcher die Transkription von Genen reguliert, die für Proteine des Glycin-Katabolismus oder dessen Transport codieren, hat eine Besonderheit. Er besteht aus zwei strukturell sehr ähnlichen, durch einen Linker verbundenen Aptameren (MANDAL *et al.*, 2004; PHAN and SCHUMANN 2007). Glycin wird dabei kooperativ an beide Aptamere gebunden, was sich in einem Hill-Koeffizienten von $n = 1,6$ ausdrückt (FORSEN and LINSE 1995). Durch Bindung dieses Metaboliten an das Aptamer 1 kommt es zur drastischen Steigerung der Affinität des Aptamer 2 um das 1000-fache gegenüber dieser Aminosäure (KWON and STROBEL 2008; LIPFERT *et al.*, 2007). Strukturell sehr ähnliche Moleküle wie Sarcosin, Alanin oder Serin werden nur sehr schlecht gebunden (MANDAL *et al.*, 2004).

Während alle bisher beschriebenen Riboswitch Klassen nur in Bakterien identifiziert werden konnten, stellt der TPP-Riboswitch, auch als Thi-Box-Riboswitch bezeichnet, eine Ausnahme dar, da er in allen drei Domänen des Lebens identifiziert werden konnte. Neben seiner starken Verbreitung in bakteriellen Genomen ist er in den Archaea, in den Thermoplasmatales der Euryarchaeota, identifiziert worden, was mit großer Wahrscheinlichkeit als Ergebnis eines horizontalen Gentransfers anzusehen ist (MIRANDA-RIOS 2007). Als bislang einziger Riboswitch ist er auch in Eukaryoten, speziell in den Genomen von Pflanzen und Pilzen zu finden (BARRICK and BREAKER 2007; SUDARSAN *et al.*, 2003a). Hier ist er im 3'-nichttranslatierten Bereich von pre-mRNAs lokalisiert und beeinflusst deren *splicing*. In Prokaryoten ist er mit Genen der Thiamin-Synthese, dessen Phosphorylierung und Transport assoziiert, wo er sowohl deren Transkription, aber auch die Translation regulieren kann.

In Tabelle 1 ist eine Übersicht aller bisher beschriebenen Riboswitch-Klassen dargestellt.

Tab. 1: Übersicht aller bisher beschriebenen Riboswitch-Klassen (BARRICK and BREAKER 2007; mod.)

Riboswitch/Ligand	Zielgene	Regulation
TPP-Riboswitch ¹	Synthese, Phosphorylierung und Transport von Thiamin	Abbruch der Transkription Verhinderung der Translationsinitiation
FMN-Riboswitch ²	Biosynthese und Transport von Riboflavin	Abbruch der Transkription Verhinderung der Translationsinitiation
Coenzym-B ₁₂ - Riboswitch ³	Cobalamin-Biosynthese Transport und Biosynthese von Porphyrin und Cobalt	Abbruch der Transkription Verhinderung der Translationsinitiation
SAM-Riboswitch ⁴	Biosynthese und Transport von Methionin und S-Adenosyl-Methionin Schwefelmetabolismus	Abbruch der Transkription Verhinderung der Translationsinitiation
SAM _{MK} -Riboswitch ⁵	SAM-Synthase	Abbruch der Transkription
SAM _{II} -Riboswitch ⁶	Biosynthese und Transport von Methionin und S-Adenosyl-Methionin	Abbruch der Transkription
Lysin-Riboswitch ⁷	Synthese und Transport von Lysin, Lysin-Katabolismus	Abbruch der Transkription
Glycin-Riboswitch ⁸	Glycin-Decarboxylase, Transport von Glycin, Na ⁺ /Alanin-Symporter	Transkriptionsinitiation
Adenin-Riboswitch ⁹	Transport und Synthese von Purinen	Abbruch der Transkription
Guanin-Riboswitch ¹⁰	Transport und Synthese von Purinen	Abbruch der Transkription Transkriptionsinitiation
2'-Deoxy-Guanosin- Riboswitch ¹¹	Ribonukleotid-Reduktase	Abbruch der Transkription
PreQ1-Riboswitch ¹²	Biosynthese von Queosin	Abbruch der Transkription
MoCo/Tuco- Riboswitch ¹³	Transport von Molybdat oder Wolframat, Biosynthese von Molybdän- Cofaktoren	Verhinderung der Translationsinitiation
GlcN6P-Riboswitch ¹⁴	Glucosamin-6-Phosphat Synthase	Verdau der mRNA

¹⁻¹⁴ die Literatur zu den einzelnen Riboswitch-Klassen ist auf der nächsten Seite aufgelistet

- ¹ (BARRICK and BREAKER 2007; NOESKE *et al.*, 2006; SUDARSAN *et al.*, 2006; WINKLER *et al.*, 2002a)
² (VITRESCHAK *et al.*, 2002; WICKISER *et al.*, 2005b; WINKLER *et al.*, 2002b)
³ (NAHVI *et al.*, 2004; VITRESCHAK *et al.*, 2003)
⁴ (GRUNDY and HENKIN 1998; 2003; 2006; RODIONOV *et al.*, 2004)
⁵ (FUCHS *et al.*, 2006; 2007; GILBERT *et al.*, 2008)
⁶ (CORBINO *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2006)
⁷ (GRUNDY *et al.*, 2003; KOCHHAR and PAULUS 1996; RODIONOV *et al.*, 2003; SUDARSAN *et al.*, 2003)
⁸ (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004; PHAN and SCHUMANN 2007)
⁹ (LEMAY *et al.*, 2006; MANDAL and BREAKER 2004a; NOESKE *et al.*, 2005; WICKISER *et al.*, 2005a)
¹⁰ (BATEY *et al.*, 2004; NOESKE *et al.*, 2007; NOESKE *et al.*, 2005)
¹¹ (KIM *et al.*, 2007)
¹² (MEYER *et al.*, 2008; ROTH *et al.*, 2007)
¹³ (REGULSKI *et al.*, 2008; WEINBERG *et al.*, 2007)
¹⁴ (TINSLEY *et al.*, 2007; WINKLER *et al.*, 2004)

Bis auf den Glucosamine-6-Phosphat-Riboswitch nehmen alle bisher beschriebenen Riboswitch-Klassen direkt Einfluss auf die Transkription bzw. Translation *downstream* gelegener Gene durch Ausbildung von Terminator- oder Antiterminatorstrukturen bzw. Maskierung oder Demaskierung der Ribosomen-Bindestelle (HENKIN and YANOFSKY 2002; VITRESCHAK *et al.*, 2002). Während nahezu alle Riboswitches in Gegenwart der entsprechenden Metabolite eine Terminatorstruktur und bei dessen Abwesenheit eine Antiterminatorstruktur ausbilden, ist es im Falle der Glycin-, Lysin- und Adenin-spezifischen Riboswitches umgekehrt. So wird eine unnötige Expression *downstream* lokalisierter Gene verhindert. Diese auch als intrinsische Terminatoren bezeichneten Sekundärstrukturen sind durch einen GC-reichen *stemloop* und einen aus mind. 5-9 Uridinen bestehenden 3'-Bereich gekennzeichnet. Der Terminator hat direkten Einfluss auf die Stabilität des Elongationskomplexes und verhindert die Transkription *downstream* gelegener Bereiche. Der Antiterminator, der meist aus der linken Hälfte des Terminators und *upstream* lokalisierter Sequenzen besteht, ermöglicht hingegen die Transkription der im 3'-Bereich lokalisierten Gene (GOLLNICK and BABITZKE 2002; HENKIN and YANOFSKY 2002). Viele Riboswitch-Strukturen nehmen auch direkt Einfluss auf die Translation. Im Bereich der Expressions-Plattform kommt es zur Ausbildung einer so genannten *sequestering* Helix, die eine Basenpaarung mit der Sequenz der Ribosomen-Bindestelle eingeht und so die Translation der *downstream* lokalisierten Gene verhindert, da die Shine-Dalgarno-Sequenz in dieser Form für das Ribosom nicht zugänglich ist. Durch Konformationsänderung des Aptamers, z. B. durch Metabolitbindung, kann es jedoch auch zu einer Basenpaarung eines Bereiches der *sequestering* Helix mit einem Teil des Aptamers kommen. Durch Ausbildung dieser so genannten *antisequestering* Helix wird die Translation der Gene im 3'-Bereich des Riboswitches ermöglicht (GRUNDY and HENKIN 2006; MARZI *et al.*, 2007; VITRESCHAK *et al.*, 2002; 2004).

Für *E. acidaminophilum* stellt der Glycin-Metabolismus, bestehend aus Glycin-Decarboxylase und Glycin-Reduktase bzw. Sarcosin- oder Betain-Reduktase, eine der wichtigsten Energie- und Kohlenstoffquellen dar (ANDREESEN 1994a; 1994b; 2004; ZINDEL *et al.*, 1988). Während alle bisher beschriebenen und charakterisierten Glycin-Decarboxylasen aus den vier beschriebenen Komponenten bestehen (HIRAGA and KIKUCHI 1980b; KOCHI and KIKUCHI 1974; MOTOKAWA and KIKUCHI 1972; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993;

RAJINIKANTH *et al.*, 2007; STAUFFER *et al.*, 1986), konnte für *E. acidaminophilum* weder das P3-Protein noch eine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität gefunden werden (DIETRICH *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a). Auch konnte auf DNA-Ebene kein für dieses Protein codierendes Gen identifiziert werden (LECHEL 1999; POEHLEIN 2003). Aus diesem Organismus konnte eine Thioredoxin-Reduktase mit Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität isoliert werden, die das Fehlen des P3-Proteins in Verbindung mit einem etwas atypischen Thioredoxin (HARMS *et al.*, 1998b) zu kompensieren scheint. Die bei der Oxidation des Glycins durch die Glycin-Decarboxylase freiwerdenden Elektronen werden über $\text{NADPH}+\text{H}^+$ und das Thioredoxin-System, bestehend aus Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin, direkt auf das Protein A (GrdA) der Glycin-Reduktase übertragen (DIETRICH *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; FREUDENBERG *et al.*, 1989b; MEYER *et al.*, 1991). Diesen Thioredoxinen fehlt das voluminöse Tryptophan vor dem proximalen Cystein, so dass eine Interaktion mit dem ebenfalls voluminösen Selenocystein von GrdA erleichtert wird (HARMS *et al.*, 1998b).

Neben dem Selenoprotein A (GrdA) und dem substratspezifischen Protein B der einzelnen Reduktasen zeichnet sich *E. acidaminophilum* durch mindestens sechs weitere Selenocystein-haltige Proteine aus. Eines dieser Proteine ist das von WAGNER (1997) durch 75^{Se} -Markierungen angereicherte ca. 11 kDa große (GRÖBE 2001; LECHEL 1999) Selenoprotein PrpU (*putative redox-active protein with selenocysteine U*), das bisher nur in *E. acidaminophilum* identifiziert werden konnte. Das Gen dieses Proteins konnte kloniert und die Präsenz des Selenocystein-codierenden *in frame* UGA-Codon bestätigt werden (GRÖBE 2001; LECHEL 1999). Durch Vergleiche mit in den Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen konnten keine Homologen zu Proteinen anderer Organismen identifiziert werden. Bisher konnte diesem Protein, das eine potentielle redoxaktive Sequenz von $_{134}\text{-A-C-A-T-U-D-}_{139}$ aufweist, keine Funktion zugeordnet werden. Eine Beteiligung von PrpU an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies konnte nicht gezeigt werden (GRÖBE *et al.*, 2007; PARTHER 2003). Das von LECHEL (1999) klonierte und von GRÖBE (2001) in der Sequenz korrigierte Gen ist *downstream* der Gene der Glycin-Decarboxylase und des Gens einer Formyl-THF-Synthetase in einem aus insgesamt sechs Genen bestehenden Operon lokalisiert und wird gemeinsam mit diesen transkribiert (LECHEL 1999; POEHLEIN 2003). *Downstream* dieses Operons sind zwei *orf*s für hypothetische Proteine und ein Gencluster für an der Folat-Biosynthese beteiligte Enzyme lokalisiert (LECHEL 1999). In *E. acidaminophilum* sind oftmals Gene, die gemeinsame Stoffwechselwege katalysieren, in einer Operon-ähnlichen Struktur zusammengefasst (GURSINSKY *et al.*, 2000; SONNTAG 1998).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit u. a. eine mögliche Beteiligung von PrpU am Glycin-Metabolismus von *E. acidaminophilum*, die möglicherweise in der Kompensation des Fehlens einer eigenständigen Dihydrolipoamid-Dehydrogenase zu sehen ist, geprüft werden. Die Komponenten der Glycin-Decarboxylase, des Thioredoxin-Systems, GrdA und PrpU sollten

heterolog in *E. coli* synthetisiert und durch Etablierung eines Enzym-Tests die Funktion von PrpU im Metabolismus von *E. acidaminophilum* geklärt werden. Durch gezielte Interaktionsstudien sowie Transkriptionsanalysen sollte diesem Protein eine Funktion zugeordnet werden.

Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit die von LÜBBERS und ANDREESEN (1993), SONNTAG (1998) WAGNER *et al.* (1999) und KOHLSTOCK *et al.* (2001) identifizierten Gensätze der Komponenten der Glycin-, Sarcosin und Betain-Reduktase sowie des Thioredoxin-Systems vollständig kloniert werden, um so zu sehen, ob eventuell noch essentielle Komponenten übersehen wurden. Es sollten aber auch die Protein-Komponenten aus *E. acidaminophilum* mit der Glycin- und D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* verglichen werden (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001; KABISCH *et al.*, 1999).

2. Material & Methoden

2.1. Organismen und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Bakterienstämme sind in Tabelle 2, Vektoren und hergestellte Hybrid-Plasmide in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht über verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
<i>Eubacterium acidaminophilum</i> DSM 3953	Wildtyp	ZINDEL <i>et al.</i> , (1988)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1</i> , lac[F' proAB, <i>lacI^qZ</i> Δ M15, Tn10(Tet^R)]	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1</i> , lac[F' proAB, <i>lacI^qZ</i> Δ M15, Tn10(Kan^R)]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> SU101	Derivat von JL1434, chromosomales <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle eines <i>lexA</i> -Wildtyp-Operators, <i>sulA</i> -Promotor	DMITROVA <i>et al.</i> , (1998)
<i>Escherichia coli</i> SU202	Derivat von JL1434, chromosomales <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle eines <i>lexA</i> -Hybrid-Operators, <i>sulA</i> -Promotor	DMITROVA <i>et al.</i> , (1998)
<i>Escherichia coli</i> -Reporterstamm (BacterioMatch@Two-Hybrid-System)	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' lacIq HIS3 aadA Kan^R]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	B F- <i>ompT hsdS(r_B-m_B-) dcm⁺ Tet^R gal λ (DE3)</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	B F- <i>ompT hsdS(r_B-m_B-) dcm⁺ Tet^R gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	Tet ^r $\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacHte [F' proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Cam ^R]	Stratagene

Tab. 3: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Merkmale ¹	Referenz, Quelle
<u>Klonierungsplasmide</u>		
pUC18	Amp ^R , <i>lacPoz</i>	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , (1985)
pASK-IBA3	Expressionsvektor, Amp ^R , f1-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , t _{lpp} , <i>tet</i> -repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -tag [®] II C-terminal	IBA, Göttingen
pASK-IBA5	Expressionsvektor, Amp ^R , f1-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , t _{lpp} , <i>tet</i> -repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -tag [®] II N-terminal	IBA
pASK-IBA53ke	Expressionsvektor, Ap ^R , f1-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , t _{lpp} , <i>tet</i> -repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -tag [®] II C-terminal und N-terminal	diese Arbeit
<u>Synthese von Selenoproteinen in <i>E. coli</i></u>		
pASBC4	pACYC184:: <i>selB</i> , <i>selC</i>	GURSINSKY 2002 GURSINSKY 2008
<u><i>Strep</i>-tag[®] II -Klonierungen</u>		
pP1aNW	pASK-IBA5:: <i>gcvP1α</i>	diese Arbeit
pP1bCW	pASK-IBA3:: <i>gcvP1β</i>	diese Arbeit
pP1bNW	pASK-IBA5:: <i>gcvP1β</i>	diese Arbeit
pP2CW	pASK-IBA3:: <i>gcvP2</i>	diese Arbeit
pP4CW	pASK-IBA3:: <i>gcvP4</i>	diese Arbeit
pP4NW	pASK-IBA5:: <i>gcvP4</i>	diese Arbeit
pP1αβ53	pASK-IBA53ke:: <i>gcvP1αβ</i> mit zusätzlicher RBS	diese Arbeit
pcP1αβ53	pASK-IBA53ke:: <i>gcvP1αβ</i>	diese Arbeit
pP1abcW	pASK-IBA3:: <i>gcvP1αβ</i>	diese Arbeit
pP1abNW	pASK-IBA5:: <i>gcvP1αβ</i>	diese Arbeit
pTRCW	pASK-IBA5:: <i>trxB</i>	diese Arbeit
pTrxCW	pASK-IBA5:: <i>trxA</i>	diese Arbeit
pPrpUCW	pASK-IBA3:: <i>prpU</i>	diese Arbeit
pPrpUCW+	pASK-IBA3plus:: <i>prpU</i>	diese Arbeit
pPMI3	pASK-IBA3:: <i>prpU</i> U ₃₃ ->C	D. GRÖBE, pers. M.
pPACW	pASK-IBA3:: <i>grdA3</i>	diese Arbeit
pPACW+	pASK-IBA3plus:: <i>grdA3</i>	diese Arbeit
pPACM	pASK-IBA3:: <i>grdA3</i> U ₃₆ ->C	diese Arbeit
pPACM+	pASK-IBA3plus:: <i>grdA3</i> U ₃₆ ->C	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3

<u>lexA-basierendes two-hybrid-System</u>		
pDP804	Amp ^R , LexA ₁₋₈₇ 408Jun-Zipper Fusion, P15A Replikon	DMITROVA <i>et al.</i> , (1998)
pMS604	Tet ^R , LexA ₁₋₈₇ WT-Fos-Zipper Fusion, ColE1 Replikon	DMITROVA <i>et al.</i> , (1998)
pMSP1 α	pMS604:: <i>gcvP1α</i>	diese Arbeit
pMSP1 β	pMS604:: <i>gcvP1β</i>	diese Arbeit
pMSP2	pMS604:: <i>gcvP2</i>	diese Arbeit
pMSP4	pMS604:: <i>gcvP4</i>	diese Arbeit
pMSPrpU	pMS604:: <i>prpU</i>	diese Arbeit
pMSGrdA	pMS604:: <i>grdA</i>	diese Arbeit
pMSTR	pMS604:: <i>trxB</i>	diese Arbeit
pMSTrx	pMS604:: <i>trxA</i>	diese Arbeit
pMSP1 $\alpha\beta$	pMS604:: <i>gcvP1$\alpha\beta$</i>	diese Arbeit
pDPP1 α	pDP804:: <i>gcvP1α</i>	diese Arbeit
pDPP1 β	pDP804:: <i>gcvP1β</i>	diese Arbeit
pDPP2	pDP804:: <i>gcvP2</i>	diese Arbeit
pDPP4	pDP804:: <i>gcvP4</i>	diese Arbeit
pDPPPrpU	pDP804:: <i>prpU</i>	diese Arbeit
pDPGrdA	pDP804:: <i>grdA</i>	diese Arbeit
pDPTR	pDP804:: <i>trxB</i>	diese Arbeit
pDPTrx	pDP804:: <i>trxA</i>	diese Arbeit
pDPP1 $\alpha\beta$	pDP804:: <i>gcvP1$\alpha\beta$</i>	diese Arbeit
<u>BacterioMatch[®]Two-Hybrid-System</u>		
pBT	<i>bait</i> -Vektor; Chl ^R , <i>lacUV5</i> -Promotor, P15A Replikon, Fusion mit λ cI-Phagenprotein möglich	Stratagene
pTRG	<i>target</i> -Vektor; Tet ^R , <i>lpp/lacUV5</i> -Promotor, ColE1 Replikon, Fusion mit der RNAP α möglich	Stratagene
pBT-LGF-2	pBT-Kontrollplasmid; Chl ^R , <i>lacUV5</i> -Promotor, P15A Replikon, λ cI -LGF2-Fusion	Stratagene
pTRG-Gall11p	pTRG-Kontrollplasmid; Tet ^R , <i>lpp/lacUV5</i> -Promotor, ColE1 Replikon, RNAP α - Gall11p-Fusion	Stratagene
pBTP1 α	pBT:: <i>gcvP1α</i>	diese Arbeit
pBTP1 β	pBT:: <i>gcvP1β</i>	diese Arbeit
pBTP2	pBT:: <i>gcvP2</i>	diese Arbeit
pBTP4	pBT:: <i>gcvP4</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3

pBTPrpU	pBT:: <i>prpU</i>	diese Arbeit
pBTGrdA	pBT:: <i>grdA</i>	diese Arbeit
pBTTR	pBT:: <i>trxB</i>	diese Arbeit
pBTTrx	pBT:: <i>trxA</i>	diese Arbeit
pBTP1 $\alpha\beta$	pBT:: <i>gcvP1$\alpha\beta$</i>	diese Arbeit
pTRGP1 α	pTRG:: <i>gcvP1α</i>	diese Arbeit
pTRGP1 β	pTRG:: <i>gcvP1β</i>	diese Arbeit
pTRGP2	pTRG:: <i>gcvP2</i>	diese Arbeit
pTRGP4	pTRG:: <i>gcvP4</i>	diese Arbeit
pTRGPrpU	pTRG:: <i>prpU</i>	diese Arbeit
pTRGGrdA	pTRG:: <i>grdA</i>	diese Arbeit
pTRGTR	pTRG:: <i>trxB</i>	diese Arbeit
pTRGTrx	pTRG:: <i>trxA</i>	diese Arbeit
pTRGP1 $\alpha\beta$	pTRG:: <i>gcvP1$\alpha\beta$</i>	diese Arbeit
<u>Klonierung der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons</u>		
pUsP4H3	pGem [®] -T Easy::1,4 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pUsP4SA	pGem [®] -T Easy::1,6 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pUsP4VP	pGem [®] -T Easy::1,3 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pAP694	pUC18-Derivat::1,7 kb Sau3A-Fragment	diese Arbeit
pAP2218	pUC18-Derivat::5,5 kb Sau3A-Fragment	diese Arbeit
<u>Klonierung Gencluster</u>		
pUsGrdE1	pGem [®] -T Easy::3,1 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pDsGrdA4	pGem [®] -T Easy::1,5 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pDsGrdC2	pGem [®] -T Easy::4,4 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pUsGrdF2	pGem [®] -T Easy::3,5 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
<u>Klonierung housekeeping Gene</u>		
pRPOAEa	pGem [®] -T Easy::0,8 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pRPOBEa	pGem [®] -T Easy::1,2 kb PCR-Fragment	diese Arbeit
pEFTUEa	pGem [®] -T Easy::1,3 kb PCR-Fragment	diese Arbeit

Abgesehen von denen auf den Plasmiden pUC18, pGEM[®]-T Easy, pMS604, pDP804, pBT, pTRG und pASK-IBA3/5 stammen die angeführten Gene aus *E. acidaminophilum*

2.2. Kultivierung von Bakterien

2.2.1. Vollmedien für *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde Lysis-Broth-Medium (LB-Medium) verwendet (SAMBROOK *et al.*, 1989).

LB-Medium:	Trypton	1	%
	Hefeextrakt	0,5	%
	NaCl	1	%
LB-Agar:	LB-Medium		
	Agar	1,5	%

2.2.2. M9-Minimalmedium (SAMBROOK *et al.*, 1989)

M9-Minimalmedium

5xM9-Salze:

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	2,00	g	48	mM
KH ₂ PO ₄	15,00	g	22	mM
NaCl	2,5	g	9	mM
NH ₄ Cl	5,00	g	19	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (1 M)	2,00	ml	2	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	0,10	ml	0,1	mM
Glucose (20 % [w/v])	20,00	ml	0,4	%
Aminosäure-Mix I	10,00	ml	0,04	mg/ml
Aminosäure-Mix II	10,00	ml	0,04	mg/ml
Thiamin-HCl (10 % [w/v])	1,00	ml	0,01	%
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml		

Aminosäure-Mix I (4 mg/ml):

L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Cystein, Na-L-Glutamin, Na-Glutaminat, Glycin, L-Histidin-HCl, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin-HCl, L-Methionin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Valin

Aminosäure-Mix II (4 mg/ml; pH 8,0):

L-Phenylalanin, L-Thyrosin, L-Tryptophan

2.2.3. Medium für die Anzucht von *E. acidaminophilum*

E. acidaminophilum wurde in einem Medium nach ZINDEL *et al.*, (1988, mod.) anaerob kultiviert.

Medium nach ZINDEL *et al.*, (1988), mod.:

KH ₂ PO ₄	0,20	g	1,5	mM
NaCl	1,00	g	17	mM
KCl	0,50	g	6,7	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50	g	2	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	0,10	ml	1	mM
NH ₄ Cl	0,25	g	3,5	mM
SL A ¹ (s. u.)	1,00	ml		
Resazurin (0,1%ig (w/v) in H ₂ O dest.)	1,00	ml	1	mg/ml
D-(+)-Biotin (1 mg/l)	0,1	ml	0,1	mg/l
C-Quelle		x (s. u.)		
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml		
pH	7,4 – 7,8			

Das Medium wurde zunächst 15 min gekocht und anschließend 30 min mit N₂ begast, nach der von HUNGATE (1969) beschriebenen Methode jeweils 9 ml in Hungate-Röhrchen mit Butylgummistopfen abgefüllt und autoklaviert (25 min, 121 °C). Danach wurden pro Röhrchen 500 µl einer sterilen 8,4%igen NaHCO₃ (w/v) zugegeben und der pH-Wert durch Zugabe von 1 N HCl auf 7,4-7,8 eingestellt. Vor dem Beimpfen der einzelnen Röhrchen wurden noch 2-3 Tropfen Biotin (10 mg/ ml) und 100 µl 6%iges Na₂S (w/v) zugegeben.

Folgende C-Quellen wurden verwendet:

Glycin	50	mM
Serin/Na-Formiat/Sarcosin	10/40/60	mM
Serin/Na-Formiat/Betain	10/40/60	mM
Alanin/Sarcosin	30/50	mM
Alanin/Betain	30/50	mM
Na-Formiat/Glycin	50/40	mM
Serin/Sarcosin	20/10	mM
Serin/Betain	20/10	mM

¹Spurenelementlösung SL A (HORMANN and ANDREESEN 1989) mod.

FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,500	g	7,5 x 10 ⁻⁶	M
ZnCl ₂	0,070	g	5,1 x 10 ⁻⁷	M
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,100	g	5,1 x 10 ⁻⁷	M
H ₃ BO ₃	0,006	g	9,7 x 10 ⁻⁸	M
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,190	g	8,0 x 10 ⁻⁸	M
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002	g	1,2 x 10 ⁻⁸	M
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024	g	1,0 x 10 ⁻⁷	M
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,033	g	1,0 x 10 ⁻⁷	M
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,260	g	1,0 x 10 ⁻⁶	M
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036	g	1,5 x 10 ⁻⁷	M
HCl (25 % (v/v))	10,0	ml	7,5 x 10 ⁻²	M
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml		

Die angegebenen Konzentrationen der Spurenelemente ergeben sich nach Zusatz von 1 ml Lösung zum oben beschriebenen Medium.

2.2.3. Medienzusätze

Bei Bedarf wurden den Medien die in Tabelle 4 aufgeführten Zusätze beigemischt.

Tab 4.: Übersicht über verwendete Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung¹	Konzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in H ₂ O dest.	125 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 50 % Ethanol	12,5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O dest.	30 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	35 µg/ml
Anhydrotetracyclin	20 mg/ml in DMF	0,2 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml in DMF	48 µg/ml
IPTG	40 mg/ml in H ₂ O dest.	40 µg/ml

¹Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4. Zellanzucht

Die aerobe Anzucht der in Tabelle 2 aufgeführten *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C und 150-200 Upm auf einem Rundschüttler (Typ KS 500, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) oder einem Reziproschüttler (Typ HS 500 H, Janke & Kunkel).

Die strikt anaerobe Anzucht von *E. acidaminophilum* wurde in mit Butylsepten verschlossenen Kulturröhrchen nach HUNGATE (1969) oder in Serumflaschen mit Latexsepten durchgeführt. Das Medium wurde mit 10 % Inokulum beimpft und bei 30 °C unbewegt inkubiert.

2.2.5. Messung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) als Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 600 bzw. 550 nm gegen unbeimpftes Medium direkt in Hungate-Röhrchen mit einem Spectronic 20+-Spektrometer (Ochs Laborbedarf, Bovenden) oder in Plastik-Küvetten mit einem Spektralphotometer Spekol 1200 (Carl-Zeiss-Technology, Jena) bestimmt.

2.2.6. Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden diese in LB-Medium mit 15 % (v/v) Glycerin bei -80 °C eingefroren.

Kurzfristige Lagerungen waren sowohl auf Vollmediumplatten als auch in Flüssigkultur bei 4 °C möglich.

Anaerob in Hungate-Röhrchen gewachsene Kulturen von *E. acidaminophilum* konnten nach Lagerung bei 4 °C für mindestens drei Monate als Inokulum für neue Kulturen verwendet werden.

2.3. Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus *E. acidaminophilum* (SAITO and MIURA 1963), mod.

Zur Isolierung von Gesamt-DNA wurden 3 g gefrorene Zellen in 4 ml Saline-EDTA-Lösung (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA; pH 8,0) suspendiert, mit 6 mg Lysozym versetzt und bei 37 °C 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen mit 25 ml Tris-SDS-Puffer (0,1M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 1 % SDS; pH 9,0) versetzt. Zur vollständigen Lyse der Zellen folgte mehrmaliges Einfrieren und Auftauen (4-5-mal). Die Suspension wurde auf zwei Zentrifugenröhrchen (SS34, Sorvall) aufgeteilt und mit je 15 ml Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0) versetzt, vorsichtig gemischt

und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich leicht geschüttelt. Zur groben Phasentrennung erfolgte anschließend eine Zentrifugation (5 min, 3000 g, 4 °C). Nach erneuter Zentrifugation der Oberphase (10 min, 20.000 g, 4 °C), der Überstand mit 2,5 Vol. Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 20.000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 25 ml 0,1xSSC gelöst, anschließend mit 2,5 ml 1xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat; pH 7,0) sowie 11 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Phenol-Extraktion und Zentrifugation (10 min, 20.000 g, 4 °C) wurde der erhaltene Überstand mit 2,5 Vol. Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Das durch Zentrifugation (10 min, 20.000 g, 4 °C) gewonnene Pellet wurde nacheinander mit eiskalter 70, 80 und 90%iger (v/v) Ethanol-Lösung gewaschen und nach dem Trocknen in 20 ml 0,1xSSC aufgenommen. Nach Zusatz von 2,2 ml Acetat-EDTA-Lösung (3 M Na-Acetat, pH 7,0; 1 mM EDTA) folgten eine Fällung mit 0,54 Vol. Isopropanol und eine Zentrifugation (30 min, 20.000 g, 20 °C). Das Pellet wurde erneut mit 70, 80 und 90%iger (v/v) Ethanol-Lösung gewaschen und in 10 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst.

2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.2.1. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (BIRNBOIM and DOLY 1979)

Das Zellsediment einer 3-5 ml Übernachtskultur wurde in 100 µl Lösung 1 (25 mM Tris, pH 8,0; 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) vollständig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl frisch hergestellter Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS) und mehrmaligem Invertieren. Nach einer 5-minütigen Inkubation erfolgte das Neutralisieren durch Zugabe von 150 µl eiskalter Lösung 3 (3 M K-Acetat; 2 M Essigsäure), vorsichtiges Mischen und 3-5-minütigem Inkubieren der Probe auf Eis. Nach Zentrifugation (10 min, 10.000 g) wurden dem so gewonnenen Überstand 5 µl RNaseA-Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.2.) und eine Isopropanolfällung (2.3.4.) durchgeführt. Das erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 30-50 µl H₂O_{dest.} aufgenommen.

2.3.2.2. Plasmidisolierung mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)

Zur Gewinnung qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurden 5 ml (für *high-copy* Plasmide) bzw. 10-15 ml (für *low copy* Plasmide) einer Übernachtskultur entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet.

2.3.2.3. Plasmid Midipräparation

Um größere Mengen qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde der 'Qiagen® Plasmid Midi Kit' (Qiagen, Hilden) eingesetzt, wobei eine leicht modifizierte Vorschrift des Herstellers zum Einsatz kam. Dabei wurden der dreifachen Menge des empfohlenen Kulturvolumens jeweils die dreifache Menge der Puffer P1, P2 und P3 zugesetzt. Die Säule wurde jeweils mit einem Drittel des Überstandes beladen, nach Vorschrift gewaschen, eluiert und stets neu äquilibriert.

2.3.3. Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung aus *E. acidaminophilum* erfolgte mit Hilfe des 'RNeasy® Mini Kit' (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus einer 10 ml Kultur, welche in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurde. Hierbei erfolgte nach der RNA-Präparation ein DNA-Verdau mit RNase freier DNase I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers.

2.4. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1. Behandlungen von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Lösungen und Geräte wurden vor dem Verwenden bei 121 °C für 25 min autoklaviert.

Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Geräte, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mit 70%igem (v/v) Ethanol benetzt oder abgeflammt.

Für Arbeiten mit RNA wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ vor dem Autoklavieren zunächst mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation (FEDORCSAK and EHRENBURG 1966) und zersetzt sich während des Autoklavierens zu CO_2 und Ethanol (KUMAR and LINDBERG 1972). Nicht autoklavierbare Gefäße und Geräte wurden nacheinander mit 3 % (v/v) H_2O_2 und DEPC behandeltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ausgespült.

2.4.2. Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen wurde der Lösung 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, folgend wurde sorgfältig gemischt und der Ansatz für 2 min bei 12.000 g 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.

2.4.3. Fällung von Nukleinsäuren

Zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung wurden Nukleinsäure-haltige Lösungen einer Ethanol-fällung unterzogen. Dazu wurden 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2-3 Vol. 96%iger (v/v) Ethanol zugesetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht bzw. bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mind. 30 min. Anschließend wurde bei 12.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen und weitere 5 min bei 12.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde nun mind. 10 min luftgetrocknet und anschließend in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ oder TE-Puffer (2.3.1.) aufgenommen. Für die Aufarbeitung von Sequenzreaktionen wurde auf Raumtemperatur erwärmter Ethanol verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei der Isopropanolfällung wurden statt Ethanol 0,7 Vol. Isopropanol zugesetzt und, wie oben beschrieben, verfahren, hierbei war keine Inkubation erforderlich.

2.4.4. Auftrennung von Nukleinsäuren

2.4.4.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte nach SAMBROOK *et al.*, (1989) in 0,8-3%igen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA). Die Proben wurden vor dem Lauf mit 0,2 Vol. Stopp-Lösung (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 40 % (v/v) Glycerin) versetzt, und die Auftrennung erfolgte bei 80 V in horizontalen Elektrophoreskammern (Peqlab, Erlangen). Anschließend wurde das Gel 20-30 min in Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) inkubiert und folgend kurz mit Wasser gespült. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Image Masters™ VDS (TFX-20.M, MWG-Biotech, Ebersberg) dadurch konnte die DNA betrachtet und fotografiert werden.

2.4.4.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem 3 % (v/v) Formaldehyd enthaltenden Agarosegel (0,8-1%ig) in MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,0; 5 mM Na-Acetat). Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben mit 1 Vol. Probenpuffer (50 % Formamid [v/w], 6 % Formaldehyd [v/w], 1xMOPS-Puffer, 0,1 % Bromphenolblau [w/w] 10 % Glycerin [w/w]) versetzt, 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V in horizontalen Kammern (Peqlab, Erlangen) für ca. 2 h.

2.4.5. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die annähernde Größe linearer DNA- oder RNA-Fragmente wurde durch direkten Vergleich mit elektrophoretisch aufgetrennten Molekülen definierter Größe (Marker) bestimmt. Zum Einsatz kamen dabei folgende Standards (Werte jeweils auf 0,01 kb gerundet):

λ -DNA/*Pst*I-verdaut:

14,06 / 11,50 / 5,08 / 4,75 / 4,51 / 2,84 / 2,56 / 2,46 / 2,44 / 2,14 / 1,99 / 1,70 / 1,16 / 1,09 / 0,81 / 0,51 / 0,47 / 0,45 / 0,34 / 0,26 / 0,25 kb

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

10,00 / 8,00 / 6,00 / 5,00 / 4,00 / 3,50 / 3,00 / 2,50 / 2,00 / 1,50 / 1,00 / 0,75 / 0,50 / 0,25 kb

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

3,00 / 2,00 / 1,50 / 1,20 / 1,03 / 0,90 / 0,80 / 0,70 / 0,60 / 0,50 / 0,40 / 0,30 / 0,20 / 0,10 kb

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

1,03 / 0,90 / 0,80 / 0,70 / 0,60 / 0,50 / 0,40 / 0,30 / 0,20 / 0,10 kb

2.4.6. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (Gene Quant, Pharmacia, Freiburg; Spekol 1200, Carl Zeiss Technology, Jena). Bei einer Absorption von 1 wurde von folgender Konzentration ausgegangen (SAMBROOK *et al.*, 1989):

doppelsträngige DNA	50 μ g/ml
RNA	40 μ g/ml
Oligonukleotide	31 μ g/ml

Durch photometrische Messungen wurde außerdem die Reinheit von Nukleinsäuren bestimmt. Bei proteinfreien DNA-Lösungen sollte das Verhältnis von OD_{260 nm} zu OD_{280 nm} 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 dienten 'ds Control-DNA' aus dem AutoreadTM Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg) sowie M13 DNA (Pharmacia, Freiburg).

2.4.7. Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Primern, Salzen und Proteinen aus PCR-Produkten wurden die Ansätze unter Anwendung des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

2.4.8. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

PCR-Produkte und Plasmide wurden mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

2.4.9. Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die Spaltung von DNA erfolgte für 2-3 h (analytischer Verdau von Plasmid-DNA) bzw. über Nacht (Verdau von Vektoren, PCR-Fragmenten, chromosomaler DNA) bei der laut Anbieter optimalen Reaktionstemperatur des jeweiligen Restriktionsenzym. Nach erfolgter Reaktion wurden diese, sofern möglich, mittels Hitzedenaturierung (20 min, 65 °C) inaktiviert und / oder einer Reinigung wie unter 2.4.7. beschrieben, unterzogen.

2.4.10. Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung der Selbstligation linearisierter Vektor-DNA erfolgte nach Abschluss der DNA-Spaltung eine Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, Promega, Mannheim). Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 U Enzym zugegeben und anschließend 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C.

2.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Zunächst wurden Vektor und Fragmente im Verhältnis 1:6 (insges. 16 µl) 10 min bei 45 °C zur Freilegung der kohäsiven Enden inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 2 µl 10 x Ligationspuffer und 2 U T4-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Der Reaktionsansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert.

2.4.12. Mikrodialyse von DNA-Lösungen (MARUSYK and SERGEANT 1980)

Die Mikrodialyse diente zur Entsalzung von DNA-Lösungen, speziell von 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.

2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.5.1. Standard-PCR

Es kamen je nach Verwendung des zu amplifizierenden PCR-Produktes verschiedene Polymerasen zum Einsatz. *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) wurde für analytische Zwecke eingesetzt, während Amplifikate, die zur Klonierung genutzt werden sollten, mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt), welche eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*) besitzt, synthetisiert wurden. Die Reaktion erfolgte in einem TRIO-Thermocycler (Biometra, Göttingen). Im Folgenden ist die Zusammensetzung für einen Standardansatz aufgeführt:

Tab. 5: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponenten	Ansatz mit <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Ansatz mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase
Primer	30 pmol	15 pmol
dNTP's	0,2 mM	0,1 mM
Puffer	1 x	1 x
Polymerase	1 U	1 U
<i>template</i> -DNA	50 ng	50 ng
Reaktionsvolumen	100 µl	50 µl

Die PCR-Ansätze wurden mit 60 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet und eine PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase:	Denaturierung:	120 s;	95 °C	} 34 x
	Denaturierung:	30 s;	95 °C	
	Annealing:	30 s;	47-68 °C	
	Extension:	30 s-270 s;	72 °C	

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase:	Denaturierung:	30 s;	98 °C	} 10 x
	Denaturierung:	10 s;	98 °C	
	Annealing:	30 s;	47-68 °C	
	Extension:	30 s-270 s;	72 °C	
	Denaturierung:	10 s;	98 °C	} 24 x
	Annealing:	30 s;	55-68 °C	
	Extension:	30 s-270 s;	72 °C	
	Extension:	420 s;	72 °C	

Die Extensionszeit richtete sich nach der Größe der zu erwartenden Produkte, je 1 kb wurden für die *Taq*-DNA-Polymerase etwa 60 s und für die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase ca. 30 s kalkuliert. Die Annealingtemperatur wurde in der Regel so gewählt, dass sie mindestens 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer lag, wobei jeweils der geringere Wert maßgebend war.

Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte dabei nach folgender Formel (BERTRAM and GASSEN 1991):

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

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogene (Karlsruhe) bzw. Metabion (Martinsried) bezogen und sind in der Tabelle 14 (s. S. 163, Anhang A.I.) aufgeführt. Für *primer-extinsion*-Experimente wurden HPLC gereinigte, FAM-markierte Oligonukleotide verwendet.

2.5.2. Identifikation unbekannter Genomabschnitte mittels Vektorette-PCR (RILEY *et al.*, 1990)

2,5 µg chromosomale DNA von *E. acidaminophilum* wurden mit den Restriktionsendonucleasen DraI, NaeI, NruI, SmaI und SspI in einem Gesamtvolumen von 20 µl vollständig geschnitten. Anschließend erfolgte die Ligation mit 1 µl der so genannten *bubble* DNA bei 16 °C über Nacht in einem Endvolumen von 50 µl (1 x Reaktionspuffer, 2 U T4-DNA-Ligase, 5 % PEG-4000). Diese Ligationsansätze konnten direkt als *template* für PCR-Reaktionen (2.5.1.; Tab. 5) eingesetzt werden. Hierzu wurden jeweils ein spezifischer Primer aus dem bereits bekannten Genabschnitt und der Primer UV (s. S. 163, Anhang A.I.), welcher im *missmatch* Bereich der *bubble*-DNA bindet, zur Amplifikation verwendet.

Zur Herstellung der *bubble*-DNA wurden je 500 µM der Oligonukleotide ABPFW und ABPRV (s. S. 163, Anhang A.I.) in einem Endvolumen von 84 µl für 10 min bei 65 °C inkubiert, nach Zugabe von 6 µl MgCl₂ (25 mM) erfolgte eine langsame Abkühlung des Ansatzes (RT), welcher anschließend bei -20 °C gelagert werden konnte.

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

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

2.6.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 ml selektives LB-Medium 1%ig mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 schüttelnd kultiviert. Die Zellen wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (20 min, 4.500 g, 4 °C). Das Pellet wurde zweimal mit je 200 ml eiskaltem H₂O dest. und einmal mit 30 ml 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen, anschließend mit 0,5-0,7 ml 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.6.1.2. Übertragung von DNA in *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser™ (BioRad, München). 40 µl der elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 5-10 µl eines Ligationsansatzes oder 2 µl einer Plasmid-Miniprep (1:50 verdünnt) mit diesen Zellen gemischt und nach 1-minütiger Inkubation auf Eis in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Nach 30 s Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 25 µF und einer Feldstärke von 12,5 kV/cm. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 45-60 min bei 37 °C inkubiert und 50-200 µl dieses Ansatzes auf Selektivmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.7. Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Herstellung von DIG-markierten Sonden

Die Markierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem 'DIG DNA Labeling Kit'(Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit Digoxigenin-11dUTP.

2.7.2. DNA-Hybridisierung (SOUTHERN 1975)

Zunächst wurde die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, dann mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Um den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern, wurde zuvor eine Depurinierung der DNA durch 20-minütige Inkubation in 0,25 N HCl durchgeführt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch 20-minütige Inkubation in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), an die sich eine 20-minütige Inkubation in Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) anschloss. Danach wurde das Gel in 10xSSC (2.3.1.) getränkt. Der Transfer der Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe einer Vakuumblot-Apparatur (Appligene-Oncor, Heidelberg) für 3 h bei 50 mbar mit 10xSSC auf eine ebenfalls in Transferpuffer getränkte, ungeladene Nylonmembran (porablot NYamp, Macherey und Nagel, Düren). Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung verwendet oder getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Prähybridisierung (≥ 2 h) und Hybridisierung (ü. Nacht; 0,5 μ g DNA-Sonde) erfolgten in Standard-Hybridisierungspuffer (5xSSC; 1 % Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim); 0,1 % (v/v) N-Laurylsarcosin; 0,02 % (w/v) SDS) in einem Hybridisierungs-ofen (OV4, Biometra, Göttingen). Für homologe DNA-Sonden wurde eine Hybridisierungstemperatur von 50-68 °C gewählt.

Nach Abschluss der Hybridisierung wurde die Membran 2x5 min bei Raumtemperatur in 2xSSC; 0,1 % (w/v) SDS und 2x15 min bei Hybridisierungstemperatur in 0,1xSSC; 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Die anschließende Detektion erfolgte mit dem 'DIG Luminescent Detection Kit' (Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers. Das Ergebnis wurde auf einem 'Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film' (Roche Diagnostics) festgehalten.

2.7.4. Dot-Blot-Hybridisierung

Ca. 100 ng der rekombinanten Plasmide wurden 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend unter Verwendung einer Dot-Blot-Apparatur (Biorad, München) auf eine zuvor mit 15xSSC (2.3.1.) äquilibrierte ungeladene Nylonmembran (porablot NYamp, Macherey und Nagel) transferiert. Nach erfolgtem Transfer wurden alle Kavitäten der Apparatur zweimal mit je 150 μ l 15xSSC gespült. Die Fixierung der DNA erfolgte durch 2-minütige UV-Bestrahlung (Transilluminator TF-20M, Vilber Lourmat, Marne la Vallée/Frankreich).

2.7.5 Kolonie-Hybridisierung

Die Kolonie-Hybridisierung erfolgte auf ungeladenen Nylonmembranen (porablot NYamp). Diese wurden auf Agar-Platten aufgelegt, mit rekombinanten *E. coli*-Klonen beimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit den Bakterienkolonien nach oben wurden die Membranen anschließend wie folgt auf Lösungs-

getränkten Filterpapierstapeln inkubiert: 5 min Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl; 0,1 % (w/v) SDS), 5 min Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) und 2 min 2xSSC. Danach wurde die DNA durch 2-minütige UV-Bestrahlung fixiert. Zur Entfernung von Zellresten erfolgte zusätzlich eine 30-minütige Behandlung der Membranen (*prewashing*) bei 50 °C in 5xSSC; 0,5 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA. Alle weiteren Arbeitsschritte (Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschen und Detektion) wurden analog zur DNA-Hybridisierung (2.7.2.) durchgeführt.

2.8. Methoden zur DNA-Analyse

2.8.1. DNA-Sequenzierung am ABI377-Sequenzier

Sequenzreaktionen mit dem 'dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit' (PE Applied Biosystems, Langen) wurden nach den Anweisungen des Herstellers im TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Analyse wurde mit Hilfe des automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Langen) von Frau U. LINDENSTRAUB durchgeführt.

2.8.2. Auswertung von Sequenzdaten

Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen DNASIS (Version 5.00), Clone4 (Clone Manager-Version 4.0 und 4.1, Scientific & Educational Software, Durham/NC, USA) ausgewertet.

Mit Hilfe der Programme FASTA (PEARSON and LIPMAN 1988) und dem Algorithmus BLAST (*basic local alignment search tool*, (ALTSCHUL *et al.*, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1997) wurden über das „National Center for Biotechnological Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) die in den Datenbanken EMBL und SwissProt gespeicherten DNA- bzw. Proteinsequenzen mit den Nukleinsäure- bzw. daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen klonierter DNA-Fragmente verglichen.

Das Programm MFOLD (MATHEWS 2006; MATHEWS and TURNER 2006 ; <http://mfold.burnet.edu.au/>) diente zur Analyse von RNA-Sekundärstrukturen, welche sich aus der vorliegenden DNA-Sequenz ergaben. Vollständige Sequenzvergleiche und multiple Alignments von Proteinen wurden mit dem Programm CLUSTAL W (1.74, Matrix „*blossum*“ (THOMPSON *et al.*, 1997) über das European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) durchgeführt. Paarweise Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) durchgeführt (HUANG and MILLER 1991). Die Bestimmung physikalischer Daten der bearbeiteten Proteine anhand der Aminosäuresequenz erfolgte mit Hilfe von Programmen des Institutes für Bioinformatik, Genf (<http://www.expasy.org>).

2.9. Methoden zur RNA-Analyse

2.9.1. Reverse Transkription (RT-PCR)

Der Nachweis von Transkripten erfolgte durch Reverse Transkription der mRNA in cDNA und anschließende Amplifikation des DNA-Fragmentes mittels PCR. Die Reverse Transkription erfolgte mit dem 'RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit' (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Vorgaben des Herstellers. Es wurden 0,5-5 µg DNA-freie Gesamt-RNA in die Reaktion eingesetzt. Als Kontrollen der RT-Ansätze diente RNA, die nicht in cDNA umgeschrieben wurde, sowie chromosomale DNA aus *E. acidaminophilum*.

2.9.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels *primer extension*

1-5 µg Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* wurden mit 2 pmol eines 6-FAM-markierten Primers nach Angaben des Herstellers mit dem 'RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit' (MBI Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Die Länge der erhaltenen cDNA-Fragmente wurde mit Hilfe des internen GeneScan-500 (ROX) Größenstandards (PE Applied Biosystems, Langen) bestimmt, welcher den Ansätzen beigefügt wurde. Die Auswertung der Fragmentanalyse erfolgte mit der GENESCAN2.1-Software. Die Fragmentlängen-Analyse wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) übernommen.

2.10. Proteinchemische Methoden

2.10.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (BRADFORD 1976)

20 µl Proteinprobe wurden mit 1 ml BRADFORD-Reagenz (0,007 % (w/v) Serva Blau G-250; 5 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) H₃PO₄) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Spekol 1200 (Carl-Zeiss-Technology, Jena) in Plastik-Küvetten vermessen. Mit Rinderserum-Albumin (BSA) wurde eine Eichgerade im Konzentrationsbereich von 1-10 µg / 20 µl Probe erstellt.

2.10.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI 1970)

Die visuelle Analyse der Proteine erfolgte in 10-17,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen (LAEMMLI 1970) in vertikalen Minigel-Apparaturen (Biometra, Göttingen) bzw. HOEFFER SE 200 Mighty Small-Apparatur

(GE Healthcare, München). Nach Angaben des Herstellers wurden Sammelgel (5 % (w/v) Acrylamid (37,5:1); 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS) und Trenngel (10-17,5 % (w/v) Acrylamid (37,5:1); 376 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS) vorbereitet, die Proben mit 0,5 Vol. 5xSDS-Probenpuffer (315 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 50 % Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt und nach Denaturierung (10 min, 95 °C) bei 25 mA in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) aufgetrennt.

Als Größenstandard diente PageRuler™ Unstained Protein Ladder (200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa; MBI Fermentas).

2.10.3. Denaturierende Tris-Tricine-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SCHÄGGER 2006)

Die Auftrennung von kleinen Proteinen erfolgte in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen nach SCHÄGGER (2006). Das Sammelgel (4 % (w/v) Acrylamid (29:1), Gelpuffer (1M Tris/HCl; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,45) und das Trenngel (10 % (w/v) Acrylamid (29:1), Gelpuffer (1M Tris/HCl; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,45) und 10 % Glycerin (v/v) wurden entsprechend vorbereitet und die Proben wie unter 2.10.2. bearbeitet. Die Auftrennung erfolgte in Anodenpuffer (0,2 M Tris/HCl; pH 8,9) und Kathodenpuffer (0,1 M Tris/HCl; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,25) bei 25 mA.

2.10.4. Coomassie-Färbung von Proteinen

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteine wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele 30-60 min in Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Serva Blau R250; 0,05 % (w/v) Serva Blau G250; 42,5 % (v/v) Ethanol; 5 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert und anschließend innerhalb von 1-2 h durch einen schnellen Entfärber (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bzw. über Nacht mit einem langsamen Entfärber (7 % (v/v) Essigsäure) entfärbt.

2.10.5 Trocknung von Protein-Gelen

Die Gele wurden zunächst 10 min in Trockenlösung (40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 3 % (v/v) Glycerin) inkubiert und anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Zellophan-Folien (Biometra, Göttingen), welche zuvor ebenfalls in dieser Lösung inkubiert wurden, gespannt und für mindestens zwei Tage getrocknet.

2.10.6. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen und Western-Blot Analyse

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen wurden diese mit Hilfe einer Fastblot B34-Apparatur (Biometra) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Pierce, Rockford/IL, USA) transferiert. Nach Beenden der Elektrophorese wurden die Gele zunächst 10 min in Transferpuffer (50 mM Na-Borat pH 9,0; 10 % (v/v) Methanol) inkubiert und die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran nacheinander je 1 min in Methanol, Wasser und Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde von der Anode aus folgende Schichtung luftblasenfrei vorgenommen: drei Lagen Transferpuffer-getränktes Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel, drei Lagen getränktes Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 4 °C und 1,2 mA pro cm² Membranfläche. Als Größenstandard diente PageRuler™ Prestained Protein Ladder (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa; MBI Fermentas).

2.10.6.1. Nachweis von *Strep*-tag[®] II-Fusionsproteinen

Der Nachweis von *Strep*-tag[®] II-Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe des *Strep*-tag[®] HRP Detection Kit (IBA, Göttingen) nach Angaben des Herstellers.

2.10.7. Heterologe Synthese von Proteinen mit Hilfe des *Strep*-tag[®] II-Expressionssystems

Die Überproduktion und Reinigung rekombinanter Proteine als *Strep*-tag[®] II-Fusionen erfolgte mit Hilfe der Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 (IBA, Göttingen) sowie der Stämme *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL und *E. coli* BL21(DE3).

2.10.7.1. Kultivierung, Induktion der Proteinsynthese und Ernte der Zellen

Je 1 l LB-Medium (mit Ampicillin und Chloramphenicol) wurde mit einer Start-OD_{600nm} von 0,1 (Inokulation durch eine über Nacht gewachsene Vorkultur) schüttelnd bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 inkubiert. Nach einer 3-stündigen Induktion des *tet*-Promotors mit Anhydrotetracyclin (0,2 µg/ml Endkonzentration) wurden die Zellen 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 5.000 g, 4 °C). Die geernteten Zellen wurden bei –80 °C gelagert.

2.10.7.2. *rapid screening* von Expressionskulturen

Das Zellpellet von 1 ml Kultur wurde in PufferW (100 mM Tris/HCl, pH 8; 2 mM EDTA) resuspendiert (0,1 Vol. der OD_{600nm}). 8 µl des Zell-Lysates wurden mit Probenpuffer (2.10.2.) versehen und 10 min bei 96 °C

inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.10.2.) separiert und durch Coomassie-Färbung (2.10.4.) sichtbar gemacht.

2.10.7.3. Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes

Die pelletierten Zellen von 1 l Kultur wurden in 10 ml PufferW (2.10.7.2.) resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym, 0,1 μ M PMSF und 5 μ g/ml DNase erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Den Zellen wurden mittels zwei Passagen durch eine French-Press (20K-Zelle, SLM Instruments, Rochester/NY, USA) bei 1260 psi aufgeschlossen. Nach Zugabe von Avidin (25 mg/ml) zur Maskierung von Biotin, welches ansonsten irreversibel an das Affinitätsmaterial bindet, folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die unlöslichen Komponenten wurden durch Zentrifugation (30 min, 19.000 g, 4 °C) abgetrennt, der Überstand (Rohextrakt) wurde auf Eis gelagert.

2.10.7.4. Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose

Die Reinigung der *Strep*-tag[®] II-Fusionsproteine erfolgte an StrepTactin-Sepharose (1 ml Säulen-Volumen in Polypropylen-Säulen; Qiagen, Hilden). Nach dem Äquilibrieren der Säulenmatrix mit 5 ml PufferW (2.10.7.2.) erfolgten die Auftragung des Rohextraktes und das Entfernen der ungebundenen Proteine durch Waschen mit 5x1 ml PufferW. Die gebundenen Proteine wurden mit 5x0,5 ml PufferE (PufferW mit 2,5 mM α -Desthiobiotin (Sigma, Taufkirchen) eluiert. Die Säulenmatrix wurde durch Zugabe von 3x5 ml PufferR (PufferW mit 1 mM HABA, Sigma, Taufkirchen) und anschließendes Waschen mit 2x4 ml PufferW regeneriert und konnte so 3-5-mal wiederverwendet werden.

2.11. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.11.1. Thioredoxin-System-Test mit DTT und NADP (MEYER *et al.*, 1991), mod.

Die Messung erfolgte anaerob in mit Naturkautschuk-Septen (Sigma-Taufkirchen) verschlossenen Halbmikro-Glasküvetten. Die Extinktionsänderung bei 340 nm wurde mit einem Spektrophotometer (Uvikon 630, Kontron Instruments, Mailand/Italien) verfolgt. Hierzu wurde der Puffer zunächst 5 min mit Stickstoff begast, der Ansatz anschließend nach Zugabe von NADP, Thioredoxin-Reduktase und DTT 5 min bei 30 °C vorinkubiert und schließlich durch Thioredoxin gestartet.

Tris-HCl-Puffer (100 mM), pH 8,0	870 μ l
Na ₂ -EDTA (10 mM)	20 μ l
Thioredoxin-Reduktase (aus <i>E. acidaminophilum</i>)	10 μ g
Thioredoxin (aus <i>E. acidaminophilum</i>)	5 μ g
NADP (20 mM)	25 μ l
DTT (0,5 M)	10 μ l
ad.	1000 μ l

2.11.2. Thioredoxin-System-Test mit NADPH und Lipoamid (MEYER *et al.*, 1991), mod.

Dieser Test wurde analog zu 2.11.1 durchgeführt. Nach Zugabe von NADPH wurde eine eventuelle Blindreaktion abgewartet und dann die Reaktion mit Lipoamid gestartet.

Tris-HCl-Puffer (100 mM), pH 8,0	820 μ l
Na ₂ -EDTA (10 mM)	20 μ l
Na-Dithionit (25 mM)	10 μ l
Thioredoxin-Reduktase (aus <i>E. acidaminophilum</i>)	10 μ g
Thioredoxin (aus <i>E. acidaminophilum</i>)	5 μ g
NADPH (20 mM)	10 μ l
Lipoamid (25 mM in DMSO [100 % v/v])	60 μ l
ad.	1000 μ l

2.11.3 Test auf Diaphorase-Aktivität nach KLEIN and SAGERS (1967)

Dieser Test wurde analog zu 2.11.1 durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH gestartet und die Extinktionsänderung bei 555 nm verfolgt.

KP-Puffer (100 mM, pH 7,8)	500 μ l
Benzylviologen (100 mM)	50 μ l
Proteinprobe	5-100 μ g
NAD(P)H (20 mM) oder DTT (0,5 M)	25 μ l bzw. 10 μ l
ad.	1000 μ l

2.11.4 Glycin-Decarboxylase, lichtoptischer Test nach KLEIN and SAGERS (1967)

Dieser Test wurde anaerob (2.11.1.) durchgeführt und durch Zugabe von Glycin gestartet und die Extinktionsänderung bei 365 nm verfolgt. Als Probe wurden zum einen Rohextrakt von *E. acidaminophilum* und zum anderen die Decarboxylase-Proteine P1, P2 und P4 (aus *E. acidaminophilum*) und Diaphorase (500 µg/ml; 5 U/mg; Sigma, Taufkirchen) eingesetzt.

KP-Puffer (100 mM, pH 8)	680 µl
DTE (100 mM)	50 µl
THF (50 mM in 0,01 N NaOH)	50 µl
NAD(P) (20 mM)	50 µl
Probe	75 µl
Pyridoxalphosphat (25 mM)	10 µl
Glycin (1 M; puriss.)	50 µl
ad.	1000 µl

Berechnung der spezifischen Aktivitäten

Nach Starten der jeweiligen Reaktionen wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der einsetzenden Reaktion bestimmt.

Mit Hilfe der Extinktionsänderung wurde die Volumenaktivität der Probe berechnet.

$$A_v = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_\tau}{d \cdot \varepsilon \cdot V_p}$$

A_v = Volumenaktivität [U/ml]

$\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute

d = Schichtdicke [cm]

ε = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

V_τ = Volumen des Testansatzes [ml]

V_p = Volumen der eingesetzten Probe [ml]

Die spezifische Aktivität (U/mg) konnte anhand der ermittelten Proteinkonzentration (2.10.1) berechnet werden.

2.11.5. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität (MILLER 1992), mod.

2.11.5.1. Zellanzucht

6 ml M9-Medium (2.2.2) mit Amp (100 $\mu\text{g/ml}$), Tet (10 $\mu\text{g/ml}$) und IPTG (1 mM) wurden mit ca. 500 μl einer Vorkultur angeimpft (Start OD_{600} von 0,1 wurde eingestellt) und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach 5 minütigem Abkühlen auf Eis erfolgte die Ernte in je 1 ml Aliquots durch Zentrifugation (5 min, 10.000 g). Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -20 °C.

2.11.5.2. Aktivitätsbestimmung

Die Zellpellets von 1 ml Kulturvolumen wurden in 880 μl Puffer Z (60 mM Na_2HPO_4 ; 40 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4) resuspendiert und mit 4 μl β -Mercaptoethanol und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 80 μl Chloroform (100 % v/v) und 40 μl 0,1 % (w/v) SDS erfolgte nach 10 s Vortexen eine weitere Inkubation für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Proben einer Zentrifugation unterzogen (10 min, 10.000 g). Je 65 μl des Überstandes wurden mit 35 μl Puffer Z gemischt und in die Kavität einer Microtiterplatte gegeben (nach GIFFITH and WOLF 2002, mod.). Die Reaktion wurde durch Zusatz von 50 μl Substratlösung (ONPG; 4 mg/5 ml) gestartet und die Extinktionsänderung mit einem Microplate-Reader (Model 3550, BioRad München) bei 415 nm aufgezeichnet.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach dieser Formel:

$$A = \frac{\Delta E}{\text{min} \cdot \epsilon \cdot d} \cdot 1000$$

A = Volumenaktivität [U/ml]

$\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

Eine internationale Enzymeinheit (U) entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute. Die folgend aufgeführten Extinktionskoeffizienten wurden verwendet:

Benzylviologen:	$\epsilon_{555} = 1,56 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
DTNB:	$\epsilon_{412} = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
NAD(H_2):	$\epsilon_{365} = 3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
NADP(H_2):	$\epsilon_{365} = 3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
ONP:	$\epsilon_{420} = 3,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

2.12. Geräte und Chemikalien

Neben den bereits in den vorausgehenden Kapiteln erwähnten Materialien fanden Geräte folgender Hersteller Verwendung:

Abimed (Langenfeld):	automatische Pipetten
A&D Company (Tokio/Japan):	Feinwaagen FX-200, ER-182A
Beckman (Palo Alto/CA, USA):	Ultrazentrifuge L8-60M
Bender & Hobein AG (Ismaning):	Vortex Genie 2
Biometra (Göttingen):	Power Pack P25
Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg):	Tischzentrifuge 5415 C, Thermomixer 5436
Hamilton (Bonaduz/Schweiz):	Mikroliterspritzen
Hermle Labortechnik (Wehingen):	Zentrifuge Z 323 K
Hettich (Tuttlingen):	Zentrifuge 30 RF
Julabo Labortechnik (Seelbach):	Wasserbad UC-5B/5
Knick (Berlin):	Mikroprozessor pH-Meter 761
Sorvall (Hanau):	Zentrifuge RC 5BPlus
Roth (Karlsruhe):	Magnetrührer R 1000

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Difco (Detroit, USA), Gerbu (Gaiberg), Gibco (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) bezogen. Weiterhin wurden Chemikalien und Enzyme folgender Firmen bzw. Anbieter eingesetzt:

Appligene-Oncor (Heidelberg):	Lysozym, Ampicillin
MBI Fermentas (St. Leon-Rot):	Restriktionsenzyme, λ -DNA, dNTP's
Messer Griesheim (Krefeld):	Stickstoff (4.0), Wasserstoff (3.0), Formiergas
New England Biolabs (Frankfurt/Main):	Restriktionsenzyme
Roth (Karlsruhe)	Lysozym, Ampicillin
Serva (Heidelberg):	BSA, Pepton, Hefeextrakt

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase-Gencluster in *E. acidaminophilum*

E. acidaminophilum kann Glycin und die Glycin-Derivate Sarcosin, Creatin, Creatinin und Betain durch einen als Sticklandreaktion (STICKLAND 1934) bezeichneten Stoffwechselweg als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen (ZINDEL *et al.*, 1988). Während Glycin sowohl als Elektronen-Akzeptor (Glycin-Reduktase) als auch als Elektronen-Donor (Glycin-Decarboxylase) fungieren kann, ist nur eine Reduktion von Sarcosin und Betain, katalysiert durch die Sarcosin- bzw. Betain-Reduktase, möglich (HORMANN and ANDREESEN 1989), die in zwei der drei Proteinkomplexe übereinstimmen (ANDREESEN 2004). Die Glycin-Reduktase ist ebenso wie die Glycin-Decarboxylase ein Multienzymkomplex, der aus dem substratspezifischem Selenoprotein A (GrdA) (DIETRICH *et al.*, 1991), dem substratspezifischem Selenoprotein B (GrdB und GrdE) (WAGNER *et al.*, 1999) und dem substratspezifischen Protein C (GrdC und GrdD) (SCHRÄDER and ANDREESEN 1992) besteht. Die Gene, welche für die einzelnen Proteinkomponenten der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase codieren, sind zusammen mit den Genen der Komponenten des Thioredoxin-Systems und Genen, die z. T. für Aminosäuretransporter codieren, in Genclustern organisiert (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001; KOHLSTOCK *et al.*, 2001; LÜBBERS and ANDREESEN 1993; SONNTAG 1998). Von einer Vielzahl dieser Gene sind im Genom von *E. acidaminophilum* zwei leicht unterschiedliche Kopien zu finden, u. a. von *grdB*, *trxB*, *trxA* *grdT* und *grdC*. Von dem für das Selenoprotein A (GrdA) codierenden Gen scheinen sogar noch mehr Kopien vorzuliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die im Gencluster I vorkommende dritte Kopie von *grdA* vollständig kloniert und das Vorhandensein einer möglichen weiteren Kopie von *grdE* geklärt werden. Der durch RUDOLF (2003) und STEINER (2004) identifizierte Gensatz VI sollte sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich vervollständigt werden. *Downstream* der im Betain-Reduktase-spezifischen Gensatz V/II lokalisierten zweiten Kopie von *grdC* sollte eine mögliche weitere Kopie von *grdD* gesucht werden.

Leider ergab sich keine Zusammenarbeit mit einem Laboratorium, das vollständige Genomsequenzierungen durchführt.

3.1.1. Vollständige Klonierung des Gencluster I der Glycin-Reduktase

Im Gencluster I der Glycin-Reduktase sind die Gene *grdB₁*, *trxB₁*, *trxA₁*, *grdA₁* sowie die für die Untereinheiten des Protein C codierenden Gene *grdC₁* und *grdD₁* lokalisiert (Abb. 4). *Upstream* von *grdB₁* befindet sich ein unvollständiger offener Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz signifikante Homologien zu dem auf diesem Gensatz lokalisierten *grdA₁* aufweist. In Gencluster III ist eine weitere Kopie

von *grdA* zu finden, welche *upstream* von *grdE₁* und *downstream* von *grdB₂* flankiert wird. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass auch in Gencluster I diese Genanordnung vorzufinden ist.

Ein Sequenzvergleich der bereits kloniert vorliegenden Kopien von *grdA* zeigte, dass alle drei Kopien auf Nukleinsäureebene sehr ähnlich sind, weshalb durch PCR-Reaktionen und nicht mit Hilfe von Hybridisierungstechniken nach fehlenden Genabschnitten bzw. Genen gesucht werden sollte.

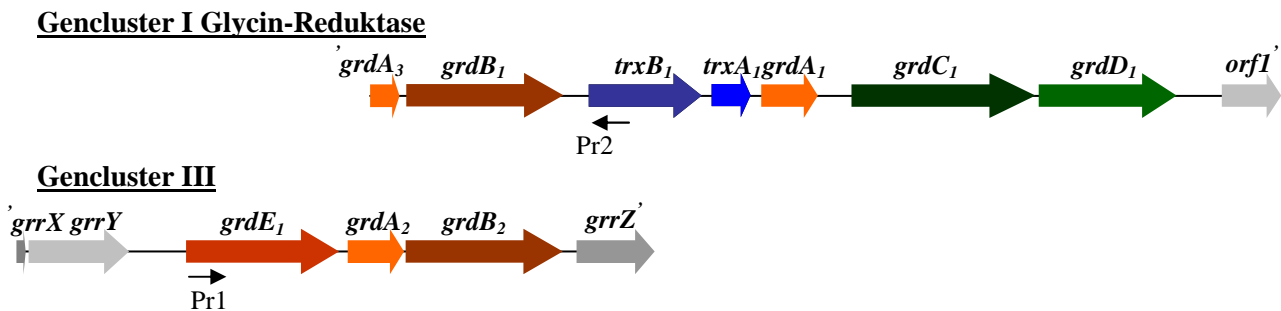


Abb. 4: Übersicht über die im Glycin-Reduktase-spezifischen Gencluster I und III lokalisierten Gene (Kohlstock *et al.*, 2001; Lübbers and Andreesen 1993; Sonntag 1998). Dargestellt sind die im Gencluster I und III organisierten Gene sowie die Position der für die Amplifikation des *upstream*-Bereichs von *grdB₁* verwendeten Primer Pr1_TrxB1Ear und Pr2_GrdEEaf. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdX*_GrdX (hypothetisch), *grdE*_Protein der 25- und 22 kDa-Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *grdA*_Selenoprotein A der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdB*_47 kDa -Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *trxB*_Thioredoxin-Reduktase, *trxA*_Thioredoxin *grdC*_57 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdD*_48 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *orf1*_hypothetisches Protein unbekannter Funktion, *grrW*_hypothetisches Protein unbekannter Funktion, *grrX*_RNA-Methylase (hypothetisch), *grrY*, *grrZ*_hypothetische Proteine unbekannter Funktion

Da von einem hohen Grad der Übereinstimmung der beiden möglichen *grdE*-Gene ausgegangen wurde, sollte mit einem *forward*-Primer, welcher am 5'-Ende von *grdE₁* bindet (GrdEEaf) und einem *reversen* Primer, welcher am 5'-Ende von *trxB₁* bindet (TrxB1Ear), der Bereich *upstream* von *grdB₁* amplifiziert werden (Abb. 4). Mit diesen Primern wurde durch eine PCR-Reaktion an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* ein ca. 3,1 kb Fragment generiert, welches anschließend in den Vektor pGem®-T Easy kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert wurde. Dieses Hybrid-Plasmid wurde mit pUsGrdB1 bezeichnet. Durch Sequenzierung dieses Plasmides konnte der fehlende Bereich von *grdA₃* identifiziert und *upstream* davon eine zweite Kopie von *grdE*, welche mit *grdE₂* bezeichnet wurde, nachgewiesen werden (s. S. 43, Abb. 7; Anhang A.III.). Für das Genom von *E. acidaminophilum* wurden somit vier Kopien für *grdA* und zwei Kopien für *grdE* beschrieben.

Durch Vektorette-PCR (Riley *et al.*, 1990) mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1.) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* mit den Primerpaaren usGrdE2/1 und UV (Anhang A.I.) sowie usGrdE2/2 und UV sollte der Bereich *upstream* von *grdE₂* identifiziert werden. Durch Sequenzierung der mit diesen beiden Primerpaaren amplifizierten Fragmente (1 kb und 1,2 kb) konnte nur der Bereich *upstream* von *grdE₁* (Gencluster III) amplifiziert werden (s. S. 43, Abb. 7; Anhang A.IV.).

3.1.2. Vollständige Klonierung des Gencluster VI der Betain-Reduktase

Der erst von RUDOLF (2003) und STEINER (2004) identifizierte und mit Gencluster VI bezeichnete Sarcosin-spezifische Gensatz trägt eine weitere, die vierte Kopie von *grdA*, eine zweite Kopie von *grdT* (Gen eines mutmaßlichen Sarcosin-Transporters) sowie des Gen einer Creatinase (*creA*) und den 3'-Bereich der zweiten Kopie von *grdF* (Abb. 5).

Gencluster IV Sarcosin-Reduktase

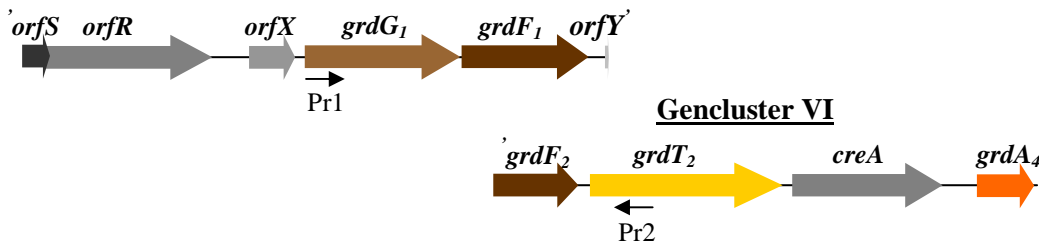


Abb. 5: Übersicht über die im Glycin-Reduktase spezifischen Gencluster IV und VI lokalisierten Gene. Dargestellt sind die im Gencluster IV und VI organisierten Gene sowie die Position der für die Amplifikation des *upstream*-Bereichs von *grdF₂* verwendeten Primer Pr1_GrdG1Eaf und Pr2_GrdT2Ear. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *orfS*_Zwei-Komponenten-Sensor-Histidin-Kinase, *orfR*_NtrC-ähnlicher Responseregulator, *orfX*, *orfY*_hypothetische Proteine, *grdG*_Protein der 22- und 25 kDa Untereinheit des substratspezifischen Protein B der Sarcosin-Reduktase, *grdF₄₇* kDa-Untereinheit der Sarcosin-Reduktase, *grdT*_Glycin-Betain-Transporter, *creA*_Creatinase, *grdA*_Selenoprotein A der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase.

Ausgehend davon, dass *upstream* von *grdF₂* eine mögliche weitere Kopie von *grdG* zu finden ist, wurde durch eine PCR-Reaktion mit einem *forward* Primer aus dem 5'-Bereich von *grdG₁* (Gencluster IV; GrdG1Eaf) und einem *reversen* Primer aus dem 5'-Bereich von *grdT₂* (Gencluster VI; GrdT2Ear) ein Fragment mit einer Größe von ca. 3,5 kb amplifiziert, welches folgend in den Vektor pGem®-T Easy kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF transformiert und mit pUsGrdF2 bezeichnet wurde. Auf diesem Hybridplasmid lag jeweils eine zweite Kopie der Gene *grdF* und *grdG* vollständig kloniert vor. Das hier beschriebene PCR-Produkt wurde anschließend nochmals mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1.) generiert und ebenfalls vollständig sequenziert (s. S. 43, Abb. 7; Anhang A.VII.).

Der Genabschnitt *upstream* von *grdG₂* wurde durch Vektorette-PCR (RILEY *et al.*, 1990) mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1.) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* mit den Primern usGrdG2Ea1 und UV sowie usGrdG2Ea2 amplifiziert. Die generierten PCR-Produkte mit Größen von 0,8 kb und ca. 0,9 kb wurden vollständig sequenziert und die erhaltenen Sequenzen verknüpft. Dabei wurde der Bereich *upstream* *grdG₂* amplifiziert, jedoch konnte in einem 0,9 kb großen Basenbereich kein offener Leserahmen identifiziert werden.

Somit sind im Genom von *E. acidaminophilum* auch zwei Kopien der Gene *grdG* und *grdF* identifiziert worden (s. S. 43, Abb. 7).

Auch der *downstream*-Bereich der sich auf dem Gencluster VI befindenden vierten Kopie von *grdA* sollte identifiziert werden. Durch eine PCR am Gesamtpool der Sau3A-Genbank von *E. acidaminophilum* (POEHLEIN 2003) mit den Primern usGrdA3/2 konnte ein ca. 1,5 kb PCR-Produkt amplifiziert werden,

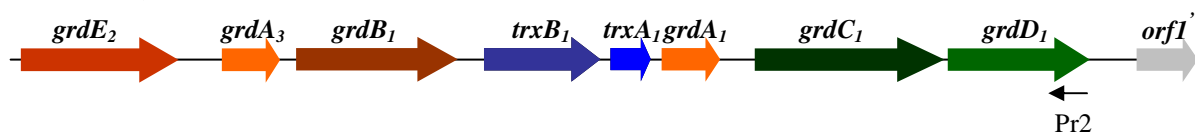
welches in den Vektor pGem®-T Easy kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert wurde. Durch Sequenzierung des Plasmid-Inserts (pDsGrdA4) konnte *downstream* von *grdA₄* ein putatives Gen einer Adenine-spezifischen DNA-Methylase identifiziert werden (s. S. 43, Abb. 7; Anhang A.VIII.). Es konnten somit insgesamt vier Kopien des für das Selenoprotein A der drei Reduktasen codierenden Gens im Genom von *E. acidaminophilum* nachgewiesen werden.

3.1.3. Vollständige Klonierung des Gencluster V/II der Betain-Reduktase

Durch die vollständige Klonierung von *grdT₁* (STEINER 2004) konnten der von SONNTAG (1998) identifizierte Gensatz V des Betain-spezifischen Genclusters und der von LÜBBERS (1993) identifizierte Gensatz II zu einem gemeinsamen Betain-spezifischen Gencluster, folgend mit Gensatz V/II bezeichnet, zusammengefasst werden (Abb. 6). Auf diesem Gencluster waren neben den Genen *grdH* und *grdI*, die für die Betain-spezifische Reduktase-Untereinheiten codieren, wie schon erwähnt, die zweite Kopie von *grdT*, ein für einen Aminosäuretransporter codierendes Gen, jeweils eine zweite Kopie der Gene des Thioredoxin-Systems und eine zweite Kopie von *grdC* lokalisiert. Es konnte auch hier davon ausgegangen werden, dass *downstream* dieses Gens eine weitere Kopie von *grdD* zu finden ist.

Durch PCR an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* mit einem im 3'-Bereich von *grdT₁* (Gencluster V/II) abgeleiteten *forward* Primer (GrdT1Eaf) und einem im 3'-Bereich von *grdD₁* (Gencluster I; (Abb. 6) abgeleiteten *reverse* Primer (GrdD1Ear) konnte ein ca. 4,4 kb PCR-Produkt amplifiziert werden, welches anschließend in den Vektor pGem®-T Easy kloniert, mit pDsGrdC2 bezeichnet und vollständig sequenziert wurde.

Gencluster I Glycin-Reduktase



Gencluster V/II Betain-Reduktase

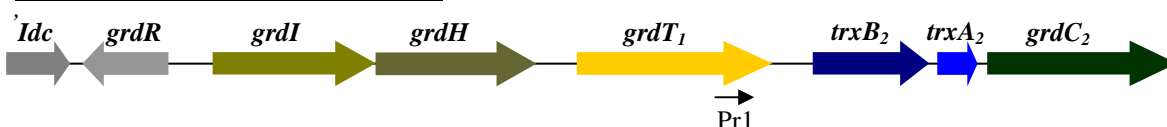


Abb. 6: Übersicht über die im Glycin-Reduktase spezifischen Gencluster I und Betain-Reduktase spezifischen Gencluster V/II lokalisierten Gene (KOHLSTOCK *et al.*, 2001; LÜBBERS and ANDREESEN 1993; SONNTAG 1998; STEINER 2004). Dargestellt sind die im Gencluster I und V/II organisierten Gene sowie die Position der für die Amplifikation des *downstream*-Bereichs von *grdC₂* verwendeten Primer Pr1_GrdT1Eaf und Pr2_GrdD1Ear. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdX*_GrdX (hypothetisch), *grdE*_Protein der 25- und 22 kDa-Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *grdA*_Selenoprotein A der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdB*_47 kDa -Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *trxB*_Thioredoxin-Reduktase, *trxA*_Thioredoxin *grdC*_57 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdD*_48 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *orf1*_hypothetisches Protein unbekannter Funktion, *ldc*_Lysin-Decarboxylase, *grdR*_Regulatorprotein (hypothetisch), *grdI*_48 kDa-Untereinheit des Protein B der Betain-Reduktase, *grdH*_45 kDa-Untereinheit des Protein B der Betain-Reduktase. *grdT*_Glycin-Betain-Transporter

Dieses PCR-Produkt repräsentierte den 3'-Bereich von *grdT₁*, die vollständigen Sequenzen der Gene *trxB₂*, *trxA₂* sowie *grdC₂* und *downstream* die Sequenz einer zweiten Kopie von *grdD*. Diese PCR-Reaktion wurde mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1.) wiederholt. Auch hier wurde ein ca. 4,4 kb Fragment generiert, welches ebenfalls vollständig sequenziert wurde (s. S. 43, Abb. 7; Anhang A.VI.). Somit konnte gezeigt werden, dass auch die Gene *grdC* und *grdD* in zweifacher Kopienzahl im Genom von *E. acidaminophilum* vorzufinden sind. Auch der Genbereich *downstream* von *grdD₂* sollte im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Durch Vektorette-PCR (RILEY *et al.*, 1990) mit den Primern dsGrdD2EA1 und dsGrdD2EA2 jeweils in Kombination mit dem Primer UV sowie durch PCR mit diesen Primern und den Vektor-spezifischen Primern UPRN sowie RPRN und dem Gesamtplasmidpool der Sau3A-Genbank von *E. acidaminophilum* als *template*, konnten nur PCR-Produkte generiert werden, die den 3'-Bereich von *grdD₁* und den *downstream* gelegenen *orf1* (KOHSTOCK 2001) repräsentieren. Da beide Kopien der Gene *grdD* zu 100 % identisch waren, konnten keine *grdD₂*-spezifischen Primer generiert werden. Auch das *screening* der Sau3A-Genbank von *E. acidaminophilum* mit den Primern GrdT1Eaf und GrdD1Ear erbrachte keine Resultate. Die Sequenz des Genbereiches *downstream* *grdD₂* bleibt also weiterhin unbekannt. Einzig die Gene der beiden Untereinheiten der Betain-spezifischen Reduktase, *grdI* und *grdH*, sind nach bisherigem Wissensstand nur als singulär vorkommende Gene im Genom von *E. acidaminophilum* vertreten.

3.1.4. Verknüpfung der Gencluster

Da nichts über die Lokalisation der beschriebenen Gensätze im Genom von *E. acidaminophilum* bekannt war, sollte durch PCR-Reaktionen mit Cluster-spezifischen Primern versucht werden, eventuell einzelne Gensätze zu verknüpfen und somit die Sequenzen *upstream* und *downstream* dieser zu identifizieren. Dazu wurden jeweils im 3'-Bereich der Gene bzw. offenen Leserahmen *grdE₂*, *grrX*, *orfS*, *grdG₂* sowie *ldc* und im 5'-Bereich von *orfU*, *grrZ*, *orfY*, *dadM* sowie *grdD₂* jeweils zwei Primer abgeleitet. Die entsprechenden Primer sind aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht im Einzelnen aufgeführt, sondern nur der Tabelle 14 (s. S. 163, Anhang A.I.) zu entnehmen. Es wurden jeweils zwei Primer im Abstand von ca. 100-150 bp abgeleitet, um schon anhand der Größe der generierten PCR-Fragmente auf eine spezifische Amplifikation schließen zu können und somit eine Vorauswahl zu treffen.

Durch PCR-Reaktionen mit allen sich mit diesen Oligonukleotide ergebenden Primerpaarungen (144 Kombinationen) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* wurde eine Vielzahl an Fragmenten amplifiziert. Bei einer Vielzahl der PCR-Reaktionen wurden keine Produkte erhalten, bei anderen PCRs hingegen wurden z. T. zwei bis fünf Fragmente amplifiziert. Nur bei sehr wenigen PCR-Reaktionen wurden nur ein bzw. zwei deutliche Fragmente generiert, die anschließend sequenziert wurden.

Durch die Primerpaare OrfREar und LdcEar, OrfSEar und GrrZEaf1 sowie OrfREar und GrrYEar2 wurden PCR-Produkte mit ungefähren Größen von 0,8 kb; 1,2 sowie 1,1 kb amplifiziert, die den 5'-Bereich des von SONNTAG (1998) beschriebenen *orfR* und den 3'-Bereich von *orfS* repräsentierten. Durch diese Amplifikate

konnte die Sequenz des *orfS* upstream um 900 bp erweitert werden. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz dieses *orfS* zeigte signifikante Homologien zu Zwei-Komponenten-Sensor-Histidin-Kinasen diverser Organismen. Die Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Anhang A.V. dargestellt. Durch PCR-Reaktionen mit den Primern LdcEar2 und GrrYEar1 sowie GrrYEar1 und dsGrdD2Ea2 konnten Fragmente mit Größen von ca. 0,5 kb bzw. 1,2 kb generiert werden. Diese PCR-Produkte repräsentierten den 5'-Bereich des von SONNTAG (1998) im Gencluster III beschriebenen *grrY* und die vollständige Sequenz des ebenfalls von SONNTAG (1998) beschriebenen *grrX*. *Upstream* war ein offener Leserahmen, welcher mit *grrW* bezeichnet wurde, lokalisiert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien zu nicht näher klassifizierten hypothetischen Proteinen diverser Organismen aufzeigte. Die Sequenz dieser PCR-Produkte ist im Anhang A.IV. dargestellt, die Lage der beschriebenen ORFs auf den für Glycin-, Sarcosin- und Betain-spezifischen Reduktase-Genclustern ist in Abbildung 7 dargestellt.

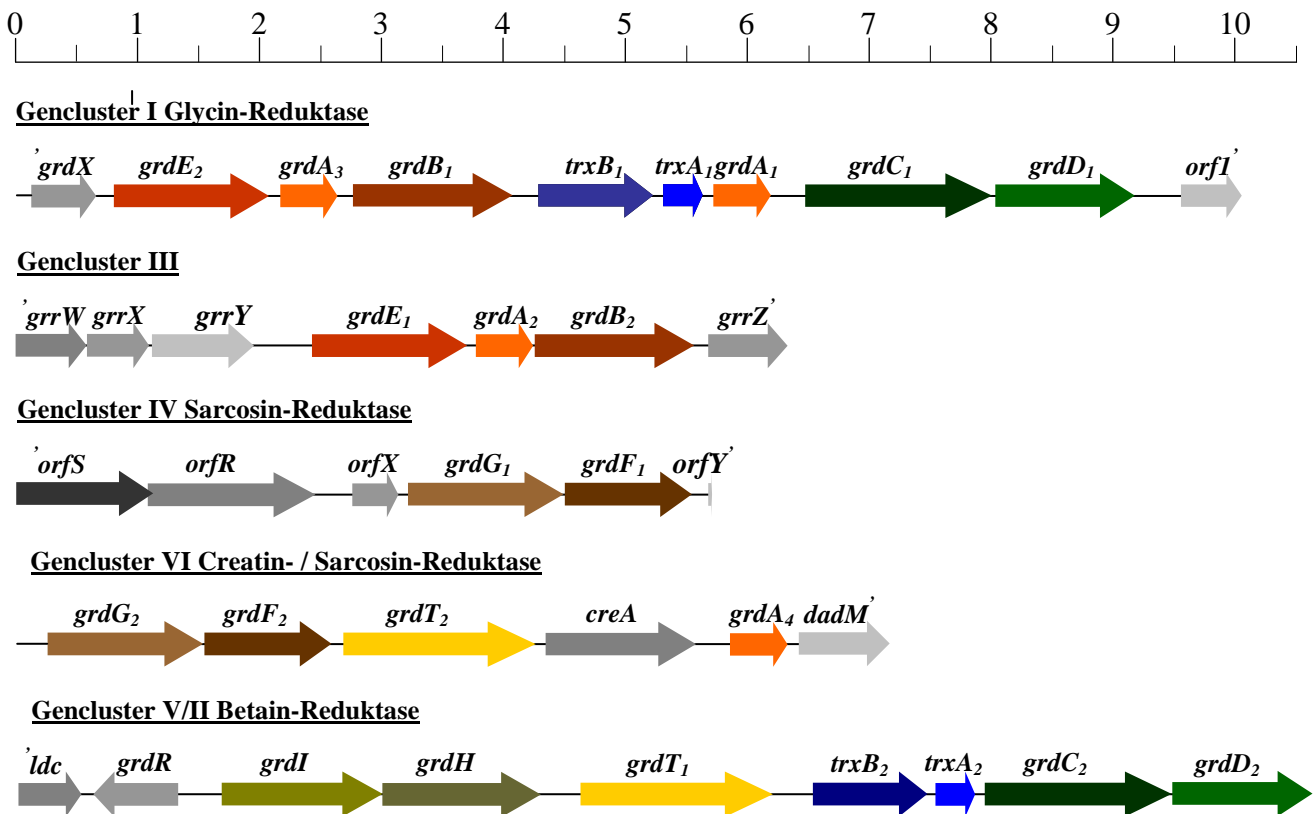


Abb. 7: Übersicht über die Organisation der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase spezifischen Gencluster aus *E. acidaminophilum*. Die Orientierung der Gene ist durch die Richtung der Pfeile angegeben. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdX*_GrdX (hypothetisch), *grdE*_Proprotein der 25- und 22 kDa-Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *grdA*_ Selenoprotein A der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdB*_47 kDa - Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *trxB*_Thioredoxin-Reduktase, *trxA*_Thioredoxin *grdC*_57 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdD*_48 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *orfI*_hypothetisches Protein unbekannter Funktion, *grrW*_hypothetisches Protein unbekannter Funktion, *grrX*_RNA-Methylase (hypothetisch), *grrY*, *grrZ*_hypothetische Proteine unbekannter Funktion, *orfS*_Zwei-Komponenten-Sensor-Histidin-Kinase, *orfR*_NtrC-ähnlicher Responseregulator, *orfX*, *orfY*_hypothetische Proteine, *grdG*_Proprotein der 22- und 25 kDa-Untereinheit des Protein B der Sarcosin-Reduktase, *grdF*_47 kDa-Untereinheit der Sarcosin-Reduktase, *grdT*_Glycin-Betain-Transporter, *creA*_Creatinase, *dadM*_Adenin spezifische DNA-Methylase, *ldc*_Lysin-Decarboxylase, *grdR*_Regulatorprotein (hypothetisch), *grdI*_48 kDa-Untereinheit des Protein B der Betain-Reduktase, *grdH*_45 kDa-Untereinheit des Protein B der Betain-Reduktase.

Mit den Primern GrrZEaf2 und usGrdE2/1 konnte ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1,1 kb amplifiziert werden. Dieses PCR-Produkt repräsentiert den 5'-Bereich von *grdE₂* sowie einen *upstream* gelegenen offenen Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz starke Homologie zu dem für *C. sticklandii* beschriebenen Protein GrdX (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001) aufwies (s. S. 43, Abb. 7; Anhang A.III.). Die Gene der Gencluster I und III konnten so jedoch nicht verknüpft werden.

Durch Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte konnte gezeigt werden, dass sich keiner der bisher beschriebenen Gencluster mit einem andern durch diese Methode verknüpfen ließ. Des Weiteren zeigte sich, dass bei jeder PCR-Reaktion (deren Amplifikate sequenziert wurden) mind. einer der verwendeten Primer unspezifisch gebunden hatte. Es wurden keine PCR-Produkte amplifiziert, die größer als 2,5 kb waren.

Es ist davon auszugehen, dass die Gencluster mehr als 7 kb voneinander entfernt auf dem Genom von *E. acidaminophilum* lokalisiert sind und ein Bereich dieser Größe nicht durch PCR-Reaktionen mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert werden kann.

3.2. Das Glycin-Decarboxylase-Operon aus *E. acidaminophilum*

3.2.1. Vollständige Klonierung des Glycin-Decarboxylase-Operons aus *E. acidaminophilum*

Die Glycin-Decarboxylase ist ein meist aus vier Proteinen bestehender Multienzymkomplex. Die als P1-Protein bezeichnete Komponente katalysiert zusammen mit dem P2, dem Elektronen-transferierenden Protein, die Abspaltung von CO₂ und die Übertragung der Aminomethylgruppe auf die zunächst oxidierte Liponsäuregruppe des P2-Proteins. Die Aminomethyl-Transferase, auch als P4-Protein bezeichnet, überträgt die C₁-Einheit der Aminomethylgruppe auf THF, es kommt dadurch zur Bildung von 5,10-Methylentetrahydrofolat und der Freisetzung von NH₃. Die durch Reoxidation der Liponsäuregruppe, katalysiert durch das P3-Protein, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, freiwerdenden Elektronen werden meist auf NAD⁺, z. T. aber auch auf NADP⁺ übertragen.

Basis der in der vorliegenden Arbeit dargelegten Untersuchungen ist ein in der vorangegangenen Diplomarbeit (POEHLEIN 2003) beschriebenes PCR-Produkt mit einer Größe von 4,2 kb. Auf diesem Fragment waren die Gene *gcvP2* (Elektronen-transferierendes Protein; P2-Protein), *gcvP1α* (α-Untereinheit des P1-Proteins) und *gcvP1β* (β-Untereinheit des P1-Proteins) vollständig, das Gen des P4-Proteins, *gcvP4* hingegen nur unvollständig lokalisiert. Die Gene der Formyl-THF-Synthetase (*thf*), des Selenoproteins PrpU (*prpU*) und der 3'-Bereich des Gens für die β-Untereinheit des P1-Proteins (*gcvP1β*) lagen auf den beiden aus einer Sau3A-Genbank (POEHLEIN 2003) von *E. acidaminophilum* isolierten Plasmiden pAP2218 bzw. pAP694 kloniert vor (s. S. 46, Abb. 8). Diese sechs Gene wiesen die gleiche Transkriptionsrichtung auf.

Die ersten Schritte weiterführender Arbeiten waren die vollständige doppelsträngige Sequenzierung dieses PCR-Produktes durch *primer-walking* und die vollständige Klonierung des Gens der Aminomethyl-Transferase (*gcvP4*).

Der Vergleich der bereits bekannten Sequenz von *gcvP4* aus *E. acidaminophilum* mit Genen und Proteinen anderer Organismen zeigte, dass noch ein ca. 200-250 bp umfassender Bereich fehlte, um dieses Gen vollständig zu klonieren. Durch Southern-Hybridisierungen mit chromosomaler DNA aus *E. acidaminophilum* wurde gezeigt, dass *gcvP4* auf einem 1,3 kb HindIII-Fragment lokalisiert war (Daten nicht gezeigt). Die entsprechende Schnittstelle im bereits sequenzierten Genbereich befindet sich ca. 450-500 bp *downstream* des 5'-Endes von *gcvP4*. Durch Klonierung dieses Fragmentes sollte der Bereich also um ca. 800-850 bp erweitert und somit das Gen des P4-Proteins vollständig vorliegen.

Zur Erstellung der partiellen HindIII-Genbank wurde chromosomale DNA von *E. acidaminophilum* mit HindIII vollständig verdaut, die Fragmente mit einer Größe von ca. 1,3 kb wurden aus einem Agarosegel eluiert und in mit ebenfalls HindIII linearisierten pUC18-Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert. 1000 der resultierenden Klone wurden auf Nylonmembranen ausgestrichen und einer Kolonie-Hybridisierung mit einer mit den Primern *gcvP4f* und *gcvP4r* (ca. 0,5 kb) amplifizierten, mit Digoxigenin markierten Sonde unterzogen. Auf diese Weise konnte kein Klon identifiziert werden, der den gesuchten Genbereich repräsentierte. Durch PCR an dem für die Klonierung der partiellen HindIII-Genbank verwendeten Ligationsansatz mit den Primern *Seq414r* und *UPRN* konnte ein ca. 1,4 kb Fragment amplifiziert werden, welches anschließend in den Vektor pGem®-T Easy kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert wurde. Das durch Plasmidpräparation aus den entstandenen Klonen isolierte Hybrid-Plasmid wurde mit *pUsP4H3* bezeichnet, der gesuchte Bereich von *gcvP4* und die Region *upstream* waren darauf lokalisiert. Durch Sequenzierung konnte der fehlende Bereich des *gcvP4*-Gens (482 bp) identifiziert werden. Das anhand der DNA-Sequenz abgeleitete Molekulargewicht des Proteins betrug 41,1 kDa (372 Aminosäuren).

Durch Screening der bestehenden *Sau3A*-Genbank von *E. acidaminophilum* (POEHLEIN 2003) sollte ein noch größerer Bereich *upstream* von *gcvP4* kloniert werden, der wieder einen *orf* beinhaltete. Die 50, jeweils 96 Klone repräsentierenden Plasmidpools wurden einer Dot-Blot-Hybridisierung und die 96 Klone der Pools, die die stärksten Signale zeigten, einer Kolonie-Hybridisierung mit einer Digoxigenin markierten Sonde (*GcvP4f1* und *GcvP4r*) unterzogen. Trotz deutlicher Signale bei der Dot-Blot-Hybridisierung konnte durch Kolonie-Hybridisierung und anschließender Sequenzierung einiger Klone kein Fragment isoliert werden, auf welchem der gesuchte Bereich lokalisiert war. Im Rahmen dieser Versuche wurde ein Plasmid isoliert, auf dem u. a. der 3'-Bereich eines Gen einer Serin-Hydroxymethyltransferase lokalisiert war, diese wurde jedoch nicht näher charakterisiert. Durch PCR mit den Primern *UPRN* und *Seq48r* an den durch die Dot-Blot-Hybridisierung detektierten Plasmidpools der *Sau3A*-Genbank von *E. acidaminophilum* konnte ein ca. 1,6 kb großes Fragment amplifiziert werden, welches anschließend in den Vektor pGem®-T Easy kloniert und mit *pUsP4SA* bezeichnet wurde. Durch Sequenzierung dieses Plasmides konnte *upstream* von *gcvP4* das 3'-Ende eines offenen Leserahmens identifiziert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz deutliche

Homologien zu NLP/P60-Proteinen (Zellwand assoziierte Reduktase mit SH3-Domäne) diverser Organismen zeigte (s. S. 46, Abb. 8). Durch Vektorette-PCR (RILEY *et al.*, 1990) an mit den Restriktionsendonukleasen DraI, SmaI, SspI, NaeI und NruI geschnittener und mit der *bubble*-DNA ligierter chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* (2.5.1.) mit den Primern VPusP41r und UV und anschließender Klonierung der generierten Fragmente (1,3 kb) in den Vektor pGem[®]-T Easy (pUusP4VP) konnte dieser Genbereich vollständig kloniert werden. *Upstream* wurde das 5'-Ende eines weiteren offenen Leserahmens identifiziert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien zu 3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen (FabG) aus verschiedenen Organismen aufwies.

Abschließend wurde die Genregion, welche durch die Plasmide pUsP4H3, pUsP4SA und pUsP4VP repräsentiert wird, durch Vektorette-PCR (RILEY *et al.*, 1990) mit Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase (s. o.) mit den Primerpaaren VPusP4r1 und UV sowie VPusP4r2 und UV, und PCR an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* mit den Primern SequGcvP4f1 und 48r sowie SequGcvP4f2 und 48r amplifiziert und vollständig sequenziert. Durch diesen Schritt sollten Fehler, die durch die Amplifikation mit *Taq*-DNA-Polymerase auf Grund ihrer Fehlerrate (1 Fehler auf ca. 1000 bp) entstanden sein könnten, ausgeschlossen werden.

Die Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons, *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* , *gcvP1 β* , *thf* und *prpU* sowie das Gen *nlpP* weisen die gleiche Transkriptionsrichtung auf, das Gen *fabG* hingegen ist entgegengesetzt orientiert.

In Abbildung 8 sind die klonierten Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons und der Region *upstream* dargestellt.

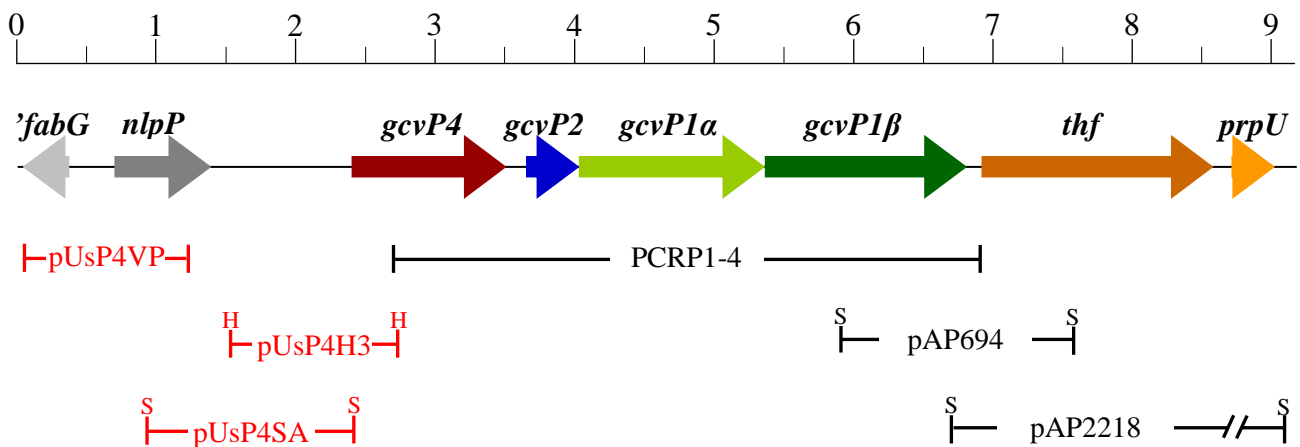


Abb. 8: Schematische Darstellung des Glycin-Decarboxylase-Operons und der angrenzenden Genregionen. Die in der vorgelegten Arbeit klonierten Fragmente sind rot dargestellt, die Transkriptionsrichtung der Gene ist durch die jeweilige Pfeilrichtung wiedergegeben. Die klonierungsrelevanten Schnittstellen HindIII (H) und Sau3A (S) sind verdeutlicht. *fabG*_3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase, *nlpP*_Zellwand assoziierte Reduktase mit SH3-Domäne, *gcvP4*_P4-Protein, *gcvP2*_P2-Protein, *gcvP1 α* _ α -Untereinheit des P1-Proteins, *gcvP1 β* _ β -Untereinheit des P1-Proteins, *thf*_Formyl-THF-Synthetase, *prpU*_PrpU.

Die vollständige Sequenz der in Abbildung 8 dargestellten Genregion ist in Anhang A.II. dargestellt, putative Promotorelemente, Ribosomen-Bindestellen und Terminationsstrukturen wurden gekennzeichnet. Auffallend ist jedoch der 1 kb große intergene Bereich *upstream* von *gcvP4*, der offensichtlich keinen *orf* enthält.

In der vorangegangenen Diplomarbeit wurde durch Southern-Hybridisierungen gezeigt, dass die Gene *gcvP4*, *gcvP1 α* und *gcvP1 β* als singuläres Gen im Genom von *E. acidaminophilum* zu finden sind, dieses Ergebnis konnte im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen für das Gen des P4-Proteins bestätigt und ebenso für das Gen *gcvP2* gezeigt werden. Als Sonde diente jeweils ein mit Digoxigenin markiertes PCR-Produkt, welches mit den Primern *gcvP2f* und *gcvP2r* (*gcvP2*) bzw. *gcvP4f* und *gcvP4r* (*gcvP4*) generiert wurde.

3.2.2. Transkriptionsanalysen des Glycin-Decarboxylase-Operons durch RT-PCR

In früheren Arbeiten wurde durch Northern-Hybridisierungen auch ein gemeinsames Transkript der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons (s. 3.2.1.) zusammen mit den Genen *thf* und *prpU* nachgewiesen (POEHLEIN 2003). Es war daraus ebenso ersichtlich, dass auch ein relativ großer Bereich *upstream* von *gcvP4* zu diesem Transkript gehörte. Durch RT-PCR sollten diese Daten überprüft werden.

DNase-behandelte Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* wurde dazu mit *random* Hexamer-Primer mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche als *template* für die PCR-Reaktionen genutzt wurde. Als Kontroll-Reaktionen zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen durch unvollständigen DNase-Verdau dienten Ansätze mit hitzeinaktivierter Reverser Transkriptase bzw. PCR-Reaktionen direkt an der DNase-behandelten RNA, aber auch Reaktionen ohne *template* (Wasserprobe). Als Positivkontrolle diente die PCR mit den entsprechenden Primern an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum*.

Die RT-PCRs der einzelnen Gene wurden mit den Primerpaaren SeqGcvF1 und Seq884R (*gcvP4*), SeqGcv228F und Seq360r (*gcvP2*), Seq1400F und Seq1819r (*gcvP1 α*), Seq1973F und Seq2140r (*gcvP1 β*), NTERMTHFS52 und THFS350r (*thf*), RTPrpUf und RTPrpUr (*prpU*), RTusP4f11 und RTusP4r2 (*fabG*) sowie RTusP4f13 und VPusP4f1 (*nlpP*) durchgeführt. Die RT-PCRs hinsichtlich der intergenen Bereiche der untersuchten Gene erfolgte mit den Primern Seq918F und SeqGcvR14 (*gcvP4-gcvP2*), Seq337F und Seq1203r (*gcvP2-gcvP1 α*) sowie Seq1400F und SeqGcv20r (*gcvP1 α -gcvP1 β*). Für jede RT-PCR konnte ein Produkt erhalten werden, dessen Größe der Lage der entsprechenden Primerpaare in den Genen und dem Produkt, welches in der jeweiligen PCR-Reaktion an chromosomaler DNA generiert wurde, entsprach. Dies lässt auf eine Transkription aller untersuchten Gene schließen. Durch RT-PCR mit den Primern Seq918f und SeqGcvR20 (s. S. 48, Abb. 9; Spuren 32 und 34; *gcvP4-gcvP1 β*) sowie dem Primerpaar GlyDC219f und RTPrpUr (s. S. 48, Abb. 9; Spuren 41 und 43; *gcvP1 β -prpU*) konnte die Existenz eines gemeinsamen Transkriptes der Gene der Glycin-Decarboxylase mit den Genen der Formyl-THF-Synthetase sowie PrpU bestätigt werden. Die hier beschriebenen RT-PCRs sind in Abbildung 9 dargestellt.

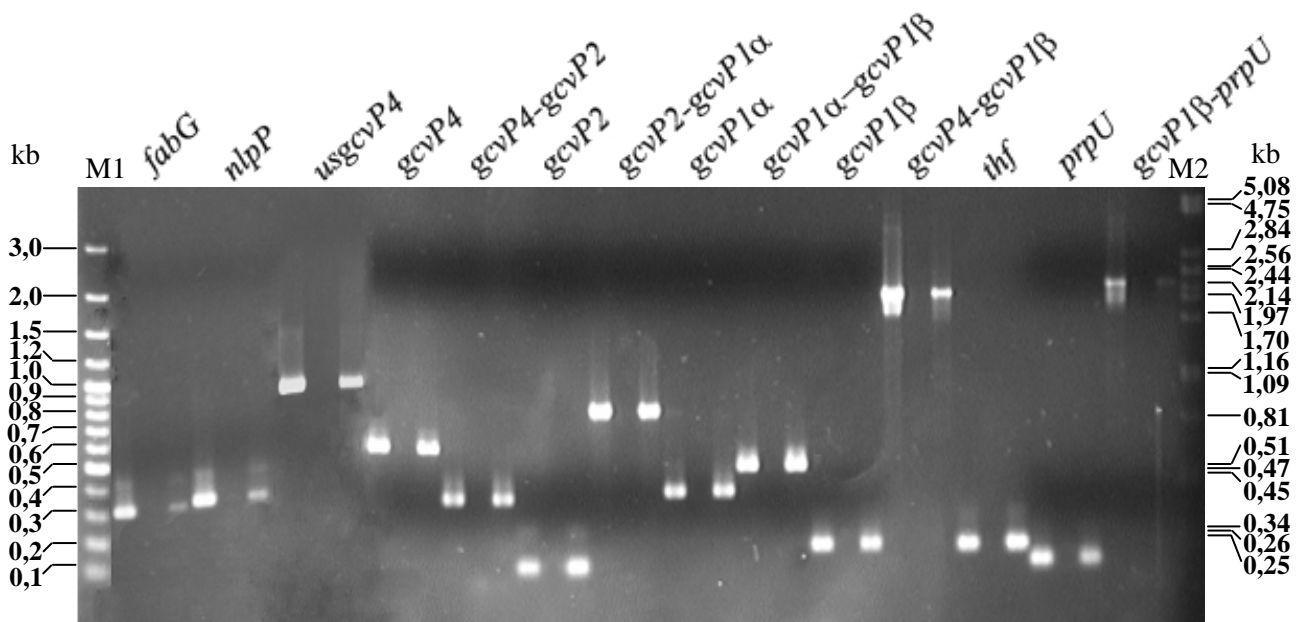


Abb. 9: RT-PCRs zur Transkriptionsanalyse des Glycin-Decarboxylase-Operons von *E. acidaminophilum*.

Die durch die RT-PCRs amplifizierten Genbereiche sind über den jeweiligen Produkten dargestellt, die Auftragung der einzelnen Reaktionen erfolgte immer in der Reihenfolge Pos.-Kontrolle, Neg.-Kontrolle und RT-PCR. M1_GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus, M2_Lambda DNA/PstI Marker. Diese Abbildung wurde aus drei Gelbildern zusammengestellt.

Wie bereits erwähnt, war aus den vorangegangenen Northern-Hybridisierungen zu erkennen, dass bedingt durch die Transkriptgröße der Transkriptionsstartpunkt des Transkriptes dieses Glycin-Decarboxylase-Operons weit vor dem Start-Codon des *gcvP4*-Gens liegen muss. Für diesen Versuchsteil wurde eine reverse Transkription DNase-behandelter RNA aus *E. acidaminophilum* mit dem Primer Seqgcv48r durchgeführt. Durch RT-PCRs mit den Primern RTusP4f1-10 (alle *upstream gcvP4* jeweils im Abstand von 100-150 bp lokalisiert) in Kombination mit dem Primer Seqgcv48r wurde gezeigt, dass der mRNA-Startpunkt ca. 1000 bp *upstream* des Translationsstartpunktes von *gcvP4* gelegen sein muss (Abb. 9; Spur 8 und 10; *usgcvP4*). Auf eine genaue Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte wird detailliert im nächsten Abschnitt eingegangen.

3.2.3. primer-extension Experimente zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte

Zur genauen Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Glycin-Decarboxylase-Operons und zum Nachweis etwaiger Einzeltranskripte der einzelnen Gene wurden *primer-extension*-Experimente mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die jeweiligen Primer waren 100-150 Nukleotide *downstream* der Startcodons der Gene *gcvP2* (Pr-Ext-P2), *gcvP1α* (Pr-Ext-P1a) und *gcvP1β* (Pr-Ext-P1b) bzw. 500 Nukleotide *upstream* von *gcvP4* (Pr-Ext-P4) lokalisiert. Die Reaktionen mit den Primern Pr-Ext-P2 und Pr-Ext-P1a ergab trotz Wiederholung der Versuche keine Signale, was gegen Einzeltranskripte dieser

Gene spricht. Die Analyse mit dem Primer Ext-P1b ergab ein cDNA-Fragment mit einer Größe von 91 Nukleotide, was jedoch nicht als Transkriptionsstartpunkt, sondern als Abbruchprodukt der Reversen Transkriptase zu werten ist, da die so bestimmte Base 48 Nukleotide *downstream* des Startcodons von *gcvP1 β* zu finden war. Die *primer-extension*-Analyse mit dem *gcvP4*-spezifischen Primer ergab ein deutliches Signal bei einer Fragmentgröße von 622 Nukleotide (Abb. 10), was einem Thymin 1125 bp *upstream* des Startcodons von *gcvP4* entsprach.

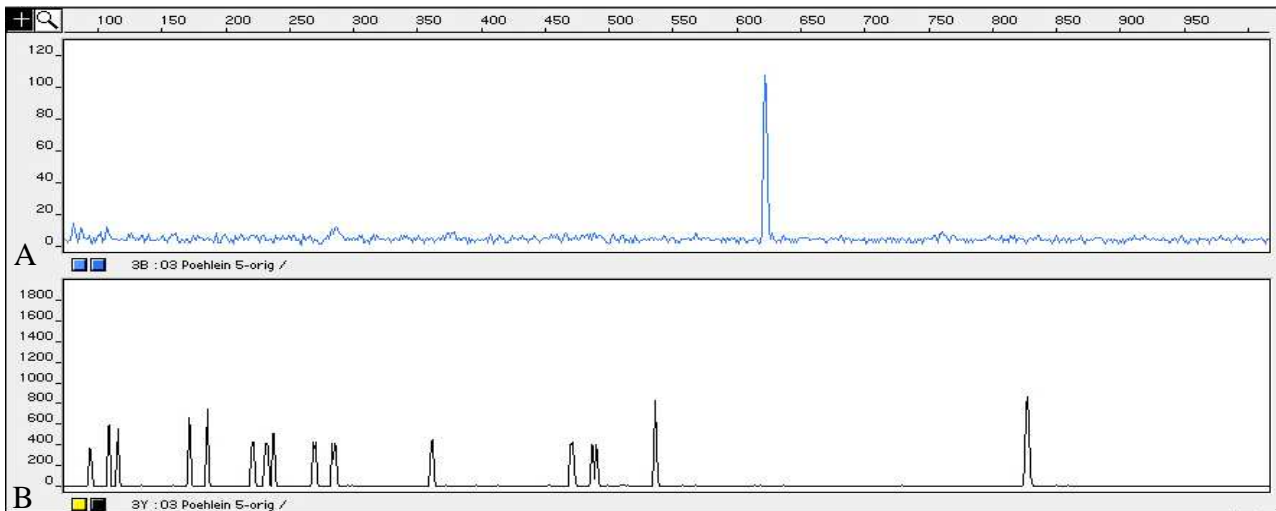


Abb. 10: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Glycin-Decarboxylase-Operons. Dargestellt ist die Fragmentlängenanalyse der Fluoreszenz-markierten cDNA Fragmente (A), welche durch *primer-extension* erhalten wurden, darunter ist der ROX-Standard (B) dargestellt.

Mit einem zweiten Primer, der 960 Nukleotide *upstream* von *gcvP4* (Pr-Ext-P4/2) lokalisiert war, konnte dieser mögliche Transkriptionsstartpunkt des Glycin-Decarboxylase-Operons bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

LECHEL (1999) postulierte 55 Nukleotide *upstream* von *thf* ein Cytosin bzw. 111 Nukleotide *upstream* von *prpU* ein Guanin als mögliche Transkriptionsstartpunkte der ebenfalls beobachteten Einzeltranskripte beider zum Glycin-Decarboxylase-Operon gehörenden Gene.

3.2.4. Putative Transkriptions- und Translationssignale des Glycin-Decarboxylase-Operons

Durch die in Abschnitt 3.2.3. beschriebenen *primer-extension*-Analysen wurde ein möglicher Transkriptionsstartpunkt 1115 Nukleotide *upstream* von *gcvP4* postuliert. 9 Nukleotide in 5'-Richtung des möglichen mRNA-Transkriptes befand sich eine putative -10-Region (5'-ATGAAT-3') 18 Nukleotide in 5'-Richtung eine mögliche -35-Region (TGTAAG). Beide potentiellen Promotor-Elemente zeigen jedoch nur eine geringe Übereinstimmung mit der Konsensussequenz (5'-TTGACA_{-17±1}-TATAAT-3') σ^{70} -abhängiger *E. coli*-Promotoren (HARLEY and REYNOLDS 1987) bzw. σ^A -abhängiger *B. subtilis*-Promotoren (HELMANN

1995). Das von GRAVES and RABINOWITZ (1986) postulierte Promotorelement Gram-positiver Organismen mit der Sequenz 5'-TNTG-3' konnte *upstream* des möglichen Transkriptionsstartpunktes nicht identifiziert werden.

Upstream der Startcodons der Gene *gcvP2*, *gcvP1α* und *gcvP1β* konnten keine potentiellen Promotorelemente identifiziert werden, was die Vermutung bekräftigt, dass diese Gene nicht monocistronisch transkribiert werden. 7 Nukleotide *upstream* des von LECHEL (1999) postulierten Transkriptionsstartpunktes von *thf* bzw. *prpU* konnten potentielle Promotoren mit der Sequenz 5'-TTATAA_{13 bp}-CAAAGC-3' bzw. 5'-CGGAGA_{16 bp}-TAATAT-3' identifiziert werden, die jedoch beide eher geringe Homologien zu oben erwähnten Promotoren aufwiesen.

Upstream des *nlpP*-Gens konnte im Abstand von 91 ein möglicher Promotor mit der Sequenz 5'-TTGACA_{17 bp}-TATAAT-3' lokalisiert werden, der mit der Konsensussequenz σ^{70} -abhängiger *E. coli*-Promotoren 100 % übereinstimmt, ein möglicher Promotor des *fabG*-Gens konnte nicht identifiziert werden. Da beide letztgenannten Gene nicht unmittelbarer Gegenstand der in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Untersuchungen waren, wurde auf eine Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *primer-extension* verzichtet.

Die während der vorangegangenen Diplomarbeiten (LECHEL 1999; POEHLEIN 2003) postulierten rho-abhängigen (3'-Bereich von *gcvP1β*) bzw. rho-unabhängigen Terminationsstrukturen (PLATT 1986) im *downstream*-Bereich der Gene *thf* bzw. *prpU* konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Für die Gene *gcvP4*, *gcvP2* und *gcvP1α* konnten keine putativen Terminationselemente identifiziert werden, was die Vermutung bekräftigt, dass die Gene der Glycin-Decarboxylase polycistronisch transkribiert werden.

Downstream des *nlpP*-Gens konnte ebenfalls ein möglicher rho-unabhängiger Terminator postuliert werden (Abb. 11).

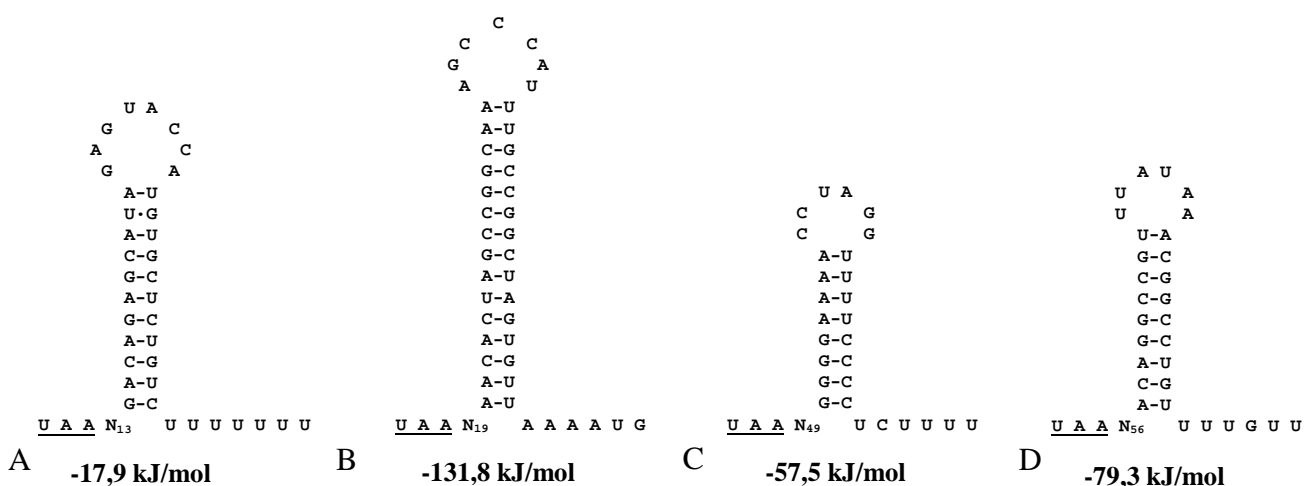


Abb. 11: Putative Terminatorstrukturen *downstream* der Gene *nlpP* (A), *gcvP1β* (B), *thf* (C) und *prpU* (D). Die Stopcodons (UAA) der jeweiligen Gene sind unterstrichen, die Änderung der freien Energie wurde mit dem Programm MFOLD kalkuliert.

Die Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1α*, *gcvP1β*, *thf* und *prpU* weisen genau wie die Gene *fabG* und *nlpP* das Startcodon ATG auf und mit Ausnahme von *gcvP4*, welches das Stopcodon TAG besitzt, enden alle anderen Gene mit einem TAA-Codon. *Upstream* der Gene konnten mögliche Ribosomen-Bindestellen (SHINE and DALGARNO 1974) mit den Sequenzen 5'-AGGTGG_{N5}ATG-3' (*fabG*), 5'-GGAGGU_{N3}ATG-3' (*nlpP*), 5'-AGGAGGA_{N8}ATG-3' (*gcvP4*), 5'-AGGAGGA_{N7}ATG-3' (*gcvP2*), 5'-AGGAGG_{N6}ATG-3' (*gcvP1α*), 5'-GGAGGU_{N11}ATG-3' (*gcvP1β*), 5'-AGGAGGU_{N6}ATG-3' (*thf*) und 5'-AGGAGGG_{N7}ATG-3' (*prpU*) identifiziert werden, da sie signifikante Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz 5'-AGGAGGU_{Nx}ATG-3' aufweisen.

Im intergenen Bereich zwischen *nlpP* und *gcvP4* (Position 1921-2160 der im Anhang A.II. dargestellten Sequenz) wurde ein Sequenzmotiv identifiziert, welches sehr hohe Homologien zu der von MANDAL (2004) für *B. subtilis* postulierten, als Riboswitch fungierenden mRNA-Sekundärstruktur aufwies (Abb. 12). Auf eine mögliche Funktion dieser Struktur soll in einem späteren Kapitel in der Diskussion genauer eingegangen werden.

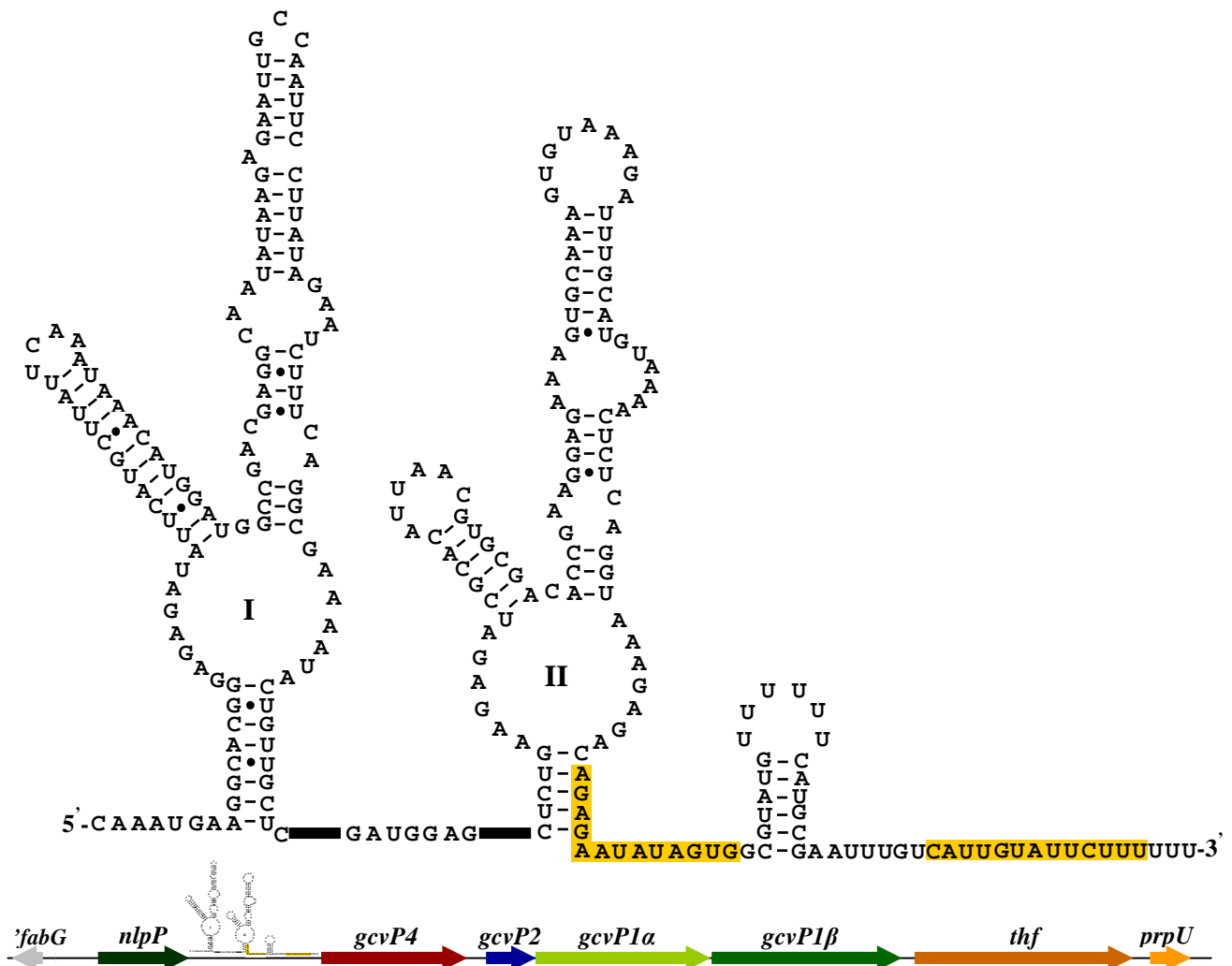


Abb. 12: Sekundärstruktur des Glycin-abhängiger Riboswitches. Sekundärstruktur des Glycin-Riboswitches aus *E. acidaminophilum* und darunter dessen Lage *upstream* des Glycin-Decarboxylase-Operons. Die orange unterlegten Nukleotide repräsentieren die intrinsische Terminatorstruktur, die sich bei Formation des Aptamer II durch Bindung von Glycin nicht ausbilden kann.

3.2.5. Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Wachstumsbedingungen

Die Transkription der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons sollte bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, d.h. während verschiedener Wachstumsphasen von *E. acidaminophilum* auf Standard-Medium (50 mM Glycin; ZINDEL *et al.*, 1988) und der Kultivierung dieses Organismus in diversen Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen untersucht werden. Für dieses Bakterium war bisher kein Gen bekannt, welches als *housekeeping* Gen für die Transkriptionsanalysen genutzt werden kann. Der erste Schritt weiterführender Arbeiten war daher die Suche nach einem geeigneten *housekeeping* Gen. Als mögliche Kandidaten sollten die Gene *selB*, *rpoA*, *rpoB*, *tuf* bzw. das der 16S-rRNA getestet werden. Während die Sequenzen von *selB* (GURSINSKY *et al.*, 2000) und der 16S-rDNA (BAENA *et al.*, 1999) bekannt waren, mussten die anderen Gene hingegen noch identifiziert werden.

Dazu wurden aus Aminosäurealignments der Proteine RPOA, RPOB und EF-TU der Organismen *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium tetani*, *C. difficile* und *Thermoanaerobacter tengcongensis* aus hochkonservierten Bereichen die degenerierten Primer RPOAf und RPOAr (*rpoA*), RPOBf und RPOBr (*rpoB*) sowie EFTUf und EFTUr (*tuf*) abgeleitet. Durch PCR an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* wurden PCR-Produkte der erwarteten Größe generiert und diese nach Klonierung in pGem®-T Easy sequenziert. Die aus den erhaltenen Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen wiesen hohe Homologien zu den Proteinen RPOA, RPOB bzw. EF-TU aus diversen Organismen auf (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Hybridplasmide wurden mit pRPOAEa (*rpoA*), pRPOBEa (*rpoB*) und pEFTUEa (*tuf*) bezeichnet.

3.2.5.1. Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Wachstumsphasen

Für die Transkriptionsanalysen wurde *E. acidaminophilum* jeweils im 10 ml Maßstab in Medium mit 50 mM Glycin als einzige Kohlenstoffquelle kultiviert (2.2.3.), die Ernte der Zellen erfolgte zu zwei Zeitpunkten der lag-Phase (L1 und L2), zu drei Zeitpunkten der exponentiellen Phase (E1, E2 und E3) und während der stationären Phase (St). Nach Isolation der Gesamt-RNA und einer DNase-Behandlung erfolgte die reverse Transkription mit Hexamer-Primern. Die so gewonnenen cDNAs dienten als *template* für PCR-Reaktionen mit den Primern RTSelBEaf und RTSelBEar (*selB*), RT16SEaf und RT16SEar (16SrDNA), RTRPOAEaf und RTRPOAEar (*rpoA*), RTRPOBEaf und RTRPOBEar (*rpoB*) sowie RTEFTUEaf und RTEFTUEar (*tuf*). Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung, d. h. die Präparation der Gesamt-RNA aus jeweils zwei unterschiedlichen Kulturen. Als Negativ-Kontrolle diente jeweils eine PCR-Reaktion mit allen genannten Primerpaaren an den für die Reverse Transkription verwendeten RNAs, als Positiv-Kontrolle diente chromosomale DNA von *E. acidaminophilum* als *template* der einzelnen PCR-Ansätze. Die Gene *rpoA*, *rpoB* und *selB* zeigte keine konstitutive Expression, es war deutlich zu erkennen, dass die Transkription der

jeweiligen Gene während der stationären Phase deutlich vermindert war. Die Expression des Gens der 16S-rRNA hingegen war so stark, dass dieses ebenfalls nicht als *housekeeping* Gen verwendet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Expression des Gens für EF-TU hingegen war während der stationären Phase nur geringfügig vermindert, so dass dieses Gen als Referenz für die folgenden Transkriptionsanalysen am geeignetsten schien.

Die Transkription der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons, *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* , *gcvP1 β* , *thf*, *prpU* sowie der Bereich *upstream* von *gcvP4* sollte ebenfalls während der einzelnen Wachstumsphasen von *E. acidaminophilum* analysiert werden. Die oben beschriebenen cDNAs wurden dazu als *template* für PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren SeqGcvF1 und Seq884R (*gcvP4*), SeqGcv228F und Seq360r (*gcvP2*), Seq1400F und Seq1819r (*gcvP1 α*), Seq1973F und Seq2140r (*gcvP1 β*), NTERMTHFS52 und THFS350r (*thf*), RTPrpUf und RTPrpUr (*prpU*) sowie RTusP4f8 und Seq48r (*upstream gcvP4*) eingesetzt. Die dabei generierten PCR-Produkte sind in Abbildung 13 dargestellt.

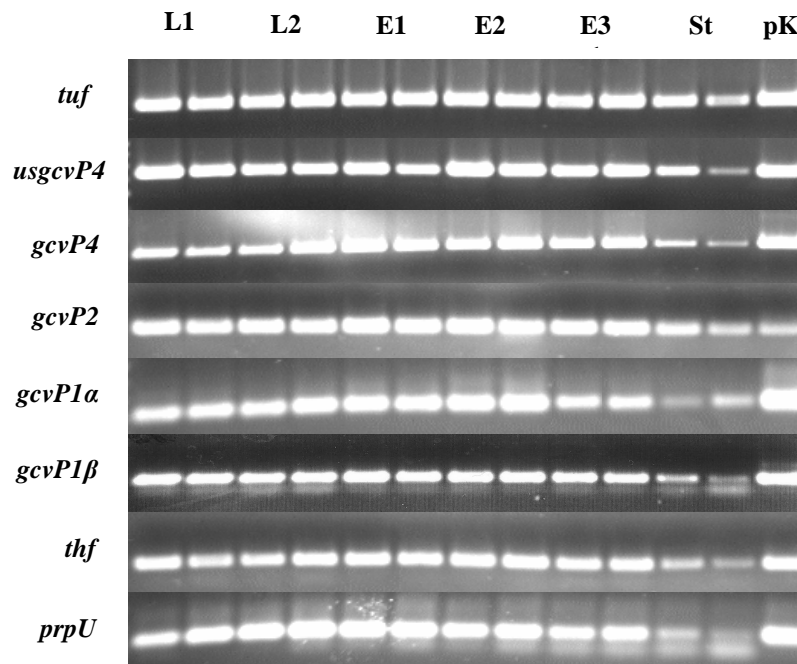


Abb. 13: Transkriptionsanalysen des Glycin-Decarboxylase-Operons zu unterschiedlichen Wachstumsphasen von *E. acidaminophilum* auf Glycin. Dargestellt sind die einzelnen auf den unterschiedlichen Wachstumsphasen basierenden RT-PCR-Produkten. Die zugrunde liegenden Wachstumsphasen sind über den einzelnen Spuren und die untersuchten Gene auf der linken Seite der Abbildung dargestellt: L1_Zellernte zu Beginn der lag-Phase, L2_Zellernte in später lag-Phase, E1, E2 und E3_Zellernte während der exponentiellen Phase, St_Zellernte während der stationären Phase, pK_Positiv-Kontrolle (PCR an chromosomaler DNA).

Alle untersuchten Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons wurden während aller getesteten Wachstumsphasen exprimiert. Die stärkste Transkription war während der exponentiellen Phase zu erkennen, geringfügig schwächer ausgeprägt war diese innerhalb der lag-Phase. Die schwächste Transkription aller Gene war innerhalb der stationären Phase zu erkennen.

3.2.5.2. Transkriptionsanalysen bei der Kultivierung mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Für die Analyse der Transkription der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons bei Wachstum von *E. acidaminophilum* auf unterschiedlichen Medien erfolgte die Kultivierung dieses Organismus mit folgenden Kohlenstoffquellen: Glycin (50 mM); Serin (10 mM), Na-Formiat (40 mM) und Betain (60 mM); Serin (10 mM), Na-Formiat (40 mM) und Sarcosin (60 mM); Alanin (30 mM) und Sarcosin (50 mM); Alanin (30 mM) und Betain (50 mM); Formiat (50 mM) und Glycin (40 mM); Serin (20 mM) und Sarcosin (10 mM) sowie Serin (20 mM) und Betain (10 mM). Die Ernte der einzelnen Kulturen (10 ml) erfolgte während der exponentiellen Phase und nach Isolation der Gesamt-RNA erfolgte eine Behandlung mit DNase. 1 µg dieser DNA-freien RNA wurde durch Hexamer-Primer und Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche als *template* für PCR-Reaktionen mit den Primern SeqGcvF1 und Seq884R (*gcvP4*), SeqGcv228F und Seq360r (*gcvP2*), Seq1400F und Seq1819r (*gcvP1α*), Seq1973F und Seq2140r (*gcvP1β*), NTERMTHFS52 und THFS350r (*thf*), RTPrpUf und RTPrpUr (*prpU*) sowie RTusP4f8 und Seq48r (*upstream gcvP4*) genutzt wurde. Die bei diesen RT-PCRs generierten Produkte sind in Abbildung 14 dargestellt.

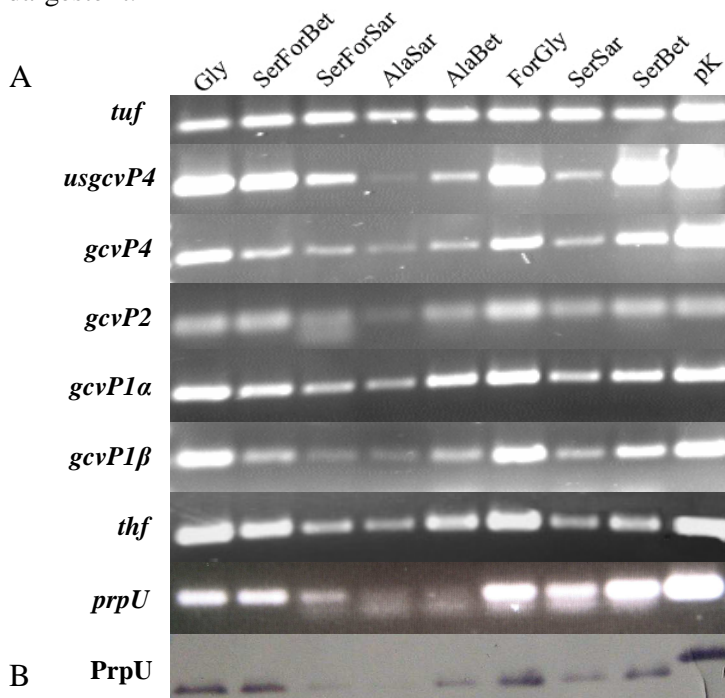


Abb. 14: Transkriptionsanalysen des Glycin-Decarboxylase-Operons bei Kultivierung von *E. acidaminophilum* auf unterschiedlichen Medien (A) und Western-Blot-Nachweis von PrpU (B). Dargestellt sind die einzelnen auf den unterschiedlichen Medien basierenden RT-PCRs. Die zugrunde liegenden Medien sind über den einzelnen Spuren und die untersuchten Gene sind auf der linken Seite der Abbildung dargestellt: Gly_Glycin (50 mM); SerForBet_Serin (10 mM), Na-Formiat (40 mM) und Betain (60 mM); SerForSar_Serin (10 mM), Na-Formiat (40 mM) und Sarcosin (60 mM); AlaSar_Alalanin (30 mM) und Sarcosin (50 mM); AlaBet_Alalanin (30 mM) und Betain (50 mM); ForGly_Formiat (50 mM) und Glycin (40 mM); SerSar_Serin (20 mM) und Sarcosin (10 mM); SerBet_Serin (20 mM) und Betain (10 mM); pK_Positiv-Kontrolle (RT-PCR_PCR an chromosomaler DNA; Western-Blot_Detektion von heterolog synthetisiertem *Strep*-tag® II-fusioniertem PrpU).

Generell konnte eine Transkription der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons bei Kultivierung von *E. acidaminophilum* auf allen acht untersuchten Medien gezeigt werden. Jedoch wurde eine starke Induktion der Transkription nach Wachstum mit Glycin bzw. Formiat und Glycin im Medium festgestellt. Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der Kultivierung auf den Medien mit Serin, sowohl mit und ohne Formiat, und Alanin jeweils eine stärkere Expression aller Gene durch Betain als Elektronen-Akzeptor induziert zu sein scheint im Vergleich zur Anzucht von *E. acidaminophilum* auf Medien mit Sarcosin als Elektronen-Akzeptor.

Um die Ergebnisse der RT-PCRs zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Western-Blot-Analyse mit Anti-PrpU-Antikörper an Gesamtprotein der Zellen, die auf den diversen beschriebenen Medien kultiviert wurden, durchgeführt. Die Auftrennung der Zell-Lysate (aus dem Pellet von 10 ml Kultur) erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, nach dem Transfer der Proteine erfolgte der Nachweis von PrpU mit spezifischem Antikörper. Auch hier war eine stärkere Synthese von PrpU bei Kultivierung auf Glycin-haltigen Medien zu erkennen. Schwächer ausgeprägt war die Proteinsynthese bei Kultivierung auf den anderen getesteten Medien, aber auch hier konnte eine stärkere Synthese von PrpU bei Wachstum auf Betain-haltigen Medien im Vergleich zur Kultivierung auf Sarcosin-haltigen Medien festgestellt werden.

3.3. Interaktionsstudien von PrpU mit Hilfe von bakteriellen *two-hybrid*-Systemen

Um die Funktion von PrpU im Stoffwechsel von *E. acidaminophilum* näher klassifizieren zu können, sollte mit Hilfe von bakteriellen *two-hybrid*-Systemen nach potentiellen Interaktionspartnern gesucht werden. Auf Grund der einfacheren und vor allem schnelleren Handhabung dieser Systeme im Vergleich zum Hefe-*two-hybrid*-System sollten in der vorliegenden Arbeit bakterielle *two-hybrid*-Systeme zur Anwendung kommen. Für die Interaktionsstudien stand das *lexA*-basierende bakterielle *two-hybrid*-System (DMITROVA *et al.*, 1998) und das BacterioMatch[®]Two-Hybrid-System (Stratagene, Amsterdam) zur Verfügung. Mit beiden Systemen sollten mögliche Interaktionen von PrpU mit der Aminomethyl-Transferase (GcvP4), dem *hydrogen-carrier*-Protein (GcvP2), der eigentlichen Decarboxylase, bestehend aus α - und β -Untereinheit (GcvP1 α und GcvP1 β) des P1-Proteins der Glycin-Decarboxylase, mit den beiden Proteinen Thioredoxin-Reduktase (TrxB) und Thioredoxin (TrxA) des Thioredoxin-Systems, mit dem Selenoprotein A (GrdA) des Glycin-Reduktase-Systems und mit sich selbst untersucht und die Ergebnisse beider Systeme miteinander verglichen werden.

3.3.1. Einführung in das BacterioMatch®Two-Hybrid-System

Das BacterioMatch®Two-Hybrid-System stellt eine schnelle und effiziente Möglichkeit dar, Heterodimerisierung von Proteinen *in vivo* zu detektieren. Das so genannte *bait*-Protein, also das Protein von Interesse, wird mit Hilfe des Plasmides pBT über eine Translationsfusion mit dem λ CI-Repressor-Protein verknüpft. Dieses besitzt eine amino-terminale DNA-Bindedomäne und carboxy-terminale Dimerisierungsdomäne (Abb. 15). Die Transkription steht hierbei unter Kontrolle des *lac-UV5*-Promotors. Die *target*-Proteine (die möglichen Interaktionspartner) werden mit Hilfe des Plasmides pTRG ebenfalls über eine Translationsfusion amino-terminal mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase verknüpft, wobei hier die Transkriptionskontrolle dem Tandem-Promotor *lpp/lac-UV5* zukommt (Abb. 15). Beide Promotoren sind IPTG-induzierbar, der Expressionsspiegel, gegeben durch den *lpp/lac-UV5*-Promotors, liegt hierbei aber über dem des *lac-UV5*-Promotors.

Der Reporterstamm trägt F'-episomal die beiden Reportergene *amp^r* und *lacZ* und *upstream* davon einen aktivierbaren *lac*-Promotor und einen einzelnen λ Operator, welcher die normalerweise mit diesem Promotor assoziierte CRP-Bindestelle ersetzt. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten, nicht durch IPTG induzierbaren *lac*-Promotor. Die Shine-Dalgarno-Sequenz (SHINE and DALGARNO 1974) ist ebenfalls in dieser Region, *upstream* der Reportergene zu finden.

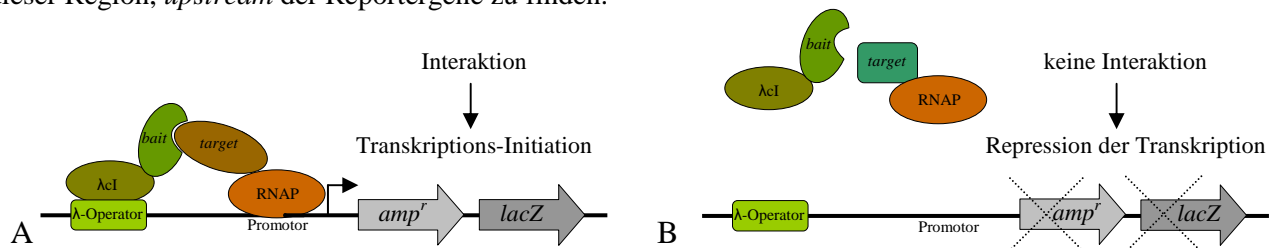


Abb. 15: Darstellung der Funktionsweise des BacterioMatch®Two-Hybrid-Systems. Dargestellt ist die Promotor-Operator-Region des Reporterstammes und die *downstream* lokalisierten Reportergene *amp^r* und *lacZ*. A: Interaktion des *bait*- und *target*-Proteins und somit Positionierung des λ CI-Repressor-Protein und der α -Untereinheit der RNA-Polymerase im Operator-Promotor-Bereich der Reporter-Gene und damit verbundene Transkriptions-Initiation dieser. B: keine Interaktion zwischen *bait*- und *target*-Protein und somit keine Stabilisierung der Bindung der RNA-Polymerase am Operator-Bereich der Reporter-Gene, was in Repression der Transkription resultiert.

Durch Interaktion des *bait*- und *target*-Proteins kommt es zur Bindung des mit dem *bait*-Protein fusionierten λ CI-Repressor-Proteins an den λ -Operator und der damit verbundenen Stabilisierung der Bindung der mit dem *target*-Protein fusionierten RNA-Polymerase am Promotor-Bereich der Reporter-Gene *amp^r* und *lacZ* und der damit einhergehenden Transkriptions-Initiation (Abb. 15) (DOVE and HOCHSCHILD 1998; DOVE *et al.*, 1997). Im Fall der fehlenden Interaktion der *bait*- und *target*-Proteine kommt es zu keiner bzw. nur zu einer sehr schwachen Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor und somit zu einer Repression der Transkription beider Reportergene.

Protein-Protein-Interaktionen können bei diesem System zum einen durch die initiierte Ampicillin-Resistenz, aber zum anderen auch über das *lacZ*-System und der damit verbundenen Möglichkeit der Blau-Weiß-Selektion bzw. der Messung der β -Galactosidase-Aktivität detektiert, aber auch quantifiziert werden.

Die Dimerisierungsdomäne des aus Hefe stammenden Translations-Aktivators Gal4 und eine durch Mutation des Gal11-Proteins konstruierte Domäne dienen bei diesem *two-hybrid*-System als Positivkontrolle für die Funktionsfähigkeit des Systems.

3.3.2. Einführung in das bakterielle *lexA*-basierende *two-hybrid*-System (DMITROVA *et al.*, 1998)

Mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems obliegt die Möglichkeit, sowohl die Heterodimer-Bildung zweier verschiedener Proteine, als auch die Homodimer-Bildung eines einzelnen Proteins zu identifizieren.

Ein zu untersuchendes Protein wird über eine Translationsfusion mit der auf dem Plasmid pMS604 codierten DNA-Bindedomäne des Wild-Typ LexA-Repressors verknüpft, das zweite Protein wird ebenfalls translational mit einer in ihrer Spezifität veränderten DNA-Bindedomäne des LexA-Repressors fusioniert, welche von dem Plasmid pDP804 codiert wird (Abb. 16). Die Transkriptionskontrolle erfolgt in beiden Fällen durch den IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotor. Die Kontrolle der Transkription des chromosomal lokalisierten *lacZ*, dem Reporter-Gen dieses Systems, erfolgt im Reporterstamm SU202 über einen *lexA*-Hybrid-Operator, bestehend aus einer mutierten (CCGT) und einer Wild-Typ-Hälfte (CTCG). Die Transkription des Reporter-Gens im Stamm SU101 wird durch einen *lexA*-Hybrid-Operator bestehend aus zwei Wild-Typ-Hälften, (CTCG) reguliert (DMITROVA *et al.*, 1998).

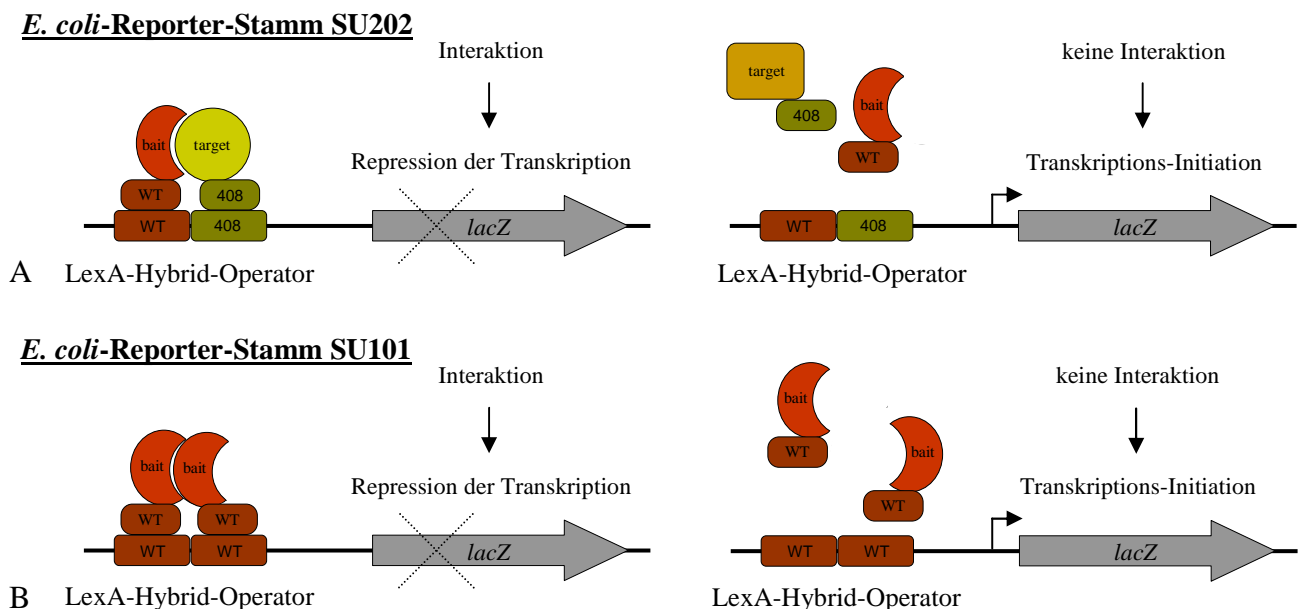


Abb. 16: Darstellung der Funktionsweise des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems in den Reporterstämmen *E. coli*-SU202 (A) und *E. coli*-SU101 (B). Dargestellt ist der *upstream* des Reporter-Gens (*lacZ*) gelegenen Operatorbereich, bestehend aus einer Wildtyp-*lexA*-Operator-Hälfte und einer mutierten *lexA*-Operatorhälfte im Reporterstamm *E. coli*-SU202 und aus zwei Wildtyp-*lexA*-Operator-Hälften im Reporterstamm *E. coli*-SU101. A: Durch Interaktion von *bait* und *target* kommt es zur Bindung beider LexA-Repressor-Domänen an den *lexA*-Hybrid-Operator des Reporterstammes *E. coli*-SU202 und somit zur Repression der Transkription des *lacZ*-Gens. B: Durch Homo-Dimerbildung kommt es zur Bindung zweier Wildtyp-*lexA*-Repressor-Domänen an den *lexA*-Hybridoperator des Reporterstammes *E. coli*-SU101 und somit zur Repression der Transkription des Reporter-Gens.

Durch Interaktion des an die Wildtyp-LexA-Repressor-Hälfte fusionierten *bait*-Proteins mit dem an die mutierte Hälfte des LexA-Repressors fusionierten *target* Proteins werden beide Repressor-Hälften so zusammengeführt, dass sie an den LexA-Hybrid-Operator binden können. Im Fall des Reporter-Stammes *E. coli*-SU202 besteht dieser aus einer Wildtyp-*lexA*-Operator-Hälfte und einer mutierten Operator-Hälfte, was eine spezifische Bindung beider Repressor-Domänen an die jeweilige Operator-Hälfte ermöglicht (Abb. 16). Dies führt zur Repression des konstitutiv exprimierten *lacZ*-Gens. Interagieren die Proteine von Interesse nicht, kommt es nicht zur Bindung beider Repressor-Hälften an den Hybrid-Operator und somit auch nicht zur Repression der Transkription des Reporter-Gens (Abb. 16).

Der Reporter-Stamm *E. coli*-SU101 ist für die Erkennung von Homodimer-Bildung von Proteinen prädestiniert. Der *upstream* des *lacZ*-Gens gelegene *lexA*-Hybrid-Operator besteht aus zwei Wildtyp-Operator-Hälften, was die Bindung von zwei Wildtyp-LexA-Repressor-Domänen ermöglicht. Durch Oligomerisierung eines mit dieser Repressor-Domäne fusionierten Proteins kommt es zur Bindung der Repressors an den Hybrid-Operator und zur Repression der Transkription des Reporter-Gens.

Auch bei diesem *two-hybrid*-System lassen sich die Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des *lacZ*-Systems durch Blau-Weiß-Selektion detektieren und durch Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität quantifizieren.

3.3.3. Klonierung in die Plasmide pBT und pTRG des BacterioMatch® Two-Hybrid-Systems

Um Interaktionsstudien von PrpU mit den Proteinen der Glycin-Decarboxylase (GcvP4, GcvP2, GcvP1 α und GcvP1 β), mit dem Thioredoxin-System (Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin) und GrdA der Glycin-Reduktase und den Komponenten untereinander durchführen zu können, mussten die entsprechenden Gene der einzelnen Proteine sowohl in den Vektor pBT (*bait*) als auch in den Vektor pTRG (*target*) kloniert werden. Die Proteine werden dann durch IPTG-Induktion als Translationsfusionen mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (pTRG) bzw. mit dem λ -cI-Repressor synthetisiert (pBT). Im Fall der Selenoproteine PrpU und GrdA sollten die Cystein-Varianten für die Interaktionsstudien herangezogen werden. Für eine heterologe Synthese von Selenoproteinen aus *E. acidaminophilum* in *E. coli* ist das Plasmid pASBC4 unabdingbar (GURSINSKY 2002; GURSINSKY *et al.*, 2008), ohne dass es zum vorzeitigen Translationsabbruch bzw. dem Einbau von Cystein oder Tryptophan kommt. Da es sich sowohl beim Vektor pTRG als auch bei pASBC4 um ein pACYC-Derivat handelt und beide eine Tetracyclin-Resistenz tragen, kommt es auf Grund dessen zu einer Inkompatibilität beider Plasmide.

Das P1-Protein der Glycin-Decarboxylase von *E. acidaminophilum* ist wie bei den meisten Prokaryoten als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vorzufinden (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989). Beide Untereinheiten sollten sowohl einzeln als auch bei Co-Synthese beider Untereinheiten auf potentielle Interaktionspartner untersucht werden.

Die zu klonierenden Gene wurden durch Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5) generiert. Die Primerpaarungen, die sowohl für die Klonierung in das Plasmid pBT als auch in das Plasmid pTRG zur Anwendung kamen, sind in Tabelle 6 aufgelistet. Für die Synthese der Gene der Cysteinvarianten der Selenoproteine dienten die Plasmide pPMI3 im Fall von *prpU* (GRÖBE 2001) und pMUA36 im Fall von *grdA* (pers. Mitteilung J. JÄGER), in allen anderen Fällen chromosomale DNA von *E. acidaminophilum* als *template*. Nach Restriktion der erhaltenen PCR-Produkte mit den Restriktionsendonukleasen NotI und XhoI, bzw. im Fall von *gcvP1α* mit NotI und BamH1 bzw. NotI und SpeI und im Fall der gemeinsamen Klonierung von *gcvP1α* und *gcvP1β* mit NotI und SalI erfolgte die Ligation in mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektoren pBT und pTRG. Nach Transformation der insgesamt 18 Ligationsansätze in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ wurden aus jeweils drei der resultierenden Klone die Plasmide isoliert und die Inserts durch Sequenzierung überprüft. Die Bezeichnungen der durch Klonierung der einzelnen Gene in die Vektoren pBT und pTRG konstruierten Hybrid-Plasmide sind ebenfalls in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primerpaarungen und Bezeichnung der resultierenden Plasmide

	Primerpaare	Plasmidbezeichnung	
		pBT	pTRG
GcvP1α	EaPTrxNotIf und EaP1aBamH1r ¹	pBTP1α	pTRGP1α
	EaPTrxNotIf und EaP1aSpeIr ²		
GcvP1β	EaP1βNotIf und EaP1βXhoIr	pBTP1β	pTRGP1β
GcvP2	EaP2NotIf und EaP2XhoIr	pBTP2	pTRGP2
GcvP4	EaP4NotIf und EaP4XhoIr	pBTP4	pTRGP4
PrpU	EaPrpUNotIf und EaPrpUXhoIr	pBTPrpU	pTRGPrpU
GrdA	EaGrdANotIf und EaGrdAXhoIr	pBTGrdA	pTRGGrdA
TrxB	EaTRNotIf und EaTRXhoIr	pBTTR	pTRGTR
TrxA	EaPTrxNotIf und EaTrxXhoIr	pBTTrx	pTRGTrx
GcvP1αβ	EaP1aNotIf und EaP1βSalIr	pBTP1αβ	pTRGP1αβ

¹ für die Klonierung in das Plasmid pBT

² für die Klonierung in das Plasmid pTRG

Anschließend erfolgte eine Co-Transformation der einzelnen rekombinanten pBT-Derivate mit dem pTRG-Leervektor und umgekehrt ein Co-Transformation der konstruierten pTRG-Derivate mit dem pBT-Leervektor in den Reporterstamm. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf LB-CTCK-Medium (LB-Selektiv-Agar mit Chloramphenicol, Tetracyclin, Carbenicillin und Kanamycin) ausgestrichen und kultiviert. Es sollte getestet werden, ob die Proteine auch allein in der Lage sind, die Transkription der Reportergene (*amp^r* und *lacZ*) zu initiieren, was durch eine damit verbundenen Ampicillin-Resistenz zu zeigen ist. Bei nahezu allen Transformationsansätzen kam es zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Koloniebildung. Auf Grund dieser hohen Hintergrundaktivität sind die zu untersuchenden Proteine nicht für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem BacterioMatch® Two-Hybrid-System geeignet

(Stratagene, Amsterdam). Da die Daten, welche durch dieses System zu erhalten wären, nicht aussagekräftig und vor allem nicht zu vergleichen wären, wurde während der vorliegenden Arbeit nicht mit diesem System weitergearbeitet, sondern für die Interaktionsstudien nur mit dem *lexA*-basierenden *two-hybrid*-System (DMITROVA *et al.*, 1998) fortgefahren.

3.3.4. Klonierung in die Plasmide pMS604 und pDP804 des *lexA*-basierende *two-hybrid*-Systems

Um eine mögliche Beteiligung des Selenoproteins PrpU am Aminosäure-Metabolismus von *E. acidaminophilum* zu zeigen, sollten mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-System mit ausgewählten Proteinen des Glycin-Metabolismus mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Die Gene der Glycin-Decarboxylase (*gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* und *gcvP1 β*), des Thioredoxin-Systems (*trxA* und *trxB*), von GrdA der Glycin-Reduktase (*grdA*) und von PrpU (*prpU*) mussten dafür in die Vektoren pMS604 und pDP804 kloniert werden. Genau wie bei dem BacterioMatch®Two-Hybrid-System sollten anstelle der Wildtyp-Selenoproteine PrpU und GrdA deren Cysteinvarianten untersucht werden. Auch die beiden Untereinheiten des P1-Proteins sollten sowohl getrennt, als auch gemeinsam synthetisiert, betrachtet werden.

Für die Klonierung der einzelnen Gene in das Plasmid pMS604 wurden die einzelnen Gene durch PCR mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5) unter Verwendung der in Tabelle 7 aufgeführten Primerpaare.

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primerpaarungen

Gen	pMS604		pDP804	
	pMS604	Plasmid	pDP804	Plasmid
<i>gcvP1α</i>	EaP1 α AgeIf und EaP1 α Sallr	pMSP1 α	EaP1 α BssHIIf und EaP1 α BgIIr	pDPP1 α
<i>gcvP1β</i>	EaP1 β AgeIf und EaP1 β XhoIr	pMSP1 β	EaP1 β BssHIIf und EaP1 β BgIIr	pDPP1 β
<i>gcvP2</i>	EaP2AgeIf und EaP2XhoIr	pMSP2	EaP2BssHIIf und EaP2BgIIr	pDPP2
<i>gcvP4</i>	EaP4AgeIf und EaP4XhoIr	pMSP4	EaP4BssHIIf und EaP4BamH1r	pDPP4
<i>prpU</i>	EaPrpUAgeIf und EaPrpUXhoIr	pMSPrpU	EaPrpUBssHIIf und EaPrpUBgIIr	pDPPPrpU
<i>grdA</i>	EaGrdAAgeIf und EaGrdAXhoIr	pMSGrdA	EaGrdABssHIIf und EaGrdABgIIr	pDPGrdA
<i>trxB</i>	EaTRAgeIf und EaTRXhoIr	pMSTR	EaTRBssHIIf und EaTRBgIIr	pDPTR
<i>trxA</i>	EaTrxAgeIf und EaTrxXhoIr	pMSTrx	EaTrxBssHIIf und EaTrxBgIIr	pDPTrx
<i>gcvP1$\alpha\beta$</i>	EaP1 α AgeIf und EaP1 β Sallr	pMSP1 $\alpha\beta$	EaP1 α BssHIIf und EaP1 β BgIIr	pDPP1 $\alpha\beta$

Für die Synthese der Gene *prpU* und *grdA* dienten auch hier die Plasmide pPMI3 (GRÖBE 2001) und pMUA36 (pers. Mitteilung J. JÄGER) als *template*, für die Amplifikation der anderen Gene chromosomale DNA aus *E. acidaminophilum*. Nach Restriktion der erhaltenen PCR-Produkte mit den

Restriktionsendonukleasen AgeI und XhoI bzw. im Fall von *gcvP1 α* und *gcvP1 $\alpha\beta$* mit AgeI und SalI erfolgte die Ligation in AgeI-XhoI-linearisierten pMS604.

Für die Klonierung in das Plasmid pDP804 wurde dieses mit BssHII und BglII linearisiert und die zu klonierenden PCR-Produkte ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen bzw. mit BssHII und BamHI behandelt und in das linearisierte Plasmid ligiert. Es erfolgte die Transformation der 18 Ligationsansätze in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ und die Isolation der rekombinanten Plasmide aus jeweils drei der entstandenen Klone. Die Inserts dieser Hybrid-Plasmide wurden durch Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern (s. S. 163, Anhang A.I.) überprüft. Die Bezeichnung der jeweiligen Plasmide ist in Tabelle 7 aufgeführt.

3.3.5 Transformation der konstruierten Hybrid-Plasmide in die Reporterstämme

Mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems (DMITROVA *et al.*, 1998) kann sowohl die Fähigkeit eines Proteins Homodimere zu bilden (im Stamm *E. coli* SU101) als auch die Interaktion zweier verschiedener Proteine (im Stamm *E. coli* SU202) untersucht werden.

Um zunächst alle zu untersuchenden Proteine auf Selbstinteraktion zu testen, wurden die neun konstruierten pMS604-Derivate pMSP1 α , pMSP1 β , pMSP2, pMSP4, pMSPrpU, pMSGrdA, pMSTR, pMSTRx und pMSP1 $\alpha\beta$ in den Reporterstamm *E. coli* SU101 transformiert und jeweils drei der resultierenden Klone durch Kolonie-PCR mit den vektorspezifischen Primern pMS604f und pMS604r überprüft. Hierdurch sollte gezeigt werden, dass jeweils die korrekten Plasmide transformiert wurden.

Als Negativkontrolle zum Ausschluss gewisser Hintergrundaktivitäten wurden auch die neun erhaltenen pDP-Derivate pDPP1 α , pDPP1 β , pDPP2, pDPP4, pDPPrpU, pDPGrdA, pDPTR, pDPTRx und pDPP1 $\alpha\beta$ in den Reporterstamm *E. coli* SU101 transformiert und ebenfalls jeweils drei erhaltene Klone mittels Kolonie-PCR mit den vektorspezifischen Primern pDP804f und pDP804r überprüft.

Für die Protein-Protein-Interaktionsstudien, speziell von PrpU mit den Komponenten der Glycin-Decarboxylase (GcvP1 α , GcvP1 β , GcvP2 und GcvP4), mit dem Thioredoxin-System (Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin) und Protein A der Glycin-Reduktase wurden jeweils alle neun konstruierten pMS604-Derivate mit allen erhaltenen pDP804-Derivaten gemeinsam in den Reporterstamm *E. coli* SU202 transformiert, sodass 81 verschiedene Kombinationen entstanden. Jeweils drei der erhaltenen Klone wurden durch Kolonie-PCR mit den vektorspezifischen Primern pMS604f und pMS604r, aber auch mit den Primern pDP804f und pDP804r überprüft. Es wurde geprüft, ob jeweils die richtigen Plasmide miteinander kombiniert wurden, aber vor allem, ob auch zwei heterologe Plasmide in den jeweiligen Stämmen zu finden waren. Als Negativkontrollen wurden jeweils alle neun pMS604-Derivate und alle neun pDP804-Derivate allein in den Reporterstamm *E. coli*-SU202 transformiert und ebenfalls durch Kolonie-PCR mit den jeweils vektorspezifischen Primern überprüft.

3.3.6. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivitäten

Im folgenden Abschnitt soll zunächst detailliert auf die Analyse der Protein-Protein-Interaktionen von PrpU mit den untersuchten Proteinen eingegangen werden.

Die Kultivierung der unter 3.3.5. beschriebenen Stämme erfolgte im 6 ml Maßstab (in 20 ml Zentrifugenröhrchen) in M9-Minimalmedium (2.2.2.) mit Ampicillin (für die pDP804-Derivate), Tetracyclin (für die pMS604-Derivate) und IPTG zur Transkriptionsinitiation der Genfusionen durch Induktion des *lacUV5*-Promotors. Die Zellen wurden schüttelnd bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,8 inkubiert. Von jedem Stamm (3.3.5) wurden drei unterschiedliche Klone jeweils an drei unterschiedlichen Tagen kultiviert, die Ernte erfolgte zu je dreimal 1 ml durch Zentrifugation (für eine Dreifachbestimmung). Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte, wie unter 2.11.5 beschrieben, die ermittelten Werte sind in Tabelle 8. zusammengefasst.

Tab. 8. β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme

Plasmid-Kombinationen	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (relativ) ¹					
pMSPrpU + ²	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	244	(\pm 14)	184	(\pm 9)	150	(\pm 15)
pDPP1 β	434	(\pm 13)	350	(\pm 15)	350	(\pm 16)
pDPP2	105	(\pm 9)	83	(\pm 21)	75	(\pm 14)
pDPP4	322	(\pm 29)	290	(\pm 28)	257	(\pm 7)
pDPPPrpU	309	(\pm 29)	202	(\pm 13)	128	(\pm 12)
pDPGrdA	60	(\pm 5)	99	(\pm 24)	37	(\pm 21)
pDPTR	322	(\pm 22)	324	(\pm 41)	311	(\pm 44)
pDPTrx	109	(\pm 38)	111	(\pm 43)	143	(\pm 14)
pDPP1 $\alpha\beta$	320	(\pm 43)	288	(\pm 38)	370	(\pm 27)
pDPPPrpU + ³						
pMSP1 α	268	(\pm 16)	246	(\pm 19)	241	(\pm 18)
pMSP1 β	413	(\pm 34)	373	(\pm 45)	325	(\pm 55)
pMSP2	81	(\pm 39)	43	(\pm 10)	85	(\pm 12)
pMSP4	294	(\pm 71)	258	(\pm 23)	212	(\pm 1)
pMSPrpU	309	(\pm 29)	202	(\pm 13)	128	(\pm 12)
pMSGrdA	147	(\pm 31)	245	(\pm 18)	257	(\pm 21)
pMSTR	294	(\pm 20)	335	(\pm 18)	286	(\pm 53)
pMSTRx	173	(\pm 33)	80	(\pm 17)	124	(\pm 4)
pMSP1 $\alpha\beta$	296	(\pm 30)	357	(\pm 2)	343	(\pm 18)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSPrpU und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

³ diese Stämme enthielten jeweils das Plasmid pDPPPrpU und eins der neun aufgeführten pMS604-Derivate

Um die ermittelten Werte für die Interaktionsstudien von PrpU auswerten zu können, wurden die für die Positivkontrolle (Interaktion des Jun- und Fos-Zippers) ermittelten relative β -Galactosidase-Aktivitäten von ca. 1,88 (Anhang A.IX.12., Durchschnitt aller Werte) und die für den Reporterstammes *E. coli*-SU202 ohne Hybridplasmid ermittelte relative β -Galactosidase-Aktivität von ca. 511 (Anhang A.IX.12., Durchschnitt

aller Werte) zur Auswertung herangezogen. Als Negativkontrollen dienten die *E. coli*-SU202-Reporterstämme, die jeweils nur ein pMS604- bzw. ein pDP804-Derivat trugen. Durch diese Versuche sollten mögliche Hintergrundaktivitäten ausgeschlossen werden. Die Daten dieser Messungen sind im Anhang A.IX.9-11. zu finden, genau wie die grafische Darstellung der Messergebnisse. Die relativen β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten Stämme sind zur besseren Übersicht auch in Abbildung 17 grafisch dargestellt.

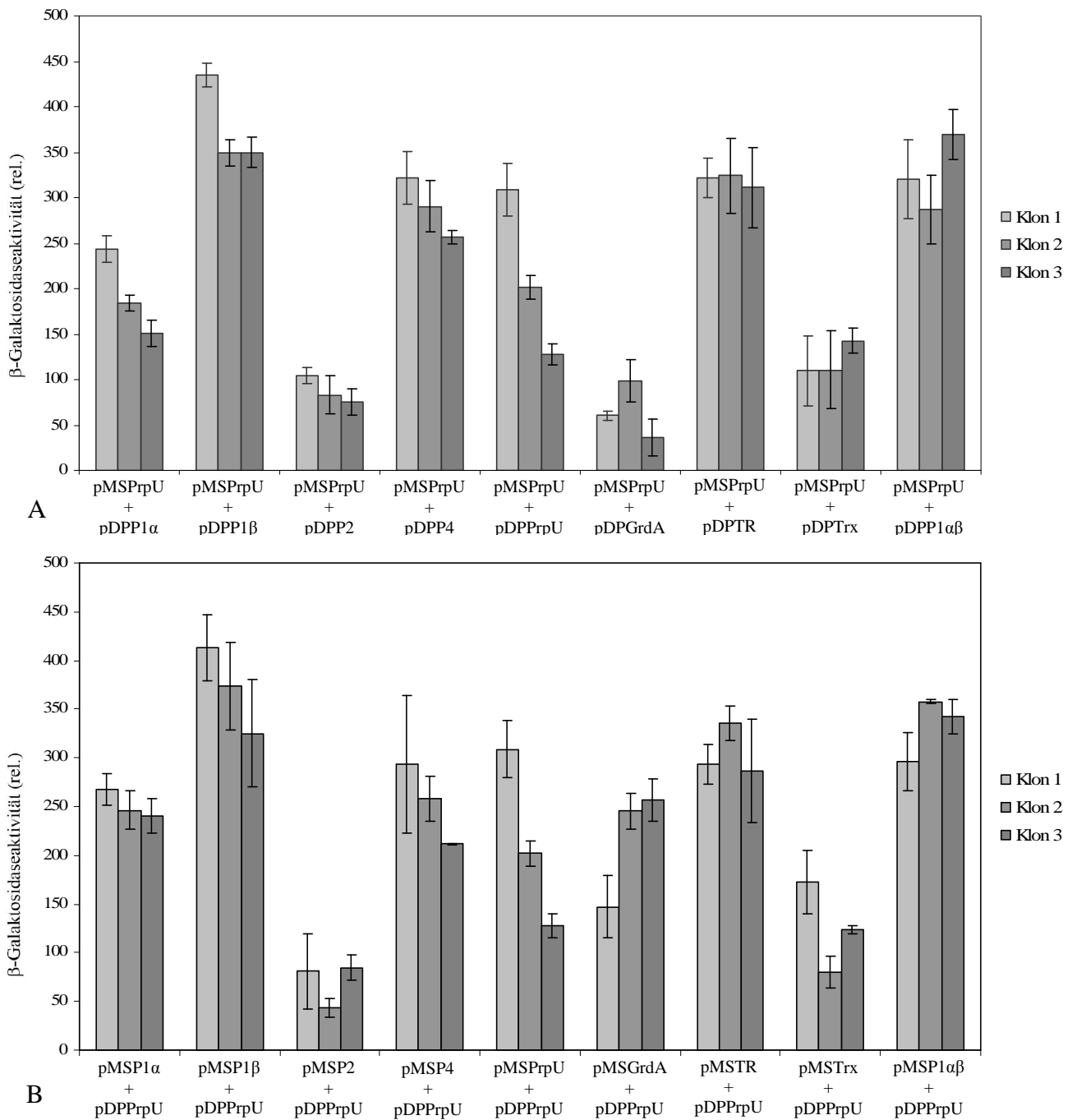


Abb. 17: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die relativen β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämmen (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSPrpU kombiniert mit allen pDP804-Derivaten (A) bzw. das Plasmid pDPPrpU kombiniert mit allen pMS604-Derivaten tragen (B). Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

Die deutlichste Verringerung der β -Galactosidase-Produktion war bei gemeinsamer Synthese von PrpU (pMSPrpU) mit GrdA (pDPGrdA) zu messen, wobei hier die Werte der drei Klone zwischen 37, 60 bzw. 99 (relative β -Galactosidase-Aktivität) schwankten. Diese deutliche Absenkung der β -Galactosidase-Aktivität war bei der Überproduktion dieser beiden Proteine durch das jeweils andere Plasmid (pDPPPrpU und pMSGrdA) nicht zu finden, hier wurden relative β -Galactosidase-Aktivität von 147, 245 bzw. 257 bestimmt. Eine Erklärung hierfür könnte ein durch unterschiedliche Kopienzahl der Plasmide pDPPPrpU (pACYC-Derivat) und pMSGrdA (pUC-Derivat) bedingter Unterschied in der Menge der heterolog synthetisierten Proteine sein (DMITROVA *et al.*, 1998; PORTE *et al.*, 1995).

Ebenfalls eine deutlich verminderte β -Galactosidase-Produktion war bei gemeinsamer Synthese der Proteine PrpU und GcvP2 zu erkennen. Die ermittelten Werte der Expression von *prpU* durch das Plasmid pMSPrpU und von *gcvP2* durch das Plasmid pDPP2 von 105, 83 bzw. 75 sind mit denen der Expression beider Gene durch das jeweils andere Plasmid (pDPPPrpU und pMSP2) vergleichbar. Bei dieser Expressions-Variante wurden relative β -Galactosidase-Aktivitäten von 81, 43 bzw. 85 (s. S. 62, Tab. 8) ermittelt. Eine etwas schwächer ausgeprägte Repression des *lacZ*-Gens konnte bei gemeinsamer Synthese von PrpU und TrxA festgestellt werden. Bei Kombination dieser beiden Proteine wurden relative β -Galactosidase-Aktivitäten von 109, 111 bzw. 143 (pMSPrpU in Kombination mit pDPTrx) und Aktivitäten von 173, 80 bzw. 124 (pDPPPrpU kombiniert mit pMSTrx) gemessen.

Bei gemeinsamer Synthese beider PrpU-Derivate durch die Plasmide pMSPrpU und pDPPPrpU wurden für die drei getesteten Klone sehr inhomogene Werte ermittelt. Die relativen β -Galactosidase-Aktivitäten schwankten zwischen 128, 202 bzw. 309. Während man bei einer relativen β -Galactosidase-Aktivität von 128 noch von einer schwachen Interaktion, sprich Homodimer-Bildung, ausgehen kann, zeigen die anderen beiden getesteten Klone keine Interaktion von PrpU mit sich selbst.

Für die Kombinationen von PrpU, synthetisiert sowohl durch das Plasmid pMSPrpU als auch durch pDPPPrpU, mit allen anderen Proteinen, genauer mit GcvP1 α , GcvP1 β , GcvP4, Thioredoxin-Reduktase und GcvP1 $\alpha\beta$ wurden relative β -Galactosidase-Aktivitäten von 200 bis zu 450 bestimmt, was darauf hindeutet, dass zwischen diesen Proteinen keine Interaktion stattfand bzw. detektierbar war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems Interaktionen von PrpU mit dem Lipoamid-tragenden P2-Protein der Glycin-Decarboxylase, mit dem redoxaktiven Selenoprotein A (GrdA) der Glycin-Reduktase und mit Elektronencarrier Thioredoxin identifiziert werden konnten.

3.3.7. Detektion der PrpU-Derivate mittels Western-Blot

Zur Überprüfung der Synthese der PrpU-Translationsfusionen (ca. 20 kDa) wurden die Zell-Lysate (von 1 ml Kultur) welche entweder das Plasmid pMSPrpU oder pDPPPrpU trugen, in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf PVDF-Membranen übertragen. Der

Nachweis der PrpU-Derivate erfolgte mittels des spezifischen Anti-PrpU-Antikörpers. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 18 dargestellt.

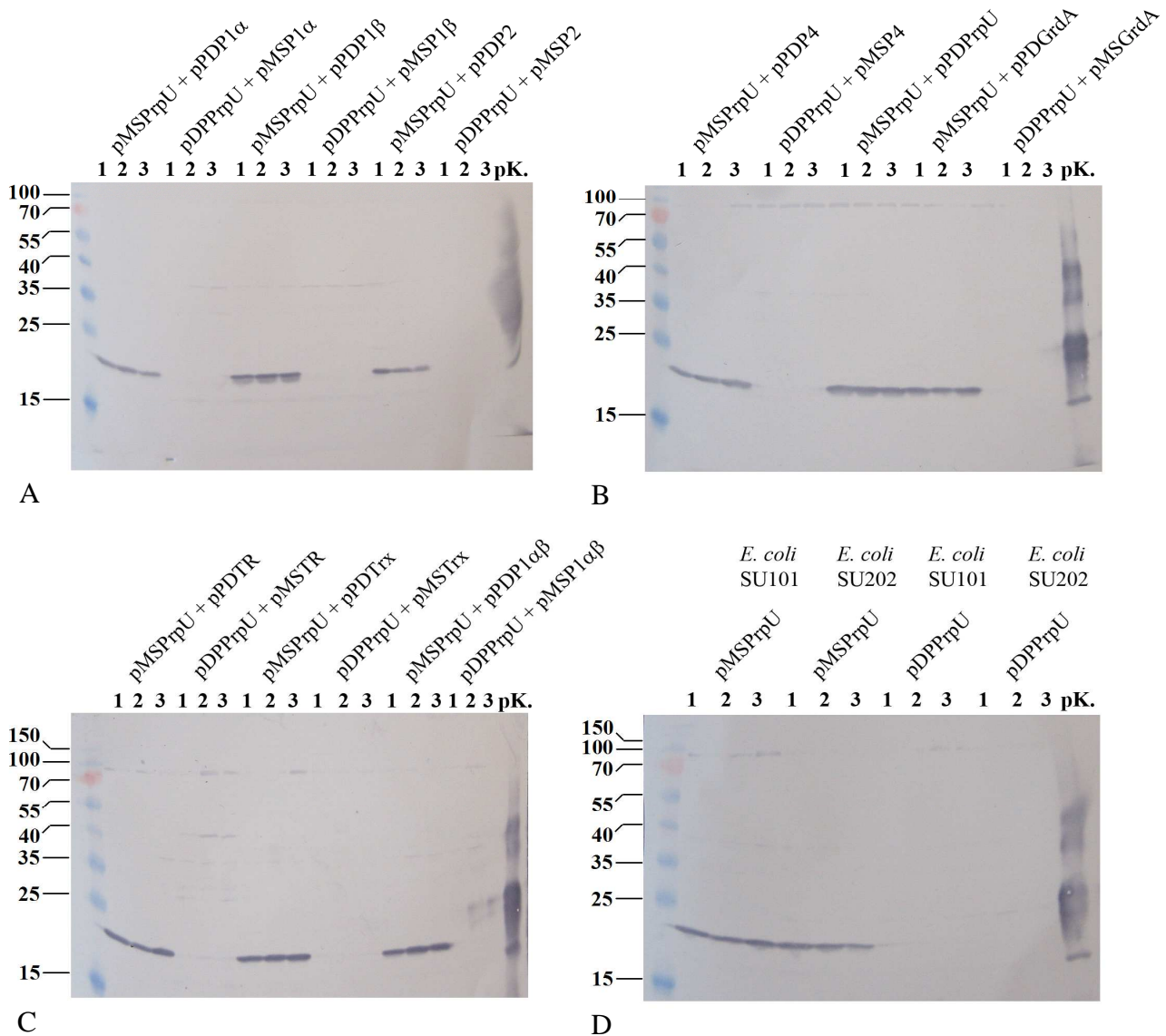


Abb. 18: Western-Blot-Nachweis der in *E. coli*-SU202 (A, B, C, D) und in *E. coli*-SU101 (D) synthetisierten PrpU-Derivate. SDS-Lysate ganzer Zellen, die die entsprechenden pMS604- und pDP804-Derivate trugen, wurde durch 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Detektion des heterolog synthetisierten PrpU erfolgte mittels Western-Blot mit spezifischem Anti-PrpU-Antikörper. Es wurden jeweils die drei getesteten Klone eines Expressionsstammes nebeneinander aufgetragen (gekennzeichnet mit 1, 2 und 3), darüber ist die jeweilige Kombination der pMS604- bzw. pDP804-Derivate angegeben. Sofern nicht anders erwähnt, stammen die Zell-Lysate aus dem Reporterstamm *E. coli*-SU202. Als Positiv-Kontrolle (pK) diente heterolog in *E. coli* synthetisiertes mit *Strep*-tag[®] II fusioniertes PrpU

Wie in Abbildung 18 deutlich zu erkennen ist, konnte heterolog produziertes PrpU nur bei Synthese durch das Plasmid pMSPrpU deutlich detektiert werden. Die Überproduktion des Proteins durch das pDP804-Derivat pDPPrpU konnte auch durch mehrfache Wiederholung des Western-Blots und Überprüfung von weiteren Klonen nur als sehr schwaches Produkt detektiert bzw. sichtbar gemacht werden (Abb. 18 C; pDPPrpU+pMSTR). Die Protein-Banden waren nur auf den Original-Blots zu erkennen. Nach dem

Fotografieren bzw. Scannen waren diese kaum noch bzw. nicht mehr zu erkennen. Durch Auftragung größerer Mengen an Gesamtprotein kam es nicht mehr zu einer ordentlichen Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel, so dass hierauf verzichtet wurde. Die unterschiedlich ausgeprägte Synthese der beiden PrpU-Derivate ist durch die unterschiedliche Kopienzahl der beiden zugrunde liegenden Plasmide zu erklären (DMITROVA *et al.*, 1998).

3.3.8. Auswertung der Interaktionsstudien aller untersuchten Proteine

Auf Grund der Vielzahl der untersuchten Proteine und der damit verbundenen großen Anzahl an Messwerten soll im folgenden Abschnitt nur kurz und in Form einer Übersicht auf alle untersuchten Protein-Protein-Interaktionen eingegangen werden. Die während der β -Galactosidase-*assays* erhaltenen Messwerte und die grafische Darstellung dieser sind im Anhang A.IX.1-8. zu finden. Eine Übersicht über die möglichen Protein-Protein-Interaktionen ist in Abbildung 19 (s. S. 67) dargestellt. Sämtliche in diesem Abschnitt beschriebenen Protein-Protein-Interaktionsuntersuchungen erfolgten im Reporterstamm *E. coli*-SU202.

Eine sehr starke Interaktion konnte für das P2- und das P4-Protein der Glycin-Decarboxylase detektiert werden, diese war jedoch nur bei der Expression von *gcvP4* durch das Plasmid pMSP4 und der Expression von *gcvP2* durch das Plasmid pDPP2 zu finden, bei Expression beider Gene durch das jeweils andere Plasmid (pMSP2 und pDPP4) war keine Repression des *lacZ*-Gens zu detektieren. Ebenfalls eine starke Interaktion wurde zwischen den Proteinen GcvP1 β und GcvP1 α beobachtet, auch hier nur bei der Synthese des P1-Proteins durch das Plasmid pMSP1 β und nicht bei der Überproduktion durch das Plasmid pDPP1 β .

Eine deutlichere Verringerung der β -Galactosidase-Produktion war auch für die Expression von *gcvP1 β* durch das Plasmid pMSP1 β und gemeinsamer Synthese der α - und β -Untereinheit des P1-Proteins durch pDPP1 $\alpha\beta$, feststellbar. Auch hier war diese Verringerung bei der Überproduktion des GcvP1 β -Derivates durch das Plasmid pDPP1 β nicht zu finden. Des Weiteren wurde für das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase eine sehr starke Interaktion mit sich selbst, also eine Homodimer-Bildung beobachtet, etwas schwächer ausgeprägt wurde diese für Thioredoxin gefunden.

Wie im Abschnitt 3.2.6. bereits beschrieben, wurden starke Interaktionen zwischen den Proteinen PrpU und P2 der Glycin-Decarboxylase, zwischen PrpU und dem Thioredoxin, aber auch zwischen letzterem und GcvP2, und zwischen GrdA der Glycin-Reduktase und dem P2-Protein gezeigt. Diese hier beschriebenen Interaktionen zeigten sich sowohl bei der Synthese der jeweiligen Proteine durch die entsprechenden pMS604-Derivate als auch bei der Synthese durch das jeweilige pDP804-Derivat. Hierbei ist aber zu erwähnen, dass bei Expression von *grdA* durch das Plasmid pMSGrdA und Expression von *gcvP2* durch pDPP2 die relative β -Galactosidase-Aktivität deutlich höher war als bei Synthese dieser Proteine durch die Plasmide pDPGrdA bzw. pMSP2, was auf eine wesentlich geringere Interaktion schließen lässt.

Auch die Interaktion der Komponenten des Thioredoxin-Systems, der Thioredoxin-Reduktase und des Thioredoxins, konnte nur bei der Plasmid-Kombination pMSTR mit pDPTrx detektiert werden. Die

deutliche Absenkung der β -Galactosidase-Aktivität war bei der umgekehrten Kombination (pDPTR mit pMSTrx) nicht zu finden.

pMS-Derivate pDP-Derivate	pMSP1 α (GcvP1 α)	pMSP1 β (GcvP1 β)	pMSP2 (GcvP2)	pMSP4 (GcvP4)	pMSPPrpU (PrpU)	pMSGrdA (GrdA)	pMSTR (TR)	pMSTrx (Trx)	pMSP1 $\alpha\beta$ (GcvP1 α)
pDPP1 α (GcvP1 α)	(+)	++							
pDPP1 β (GcvP1 β)		(+)							
pDPP2 (GcvP2)	(+)		++	++	+	(+)		+	
pDPP4 (GcvP4)									
pDPPPrpU (PrpU)			+					+	
pDPGrdA (GrdA)			+	(+)	++	(+)		+	
pDPTR (TR)									
pDPTrx (Trx)			+		+	+	+	+	
pDPP1 $\alpha\beta$ (GcvP1 α)		++							

Abb. 19: Übersicht über mögliche Protein-Protein-Interaktionen der mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems untersuchten Proteine: Dargestellt sind die Kombinationen der jeweiligen pMS604-Derivate mit den einzelnen pDP804-Derivaten im Reporterstamm *E. coli*-SU202. Die Interaktionen der einzelnen Proteine wurde wie folgt klassifiziert: ++_sehr starke Interaktion, +_starke Interaktion, (+)_schwache Interaktion. In Klammern, unter den einzelnen Hybrid-Plasmiden, sind die entsprechenden Proteine aufgezeigt.

Eine nur sehr schwach ausgeprägte Interaktion, d. h. nur gering verminderte β -Galactosidase-Aktivitäten, konnte bei paralleler Synthese der Proteine GcvP1 α und GcvP2 bzw. GcvP4 und GrdA detektiert werden. Hierbei ist wiederum anzumerken, dass diese Interaktionen nur bei der Überproduktion des jeweils erst

genannten Proteins durch die entsprechenden pMS604-Derivate und nicht bei der Synthese durch die pDP804-Derivate feststellbar waren.

Für die α - und β -Untereinheit des P1-Proteins der Glycin-Decarboxylase sowie für GrdA der Glycin-Reduktase wurde gezeigt, dass diese Proteine zur Homodimer-Bildung neigen. Die *lacZ*-Expression ist hierbei aber nur geringfügig gemindert.

3.3.9. Identifikation von Homodimeren im Reporterstamm *E. coli*-SU101

Wie bereits in Abschnitt 3.3.2. beschrieben, können mit Hilfe des Reporterstammes *E. coli*-SU101 und den pMS604-Derivaten die einzelnen Proteine auf Homodimerisierung getestet werden. Die bei diesem Versuch erhaltenen relativen β -Galactosidase-Aktivitäten sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab. 9. β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU101-Stämme¹

	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (relativ) ²					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pMSP1 α	11	(\pm 10)	12	(\pm 5)	10	(\pm 2)
pMSP1 β	249	(\pm 12)	258	(\pm 17)	209	(\pm 27)
pMSP2	31	(\pm 19)	31	(\pm 11)	24	(\pm 2)
pMSP4	35	(\pm 13)	22	(\pm 5)	19	(\pm 5)
pMSPrpU	48	(\pm 21)	41	(\pm 18)	41	(\pm 24)
pMSGrdA	33	(\pm 12)	41	(\pm 16)	36	(\pm 14)
pMSTR	78	(\pm 26)	71	(\pm 18)	49	(\pm 26)
pMSTrx	12	(\pm 2)	15	(\pm 5)	13	(\pm 2)
pMSP1 $\alpha\beta$	256	(\pm 18)	185	(\pm 11)	184	(\pm 7)

¹ die untersuchten Stämme enthielten jeweils nur ein pMS604-Derivat

² dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

Die deutlichste Repression der *lacZ*-Expression war bei der Synthese der α -Untereinheit des P1-Proteins der Glycin-Decarboxylase und bei Synthese des Thioredoxin-Derivates zu erkennen. Hier wurden relative β -Galactosidase-Aktivitäten von 10, 11 bzw. 12 (pMSP1 α) bzw. 12, 13 bzw. 15 (pMSTrx) ermittelt, was für eine stark ausgeprägte Homodimer-Bildung dieser beiden Proteine spricht. Die hier identifizierte Homodimerisierung des Thioredoxins konnte, wie in Abschnitt 3.3.8. beschrieben, auch im Stamm *E. coli*-SU202 detektiert werden, die Oligomerisierung von GcvP1 α wurde ebenfalls bestätigt, war allerdings bei der Synthese durch die Plasmide pMSP1 α und pDPP1 α in diesem Reportersystem wesentlich schwächer ausgeprägt. Geringfügig schwächer sind die Homodimer-Bildungen einzustufen, die für die Proteine GcvP2, GcvP4, PrpU und GrdA identifiziert wurden. Für das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase und GrdA der

Glycin-Reduktase konnten somit die Ergebnisse, die mit Hilfe der entsprechenden *E. coli*-SU202 Stämme erhalten wurden, bestätigt werden. Die mit den *E. coli*-SU101-Reporterstämmen erhaltenen Resultate für die Proteine GcvP4 und PrpU unterscheiden sich hingegen von denen, welche mit den *E. coli*-SU202-Reporterstämmen erhalten wurden, da dort für beide Proteine keine Homodimerisierung festgestellt werden konnte. Die Aussage ist für PrpU kritisch zu betrachten, da hier, wie in Abschnitt 3.3.7. beschrieben, für die drei untersuchten Klone sehr verschiedene Werte erhalten wurden, wobei man bei getrennter Betrachtung bei Klon 1 von einer Homodimer-Bildung ausgehen müsste.

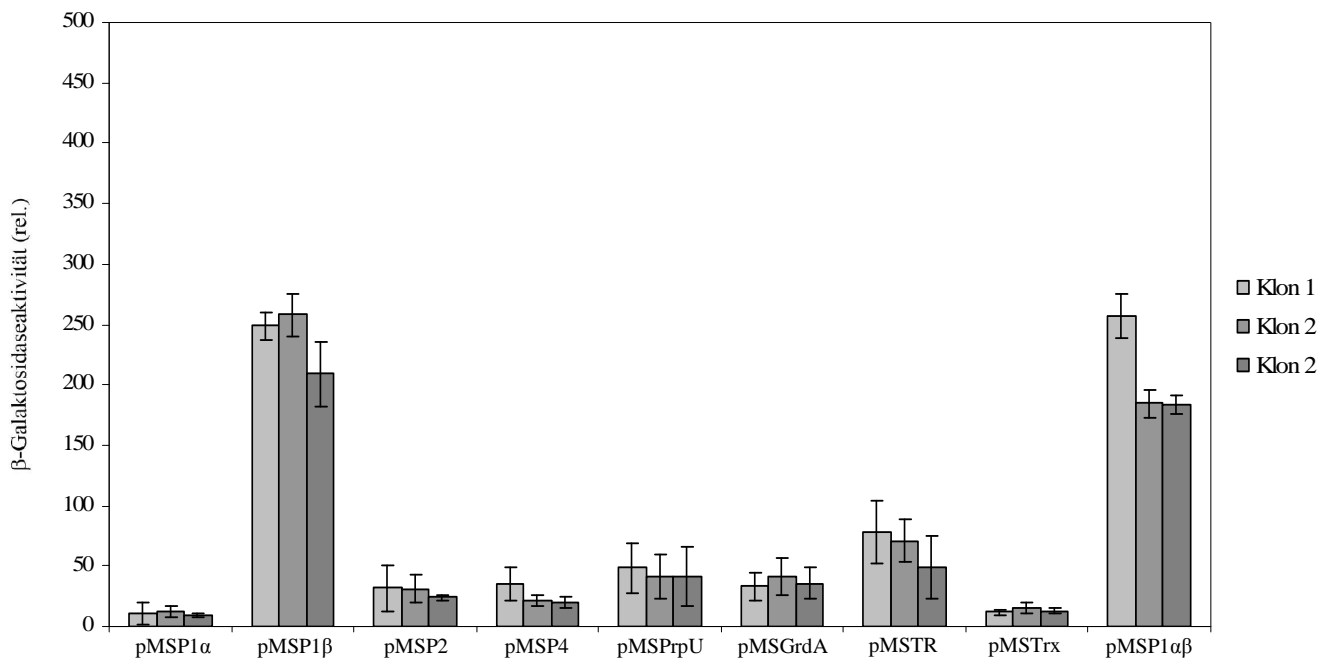


Abb. 20: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU101-Reporterstämmе. Dargestellt sind die relativen β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU101-Reporterstämmеn (Klon 1, 2 und 3), die ein pMS604-Derivat tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

Die hier gezeigte, als schwach einzustufende Interaktion der Thioredoxin-Reduktase mit sich selbst, widerspricht den mit Hilfe der entsprechenden *E. coli*-SU202-Reporterstämmеn erhaltenen Ergebnissen.

Wie in Tabelle 9 (s. S. 68) und Abbildung 20 zu erkennen ist, wurde für die β -Untereinheit des P1-Proteins keine Homodimerisierung gezeigt, während die Daten mit dem Reporterstamm *E. coli*-SU202 auf eine schwache Interaktion dieser Untereinheit mit sich selbst hinweisen.

Bei der gemeinsamen Expression von *gcvP1 α* und *gcvP1 β* konnten die mit Hilfe des Reporterstamms *E. coli*-SU202 erhaltenen Resultate, welche keine Homodimerisierung zeigten, im Reporterstamm *E. coli*-SU101 bestätigt werden.

3.4. Synthese von Proteinen aus *E. acidaminophilum* in *E. coli*

E. acidaminophilum konnte bisher keiner genetischen Manipulation unterzogen werden, da bis zum heutigen Zeitpunkt kein Transformationssystem für diesen Organismus etabliert werden konnte. Die Proteinkomponenten der Glycin-Decarboxylase, die Komponenten des Thioredoxin-Systems, GrdA der Glycin-Reduktase und das Selenoprotein PrpU sollten daher heterolog in *E. coli* synthetisiert werden, um durch *in-vitro*-Untersuchungen die Funktion des Proteins PrpU im Metabolismus von *E. acidaminophilum* klären zu können.

3.4.1. Synthese der Komponenten der Glycin-Decarboxylase als *Strep-tag*[®] II-Fusionsprotein

Die Proteine P1, P2 und P4 der Glycin-Decarboxylase von *E. acidaminophilum* sollten mit Hilfe des *Strep-tag*[®] II-basierenden Expressions- und Reinigungssystem angereichert und gereinigt werden. Der aus acht Aminosäuren (NH₂-WSHPQFEK-COOH) bestehende *Strep-tag*[®] II kann C- oder N-terminal mit Proteinen fusioniert werden, und durch seine sehr hohe Affinität zu StrepTactin (optimiertes, durch Mutagenese erzeugtes Streptavidin-Derivat) wird eine schnelle und effiziente Ein-Schritt-Reinigung erzielt (SCHMIDT and SKERRA 1994; VOSS and SKERRA 1997). Dieses Expressionssystem wurde gewählt, da für diverse Proteine von *E. acidaminophilum* bereits gute Expressions- und Reinigungsergebnisse erzielt wurden (GURSINSKY 2002; PARTHER 2003).

3.4.1.1. Klonierung in die Expressionsvektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5

Die Expression der in die Vektoren des *Strep-tag*[®] II-Expressionssystems klonierten Gene wird durch die Promotor-Operator-Region des *tetA*-Gens kontrolliert und durch den auf diesen Plasmiden konstitutiv exprimierten *tet*-Repressor streng reguliert. Die Induktion der Genexpression erfolgt durch Anhydrotetracyclin in nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen (SKERRA 1994). Klonierung in den Vektor pASK-IBA3 resultiert in C-terminalen Fusionen der zu synthetisierenden Proteine mit dem *Strep-tag*[®] II, in pASK-IBA5 hingegen in N-terminale Fusionen. Zur Synthese der Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* sollten beide Vektoren zur Anwendung kommen.

Die zu klonierenden Gene wurden durch PCR mit Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1.) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* amplifiziert, die Primerpaare P1alphaIBA3r und P1alphaIBA3f (GcvP1 α), P1betaIBA3r und P1betaIBA3f (GcvP1 β), P2IBA3r und P2IBA3f (GcvP2) und P4IBA3r und P4IBA3f (GcvP4) wurden für die folgende Klonierung in den Vektor pASK-IBA3 verwendet. Die Amplifikation der entsprechenden Gene zur Klonierung in das Plasmid pASK-IBA5 erfolgte mit den Primerpaarungen P1alphaIBA5r und P1alphaIBA5f (GcvP1 α), P1betaIBA5r und P1betaIBA5f (GcvP1 β),

P2IBA5r und P2IBA5f (GcvP2) und P4IBA5r und P4IBA5f (GcvP4). Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Fragmente einem Restriktionsverdau mit BsaI unterzogen und in die ebenfalls mit dieser Restriktionsendonuclease linearisierten Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 ligiert. Hierbei erfolgte eine gerichtete Klonierung, da BsaI außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei unterschiedliche 5'-Überhänge entstehen können.

Die ligierten Konstrukte wurden jeweils in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻ transformiert und anschließend aus je 3 Kolonien die Plasmide isoliert und die Sequenzen der entsprechenden klonierten Gene auf Richtigkeit überprüft. Je ein Plasmid mit korrektem Insert wurde gewählt und mit pP1 α CW und P1 α NW (GcvP1 α in pASK-IBA3 und pASK-IBA5), pP1 β CW und pP1 β NW (GcvP1 β in pASK-IBA3 und pASK-IBA5), pP2CW und pP2NW (Gcv2 in pASK-IBA3 und pASK-IBA5), pP4CW und pP4NW (GcvP4 in pASK-IBA3 und pASK-IBA5) bezeichnet.

3.4.1.2. Testexpression von *gcvP1 α* , *gcvP1 β* , *gcvP2* und *gcvP4* als *Strep-tag*[®] II-Translationsfusion in *E. coli*

E. acidaminophilum hat einen G+C-Gehalt von 45,2 %, während *E. coli* einen G+C-Gehalt von 51,1 % aufweist (DÖRING *et al.*, 2001). Zur besseren heterologen Synthese der Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* sollte daher der Stamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL zur Anwendung kommen. Dieser Stamm eignet sich gut zur Überproduktion von Proteinen aus Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt, da er auf einem pACYC184-Derivat die Gene *argU* (*dnaY*), *ileY* und *leuW* trägt. Diese codieren für tRNA-Species, welche nur sehr selten in *E. coli* vorkommen: tRNA₄^{Arg}, welche die Codons AGA und AGG erkennt, tRNA₂^{Ile}, für die Erkennung von AUA und tRNA₃^{Leu} für die Codons CUA und CUG.

Die Plasmide, welche die Gene der einzelnen Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* tragen (3.4.1.1.), wurden in den Stamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert und jeweils 8 Klone einer Testexpression im 20 ml Maßstab unterzogen. Nach dreistündiger Induktion des *tet*-Promotors mit Anhydrotetracyclin wurde eine Probe genommen und die Produktion rekombinanter Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat überprüft. Für alle untersuchten Stämme konnten zusätzliche Proteinbanden mit Größen von ca. 50 kDa für die α -Untereinheit und ca. 54 kDa für die β -Untereinheit des P1-Proteins, von ca. 15 kDa für das P2-Protein und ca. 42 kDa für das P4-Protein sichtbar gemacht bzw. detektiert werden. Diese zusätzlichen Proteinbanden waren ohne Induktion bzw. in den Kontrollen (pASK-IBA3 und pASK-IBA5 ohne Inserts) nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Es konnten für die einzelnen Gene (*gcvP1 α* , *gcvP1 β* , *gcvP2* und *gcvP4*), exprimiert in pASK-IBA3 und pASK-IBA5 keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel der jeweils untersuchten Stämme festgestellt werden, daher wurde jeweils nur ein Stamm für weitere Untersuchungen verwendet.

Des Weiteren sollte die optimale Induktionsdauer für die einzelnen Expressionen ermittelt werden. Hierzu erfolgte wiederum eine Testexpression im 20 ml Maßstab. Nach Induktion mit Anhydrotetracyclin wurde nach 1, 2, 3, 4, 5 und 16 h eine Probe genommen und anschließend die Synthese der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat überprüft. Hierbei zeigte sich für alle überprüften Stämme, dass bereits bei einer Induktion über 4h die Menge des rekombinant gebildeten Proteins im Vergleich zur Induktion über 3 h leicht zurückging. Bei der Induktion über Nacht waren die zusätzlichen Proteinbande nur noch sehr schwach ausgeprägt. Die optimale Induktionsdauer betrug also 3 h. Die Änderung der Temperatur von 37 °C auf 30 °C zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Expressionsraten, so dass im Folgenden die Synthese der Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* immer bei 37 °C und einer Induktionsdauer von 3h erfolgte.

3.4.1.3. Reinigung der heterolog synthetisierter Proteine

Die Anzucht der einzelnen Stämme zur Überproduktion der Proteinkomponenten der Glycin-Decarboxylase erfolgte im 1 l-Maßstab. Hierzu wurde LB-Selektivmedium mit einer über Nacht ebenfalls in LB-Selektivmedium gewachsenen Vorkultur inokuliert, sodass die Start-OD₆₀₀ der Hauptkultur 0,1 betrug, anschließend wurde diese Kultur bei einer Temperatur von 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert und der *tet*-Promotor für 3 h mit Anhydrotetracyclin induziert. Hiernach erfolgten die Ernte der Zellen (jeweils 100 ml Kultur wurde pelletiert) und die Überprüfung der Expression mittels SDS-PAGE.

Der aus dem Pellet von je 100 ml Hauptkultur präparierte Rohextrakt (2.10.7.3.) wurde auf StrepTactin-Affinitätsäulen aufgetragen, ungebundene Proteine durch Waschen der Säulen mit 5x1 ml PufferW entfernt und anschließend die gebundenen, heterolog synthetisierten *Strep-tag*[®] II-Fusionsproteine mit 2,5 mM Desthiobiotin im Puffer von der Säule eluiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C und unter Gravitationsfluss.

Anschließend wurden die einzelnen Säulenläufe mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat überprüft und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Elutionsfraktionen mittels Bradford bestimmt.

Die Proteine GcvP1 β , GcvP2 und GcvP4 konnten im Fall der C-terminalen und N-terminalen Fusion mit dem *Strep-tag*[®] II in nahezu homogener Form erhalten werden (s. S. 73, Abb. 21). Dabei war allerdings zu erkennen, dass bei allen 3 Proteinen die Fusion mit dem C-terminalen *Strep-tag*[®] II in höheren Proteinmengen resultierte. Im Fall des heterolog exprimierten *gcvP1 α* konnte nur bei C-terminaler Fusion mit dem *Strep-tag*[®] II lösliches Protein erhalten werden. Das N-terminal mit dem *Strep-tag*[®] II fusionierte Protein lag hingegen nur als *inclusion bodies* im Pellet nach der Rohextrakt-Präparation vor. Alle Proteine eluierten innerhalb der dritten Elutionsfraktion (500 μ l), wobei aus jeweils 100 ml Kulturvolumen 2 mg GcvP1 α (4 μ g/ μ l), 1,25 mg GcvP1 β (2,5 μ g/ μ l), 1 mg GcvP2 (2 μ g/ μ l) und 1,2 mg GcvP4 (2,4 μ g/ μ l) bei der Synthese durch pASK-IBA3 und 0,25 mg GcvP1 β (0,5 μ g/ μ l), 0,75 mg GcvP2 (1,5 μ g/ μ l) und 0,75 mg GcvP4 (1,5 μ g/ μ l) bei Überproduktion mit Hilfe des Plasmides pASK-IBA5 gereinigt werden konnten.

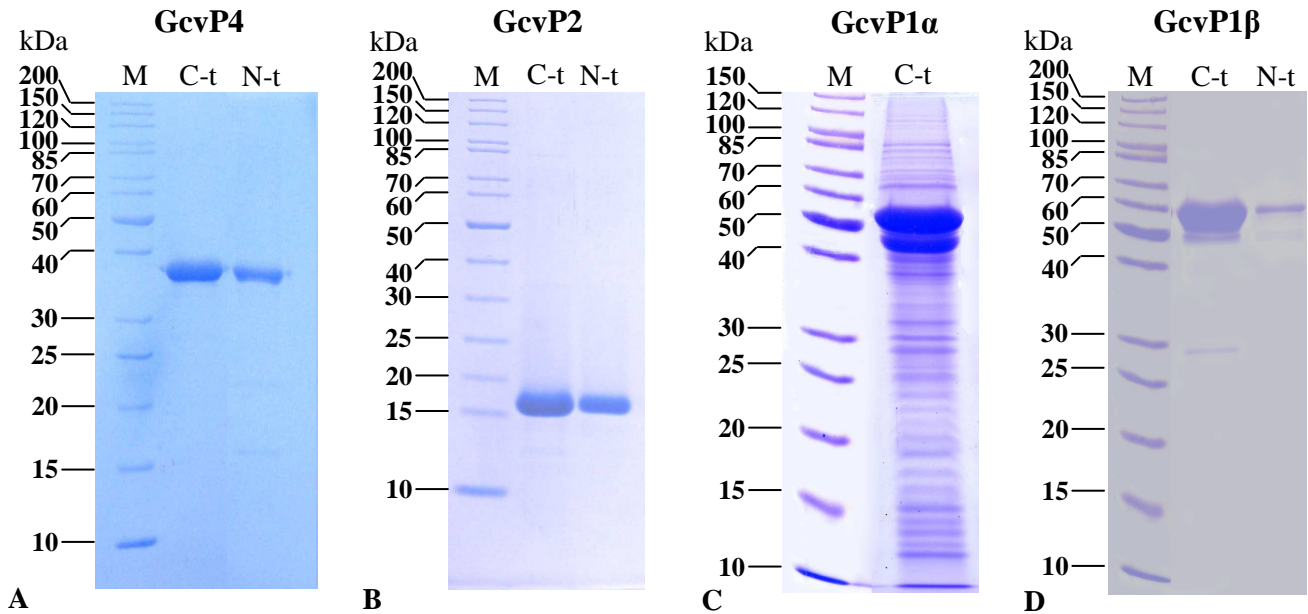


Abb. 21: Reinigung der rekombinanten Proteine GcvP4 (A), GcvP2 (B), GcvP1α (C) und GcvP1β (D) an StrepTactin-Sepharose nach Synthese durch Expressionsvektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5. Die Proben wurden in einem 12,5%igem SDS-Polyacrylamidgel (A, C und D) bzw. in einem Schagger-Gel (B) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M_Molekulargewichtsmarker, C-t_C-terminale Fusion mit dem *Strep-tag*[®] II, N-t_N-terminale Fusion mit dem *Strep-tag*[®] II. Es wurden jeweils 5 µl der dritten Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie an StrepTactin_Sepharose aufgetragen.

Bei der Reinigung von GcvP1α waren stets neben der dem rekombinanten Protein entsprechenden Proteinbande eine Vielzahl an zusätzlichen Proteinen zu erkennen, welche nach Western-Blot-Nachweis mittels StrepTactin-HRP-Konjugat als *Strep-tag*[®] II-Fusionsproteine identifiziert werden konnten (aller kleiner als 55 kDa), was auf einen proteolytischer Abbau des rekombinanten Proteins hinweist (Daten nicht gezeigt). Durch Western-Analysen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass dieser Abbau bereits während der Kultivierung der entsprechenden Stämme einsetzte.

3.4.1.4. Coexpression der Gene der α- und β-Untereinheit des P1-Proteins von *E. acidaminophilum*

Wie bei den meisten Prokaryoten liegt auch das P1-Protein der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum*, wie bereits erwähnt, als α₂β₂-Tetramer vor (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989).

Auch durch veränderte Wachstumsbedingungen der Stämme mit den Plasmiden zur Überproduktion von GcvP1α (Absenkung der Temperatur und Verkürzung der Induktionszeiten des *tet*-Promotors der Expressionsvektoren auf 1 h) konnte der proteolytische Abbau des rekombinanten Proteins nicht verhindert werden. Durch eine simultane Synthese beider Untereinheiten sollte nun eine möglicherweise stabilisierende Wirkung der β-Untereinheit auf die α-Untereinheit des P1-Proteins untersucht werden, um somit eventuell eine größere Menge an intaktem GcvP1α zu erhalten bzw. den Abbau zu verhindern.

Da die Gene für beide Untereinheiten im Genom von *E. acidaminophilum* direkt benachbart liegen, konnte mit den Primern P1alphaIBA3f und P1betaIBA3r (für die Klonierung in pASK-IBA3) und den Primern P1alphaIBA5f und P1betaIBA5r (für die Klonierung in pAK-IBA5) jeweils ein PCR-Produkt erhalten werden, welches die Gene *gcvP1 α* und *gcvP1 β* entsprechend ihrer Orientierung im Genom von *E. acidaminophilum* repräsentierte. Die Klonierung erfolgte, wie unter 3.4.1.1. beschrieben. Die resultierenden Plasmide wurden mit pP1 α β CW für die Klonierung in pASK-IBA3 und mit pP1 α β NW für die Klonierung in pASK-IBA5 bezeichnet.

Die Testexpressionen und Reinigungen erfolgten analog zu 3.4.1.2 und zu 3.4.1.3. Aus 250 ml Kulturvolumen konnten für die Expressionsvarianten in pASK-IBA3 nur sehr geringe Mengen von 0,25 mg (0,5 μ g/ μ l) an heterolog synthetisiertem GcvP1 β in löslicher Form in der entsprechenden Elutionsfraktion (E3) angereichert werden (Abb. 22).

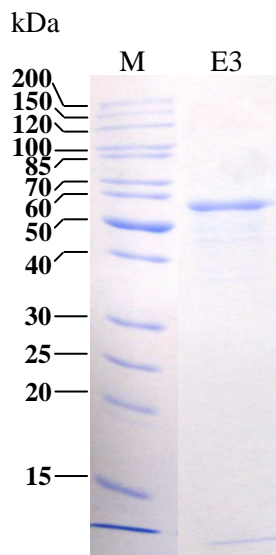


Abb. 22: Reinigung von rekombinantem GcvP1 β an StrepTactin-Sepharose nach Coexpression von *gcvP1 α* und *gcvP1 β* im Expressionsvektor pASK-IBA3.

5 μ g Protein wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M_Molekulargewichtsmarker, E3_Elution 3 nach Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose.

Bei der Cosynthese durch pASK-IBA5 war der gesamte Anteil und bei der Synthese durch pASK-IBA3 der größte Anteil hingegen als *inclusion bodies* im Pellet nach der Rohextrakt-Präparation zu finden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren war zu erkennen, dass bei der Überproduktion beider Proteine im Vektor pASK-IBA3 nur die β -Untereinheit von der StrepTactin-Affinitätssäule eluierte. Das ist insofern nicht verwunderlich, da bei dieser Expressionsvariante die β -Untereinheit mit dem *Strep-tag*[®] II-fusioniert ist. Durch Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat in Zell-Lysaten der Expressionskultur konnte gezeigt werden, dass bei Coexpression von *gcvP1 α* und *gcvP1 β* durch das Plasmid pASK-IBA5 ein proteolytischer Abbau des rekombinanten GcvP1 α -Proteins bei der simultanen Synthese beider Untereinheiten nicht mehr zu erkennen war, eine parallele Reinigung beider Proteine gelang so jedoch nicht.

3.4.1.5. Konstruktion eines Vektors zur simultanen Reinigung der α - und β -Untereinheit des P1-Proteins

Da die gemeinsame Synthese beider Untereinheiten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* in den Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 nicht zu den gewünschten Resultaten führte, sollte nun ein Vektor konstruiert werden, der sowohl eine N-terminale Fusion des *Strep-tag*[®] II mit der α -Untereinheit als auch eine C-terminale Fusion des *Strep-tag*[®] II mit der β -Untereinheit ermöglichte, um beide Proteine simultan zu synthetisieren, aber auch gemeinsam zu reinigen.

Die Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 unterscheiden sich nur hinsichtlich der Lage der Sequenz für den *Strep-tag*[®] II. Während diese im pASK-IBA5 *upstream* der *multi cloning site* gelegen ist, ist die Sequenz im pASK-IBA3 *downstream* dieser zu finden (Abb. 23).

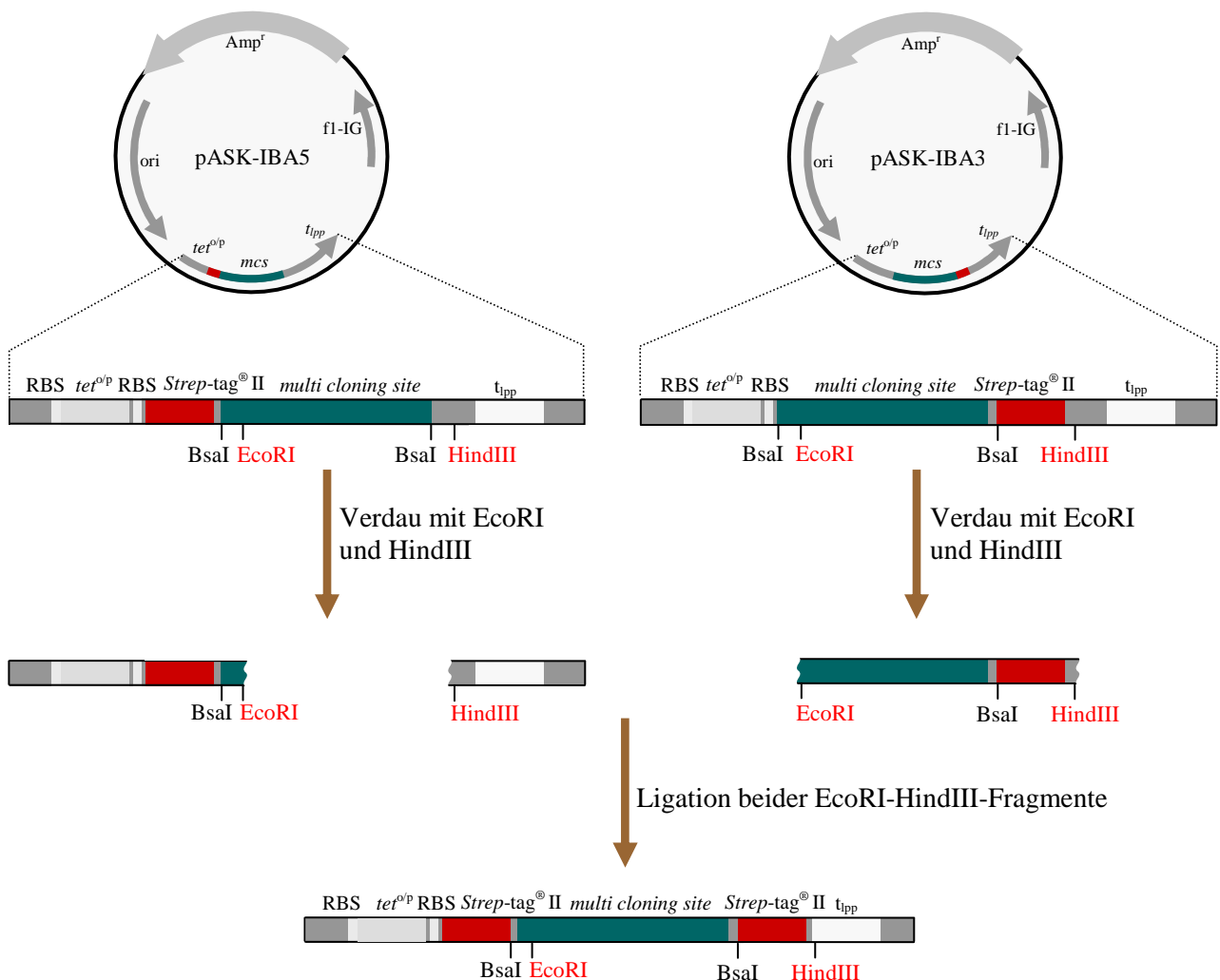


Abb. 23: Konstruktion des Vektors pASK-IBA53ke. Dargestellt sind die beiden Expressionsvektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5, wichtige Gene sind grau dargestellt, die *multi cloning site* dunkelgrün und der *Strep-tag*[®] II weinrot. Die für die Konstruktion des Vektors pASK-IBA53ke wichtigen Schnittstellen EcoRI und HindIII sind rot hervorgehoben, die für die Klonierung der zu exprimierenden Gene geeigneten BsaI Schnittstellen sind schwarz gekennzeichnet.

Durch Restriktion beider Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII wurde jeweils ein 100 bp und ein 3147 bp (pASK-IBA3) bzw. ein 100 bp und ein 3160 bp Fragment (pASK-IBA5) erhalten. Im Falle des Vektors pASK-IBA3 befindet sich die Sequenz des *Strep-tag*[®] II auf dem 100 bp Fragment, während sie nach Verdau des Vektors pASK-IBA5 auf dem 3160 bp Fragment zu finden ist. Nach Ligation dieser beiden Fragmente wurde ein Plasmid erhalten, welches sowohl die C-terminale als auch die N-terminale Translationsfusion von z.B. zwei Untereinheiten eines Proteins mit dem *Strep-tag*[®] II erlaubt. Das so erhaltene Hybrid-Plasmid weist genau wie die beiden Ausgangsvektoren zwei BsaI-Schnittstellen auf, über die eine gerichtete Klonierung der Zielgene zwischen beide *Strep-tag*[®] II-Sequenzen möglich ist. Nach Überprüfung der Sequenz der *multi cloning site* wurde dieser Expressionsvektor mit pASK-IBA53ke bezeichnet.

3.4.1.6. Klonierung des *gcvP1*-Gens von *E. acidaminophilum* in den Expressionsvektor pASK-IBA53ke

Wie in Abbildung 8 (s. S. 46) zu erkennen ist, liegen die Gene *gcvP1 α* und *gcvP1 β* , welche für die beiden Untereinheiten des P1-Proteins der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* codieren, im Glycin-Decarboxylase-Operon direkt benachbart und werden nur durch ein Base, ein Cytosin, getrennt. Die Ribosomen-Bindestelle für *gcvP1 β* befindet sich im 3'-Bereich von *gcvP1 α* .

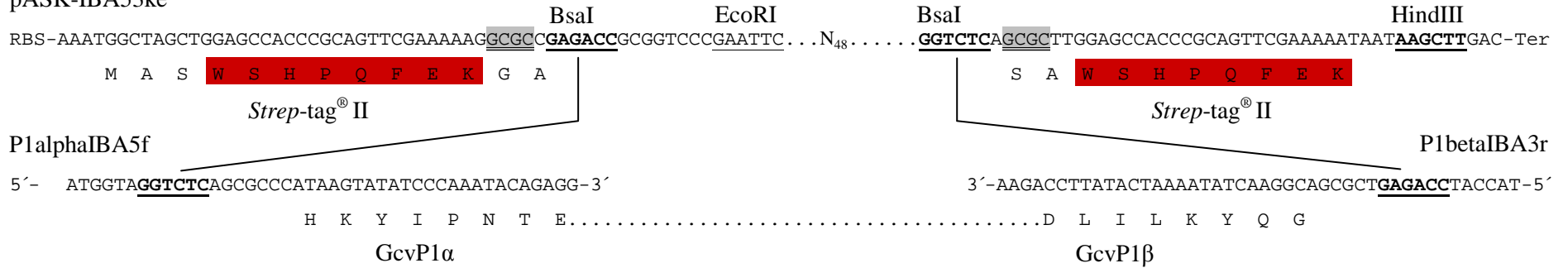
Für die Klonierung in den Expressionsvektor pASK-IBA53ke wurden 2 verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen sollten die Gene *gcvP1 α* und *gcvP1 β* so in den Vektor kloniert werden, wie sie im Genom von *E. acidaminophilum* angeordnet sind. Hierzu wurden beide Gene mit den Primern P1alphaIBA5f und P1betaIBA3r durch PCR mit Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* amplifiziert, mit BsaI verdaut und in ebenfalls mit BsaI geschnittenen pASK-IBA53ke ligiert (s. S. 77, Abb. 24).

Zum anderen sollte mit Hilfe eines Primers eine zusätzliche Ribosomen-Bindestelle zwischen beide Gene eingefügt werden. Mit den Primerpaaren P1alphaIBA5f und P1 α KE+BsaI (*gcvP1 α*) und P1betaIBA3r und P1 β KE+BsaI (*gcvP1 β*) wurden beide Gene durch PCR mit Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase (2.5.1) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* amplifiziert, ebenfalls mit BsaI verdaut und gemeinsam in mit BsaI linearisierten pASK-IBA53ke ligiert.

Die Endonuclease BsaI schneidet außerhalb ihrer Erkennungssequenz jede beliebige Sequenz, wobei ein 4 nt längerer 5'-Überhang entsteht. Die Überhänge der über die Primer P1 α KE+BsaI und P1 β KE+BsaI eingefügten BsaI-Schnittstellen wurden so konstruiert, dass im Fall der Amplifikation von *gcvP1 α* ein Überhang von fünf Adeninen und im Fall von *gcvP1 β* einer mit fünf Thyminen entsteht. Dies gewährleistet eine gerichtete Klonierung beider Gene in den Vektor pASK-IBA53ke.

A

pASK-IBA53ke



B

pASK-IBA53ke

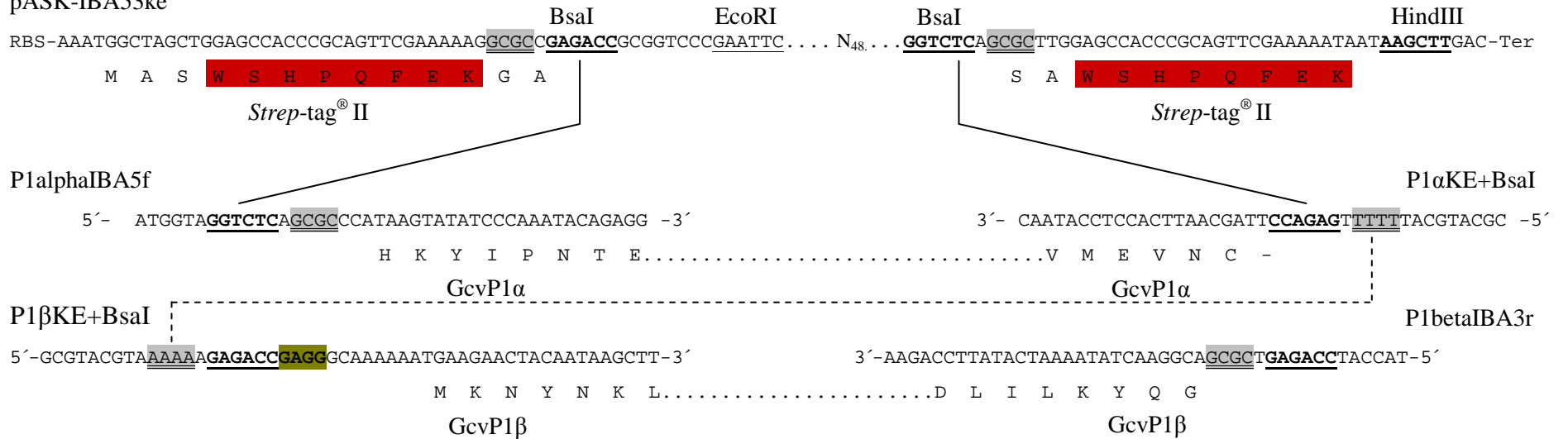


Abb. 24: Schematische Darstellung der Klonierung von *gcvP1 α* und *gcvP1 β* ohne (A) und mit zusätzlicher Ribosomen-Bindestelle (B) in das Expressionsplasmid pASK-IBA53ke. Die *multi cloning site* des Vektors pASK-IBA53ke ist dargestellt, die Sequenzen der Primer P1alphaIBA5f, P1betaIBA3r, P1 α KE+BsaI und P1 β KE+BsaI zur Amplifikation der DNA-Abschnitte, welche für die Gene *gcvP1 α* und *gcvP1 β* codieren, sind angegeben. Die klonierungsrelevanten BsaI-sites sind fett gedruckt und unterstrichen, die nach Restriktionsverdau entstandenen Überhänge grau unterlegt und doppelt unterstrichen. Die zusätzlich eingefügte Ribosomen-Bindestelle ist grün unterlegt. Die C- und N-terminalen Aminosäuresequenzen der Proteine GcvP1 α und GcvP1 β sind angegeben sowie die Sequenz des *Strep-tag*[®] II, welche zusätzlich rot unterlegt ist. RBS_Ribosomen-Bindestelle, Ter_Transkriptionsregulator.

Nach Ligation und Transformation wurden jeweils aus drei der entstandenen Klone die Plasmide isoliert und die Sequenz der Inserts überprüft. Jeweils ein Hybrid-Plasmid wurde mit pcP1 α β 53 (ohne zusätzliche Ribosomen-Bindestelle) und pP1 α β 53 (mit zusätzlicher Ribosomen-Bindestelle) bezeichnet.

Beide Plasmide wurden ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert, und die Testsynthese und Reinigung erfolgten wie in Abschnitt 3.4.1.2. beschrieben.

Bei der Überproduktion mit Hilfe des Plasmides pcP1 α β 53 waren bei der Testsynthese (3.4.1.2.) deutlich zwei zusätzliche Proteinbanden zu erkennen. Diese Proteine lagen allerdings in unlöslicher Form als *inclusion bodies* vor und waren nach dem Zellaufschluss im Pellet zu finden (Daten nicht gezeigt).

Nur bei der Expressionsvariante mit zusätzlicher Ribosomen-Bindestelle zwischen beiden Genen konnten nach Reinigung an StrepTactin-Sepharose in der 3. Elutionsfraktion zwei Proteine angereichert werden, deren Größe den Proteinen GcvP1 α (50,2 kDa) und GcvP1 β (54,4 kDa) mit *Strep-tag*[®] II entsprachen (Abb. 25). Aus 100 ml Kulturvolumen wurden 1,35 mg (2,7 μ g/ μ l) Protein, bestehend aus rekombinanten GcvP1 α und GcvP1 β , durch Affinitätschromatographie angereichert.

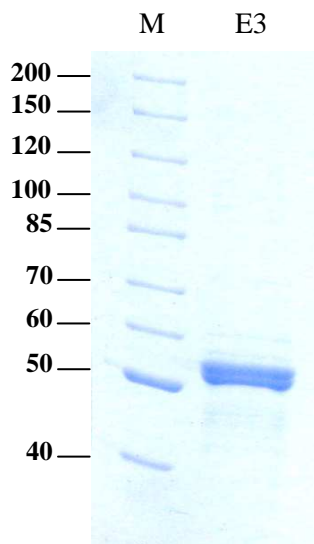


Abb. 25: Reinigung der rekombinanten Proteine GcvP1 α und GcvP1 β an StrepTactin-Sepharose nach Koexpression von *gcvP1 α* und *gcvP1 β* im Expressionsvektor pASK-IBA53ke.

2 μ g Protein wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M_Molekulargewichtsmarker, E3_Elution 3 nach Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose.

Durch simultane Überproduktion im Expressionsvektor pASK-IBA53ke und anschließender Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose konnte sowohl die α - als auch die β -Untereinheit des P1-Proteins der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* als rekombinante Proteine gereinigt werden. Der proteolytische Abbau der α -Untereinheit des P1-Proteins konnte so verhindert werden.

3.4.2. Lipoylierung des P2-Proteins der Glycin-Decarboxylase von *E. acidaminophilum*

Das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase ist die zentrale Komponente dieses Enzymkomplexes (s. S. 5, Abb. 2) und trägt als prosthetische Gruppe Liponsäure. Diese ist mit einem ubiquitär hoch konservierten Lysin-Rest über eine Peptidbindung mit dem Protein fest verknüpft ist (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; KOPRIVA *et al.*, 1996b; NAGARAJAN and STORMS 1997; PARES *et al.*, 1995). Man unterscheidet zwei Wege der Lipoylierung von Proteinen, den endogenen und den exogenen Weg. Bei erstem wird nach Aktivierung von Octansäure durch Bindung an das ACP (Acyl-Carrier-Protein) diese durch LipA zweimal sulfuniliert und in Liponsäure umgewandelt und anschließend durch LipB (Lipoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Protein-*N*-Lipoyltransferase) auf das Apoprotein übertragen. Beim exogenen Weg wird durch die Zellmembran aufgenommene Liponsäure durch Lipoat-Protein-Ligase A (LplA) unter ATP-Verbrauch direkt auf das Zielprotein übertragen (MORRIS *et al.*, 1994). Für *E. coli* konnten sowohl die Gene *lipA* und *lipB* als auch das Gen *lplA* beschrieben werden (MORRIS *et al.*, 1995; REED and CRONAN 1993). Für *E. acidaminophilum* konnte der konservierte, für die Lipoylierung essentielle Lysinrest nachgewiesen werden (POEHLEIN 2003).

3.4.2.1. Synthese des P2-Proteins in Gegenwart von Liponsäure

E. coli ist in der Lage, Liponsäure direkt über die Zellmembran aufzunehmen und mit Hilfe der Lipoat-Protein-Ligase A (LplA) diese auf die entsprechenden Zielproteine zu übertragen (MORRIS *et al.*, 1995). Bei der heterologen Überproduktion des P2-Proteins aus *E. acidaminophilum* sollte durch Zugabe von Liponsäure zum Kultivierungsmedium des entsprechenden Expressionsstammes (*E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL mit dem Plasmid pP2CW) die Lipoylierung des überproduzierten P2-Proteins gewährleistet werden.

Die Synthese des P2-Proteins in *E. coli* erfolgte in 1 l LB-Selektivmedium (125 µg/ml Amp und 30 µg/ml Chl) und unter Zugabe von 500 µg/ml Liponsäure 30 min vor Induktion des *tet*-Promotors mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin. Die Präparation des Rohextraktes erfolgte aus dem Pellet von 100 ml Kultur, die Reinigung des heterolog synthetisierten P2-Proteins durch Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose, wurde wie unter 3.4.1.3. beschrieben, durchgeführt. Das gereinigte Protein wurde anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat überprüft.

Durch MALDI-MS-Analyse konnten für das heterolog synthetisierte P2-Protein (C-terminal mit *Strep-tag*[®] II fusioniert) Massen von ca. 15,154 kDa und 15,342 kDa bestimmt werden (A. SCHIERHORN, pers. Mitteilung). Aus der Aminosäuresequenz leiteten sich ein theoretischer Wert für das P2-Apoprotein von 15,285 bzw. 15,145 kDa und ein Wert von 15,342 bzw. 15,202 kDa (mit bzw. ohne Initiationsmethionin) für

das P2-Holoenzym ab. Das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase konnte also in der Holoform, d. h. mit Liponsäure als funktionelle Gruppe heterolog in *E. coli* synthetisiert werden.

3.4.3. Expression der Gene des Thioredoxin-Systems von *E. acidaminophilum* als Strep-tag® II-Fusionsproteine

Essentiell für die Funktion des Multienzym-Komplexes der Glycin-Decarboxylase ist neben den Komponenten P1, P2 und P4 das vierte zu diesem System gehörende Protein, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Dieses Enzym reoxidiert die Thiole der Liponsäuregruppe des P2-Proteins, welche nach Spaltung der Aminomethylgruppe reduziert vorliegen, zum Disulfid. Die resultierenden Elektronen werden dabei über gebundenes FAD auf NAD⁺ bzw. NADP⁺ übertragen (ANDREESEN 1994b). Für *E. acidaminophilum* konnte bisher als Ausnahme keine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase isoliert bzw. beschrieben werden (DIETRICH *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991; POEHLIN 2003). Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität wurde bei diesem Organismus stattdessen von dem Thioredoxin-System, bestehend aus Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin, wahrgenommen. Mit dessen Hilfe werden die bei der Glycin-Oxidation freiwerdenden Elektronen direkt oder über NADP(H) auf das Protein A der Glycin-Reduktase übertragen (ANDREESEN 1994b; MEYER *et al.*, 1991). Um eine mögliche Funktion von PrpU als Komponente im Aminosäurestoffwechsel von *E. acidaminophilum* zu klären, mussten auch die beiden Komponenten des Thioredoxin-Systems, die Thioredoxin-Reduktase und das Thioredoxin, heterolog in *E. coli* überproduziert und gereinigt werden, zumal die Interaktionsstudien bereits darauf hingewiesen hatten, dass PrpU mit Thioredoxin interagiert.

3.4.3.1. Klonierung von *trxB* und *trxA* in den Expressionsvektor pASK-IBA3

Zur Überproduktion der Komponenten des Thioredoxin-Systems aus *E. acidaminophilum* wurde das Expressionsplasmid pASK-IBA3 gewählt, da mit diesem Vektor für die Komponenten der Glycin-Decarboxylase gute Resultate erzielt wurden. Das Gen *trxB*, welches für die Thioredoxin-Reduktase codiert, wurde mit den Primern TRXB-F und TRXB-R und das Gen *trxA*, codierend für Thioredoxin, wurde mit den Primern TRXA-F und TRXA-R durch PCR mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2.5) an chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* amplifiziert. Es wurden Fragmente mit einer Größe von 1 kb (*trxB*) und einer Größe von 0,3 kb (*trxA*) erhalten, was den Größen beider Gene entspricht (Daten nicht gezeigt). Die amplifizierten PCR-Produkte sowie das Plasmid pASK-IBA3 wurden mit BsaI verdaut, miteinander ligiert und in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert. Aus jeweils drei der entstandenen Klone wurden die Plasmide isoliert und die Sequenz der Inserts überprüft. Ein Plasmid mit korrektem Insert wurde mit pTRCW (Thioredoxin-Reduktase) und das andere mit pTrxCW (Thioredoxin) bezeichnet.

3.4.3.2. Synthese und Reinigung von heterologer Thioredoxin-Reduktase und heterologem Thioredoxin

Zur heterologen Synthese der Thioredoxin-Reduktase und des Thioredoxins aus *E. acidaminophilum* wurde auch hier *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL verwendet, welcher speziell für die Überproduktion von Proteinen aus Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt geeignet ist (3.4.1.2.).

Beide Hybrid-Plasmide wurden jeweils in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert und jeweils 6 Klone einer Testsynthese im 20 ml Maßstab, wie unter 3.4.1.2. beschrieben, unterzogen. Sowohl für die Synthese von Thioredoxin-Reduktase als auch für die Überproduktion von Thioredoxin konnte bei allen 6 getesteten Stämmen eine zusätzliche Proteinbande bei 35 kDa (Thioredoxin-Reduktase) bzw. 13 kDa (Thioredoxin) mittels SDS-PAGE sichtbar und im Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II durch StrepTactin-HRP-Konjugat detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Synthese beider Proteine erfolgte analog zu 3.4.1.3. im 1 l Maßstab in LB-Selektivmedium (125 µg/ml Amp und 30 µg/ml Chl) und Induktion des *tet*-Promotors mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin.

Die Präparation des Rohextraktes und die Reinigung der heterolog überproduzierten Proteine erfolgte auch hier aus dem Pellet von 100 ml Kultur. Nach Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose eluierte die Thioredoxin-Reduktase innerhalb der dritten und vierten Fraktion (Abb. 26 A) mit einem Proteingehalt von 5,6 µg/µl. Die proteinhaltigen Fraktionen waren durch eine intensive Gelbfärbung gekennzeichnet, was auf den FAD-Gehalt der rekombinanten Thioredoxin-Reduktase zurückzuführen ist. Die heterolog synthetisierte Thioredoxin-Reduktase zeigte ein für FAD-haltige Proteine charakteristisches Absorptionsspektrum (Anhang A.X.) Das rekombinante Thioredoxin eluierte vollständig innerhalb der dritten Fraktion (Abb. 26 B) mit einem Proteingehalt von 2 µg/µl. Aus jeweils 100 ml Kulturvolumen konnten 2,8 mg rekombinante Thioredoxin-Reduktase und 1 mg rekombinantes Thioredoxin durch Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose gereinigt werden.

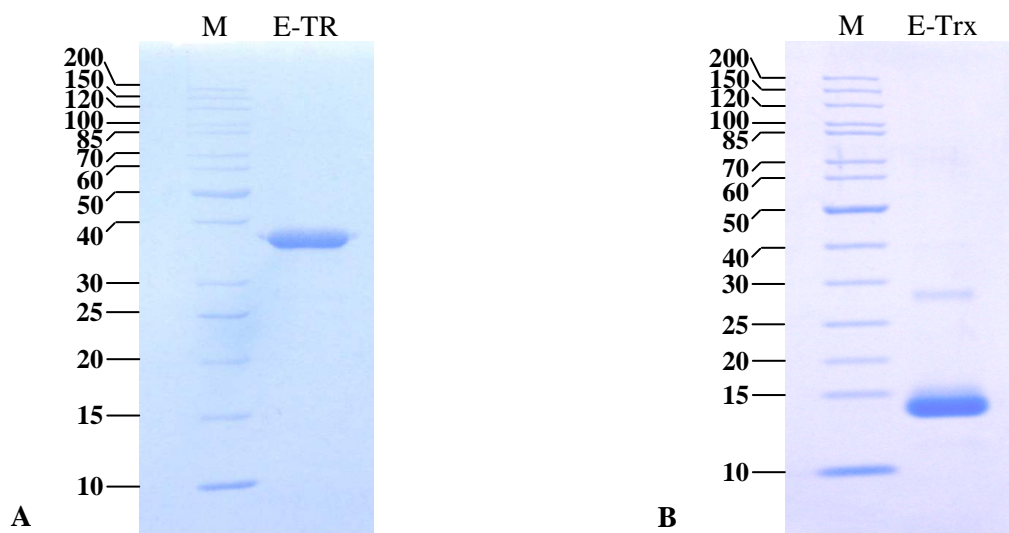


Abb. 26: Reinigung der rekombinanten Proteine Thioredoxin-Reduktase (A) und Thioredoxin (B) an StrepTactin-Sepharose nach Überproduktion im Expressionsvektor pASK-IBA3. Die Proben wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel (A) bzw. in einem Schägger-Gel (B) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M_Molekulargewichtsmarker, E-TR_Elution 4 der Affinitätschromatographie von Thioredoxin-Reduktase (2 µg) und E-Trx_Elution 3 der Affinitätschromatographie von Thioredoxin (5 µg).

3.4.4. Expression der Gene der Selenoproteine PrpU und GrdA und deren Cystein-Mutanten in *E. coli*

Die Proteine PrpU und GrdA weisen in ihrer Aminosäuresequenz ein Selenocystein auf. Der Einbau dieser seltenen Aminosäure erfolgt cotranslational durch ein UGA-Codon. Das Vorhandensein einer Selenocystein-spezifischen-tRNA und des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors SelB (FORCHHAMMER *et al.*, 1991; LEINFELDER *et al.*, 1988) ist dafür essentiell. Durch ihn erfolgt die Erkennung der SECIS-Struktur (*selenocysteine insertion sequence*), einer mRNA-Sekundärstruktur, welche *downstream* des für Selenocystein codierenden UGA-Codons zu finden und ebenfalls essentiell für die Inkorporation von Selenocystein in die Polypeptidkette ist. *E. coli*-SelB ist nicht in der Lage, SECIS-Elemente aus *E. acidaminophilum* zu erkennen, hier kommt es entweder zum Einbau von Tryptophan, der so genannten Tryptophan-Suppression (FORCHHAMMER *et al.*, 1989; HIRSH and GOLD 1971; LEINFELDER *et al.*, 1988) bzw. zum Abbruch der Translation und somit zu einem verkürzten Protein (SCOLNICK *et al.*, 1968). Erst durch die Arbeiten von GURSINSKY (2002) war es möglich, die Gene der Selenoproteine aus *E. acidaminophilum* heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Durch parallele Expression von *selB_{EA}* und *selC_{EA}* mit dem Gen des entsprechenden Selenoproteins in *E. coli* erfolgte die Erkennung des SECIS-Elementes aus *E. acidaminophilum* durch SELB_{EA} und ein Einbau von Selenocystein in das heterolog synthetisierte Protein (GURSINSKY 2002; GURSINSKY *et al.*, 2008).

3.4.4.1. Klonierung von *grdA3* und *prpU* in das Expressionsplasmid pASK-IBA3plus

Da die Gene *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* auf einem pACYC184-Derivat codiert sind (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985), ist es nicht möglich, die Selenoproteine im Stamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL zu synthetisieren, da das in diesem Expressionsstamm enthaltene RIL-Plasmid (3.4.1.2.) ebenfalls ein pACYC184-Derivat ist, was zu einer Inkompatibilität beider Plasmide führt. Vorangegangene Arbeiten (GRÖBE 2001) zeigten, dass eine Synthese von Wildtyp-Selenoproteinen mit Hilfe des Expressionsvektors pASK-IBA3 im Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ nur zu sehr geringen Expressionsraten führte. Aus diesem Grund sollte neben diesem Vektor eine variierte Form dieses Expressionsplasmides, pASK-IBA3plus, zur Anwendung kommen. Eine veränderte Translations-Initiations-*site* ermöglicht eine wesentlich höhere Produktion an heterolog synthetisiertem Protein (www.iba-go.de).

Für spätere Untersuchungen sollten sowohl die Selenocystein- als auch die Cystein-Varianten der Gene *prpU* und *grdA* heterolog überexprimiert werden. Da sich während dieser Arbeit die C-terminale Fusion mit dem Strep-tag[®] II als besser geeignet erwies, sollte auch die Synthese und Reinigung dieser beiden Proteine über eine C-terminale Translationsfusion erfolgen.

Durch GRÖBE (2001) wurden bereits das Wildtyp-*prpU* und dessen Cystein-Variante (Umwandlung des *in frame* TGA-Codons zu dem Cystein-Codon TGC durch gerichtete Mutagenese) in das Expressionsplasmid pASK-IBA3 kloniert. Nur im Fall der Cystein-Variante konnte mittels SDS-PAGE und Western-Blot-

Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat eine Synthese von heterologem PrpU detektiert werden. Eine Überproduktion des Wildtyp-PrpU konnte nicht nachgewiesen werden. Das Gen *grdA*, welches für das Selenoprotein GrdA codiert, lag zu Beginn dieser Arbeit als Wildtyp- bzw. Cystein-Variante, kloniert in das Expressionsplasmid pASK-IBA3, vor (J. JÄGER, pers. Mitteilung). Es konnten während dieser Arbeit weder für das Wildtyp-Protein noch für die Cystein-Mutante mit diesen vorliegenden Konstrukten eine Synthese nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollten die Gene beider Proteine als Wildtyp-Variante und im Fall von GrdA auch die Cystein-Variante erneut in pASK-IBA3 und zusätzlich in pASK-IBA3plus kloniert werden, um diese Proteine heterolog zu synthetisieren.

Die Gene *prpU* und *grdA* wurden durch PCR mit den Primern prpUIBA3f und prpUP2I3 bzw. GrdAIBA3f und GrdAIBA3r amplifiziert, wobei chromosomale DNA im Fall der Amplifikation der Wildtyp-Gene bzw. das Plasmid pMUA36 (J. JÄGER, pers. Mitteilung) im Fall der Amplifikation der Cystein-Variante von *grdA* als *template* dienten. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit BsaI bzw. mit BpiI (*grdA*) verdaut und in die mit BsaI behandelten Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA3plus ligiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺. Aus jeweils drei der entstandenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und das Insert mittels Sequenzierung überprüft. Die Hybrid-Plasmide wurden entsprechend der Klonierung in pASK-IBA3 mit pPrpUCW (*prpU*), pPACW bzw. pPACM (Wildtyp-*grdA* bzw. Cystein-Mutante von *grdA*) und pPrpUCW+ (*prpU*), pPACW+ bzw. pPACM+ (Wildtyp-*grdA* bzw. Cystein-Mutante von *grdA*) im Fall der Klonierung in pASK-IBA3plus bezeichnet. Bei der Sequenzierung aller Plasmide, welche die Wildtyp-Gene von *grdA* trugen, zeigte sich, dass in jedem Fall *grdA3* amplifiziert und kloniert wurde. Auf die Anzahl der im Genom von *E. acidaminophilum* vorkommenden Kopien von *grdA* und weiteren Genen des Glycin-Metabolismus wurde im Abschnitt 3.1. näher eingegangen.

3.4.4.2. Testexpression der Gene der Selenoproteine PrpU und GrdA als *Strep-tag*[®] II-Translationsfusion in *E. coli*

Wie bereits erwähnt, konnte die heterologe Synthese von Selenoproteinen nur mit Hilfe des von GURSINSKY *et al.* (2008) etablierten Plasmides pASBC4 in *E. coli* durchgeführt werden. Auf Grund der Inkompatibilität dieses Plasmides mit dem im Expressionstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL enthaltenen RIL-Plasmid war die Expression in diesem Stamm nicht möglich. Daher wurde zunächst eine Testsynthese der beiden Selenoproteine PrpU und GrdA im Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ durchgeführt.

Die Testsynthese erfolgte in 20 ml LB-Selektivmedium, als Inokulum diente eine ebenfalls in LB-Selektivmedium gewachsene Übernacht-Kultur. Nach dreistündiger Induktion des *tet*-Promotors der Expressionsplasmide erfolgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag*[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat. Für das heterolog exprimierte *grdA* konnte in einer 17,5%igen SDS-PAGE eine zusätzliche Proteinbande mit einer Größe von ca. 20 kDa im Vergleich zur nichtinduzierten Probe bei der Synthese durch pASK-IBA3plus sichtbar gemacht werden. Eine Bande

analoger Größe konnte ebenfalls im Western-Blot nachgewiesen werden. 20 kDa entspricht der Größe von heterolog exprimiertem *grdA* fusioniert mit dem *Strep*-tag[®] II. Bei der Überproduktion mit Hilfe des Vektors pASK-IBA3 konnte keine zusätzliche Bande identifiziert werden. Also war die Verwendung von pASK-IBA3plus notwendig.

Für PrpU konnte weder in der SDS-PAGE noch durch Western-Blot eine zusätzliche Bande bei Synthese durch pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA3plus sichtbar bzw. detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher erfolgte eine weitere Testsynthese der Proteine PrpU und GrdA im Stamm *E. coli* BL21(DE3). Die Überproduktion beider Proteine erfolgte auch hier mit Hilfe der Plasmide pASK-IBA3 und pASK-IBA3plus. Die Analyse der nach Testexpression gewonnenen Proben erfolgte ebenfalls durch SDS-PAGE und Western-Blot-Nachweis des *Strep*-tag[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat. Bei der Synthese beider Proteine durch das Plasmid pASK-IBA3plus konnte für PrpU eine zusätzliche Bande bei ca. 12 kDa und für GrdA eine bei ca. 20 kDa sichtbar detektiert werden. Bei Expression mittels pASK-IBA3 konnte auch in diesem Stamm weder für *prpU* noch für *grdA* eine Überproduktion der Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da die Expression des Wildtyp-*grdA* im Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF[™] wesentlich schwächer war, als im Stamm *E. coli* BL21(DE3), wurde letzterer auch für die weiteren Versuche für die Expression von Wildtyp-*grdA* verwendet.

Die Synthese der Cystein-Mutanten von PrpU und GrdA erfolgte im Stamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL. Für beide Proteine wurden nach Testsynthese und anschließender SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Analyse zusätzliche Banden mit Größen von ca. 12 kDa (PrpU) bzw. ca. 20 kDa (GrdA) visualisiert bzw. detektiert.

3.4.4.3. Synthese und Reinigung von Wildtyp-PrpU und -GrdA und deren Cystein-Varianten

Die Überproduktion beider Wildtyp-Proteine erfolgte im Stamm *E. coli* BL21(DE3) analog zu 3.4.1.3. im 1 l Maßstab in LB-Selektivmedium (125 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol) und dreistündiger Induktion des *tet*-Promotors mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin. Die Überproduktion der Cystein-Mutanten von PrpU und GrdA erfolgte im Stamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL.

Die Präparation des Rohextraktes erfolgte aus dem Pellet von 100 ml Kultur (Cystein-Varianten von PrpU und GrdA), von 200 ml (Wildtyp-GrdA) bzw. von 250 ml Kultur bei Wildtyp-PrpU. Nach Bindung des Rohextraktes an StrepTactin-Sepharose wurden die ungebundenen Proteine durch Waschen mit 5x1 ml PufferW entfernt und die überproduzierten und mit *Strep*-tag[®] II-fusionierten Proteine mit 6x0,5 ml PufferW mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C und unter Gravitationsfluss.

Anschließend wurden die einzelnen Säulenläufe mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Nachweis des *Strep*-tag[®] II mittels StrepTactin-HRP-Konjugat überprüft und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Elutionsfraktionen mittels BRADFORD-Test bestimmt.

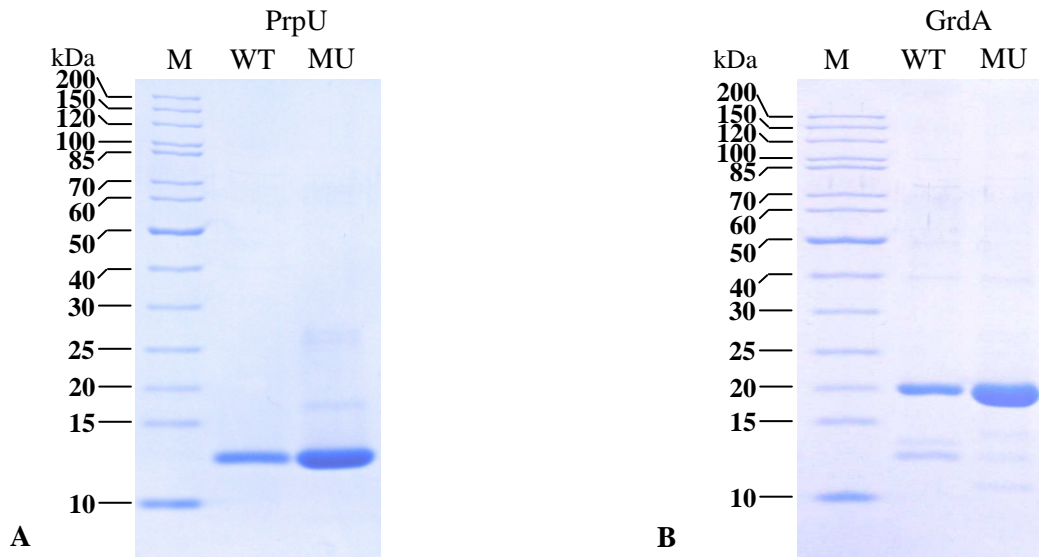


Abb. 27: Reinigung der rekombinanten Selenoproteine PrpU (A) und GrdA (B) und deren Cystein-Varianten an StrepTactin-Sepharose nach Synthese im Expressionsvektor pASK-IBA3plus. Die Proben wurden in einem Schägger-Gel (SCHÄGGER 2006) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M_Molekulargewichtsmarker, WT_Elutionsfraktion der Wildtyp-Proteine, MU_Elutionsfraktion der Cystein-Variante der Proteine PrpU und GrdA nach Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose. Es wurden jeweils 2 μg der Wildtyp-Proteine und jeweils 5 μg der Cystein-Varianten beider Proteine aufgetragen.

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass sowohl die Wildtyp-Proteine PrpU und GrdA als auch deren Cystein-Varianten innerhalb der dritten Elutionsfraktion mit Proteinkonzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (PrpU-WT), 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (PrpU-MU), 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (GrdA-WT) und 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (GrdA-MU) eluierten, wobei die beiden GrdA-Varianten nicht bis zur Homogenität gereinigt werden konnten. Somit konnten aus 250 ml Kulturvolumen 0,5 mg Wildtyp-PrpU und aus 100 ml Kulturvolumen 1 mg der Cystein-Variante von PrpU gereinigt werden. 0,5 mg Wildtyp-GrdA wurden aus 200 ml und 1,25 mg der Cystein-Variante von GrdA wurden aus 100 ml Kulturvolumen gereinigt. Am Beispiel des Selenoproteins PrpU wurde durch MALDI-MS-Analyse bestimmt, dass das heterolog synthetisierte Wildtyp-Protein aus einem Gemisch von Cystein-, Selenocystein- und Tryptophan-Varianten besteht (A. SCHIERHORN, pers. Mitteilung). Die Cystein-Variante des heterolog synthetisierten GrdA zeigte das bereits von DIETRICH *et al.* (1991) beschriebene Absorptionsspektrum mit Maxima bei 228, 277 und 411 nm sowie Schultern bei 252, 258, 265 und 268 nm (Anhang A.X.).

3.5. pull-down Experimente

Mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems konnten die Proteine P2 der Glycin-Decarboxylase, GrdA der Glycin-Reduktase und das Thioredoxin des Thioredoxin-Systems als putative Interaktionspartner des Selenoproteins PrpU identifiziert werden. Bei diesen Versuchen wurden gezielt ausgewählte Protein-Protein-Interaktionen untersucht. Durch *pull-down* Experimente sollten im Gesamtpool der cytosolischen Proteine aus *E. acidaminophilum* nach Interaktionspartner gesucht und die Ergebnisse der Interaktionsstudien durch das *lexA*-basierende *two-hybrid*-System bestätigt werden. Vorteil dieses Versuches

gegenüber dem *two-hybrid*-System war, dass die Proteine aus *E. acidaminophilum* nicht als Translationsfusionen, sondern nativ vorlagen, und man davon ausgehen konnte, dass diese Proteine korrekt gefaltet waren.

Zunächst wurde die Cystein-Variante von *prpU* mit Hilfe des Plasmides pPMI3 (GRÖBE 2001) im Stamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL heterolog exprimiert. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd in 500 ml LB-Selektivmedium bei 37 °C, nach dreistündiger Induktion des *tet*-Promotors mit Anhydrotetracyclin erfolgte die Ernte der Zellen. Die Präparation des Rohextraktes erfolgte aus dem Pellet von 100 ml Hauptkultur, wie unter 2.10.7.3. beschrieben. Nach Auftragung auf eine StrepTactin-Affinitätssäule wurden ungebundene Proteine durch Waschen der Säulen mit 5x1 ml PufferW entfernt und anschließend die gebundenen, heterolog synthetisierten und mit *Strep-tag*[®] II-fusionierten Proteine mit 2,5 mM Desthiobiotin im Puffer von der Säule eluiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C und unter Gravitationsfluss. Der Säulenlauf wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Wie in Abbildung 28 A zu erkennen, konnte PrpU homogen gereinigt werden, es eluierte fast vollständig innerhalb der dritten Elutionsfraktion mit einer Konzentration von 2 µg/µl.

Aus 2 g Glycin-gewachsener Zellen von *E. acidaminophilum* wurde der Rohextrakt, wie unter 2.10.7.3. beschrieben, präpariert und anschließend auf eine StrepTactin-Affinitätssäule aufgetragen. Die nichtgebundenen Proteine wurden durch Waschen der Säule mit 1,5 ml PufferW separiert. Durch diesen Schritt sollten die Proteine, die starke Wechselwirkungen mit der StrepTactin-Sepharose, aber nicht mit PrpU eingehen, aus dem Rohextrakt entfernt werden. Somit sollten falsch-positive Interaktionen ausgeschlossen werden.

1,5 ml des so präparierten Rohextraktes aus *E. acidaminophilum* wurden mit 500 µl homogenem gereinigtem, mit *Strep-tag*[®] II-fusioniertem PrpU (1 mg) 30 min bei RT inkubiert und das Proteingemisch anschließend einer erneuten Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose unterzogen. Die Elutionsfraktionen dieses Säulenlaufes wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese visualisiert (Abb. 28 B).

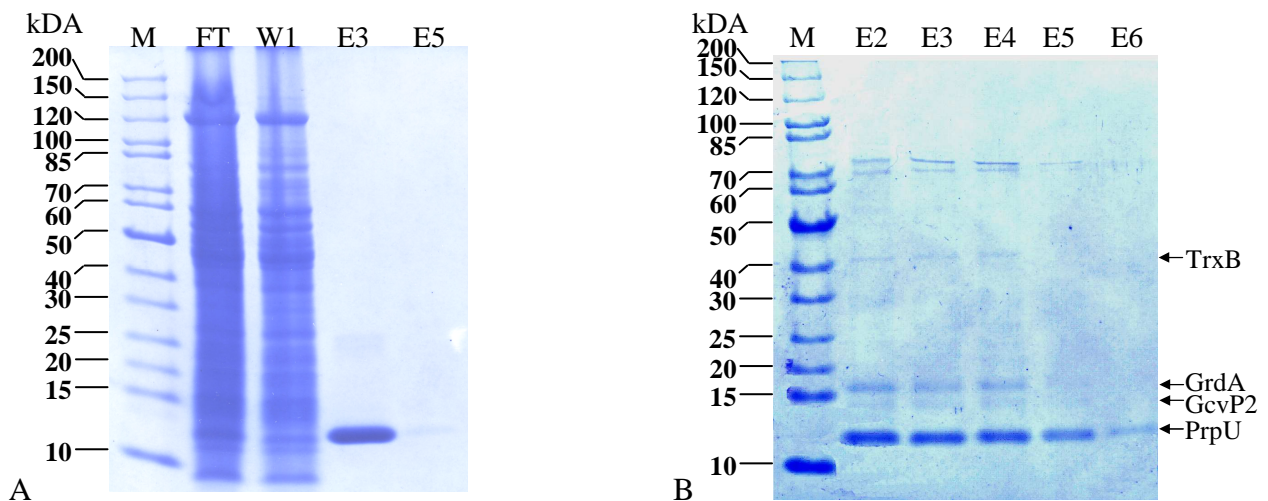


Abb. 28: Reinigung der Cystein-Variante des rekombinanten Selenoproteins PrpU an StrepTactin-Sepharose (A) und pull-down Experimente mit Rohextrakt aus *E. acidaminophilum* (B). Nach Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose wurden die Proben in einem Schägger-Gel (A, B) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M_Molekulargewichtsmarker, FT_Durchlauf, W1_1. Waschfraktion, E_Elutionsfraktionen

Wie in Abbildung 28 B zu erkennen ist, konnten neben einer ca. 12 kDa großen Bande, die dem heterolog synthetisierten, *Strep-tag*[®] II-fusionierten PrpU zuzuordnen ist, weitere Proteinbanden mit Größen von ca. 14, 16, 40, 70 und 73 kDa sichtbar gemacht werden. Durch Sequenzbestimmung mittels MALDI-MS-Analyse konnten diese dem P2-Protein der Glycin-Decarboxylase (14,1 kDa), GrdA der Glycin-Reduktase (16,6 kDa) und der Thioredoxin-Reduktase (34,3 kDa) aus *E. acidaminophilum* zugeordnet werden. Den beiden größeren Banden konnten keine bekannten Proteine aus *E. acidaminophilum* zugeordnet werden (A. SCHIERHORN, pers. Mitteilung).

Als Kontrolle wurde eine Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose nur mit Rohextrakt von *E. acidaminophilum* durchgeführt, hier konnten keine Proteinbanden in den Elutionsfraktionen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Weitere *pull-down* Experimente wurden auch mit heterolog synthetisiertem, an StrepTactin-Sepharose gereinigtem P2-Protein, GrdA und Thioredoxin mit Rohextrakt von *E. acidaminophilum* durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnten keine potentiellen Interaktionspartner identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

3.6. Aktivitätstests zur Bestimmung der Funktion von PrpU

Wie bereits erwähnt, ist der Glycin-Decarboxylase-Enzymkomplex von *E. acidaminophilum* durch das Fehlen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase und der Übernahme dieser essentiellen Funktion durch die NADP(H)-abhängige Thioredoxin-Reduktase im Zusammenspiel mit dem Thioredoxin und dem GrdA der Glycin-Reduktase gekennzeichnet (DIETRICHS *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991). Die bisher dargelegten Untersuchungen wiesen auf eine direkte Beteiligung des Selenoproteins PrpU am Glycin-Metabolismus von *E. acidaminophilum* hin. Durch Enzym-*assays* mit Hilfe der heterolog synthetisierten Proteinen der Glycin-Decarboxylase (GcvP4, GcvP2 und GcvP1 $\alpha\beta$), des Thioredoxin-Systems (Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin), dem Selenoprotein GrdA und PrpU selbst, sollten diese Resultate in der gesamten Kette verifiziert werden. Zum einen sollte eine mögliche Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase durch PrpU (analog zum GrdA) gezeigt und zum anderen eine Komplementation des Glycin-Decarboxylase-Enzymkomplexes durch PrpU aufgezeigt werden.

3.6.1. Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase

Mit Hilfe des Thioredoxin-System-Tests mit NADPH und Lipoamid konnte von DIETRICHS (1991) und MEYER (1991) gezeigt werden, dass sowohl Thioredoxin als auch GrdA als so genannte Aktivator-Proteine der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase fungieren. Da ein Vergleich der

Aminosäure-Sequenzen von PrpU und Thioredoxin eine gewisse Ähnlichkeit beider Proteine aufzeigte (POEHLEIN 2003), sollte mit diesem Versuch gezeigt werden, ob PrpU ebenfalls in der Lage ist, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase zu stimulieren.

Die Wildtyp- und die Cystein-Varianten der Proteine GrdA und PrpU sowie die Thioredoxin-Reduktase und das Thioredoxin wurden heterolog in *E. coli* synthetisiert und durch Affinitätschromatographie in StrepTactin-Sepharose gereinigt (3.4.4.2; 3.4.3.2.). Die Aktivität der Proteine des Thioredoxin-Systems wurde zunächst durch die von MEYER (1991) beschriebenen Komplementationstests überprüft.

Zunächst wurde die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase alleine, in Kombination mit dem Thioredoxin bzw. bei Anwesenheit von Thioredoxin und GrdA, ermittelt. Dabei wurden jeweils 10 µg heterolog synthetisierte, homogen gereinigte Thioredoxin-Reduktase und GrdA sowie 5 µg Thioredoxin eingesetzt. Die hierbei ermittelten spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase (Thioredoxin-System-Test mit NADPH und Lipoamid (MEYER *et al.*, 1991); 2.11.2.)

Protein-Kombinationen	ermittelte spez. Aktivität U/mg ¹	
TR	0,36	(±0,04)
TR+Trx	0,67	(±0,10)
TR+Trx+GrdA	0,91	(±0,09)
TR+Trx+PrpU	0,64	(±0,12)
TR+Trx+GrdA+PrpU	0,87	(±0,15)
TR+ PrpU	0,40	(±0,04)

¹ Die Messwerte basieren auf dem Durchschnitt einer Dreifach-Bestimmung

Die von DIETRICH (1991) und MEYER (1991) beschriebene Stimulation der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase durch Thioredoxin und vermehrt noch durch GrdA konnte für die heterolog synthetisierten Proteine ebenfalls gezeigt werden. Während die Thioredoxin-Reduktase eine Aktivität von 0,36 U/mg zeigte, konnte diese durch Zugabe von Thioredoxin nahezu verdoppelt werden (0,67 U/mg). Eine weitere Steigerung der Aktivität konnte durch das Protein GrdA erzielt werden (0,91 U/mg). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass PrpU die Funktion von GrdA als Elektronencarrier in diesem Fall nicht ersetzen kann. Die spezifischen Aktivitäten von 0,64 U/mg, die bei diesem Ansatz (Thioredoxin-Reduktase+Thioredoxin+PrpU) ermittelt wurden, sind mit denen zu vergleichen, die bei dem Ansatz mit Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin erhalten wurden. Jedoch lagen die hier ermittelten Werte deutlich unter denen von DIETRICH (1991) und MEYER (1991) bestimmten Messergebnissen. Dies könnte u. a. durch die heterologe Proteinsynthese und die Fusion mit dem für die Reinigung essentiellen *Strep*-tag[®] II bedingt sein.

Wie in Tabelle 10 (s. S. 68) zu erkennen ist, konnte durch Zugabe von PrpU zuletzt beschriebenem Messansatz (Thioredoxin-Reduktase+Thioredoxin+GrdA) keine weitere Erhöhung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase verzeichnet werden. Auch PrpU allein konnte die Aktivität der Thioredoxin-Reduktase ohne Thioredoxin nicht stimulieren. Die Zugabe von größeren Mengen PrpU (bis zu 100 µg) zu allen hier beschriebenen Meßansätzen hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase.

Auch die Kombination der Messansätze mit den Wildtyp-Varianten der Selenoproteine GrdA und PrpU erbrachte keine Unterschiede zu den in Tabelle 10 dargestellten Messwerten (Daten nicht gezeigt).

3.6.2. Glycin-Decarboxylase-Test

Mit Hilfe des lichtoptischen Tests (KLEIN and SAGERS 1967a) zur Bestimmung der Glycin-Decarboxylase-Aktivität sollte die oxidative Decarboxylierung von Glycin durch die heterolog synthetisierten Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* gezeigt werden. Des Weiteren sollte mit diesem Test eine mögliche Beteiligung von PrpU z. B. durch Ersetzen der in diesem Organismus fehlenden, eigenständigen Dihydrolipoamid-Dehydrogenase gezeigt werden. Grundlage dieses Testes ist die Übertragung der bei der Decarboxylierung des Glycins durch die Komponenten der Glycin-Decarboxylase freiwerdenden Elektronen auf NAD⁺ bzw. NADP⁺.

Zunächst wurde dieser Test (2.11.4.) mit Rohextrakt aus *E. acidaminophilum* durchgeführt, um die optimalen Pufferbedingungen zu testen. Die höchste Glycin-Decarboxylase-Aktivität konnte dabei bei der Verwendung von 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8,0 gemessen werden. Hierbei wurden spezifische Aktivitäten von 0,042 U/mg ($\pm 0,001$) erhalten, was mit den von FREUDENBERG (1987) bestimmten Werten von 0,041 U/mg sehr gut übereinstimmt. Unter diesen Pufferbedingungen wurden alle weiteren Tests durchgeführt.

Zu Beginn dieses Versuches sollte die Aktivität der zum Enzymkomplex der Glycin-Decarboxylase gehörenden Proteine, der beiden Untereinheiten des P1-Proteins; GcvP1 α und GcvP1 β , des P2- und des P4-Proteins durch den von KLEIN und SAGERS (1967) beschriebenen Test, komplettiert durch eine kommerziell erworbene Diaphorase (Sigma, Taufkirchen), überprüft werden. Die Aktivität der Diaphorase wurde vorab durch den ebenfalls von KLEIN und SAGERS (1967) beschriebenen Test überprüft.

Leider konnte durch diesen Test keine Glycin-Decarboxylase-Aktivität der heterolog synthetisierten Proteinkomponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* gemessen werden. Auch eine Erhöhung der Proteinmengen im Messansatz führte zu keinem Resultat. Daher konnte eine mögliche Beteiligung von PrpU an diesem Stoffwechselweg auf diesem Weg nicht gezeigt werden.

Da bei diesem Versuchsansatz nur die Glycin-Decarboxylase-Reaktion im Gesamten betrachtet wird, das gemessene Resultat also als Ergebnis aller Einzelreaktionen zu sehen ist, kann keine Aussage getroffen werden, welches der drei überproduzierten Proteine inaktiv war, oder ob sogar zwei oder alle drei Proteine

keine oder nur eine unzureichende Aktivität zeigten. Die eigentliche Decarboxylierung, katalysiert durch die Proteine P1 und P2, war nur durch den Einsatz radioaktiver Agenzien wie $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin bzw. ^{14}C -Bicarbonat (KLEIN and SAGERS 1966a; MOTOKAWA and KIKUCHI 1969) zu bestimmen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Der durch das P4-Protein katalysierte Transfer der Aminomethylgruppe auf THF konnte nur mit Hilfe der Proteine P1, P2 und P3 bzw. einer Diaphorase gezeigt werden (KLEIN and SAGERS 1967a).

Es sei schon an diesem Punkt der Ausführungen erwähnt, dass die ersten Schritte weiterführender Arbeiten in der Bestimmung der Aktivitäten der einzelnen Enzymkomponenten liegen sollten, und wenn möglich, in der Optimierung der Reinigung der Proteine und der Testbedingungen zu Bestimmung der Glycin-Decarboxylase-Aktivität der heterolog synthetisierten Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum*.

4. Diskussion

4.1. Die Transkription des Glycin-Decarboxylase-Operons

Im Genom von *E. acidaminophilum* sind die Gene der Komponenten der Glycin-Decarboxylase in identischer Transkriptionsrichtung in einem Operon mit der Anordnung *gcvP4* (Aminomethyl-Transferase), *gcvP2* (*hydrogen carrier Protein*), *gcvP1 α* (α -Untereinheit der Decarboxylase) und *gcvP1 β* (β -Untereinheit der Decarboxylase), gefolgt von den Genen *thf* (Formyl-THF-Synthetase) und *prpU* (PrpU), organisiert (s. S. 46, Abb. 8).

Die bei *E. acidaminophilum* vorliegende Organisation der Gene konnte sowohl in den Genomen von *Clostridium sticklandii*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* (BAO *et al.*, 2002), *Thermus thermophilus* als auch in *Thermotoga maritima* (NELSON *et al.*, 2001) gefunden werden (Abb. 29). Während bei *Neisseria meningitidis* die Gene *gcvT* und *gcvH* in gleicher Transkriptionsrichtung assoziiert vorliegen, ist das Gen *gcvP* in einem anderen Genomabschnitt lokalisiert (Abb. 29). Das native P-Protein aus diesem Organismus besteht aus einem Homodimer wie z. B. bei *E. coli* (PARKHILL *et al.*, 2000). Bei *Pyrococcus horikoshii* hingegen sind nur die beiden Gene des aus zwei Untereinheiten bestehenden P1-Proteins miteinander assoziiert, sowohl das Gen der Aminomethyl-Transferase als auch des H-Proteins (*hydrogen carrier Protein*) liegen mit identischer Transkriptionsrichtung jeweils in nicht miteinander assoziierten Bereichen des Genoms vor (KAWARABAYASI *et al.*, 1998). Bei *C. difficile* und *B. subtilis* sind die Gene *gcvP1 α* und *gcvP1 β* *downstream* von *gcvP4* lokalisiert, und bei beiden Organismen ist das Gen des P2-Proteins nicht mit diesen Genclustern assoziiert (SEBAIHIA *et al.*, 2006; TAKAMI *et al.*, 2000). Eine Sonderstellung nehmen hierbei jedoch die Gene des P4-Proteins und der α -Untereinheit des P1-Proteins aus *C. difficile* ein, da beide miteinander verschmolzen zu sein scheinen und für eine putative bi-funktionale Glycin-Dehydrogenase/Aminomethyl-transferase codieren (Abb. 29). Diese Art der Verschmelzung dieser beiden Komponenten konnte bisher nur für diesen Organismus auf Nukleinsäureebene gezeigt werden. Dieses Phänomen ist jedoch sowohl bei dem Stamm *C. difficile* 630 als auch bei dem Stamm *C. difficile* QCD-97b34 zu finden. Bei *Yersinia pestis* sind die Gene aller Komponenten der Glycin-Decarboxylase ebenfalls mit identischer Transkriptionsrichtung in einem Cluster organisiert, jedoch sind *gcvH* und *gcvT* *downstream* von *gcvP* lokalisiert, weisen also eine umgekehrte Orientierung zu der bisher beschriebenen Genanordnungen auf (PARKHILL *et al.*, 2001). In *Vibrio cholerae* liegt das Gen *gcvT* *upstream* der Gene *gcvH* und *gcvP* in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung und ist von diesen durch zwei offene Leserahmen getrennt. Während das eine, in gleicher Transkriptionsrichtung wie *gcvT* liegende Gen für ein hypothetisches Protein codiert, ist *upstream* von *gcvH* in identischer Transkriptionsrichtung das Gen einer Serin-Hydroxymethyltransferase zu finden (Abb. 29). Die Gene *gcvH* und *gcvP* liegen im Genom von *Mycobacterium tuberculosis* in identischer Transkriptionsrichtung vor, jedoch getrennt durch vier offene

Leseraster, welche für hypothetische Proteine codieren. Das Gen *gcvT* weist die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung auf und ist nicht mit diesem Genomabschnitt assoziiert.

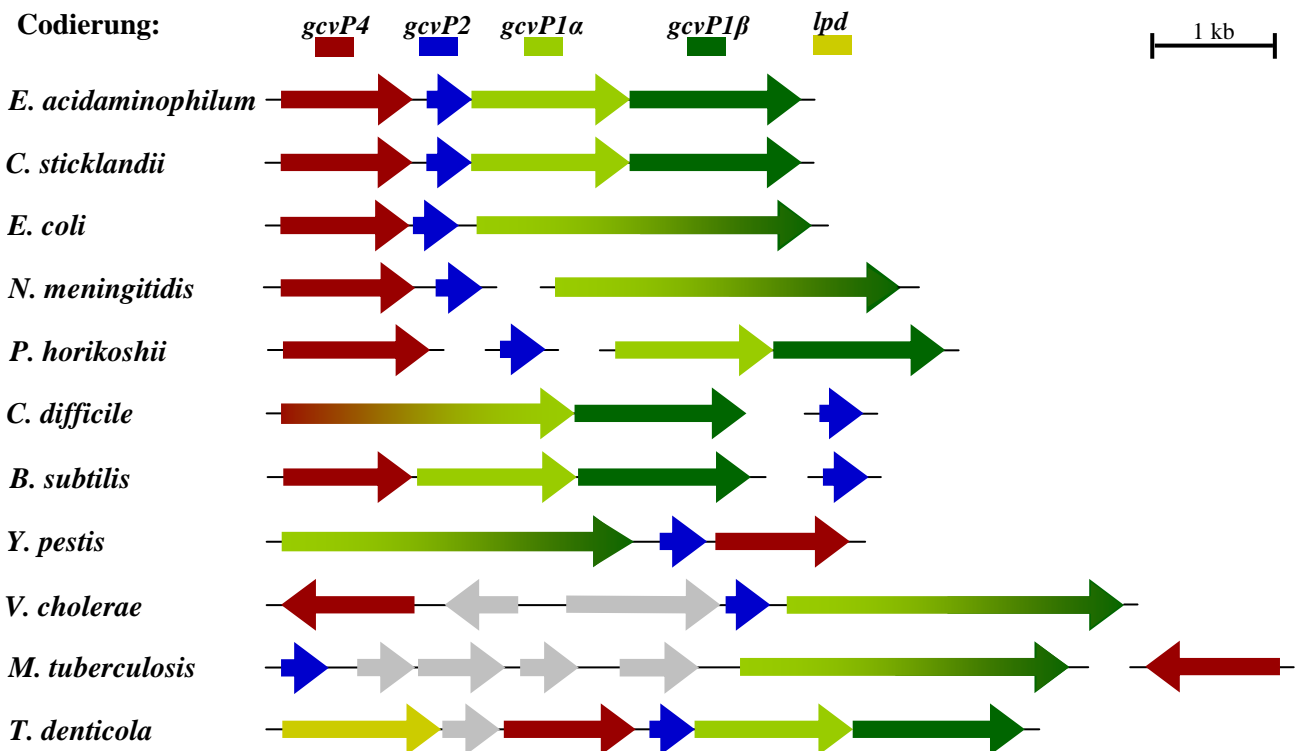


Abb. 29: Organisation der Gene der Komponenten der Glycin-Decarboxylase in den Genomen diverser Organismen: Die Anordnung der Gene der Glycin-Decarboxylase (*gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1α* und *gcvP1β*) und wenn direkt assoziiert, der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (*lpd*) in den Genomen folgender Organismen ist dargestellt: *E. acidaminophilum*, *C. sticklandii* (A. KREIMEYER, pers. Mitteilung), *E. coli* (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993), *P. horikoshii* (KAWARABAYASI *et al.*, 1998), *C. difficile* (SEBAIHIA *et al.*, 2006), *B. subtilis* (TAKAMI *et al.*, 2000), *N. meningitidis* (PARKHILL *et al.*, 2000), *Y. pestis* (PARKHILL *et al.*, 2001), *V. cholerae*, *M. tuberculosis* (FLEISCHMANN *et al.*, 2002) und *T. denticola* (SESHADRI *et al.*, 2004). Assoziierte Gene sind durch eine Linie verbunden. Bei nicht-assoziierten Genen wurden ebenfalls die Transkriptionsrichtung und die Lokalisation im jeweiligen Genom berücksichtigt. Zweifarbige Pfeile stehen für die Verschmelzung von zwei Genen.

Nur für *Treponema denticola* konnte eine fast direkte Assoziation des Gens des P3-Proteins (*lpd*), der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, gezeigt werden. Für *E. acidaminophilum* konnte weder auf Nukleinsäure- noch auf Proteinebene eine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase nachgewiesen werden (DIETRICH *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991; POEHLEIN 2003). Sowohl bei *E. coli* als auch bei *V. cholerae* und *M. tuberculosis* konnte im Genom nur eine Kopie dieses Gens nachgewiesen werden. Bei allen drei Organismen ist dieses mit den Genen der Komponenten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes assoziiert, wo es bei *E. coli* durch einen eigenständigen, direkt vor dem Gen gelegenen Promotor reguliert wird. Dieses Protein ist bei *E. coli* sowohl Komponente der Pyruvat-Dehydrogenase, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, des verzweigten Aminosäurestoffwechsels (*branched-chain fatty acid metabolism*) und des Acetoinstoffwechsels sowie der Glycin-Decarboxylase (CRONAN and LA PORTE 1996; OPPERMAN *et al.*, 1991; STEIERT *et al.*, 1990). Bei *N. meningitidis* und *Y. pestis* befindet sich eine Genkopie einer Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in enger Assoziation mit den Genen der Proteine des

Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und eine weitere Kopie in einem Cluster mit den Genen für die Proteine des 2-Oxoglutarat-Komplexes. Die Genome von *B. subtilis* und *C. difficile* hingegen weisen sogar drei Gene auf, die für eine Dihydrolipoamid-Dehydrogenase codieren. Bei *B. subtilis* sind diese Gene jeweils in einem Gencluster, codierend für die Komponenten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, des Fettsäurestoffwechsels bzw. des Acetoinstoffwechsels, organisiert. Bei *C. difficile* ist ebenfalls jeweils eine Genkopie im Cluster des Pyruvat- und des Acetoinstoffwechsels lokalisiert, die dritte Kopie hingegen ist 8 kb *upstream* von *gcvH* zu finden, wo sie von Genen für eine CO-Dehydrogenase, Formiat-THF-Ligase, Methenyl-THF-Cyclohydrolase bzw. Methylen-THF-Dehydrogenase flankiert wird. Durch die letzten drei Enzyme kann u. a. aus Formiat 5,10-Methylen-THF gebildet werden, was durch die Synthase-Aktivität der Glycin-Decarboxylase zu Glycin umgewandelt werden kann. Möglicherweise ist dieses Gen einer Dihydrolipoamid-Dehydrogenase die P3-Komponente des Glycin-Decarboxylase-Komplexes von *C. difficile*.

Für das Operon von *E. coli* konnte die gleiche Anordnung der Gene wie bei *E. acidaminophilum* gezeigt werden (Abb. 29), jedoch besteht auch bei diesem Organismus das P-Protein aus einem Homodimer, welches demzufolge nur durch ein entsprechend großes Gen codiert wird (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993). Die Gene der Glycin-Decarboxylase aus *E. coli* werden polycistronisch transkribiert, ein möglicher Transkriptionsstartpunkt des Operons wurde 104 nt *upstream* des Startcodons (ATG) von *gcvT* identifiziert, eine Terminatorstruktur, in diesem Fall Rho-abhängig, konnte nur *downstream* von *gcvP* identifiziert werden. Putative Promotorelemente bzw. Terminationsstrukturen konnten für die Gene *gcvH* und *gcvP* nicht gefunden werden (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993; STAUFFER *et al.*, 1993). Auch die Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons aus *E. acidaminophilum* werden polycistronisch transkribiert. Durch Northern-Blot-Analysen konnte sowohl eine gemeinsame Transkription der vier Gene *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* sowie *gcvP1 β* der Glycin-Decarboxylase als auch eine polycistronische Transkription mit den *downstream* lokalisierten Genen *thf* und *prpU*, welche für eine Formyl-THF-Synthetase und das Selenoprotein PrpU codieren, gezeigt werden (LECHEL 1999; POEHLEIN 2003). Durch RT-PCRs, die ebenfalls eine gemeinsame Transkription der Gene der Glycin-Decarboxylase mit *thf* und *prpU* zeigten, konnten nun die Resultate der Northern-Blot-Analysen bestätigt werden (s. S.48, Abb. 9). Durch Northern-Blot-Analysen konnten putative Einzeltranskripte für *gcvP1 α* , *gcvP1 β* , *thf* sowie *prpU* gezeigt werden. *primer-extension*-Analysen hingegen ergaben mögliche Transkriptionsstartpunkte nur *upstream* von *gcvP4*, *thf* und *prpU*, und eine Analyse der Nukleotidsequenz des Glycin-Decarboxylase-Operons ergab hingegen Terminatorstrukturen nur *downstream* von *gcvP1 β* , *thf* und *prpU* und putative Promotorelemente nur *upstream* von *gcvP4*, *thf* und *prpU*. Diese Resultate sprechen für eine polycistronische Transkription der Gene *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* und *gcvP1 β* zusammen mit *thf* und *prpU* und einer zusätzlichen monocistronischen Transkription der Gene *thf* und *prpU*. Zudem sprechen sie gegen Einzeltranskripte der Gene der Glycin-Decarboxylase-Komponenten, sodass die seinerzeit detektierten Transkripte möglicherweise unspezifisch bzw. Abbauprodukte sein können.

Die *upstream* der Transkriptionsstartpunkte von *gcvP4*, *thf* und *prpU* postulierten Promotorelemente 5'-TGTA₁₆ bp-ATGAAT-3', 5'-TTATA₁₃ bp-CAAAGC-3' bzw. 5'-CGGAGA₁₆ bp-TAATAT-3' zeigen

nur sehr geringe Übereinstimmung zu der Konsensussequenz 5'-TTGACA_{-17±1} bp-TATAAT-3' aus *E. coli* (HARLEY and REYNOLDS 1987) bzw. *B. subtilis* (HELMANN 1995). Auch ein von GRAVES und RABINOWITZ (1986) bzw. HELMANN (1995) postuliertes Promotorelement mit der Sequenz 5'-TNTG-3', welches bei stark von der Konsensussequenz abweichenden -10- und -35-Motiven einen positiven Effekt auf die Stärke des Promotors haben soll (VOSKUIL *et al.*, 1995), scheint hier keinen Einfluss zu haben. Im putativen Promotorelement von *thf* war dieses Motiv nicht zu finden, und in den anderen beiden Fällen wurde ein nicht optimaler Abstand zu dem -10-Motiv gefunden. Diese Aspekte sprechen für sehr schwache Promotoren und eine andere Regulation der Transkription des Glycin-Decarboxylase-Operons.

Sehr ungewöhnlich ist der durch *primer-extension*-Analyse 1125 nt *upstream* von *gcvP4* bestimmte Transkriptionsstartpunkt, welcher aber durch jeweils eine Doppelbestimmung mit zwei im Abstand von ca. 260 bp gelegenen Primern und vor allem durch RT-PCRs bestätigt werden konnte (s. 3.2.2. und 3.2.3.). Somit ist der Startpunkt der mRNA des Glycin-Decarboxylase-Operons im 3'-Bereich des *upstream* gelegenen Gens *nlpP* lokalisiert. Eine Analyse der Nukleotidsequenz des 1014 bp umfassenden intergenen Bereiches zwischen dem Stopcodon von *nlpP* und dem Startcodon von *gcvP4* ergab einerseits keinen Hinweis auf einen nicht gefundenen ORF, andererseits zeigte dieser aber signifikante Sequenzhomologien zu dem von BARRICK *et al.* (2004) bzw. MANDAL *et al.* (2004) beschriebenen Glycin-anhängigen Riboswitch, der oft im 5'-nichttranslatierten Bereich von Genen des Glycin-Metabolismus wie der Glycin-Decarboxylase oder der Serin-Hydroxymethyltransferase bzw. von Efflux-Systemen wie z. B. Na⁺/Alanin-Symporter zu finden ist. Die Analyse der Bereiche *upstream* der Glycin-Decarboxylase-Operons von *C. difficile* und *C. sticklandii* ergab ebenfalls einen sehr großen intergenen Bereich von 806 bp bzw. 979 bp und ein Sequenzvergleich zeigte ebenfalls signifikante Übereinstimmungen (Abb. 30) mit den für Glycin-abhängigen Riboswitches postulierten Konsensussequenzen (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004).

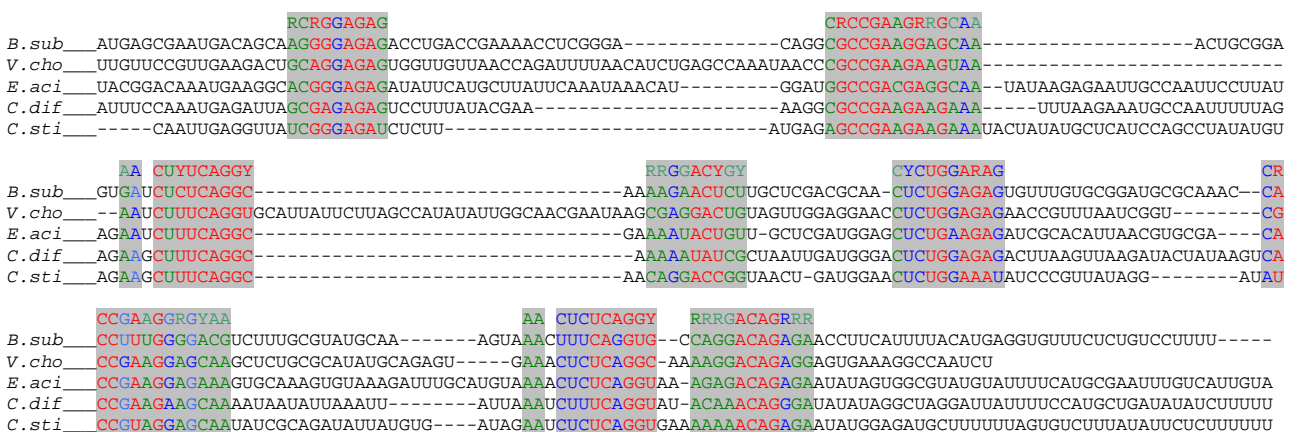


Abb. 30: Glycin Riboswitch Alignment: gezeigt ist ein Nukleinsäure-Alignment der *upstream* Bereiche potentieller Glycin-Decarboxylase-Operons aus *B. subtilis*, *V. cholerae*, *E. acidaminophilum* (der Beginn der dargestellten Sequenz ist 1913 nt *upstream* des Startcodons von *gcvP4* zu finden; s. Anhang A.II.), *C. difficile* sowie *C. sticklandii*. Über dem Alignment ist die aus 104 untersuchten potentiellen Glycin-Riboswitchen resultierende Consensussequenz konservierter Bereiche dargestellt (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004). Rot dargestellte Nukleotide bedeuten eine 97%ige, blau eine 90%ige und grün eine 75%ige Konservierung der entsprechenden Basen. Schwarz dargestellte Nukleotide sind nicht konserviert.

Durch diese charakteristischen und stark konservierten Sequenzmotive ergibt sich eine für den Glycin-Riboswitch typische Tandem-artige Sekundärstruktur, die sich aus zwei zueinander sehr ähnlichen Aptameren, welche über einen Linker verbunden sind, zusammensetzt (Abb. 31 B). Dabei sind die zentralen Bereiche sowie die *stem*-Strukturen P3 und P3a beider Aptamere sowohl in der Nukleotidabfolge als auch in ihrer Länge stark konserviert, und es ist eine Symmetrie dieser Strukturen zwischen beiden Aptameren zu erkennen (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004). Die Sequenzen der P1 *stem*-Strukturen sind nur im oberen Bereich stark konserviert, und nur die Länge des P1 *stems* des Aptamer 2 ist konserviert.

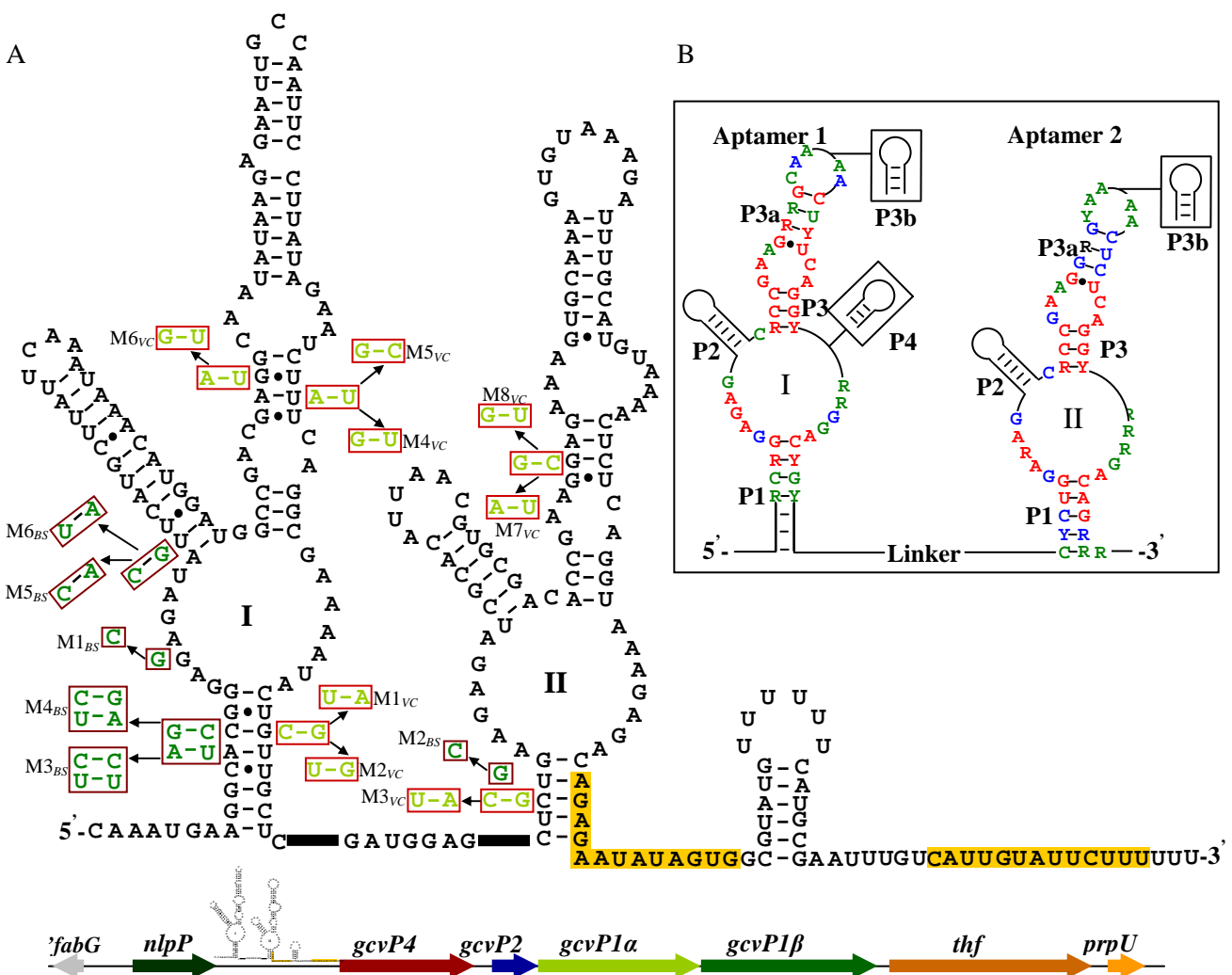


Abb. 31: Sekundärstrukturen Glycin-abhängiger Riboswitches: A: Die Sekundärstruktur des Glycin-Riboswitch aus *E. acidaminophilum* und darunter dessen Lage *upstream* des Glycin-Decarboxylase-Operons sind dargestellt. Die bei *B. subtilis* bzw. *V. cholerae* an ausgewählten Positionen vorkommenden Basen bzw. Basenpaarungen sind dunkel- bzw. hellgrün dargestellt und umrandet. Die zur Untersuchung der Funktionalität des Glycin-Riboswitch beider Organismen erzeugten Mutanten wurden im Fall von *B. subtilis* mit M1-6_{Bs} und im Fall von *V. cholerae* mit M1-8_{vc} gekennzeichnet (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004). Die orange unterlegten Nukleotide repräsentieren die intrinsische Terminatorstruktur, die sich bei Formation des Aptamer II durch Bindung von Glycin nicht ausbilden kann. B: die sich aus der Konsensussequenz von 104 Glycin-abhängigen Riboswitchen ergebende Sekundärstruktur der resultierenden mRNA sind dargestellt (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004). Nukleotide, die zu 97 %, 90 % bzw. 75 % konserviert sind, wurden in rot, blau bzw. grün dargestellt. Schwarze Linien verdeutlichen Strukturen, die in der Nukleotidabfolge bzw. ihrer Länge nicht konserviert sind. Die schwarz umrandeten *loop*-Strukturen sind nur bei einigen der durch Bioinformatik analysierten Riboswitches zu finden und ebenfalls weder in Sequenz noch Länge konserviert.

Auch der potentielle Riboswitch *upstream* des Glycin-Decarboxylase-Operons von *E. acidaminophilum* weist die typische Tandem-artige Sekundärstruktur auf, wie in Abbildung 31 A zu erkennen ist. Sowohl Aptamer I als auch II sind durch einen zusätzlichen P3b-*stem* gekennzeichnet und Aptamer I weist keinen zusätzlichen P4-*stem* auf. MANDAL (2004) postulierten *downstream* des Glycin-Riboswitch von *B. subtilis* einen potentiellen intrinsischen Terminator (GUSAROV and NUDLER 1999; YARNELL and ROBERTS 1999), der nur in Abwesenheit von Glycin als solcher fungiert und teilweise mit dem P1-*stem* des Aptamer II überlappt. Im 3'-Bereich des Glycin-Riboswitch von *E. acidaminophilum* konnte ebenfalls ein solcher Terminator identifiziert werden, welcher ebenso teilweise mit dem P1-*stem* des Aptamer II überlappt (Abb. 31 A). Die *upstream* der Glycin-Decarboxylase-Operons von *C. difficile* und *C. sticklandii* identifizierten Riboswitche weisen nahezu identische Sekundärstrukturen im Vergleich zu dem nun in *E. acidaminophilum* identifizierten auf. Diese sind ebenfalls durch P3b-*stems* an beiden Aptameren und durch das Fehlen eines P4-*stems* gekennzeichnet (Anhang A.XI.).

Von SURDASAN *et al.* (2006) wurde für den 5'-nichttranslatierten Bereich des *metE*-Gens aus *Bacillus clausii*, welches für eine Methionin-Synthase codiert, ebenfalls eine Tandem-artige Riboswitch-Struktur beschrieben. Diese besteht jedoch aus einem S-Adenosylmethionin-Riboswitch (SAM-Riboswitch) und einem Coenzym B₁₂-Riboswitch (AdoCbl-Riboswitch), die beide völlig unabhängig voneinander agieren und unterschiedliche Metabolite erkennen bzw. binden. Der Glycin-Riboswitch dagegen ist bisher der einzige, der sich durch seine Tandem-artige Struktur auszeichnet und durch kooperative Bindung von Glycin die Transkription des *downstream* gelegenen Gens bzw. der Gene reguliert (BARRICK and BREAKER 2007; MANDAL *et al.*, 2004; SUDARSAN *et al.*, 2006; WINKLER and BREAKER 2005). Durch Bindung eines Glycin-Moleküls an das Aptamer I kommt es zur signifikanten Steigerung der Affinität des Aptamer II gegenüber Glycin um das 100-1000-fache, wodurch eine erhöhte Sensibilität gegenüber Schwankungen in der Metabolit-Konzentration erreicht wird (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004; PHAN and SCHUMANN 2007). Die Dissoziations-Konstante (K_D) von Glycin-Riboswitchen gegenüber Glycin wird mit ca. 30 μ M beschrieben (MANDAL *et al.*, 2004). Dieser Wert liegt über den Dissoziations-Konstanten von 300 nM, 100 nM, 300 nM bzw. 1 μ M, die für die AdoCbl-, Thiaminpyrophosphat-, Adenin- bzw. L-Lysin-Riboswitche beschrieben wurden (MANDAL and BREAKER 2004a; MIRONOV *et al.*, 2002; NAHVI *et al.*, 2002; RODIONOV *et al.*, 2003). Deutlich geringer sind die K_D -Werte der FMN-, SAM- bzw. Guanin-Riboswitche, die nur bei 4 bzw. 5 nM liegen (MIRONOV *et al.*, 2002; WINKLER *et al.*, 2003). Die etwas höhere Dissoziations-Konstante gegenüber Glycin ist verständlich, da diese Verbindung zwar Substrat der Glycin-Decarboxylase und der Glycin-Reduktase ist, aber auch in erheblichem Maße ein sehr wichtiger Bestandteil von Proteinen ist. Der K_D -Wert des Glycin-Riboswitch, der ausschließlich Gene des Glycin-Metabolismus reguliert (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004; PHAN and SCHUMANN 2007), muss also deutlich über der Dissoziations-Konstante der Riboswitche der anderen hier erwähnten Substrate liegen. Eine sehr hohe Dissoziations-Konstante von 300 μ M weist hingegen der Glucosamin-6-Phosphat-abhängige Riboswitch auf, der sich somit deutlich von den anderen unterscheidet (WINKLER *et al.*, 2004).

Die konservierten Sequenzmotive und die daraus resultierenden Sekundärstrukturen, speziell der P1-, P3- und P3a-stem beider Aptamere (Abb. 31 B), sind essentiell für die spezifische Erkennung und kooperative Bindung des Glycins (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004). Eine Mutation der C-G-Basenpaarung im P1-stem des *V. cholerae* Riboswitch (Abb. 31 A) zu einer WATSON-CRICK-Basenpaarung (U-A; M1_{VC}) führte zu einer verminderten Kooperativität, was sich einem Hill-Koeffizienten von $n=1,1$ ausdrückte (FORSEN and LINSE 1995), während eine Doppel-Mutation dieser Position (M2_{VC}) zu einer wobble-Basenpaarung (U·G) einen kompletten Verlust der Kooperativität ($n=0,8$) zur Folge hatte. Hingegen hatte eine Mutation der entsprechenden Stelle in Aptamer II (M3_{VC}) keinerlei Auswirkung auf die Kooperativität beider Aptamere. Die hier untersuchten Nukleotide bzw. Nukleotidpaarungen sind zu 97 % konserviert (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004) und sind an entsprechender Stelle auch im Riboswitch von *E. acidaminophilum* (Abb. 31 A), aber auch bei *C. difficile* und *C. sticklandii* (Anhang A.XI.) zu finden. Auch der P3a-stem beider Aptamere scheint essentiell für die kooperative Bindung von Glycin zu sein. Eine Mutation der A-U-Basenpaarung im P3a-stem von Aptamer I des Glycin-Riboswitch von *V. cholerae* zu einer G·U-wobble-Basenpaarung (M4_{VC}) führt ebenso zu einer stark verminderten Kooperativität ($n=1,1$) wie die Mutation zu einer G-C-WATSON-CRICK-Basenpaarung (M5_{VC}), bei der ein Hill-Koeffizient von $n=1,2$ bestimmt wurde (KWON and STROBEL 2008). Im Vergleich dazu hatte die Mutation des direkt benachbart liegenden Basenpaares A-U in eine G·U-wobble-Basenpaarung (M6_{VC}) keinerlei Auswirkung auf die Kooperativität. Bei *E. acidaminophilum* ist an dieser Position diese G·U-wobble-Basenpaarung zu finden. Die Analyse von 104 Glycin-abhängigen Riboswitchen (KWON and STROBEL 2008) ergab jedoch nur in 70 % der Fälle an dieser Stelle ein Purin (R) (Abb. 31 B). Die potentiellen Riboswitch-Strukturen aus *C. difficile* und *C. sticklandii* weisen beide an dieser Position A-U-WATSON-CRICK-Basenpaarung auf (Anhang A.XI.). Im P3a-stem des Aptamer II hingegen scheint nicht die Basenfolge, sondern die Art der Basenpaarung wichtig für die Kooperativität zu sein. Während eine Mutation der G-C-Basenpaarung zu einer G·U-wobble-Basenpaarung (M8_{VC}) zu einem kompletten Verlust der Kooperativität führte ($n=0,6$), konnte dieser mit einer durch eine Doppelmutation wiederhergestellten WATSON-CRICK-Basenpaarung (A-U; M7_{VC}) kompensiert und ein Hill-Koeffizient von $n=1,4$ bestimmt werden (KWON and STROBEL 2008). Auch die drei potentiellen Riboswitch aus *E. acidaminophilum*, *C. difficile* und *C. sticklandii* weisen an dieser Position eine WATSON-CRICK-Basenpaarung auf (Abb. 31 A, Anhang A.XI.).

Die Aptamere der diversen Riboswitch erkennen die entsprechenden Metabolite mit sehr hoher Genauigkeit. So werden z. B. vom AdoCbl-Riboswitch Analoga, denen die 5'-Deoxy-Adenosylgruppe fehlt, nicht erkannt (NAHVI *et al.*, 2002). Auch der TPP-Riboswitch bzw. der FMN zeigen eine 1000-fach erhöhte Affinität gegenüber Thiaminpyrophosphat im Vergleich zu Thiaminphosphat oder Thiamin (WINKLER *et al.*, 2002a) bzw. gegenüber Riboflavin, denen eine Phosphatgruppe fehlt (WINKLER *et al.*, 2002b). Während der SAM-Riboswitch nur eine stark verminderte Affinität gegenüber S-Adenosylhomocystein besitzt (WINKLER *et al.*, 2003), bindet der Lysin-Riboswitch stereospezifisch nur L-Lysin (SUDARSAN *et al.*, 2003). Die Aptamere des Guanin- und Adenin-Riboswitch sind völlig identisch, beide unterscheiden sich nur in

einem Nukleotid. So ermöglicht im Guanin-Aptamer ein Cytosin und im Adenin-Aptamer ein Uracil eine spezifische Erkennung des entsprechenden Nukleotides über eine WATSON-CRICK-Basenpaarung (MANDAL *et al.*, 2003; MANDAL and BREAKER 2004a). Auch der Glycin-Riboswitch erkennt mit hoher Genauigkeit Glycin, aber auch Glycin-Methylester, und mit stark verminderter Affinität Glycin-Ethyl- und Glycin-*t*-Buthylester. Die Derivate Glycinamid bzw. Sarcosin hingegen werden wie Alanin bzw. β -Alanin nicht erkannt (KWON and STROBEL 2008; MANDAL *et al.*, 2004). MANDAL *et al.* (2004) postulieren jeweils ein Guanin im Core-Element beider Aptamere des Glycin-Riboswitch von *B. subtilis* als essentiell für die Erkennung und Bindung von Glycin. Eine Mutation beider Basen zu einem Cytosin (M1_{BC} und M2_{BC}) führte zum vollständigen Verlust der Fähigkeit Glycin, zu binden. Während die Riboswitch-Strukturen von *C. difficile* und *C. sticklandii* diese beiden Guanine aufweisen, ist bei *E. acidaminophilum* nur im Aptamer I diese Base zu finden. Es ist jedoch nur bei 80 % der analysierten Riboswitch-Strukturen in Aptamer II an dieser Position ein Guanin zu finden, sodass davon auszugehen ist, dass Letzterem eine geringere Bedeutung zuzuschreiben ist, wie schon von MANDAL *et al.* (2004) postuliert wurde. Auch der P1-*stem* und der P2-*stem* des Aptamer I scheinen essentiell für die Bindung von Glycin zu sein. Während eine Zerstörung beider *stems* durch Mutationen, die zu zwei *wobble*-Basenpaarungen im P1-*stem* (M3_{BC}) bzw. einer im P2-*stem* (M5_{BC}) führten, kam es ebenfalls zum Verlust der Erkennung von Glycin. Durch Wiederherstellung der WATSON-CRICK-Basenpaarung dieser Positionen durch Doppelmutationen (M4_{BC} und M6_{BC}) konnte dieses kompensiert werden (MANDAL *et al.*, 2004). Die Riboswitch-Strukturen von *E. acidaminophilum*, *C. difficile* und *C. sticklandii* zeigen an diesen Positionen ebenfalls WATSON-CRICK-Basenpaarungen. Eine Ausnahme ist eine G·U-*wobble*-Basenpaarung des P1-*stems* von *C. sticklandii*, die jedoch auf Grund der Länge des potentiellen *stems* keine großen Auswirkung auf dessen Ausbildung bzw. Stabilität haben sollte.

Eine deutliche Transkriptions-Induktion der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons durch Glycin wurde für *B. subtilis* gezeigt (PHAN and SCHUMANN 2007). In Abwesenheit von Glycin konnten große Mengen eines ca. 200 Nukleotide umfassenden Transkriptes, welches den Bereich des Riboswitch repräsentierte, detektiert werden, ein das gesamte Operon umfassende Transkript hingegen war nur in geringer Menge vorhanden. In Anwesenheit von Glycin zeigte sich hingegen eine vermehrte Transkription aller Gene des Operons (PHAN and SCHUMANN 2007). In Abwesenheit von Glycin scheint es zum Abbruch der Transkription an einer im 3'-Bereich des Riboswitch gelegenen Terminatorstruktur zu kommen, welche sich durch Bindung von Glycin an die beiden Aptamere des Riboswitch nicht ausbilden kann, was eine Transkription des gesamten *downstream* gelegenen Operons zur Folge hat (MANDAL *et al.*, 2004; PHAN and SCHUMANN 2007). Auch die Transkription des Glycin-Decarboxylase-Operons von *E. acidaminophilum* scheint durch Glycin induziert zu sein. So konnte eine starke Transkription aller Gene bei Kultivierung des Organismus auf Glycin-haltigen Medien (50 mM Glycin bzw. 50 mM Na-Formiat u. 40 mM Glycin) nachgewiesen werden. Bei Wachstum auf Medien mit den Glycin-Analogen Betain und Sarcosin war nur eine schwache Transkription der Gene zu finden, die jeweils bei Kultivierung mit Sarcosin in Kombination mit diversen Elektronen-Donatoren (Alanin und Serin bzw. Na-Formiat als zusätzlicher Elektronen-Donor) schwächer ausfiel als bei Wachstum auf Betain. Allerdings wäre hier gemessen an *B. subtilis* die

entgegengesetzte Beobachtung zu erwarten gewesen. Wie bereits erwähnt, binden die Aptamere des Glycin-Riboswitch mit sehr hoher Affinität Glycin, dessen Analoge jedoch nur mit verminderter Affinität bzw. gar nicht. KNWON *et al.* (2008) zeigten, dass die Affinität des Glycin-Riboswitch gegenüber Sarcosin nur sehr gering ist. Da Betain im Vergleich zu Glycin drei zusätzliche Methylgruppen aufweist, Sarcosin hingegen nur eine, wäre eine noch geringere Affinität gegenüber Betain zu erwarten gewesen, was sich an einer schwächeren Induktion in Anwesenheit von Betain gezeigt hätte.

Wie bereits erwähnt, kann *E. acidaminophilum* Glycin in einer gekoppelten Stickland-Reaktion (STICKLAND 1934) metabolisieren, wobei die Aminosäure sowohl als Elektronen-Donor als auch -Akzeptor dient. Die Derivate Sarcosin (N-Methylglycin) bzw. Betain (N, N, N-Trimethylglycin) hingegen können nur als Elektronen-Akzeptoren genutzt werden, hier ist die Zugabe eines zusätzlichen Elektronen-Donors wie z. B. Serin oder Na-Formiat oder auch beider gleichzeitig unumgänglich (ZINDEL *et al.*, 1988). Normalerweise kann Serin durch die Serin-Hydroxymethyltransferase in Glycin und dann weiter durch die Glycin-Decarboxylase metabolisiert werden. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit das Gen einer Serin-Hydroxymethyltransferase identifiziert wurde, konnte in früheren Arbeiten für dieses Enzym jedoch nur sehr geringe spezifische Aktivitäten von 0,00028 bzw. 0,00012 U/mg Protein im Rohextrakt von Zellen, die auf Glycin bzw. Serin gewachsen sind, bestimmt werden. Vielmehr wird Serin von diesem Organismus durch die Serin-Dehydratase zu Pyruvat metabolisiert, welches dann durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu CO₂ und Acetyl-CoA umgewandelt wird. Aus Letzterem wird über Acetyl-Phosphat die Bildung von Acetat und eine Energiegewinnung über Substratkettenphosphorylierung ermöglicht (GRANDERATH 1988; ZINDEL *et al.*, 1988). So wurde für das einleitende Enzym dieses Stoffwechselweges, die Serin-Dehydratase, eine spezifische Aktivität von 0,039 U/mg Protein, und für die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase 0,095 U/mg Protein im Rohextrakt von Zellen, die auf Serin-Medium kultiviert wurden, bestimmt (ZINDEL *et al.*, 1988). Auch Alanin wird durch die Aktivität der Alanin-Dehydratase zu Pyruvat und Reduktionsäquivalenten (NADH+H⁺) metabolisiert und so als Elektronen-Donor genutzt (GRANDERATH 1988). Sind sowohl Serin als auch Na-Formiat im Medium vorhanden, werden beide parallel von *E. acidaminophilum* als Elektronen-Donor für die Reduktion der Glycin-Derivate Betain und Sarcosin durch die Betain- und Sarcosin-Reduktasen genutzt (GRANDERATH 1988), wobei das Na-Formiat durch die Aktivität von Formiat-Dehydrogenasen (GRAENTZDOERFFER *et al.*, 2003) zu CO₂ oxidiert wird und Reduktionsäquivalente auf Glycin oder Eisen-Schwefel-Carrier übertragen und eventuell in Form von NADPH+H⁺ freierwerden. Das dem Medium zugegebene Formiat kann aber über die Formyl-THF-Synthetase, die Methenyl-THF-Cyclohydrolase und die Methylen-THF-Dehydrogenase zu Methylen-THF umgewandelt werden (s. S. 127, Abb. 37). Dieses dient als Substrat der Glycin-Decarboxylase/Synthase, durch deren Reaktion Glycin entsteht. FREUDENBERG und ANDREESEN (1989) zeigten für die Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* eine Synthase-Aktivität, die allerdings nur bei 12 % der Decarboxylase-Aktivität lag. Zum einen kann die Transkription der Glycin-Decarboxylase-Gene auf Glycin-freien Medien eine Synthase-Aktivität bedeuten, zum anderen kann aber auch von einer Grundexpression dieser Gene ausgegangen werden. Solch eine sehr schwache Grundexpression wurde auch für das

gcv-Operon von *B. subtilis* auch ohne Glycin im Wachstumsmedium gezeigt (PHAN and SCHUMANN 2007). Die geringe basale Expression ist wahrscheinlich u. a. durch den als sehr schwach einzustufenden Promotor des *gcv*-Operons bedingt. Dieser für *B. subtilis* von PHAN und SCHUMANN (2007) postulierte Promotor (5'-ATGTAT_{.17 bp}-TATAGT-3') zeigt genau wie der *upstream* des Glycin-Decarboxylase-Operons aus *E. acidaminophilum* postulierte Promotor (5'-TGTA_{.16 bp}-ATGAAT-3') nur sehr geringe Übereinstimmung mit der Konsensussequenz σ^{70} -abhängiger *E. coli*-Promotoren (HARLEY and REYNOLDS 1987) bzw. σ^A -abhängiger *B. subtilis*-Promotoren (HELMANN 1995) auf. Eine Veränderung des -10-Elementes aus *B. subtilis* zur 5'-TATAAT-3'-Konsensussequenz hatte weder eine Auswirkung auf das Grundlevel der Transkription des *gcv*-Operons noch auf die Induktion durch Glycin. Die Veränderung der -35-Region zur 5'-TTGACA-3'-Konsensussequenz hingegen führte zu einer wesentlich gesteigerten Transkriptionsinduktion durch Glycin, was jedoch mit einem um das 10-fache erhöhten Grundlevel verbunden war. Eine Veränderung beider Promotor-Regionen zur -10 und -35-Konsensussequenz führte ebenfalls zu einem stark erhöhten Grundlevel und einer wesentlich höheren Induktionsrate durch Glycin im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (PHAN and SCHUMANN 2007). Der Glycin-abhängige Riboswitch verhindert jedoch in Abwesenheit von Glycin die Transkription der Gene der Glycin-Decarboxylase-Komponenten, durch dessen Katalyse es zur Metabolisierung von Glycin zu NH_3 , Methylen-THF, CO_2 und Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ bzw. $\text{NADPH}+\text{H}^+$ kommen kann (ANDREESEN 1994a; 1994b). Ein, dem Glycin-Riboswitch vorgeschalteter starker Promotor würde so die Funktionalität und Wirkungsweise desselben stören bzw. aufheben.

Da die Western-Blot-Analysen die gleichen Resultate zeigten, das heißt, starke Expression von *prpU* bei Anwesenheit von Glycin und verminderte Expression auf Glycin-freien Medien (s. S. 54, Abb. 14 B), ist die Regulation der Transkription bzw. der Translation dieser Gene mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Ebene der Transkription und nicht auf der Ebene der Translation zu suchen, was für alle Glycin-abhängigen Riboswitche typisch ist (BARRICK and BREAKER 2007; KWON and STROBEL 2008; SUDARSAN *et al.*, 2006). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die Expression der Gene des Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* ebenfalls durch einen Glycin-abhängigen Riboswitch reguliert wird.

Im *upstream*-Bereich des Glycin-Decarboxylase-Operons von *E. coli* konnten keine Sequenzen identifiziert werden, die auf eine Glycin-Riboswitch-Struktur hinweisen. Für diesen Organismus ist eine komplizierte Regulation der Transkription dieser Gene durch diverse Proteine beschrieben worden. Das durch Glycin-Oxidation entstandene 5,10-Methylentetrahydrofolat ist für *E. coli* ein wichtiger C_1 -Donor, u. a. für die Biosynthese von Purinen, Methionin, Thymin und anderen methylierten Verbindungen. Der Promotor des *gcvTHP*-Operons aus *E. coli* ist in die Klasse III der Aktivator-abhängigen Promotoren einzuordnen, da für ihn vier regulatorische Proteine beschrieben wurden, deren Bindestellen sich mehr als 90 bp *upstream* der RNA-Polymerase-Bindestelle befinden (BUSBY and EBRIGHT 1999). Eines dieser regulatorischen Proteine ist PurR (*purine repressor protein*), ein Transkriptionsregulator der Gene des Nukleotidstoffwechsels (ROLFES and ZALKIN 1988), der in Anwesenheit von Purinen und deren Vorstufen hemmend auf die Expression der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons wirkt (STAUFFER *et al.*, 1994; STAUFFER and

STAUFFER 1994; WILSON *et al.*, 1993a). Die DNA-Bindestelle dieses Repressors liegt direkt im Promotorbereich, von Position -3 bis $+17$, sodass er wahrscheinlich direkt mit der RNA-Polymerase interagiert (WILSON *et al.*, 1993a). CRP (*cAMP receptor protein*) ist ein Aktivator des *gcvTHP*-Operons, seine Bindestelle befindet sich an Position -324 bis -303 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des Operons (WONDERLING and STAUFFER 1999). Das zur LysR-Familie (SCHELL 1993) der Regulatoren gehörende Protein GcvA ist in Gegenwart von Glycin als Aktivator und in Gegenwart von Purinen auch als Repressor an der Transkription der Gene der Glycin-Decarboxylase beteiligt (WILSON *et al.*, 1993a; WILSON *et al.*, 1993b). Das GcvA-Protein bindet an drei Stellen in der Kontroll-Region des *gcvTHP*-Operons, von bp -271 bis -242 (Bindestelle 3), von bp -241 bis -214 (Bindestellen 2) und von bp -69 bis -34 *upstream* des Transkriptionsstartpunktes (JOURDAN and STAUFFER 1999b). Während die Bindung von GcvA an alle drei Bindestellen eine hemmenden Wirkung zur Folge hat, wird der Bindung an Bindestelle 2 bzw. 3 eine aktivierende Wirkung auf die Transkription in Gegenwart von Glycin zugeschrieben (WILSON and STAUFFER 1994; WILSON *et al.*, 1995; WONDERLING *et al.*, 2000). Das *gcv*-spezifische Protein GcvR agiert als Repressor, wobei aber eine direkte Interaktion mit dem C-terminalen Ende von GcvA essentiell ist (GHRIST *et al.*, 2001; GHRIST and STAUFFER 1995; 1998). Es kommt hierbei zur Bildung eines Heterooligomers, welches durch das Vorhandensein von Purinen stabilisiert bzw. durch Glycin destabilisiert wird (HEIL *et al.*, 2002). In diesem Fall kann das an den Bindungsstellen 2 und 3 gebundene GcvA-Homodimer direkt mit der α -C-terminalen Domäne (α -CTD) der RNA-Polymerase wechselwirken (Abb. 32) und so die Transkription der Gene induzieren. (GHRIST *et al.*, 2001; JOURDAN and STAUFFER 1998; 1999a; STAUFFER and STAUFFER 2005). Für das Lrp-Protein (*leucine response regulatory protein*), welches an der Regulation des Aminosäure-Metabolismus beteiligt ist (CALVO and MATTHEWS 1994), gibt es eine Vielzahl an Bindestellen im Promotorbereich des Operons. Diese sind zwischen den Bindungsstellen 1 und 2 des GcvA-Proteins (JOURDAN and STAUFFER 1999b) lokalisiert. Durch Bindung mehrerer Lrp-Proteine an diese kommt es zur Biegung der DNA in diesem Bereich, was in einer *loop*-Bildung resultiert und die Interaktion aller an der Regulation beteiligten Proteine ermöglicht (STAUFFER and STAUFFER 1998a; 1998b; 1999).

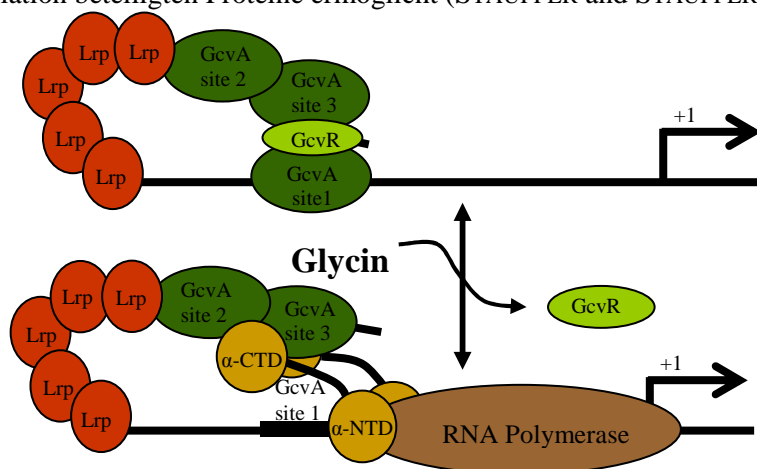


Abb. 32: Modell der Repression und Aktivierung des *gcvTHP*-Operons aus *E. coli* (nach HEIL *et al.*, 2002). Dargestellt ist ein Bereich des Promotors des *gcvTHP*-Operons aus *E. coli* und die Interaktion der an der Regulation der Transkription des *gcvTHP*-Operons beteiligten Proteine. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Lrp: *leucine response protein*; GcvA: *gcv*-spezifischer Aktivator (mit Bindestellen 1, 2 und 3); GcvR: *gcv*-spezifischer Repressor.

In Gegenwart von Glycin wird die Transkription des *gcvTHP*-Operons von *E. coli* induziert, durch das Vorhandensein von Purinen dagegen reprimiert. Diese Art der Transkriptionsregulation scheint in diesem Fall vorteilhafter zu sein als die Regulation über einen Glycin-sensitiven Riboswitch. *E. coli* nutzt Glycin nicht als Energiequelle, sondern das bei dessen Oxidation entstehende 5,10-Methylen-THF als wichtigen C₁-Donor u. a. für den Purin-Stoffwechsel. Ein Glycin-Riboswitch scheint jedoch dort von Vorteil zu sein, wo Glycin hauptsächlich als Energiequelle genutzt wird, wie es bei *E. acidaminophilum* der Fall ist.

4.2. Die Glycin-Decarboxylase - ein Komplex, der normalerweise aus vier Proteinen besteht

Die Glycin-Decarboxylase ist ein Multienzymkomplex, der normalerweise aus vier Komponenten besteht und die reversible Decarboxylierung von Glycin katalysiert und daher auch als Glycin-Decarboxylase/Synthase bezeichnet wird (ANDREESEN 1994a). Durch die oxidative Katalyse dieses Enzymkomplexes wird Glycin zu CO₂, Methylen-THF, NAD(P)H+H⁺ und NH₃ abgebaut (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989). Bei der Umkehrreaktion kommt es zur Synthese von Glycin. Die Synthase-Aktivität wurde bisher für die Organismen *A. globiformes* (KOCHI and KIKUCHI 1974; 1976), *C. acidurici* (GARIBOLDI and DRAKE 1984) sowie *E. acidaminophilum* (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989) beschrieben. Dabei konnte jeweils nur eine wesentlich geringe Synthese-Rate im Vergleich zur Decarboxylierung festgestellt werden. So lag die Synthase-Aktivität der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* nur bei ca. 12 % der Decarboxylase-Aktivität (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989). Der Enzymkomplex besteht aus vier eigenständigen, jedoch voneinander abhängigen Komponenten. Proteine prokaryotischer Herkunft werden meist mit P1, P2, P3 und P4 bezeichnet (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; GARIBOLDI and DRAKE 1984; KLEIN and SAGERS 1966a; 1966b; 1967a; 1967b; KOCHI and KIKUCHI 1969), für Eukaryoten beschriebene werden entsprechend ihrer Funktion immer mit P, H, L und T (BOURGUIGNON *et al.*, 1988; MACHEREL *et al.*, 1992; OLIVER and RAMAN 1995; SALCEDO *et al.*, 2005; TURNER *et al.*, 1993) benannt. Die terminologische Trennung prokaryotischer und eukaryotischer Proteine ist jedoch nicht überall in der Literatur zu finden, so werden u. a. die Proteine aus *E. coli* (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1999a; 1999b; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 2003; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993) oder dem Cyanobacterium *Synechocystis* (HASSE *et al.*, 2007) stets mit P, H, L und T bezeichnet, wobei letzterer Organismus als Vorläufer der pflanzlichen Chloroplasten angesehen wird (MARTIN *et al.*, 2002), was diese Bezeichnung der einzelnen Proteinkomponenten zu erklären vermag. In der vorliegenden Arbeit wurde stets die in der Literatur verwendete Bezeichnung der einzelnen Proteine übernommen.

Das P1-Protein, ein Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym, ist die eigentliche Decarboxylase, die jedoch nur gemeinsam mit dem P2-Protein die oxidative Abspaltung der Carboxylgruppe des Glycins in Form von CO₂ katalysiert (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; HIRAGA and KIKUCHI 1980a; KIKUCHI and HIRAGA

1982). Das P2-Protein ist ein kleines hitzestabiles Protein, welches kovalent gebundene Liponsäure als funktionelle Gruppe trägt, auf welche die nach der Decarboxylierung entstandene Aminomethylgruppe übertragen wird. Die so reduziert vorliegende funktionelle Gruppe wird dadurch zum Substrat für das P4-Protein, eine Aminomethyl-Transferase, welche die Abspaltung von NH_3 und die Übertragung der Methylengruppe auf den C_1 -Gruppen Carrier THF katalysiert, was in der Entstehung von 5,10-Methylen-THF resultiert (ANDREESEN 1994a; 1994b). Die für die Aktivität des Enzymkomplexes essentielle Komponente ist das P3-Protein, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Durch sie wird die reduziert vorliegende Liponsäuregruppe des P2-Proteins reoxidiert. NAD^+ stellt für dieses Enzym, welches zwei redoxaktive Cysteingruppen und FAD enthält, das natürliche Substrat dar, auf welches die Elektronen übertragen werden (FREUDENBERG *et al.*, 1989a). Eine Ausnahme hierbei stellt *E. acidaminophilum* dar. Aus diesem Organismus konnte bisher keine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase beschrieben werden. Es wurde eine NADP^+ -abhängige Thioredoxin-Reduktase (TR) mit Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität beschrieben, welche die Funktion des P3-Proteins übernimmt und die Elektronen über das Thioredoxin-System dem reduktiven Weg des Glycin-Abbaus zuführt. Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase wird *in vitro* noch durch die Proteine Thioredoxin und GrdA stimuliert (DIETRICH *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991; POEHLEIN 2003). Man findet in der Literatur jedoch weitere Beispiele für Thioredoxin-Reduktasen mit Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität. So beschreibt z. B. ARNER *et al.* (1996) für Thioredoxin-Reduktase aus diversen Säuger-Geweben oder auch DIETRICH *et al.* (1991) für das Enzym aus *C. litorale* diese eigentlich atypische Aktivität. Anzumerken ist hier jedoch, dass *E. acidaminophilum* der einzige Organismus ist, für den keine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase gefunden wurde und diese Funktion also von anderen Proteinen übernommen bzw. ersetzt werden muss (DIETRICH *et al.*, 1991; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991; POEHLEIN 2003).

Der Glycin-Decarboxylase-Komplex besteht, wie bereits erwähnt, aus vier Komponenten, und nur in Gegenwart aller Enzyme kann ein aktiver Komplex gebildet werden, durch den es zum oxidativen Abbau von Glycin zu NH_3 , CO_2 und Methylen-THF kommt. Zum besseren Verständnis der Vorgehensweise bei der heterologen Synthese der einzelnen Komponenten, wodurch deren Funktion überprüft werden sollte, aber um auch den Grad der Konservierung der charakteristischen Motive darzulegen, sollen die einzelnen Proteine des Glycin-Decarboxylase-Komplexes im Folgenden näher beschrieben werden.

4.2.1. Das P1-Protein der Glycin-Decarboxylase-die eigentliche Decarboxylase

Die beiden Untereinheiten des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum* werden durch die Gene *gcvP1a* und *gcvP1b* codiert und weisen ein Molekulargewicht von 49 bzw. 53,1 kDa auf (*accession number* AAU84893.1 bzw. AAU84894.1). In Tabelle 11 sind einige der in der EMBL-Datenbank enthaltenen Proteine, welche signifikante Ähnlichkeiten zur α - und β -Untereinheit des P1-Proteins aus

E. acidaminophilum aufweisen, wiedergegeben. Auf Grund der nahezu täglich ansteigenden Anzahl an Genomsequenzierungen wird hier nur eine Auswahl an Proteinen aus Prokaryoten aufgelistet, aber auch der Vergleich mit Proteinen aus Eukaryoten, wie z. B. *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* oder *Saccharomyces cerevisiae* gezogen, um die starke Konservierung dieses Proteins aufzuzeigen.

Tab. 11: Vergleich des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken

Organismus	Untereinheit	Protein: AS/MG (kDa)	accession- number	Identität (%) ¹
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	α	446 / 49,7	A8MEG6	64
	β	486 / 54,1	A8MEG7.1	70
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	α	449 / 50,4	Q8RCW1	59
	β	485 / 53,4	Q8RCW2	65
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	α	447 / 49,1	ABR47556.1	58
	β	486 / 53,5	ABR47557.1	65
<i>Clostridium botulinum</i> A3 str. Loch Maree	α	446 / 49,6	CP000962.1	58
	β	484 / 53,8	CP000962.1	63
<i>Clostridium difficile</i> 630	α	457 / 51,1	Q186L1	58
	β	485 / 53,8	Q186L4	63
<i>Clostridium sticklandii</i>	α	445 / 49,2		53
	β	485 / 53,4		62
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	α	448 / 49,7	A4IQV4	52
	β	490 / 56,4	A4IQV3	63
<i>Bacillus cereus</i>	α	447 / 49,4	Q818M4	52
	β	491 / 54,9	P62029	59
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	α	438 / 47,1	Q5SKW8	42
	β	474 / 52,7	Q5SKW7	52
<i>Escherichia coli</i> K12		957 / 104,4	A1AF92	35 / 41
<i>Drosophila melanogaster</i>		985 / 109,7	Q9VH09	38 / 44
<i>Arabidopsis thaliana</i>		1037 / 112,9	O80988	37 / 44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789		1034 / 114,5	P49095	35 / 43
<i>Homo sapiens</i>		1020 / 112,7	Q2M2F8	33 / 42

¹ im Vergleich zur α - und β -Untereinheit des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum*; bei Proteinen, die nur aus einer Untereinheit aufgebaut sind, erfolgte jeweils ein Vergleich des aminoterminalen Bereiches mit der α - Untereinheit und des C-terminalen Bereiches mit der β -Untereinheit des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum*

Die höchste Identität, 64 % für die α -Untereinheit und 70 % für die β -Untereinheit, ergab sich beim Vergleich mit den Proteinen aus *Alkaliphilus oremlandii* OhILAs, einem ebenfalls zur Gruppe der

Clostridien gehörenden Organismus. Auffällig ist, dass der Vergleich des Proteins aus *E. acidaminophilum* denen aus *C. difficile* und *C. sticklandii* trotz der Zugehörigkeit der drei Organismen zum Cluster XI der Clostridien nicht den höchsten Grad an Identität aufzeigt. Möglicherweise unterscheiden sich diese Organismen doch stärker voneinander, als bisher angenommen, zumal *E. acidaminophilum* als einziger dieser drei Clostridien auf Glycin als einziges Substrat zu wachsen vermag. Weiterhin fällt auf, dass die höchsten Identitäten der mit den beiden Untereinheiten des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum* verglichenen Proteinen bei 64 % (α -Untereinheit des P1-Proteins aus *A. oremlandii* OhILAs) bzw. bei 70 % (β -Untereinheit des P1-Proteins aus *A. oremlandii* OhILAs) liegen. Organismen, deren Proteine höhere Identitäten zu den Polypeptiden aus *E. acidaminophilum* aufweisen, konnten nicht identifiziert werden. Denkbar wäre, dass Organismen, die noch näher mit *E. acidaminophilum* verwandt sind, bisher noch nicht sequenziert bzw. noch nicht isoliert wurden.

Das P1 bzw. P-Protein der Glycin-Decarboxylase ist die eigentliche Decarboxylase, sie katalysiert aber nur zusammen mit dem P2-Protein effektiv die Decarboxylierung des Glycins. Die CO_2 -Austauschreaktion wird durch Zugabe des P2-Proteins sogar 100-fach stimuliert und der K_m für Glycin wird um 25 % reduziert (HIRAGA and KIKUCHI 1980a). Die Komponenten der Glycin-Decarboxylase sind ubiquitär verbreitet, so wurde auch das P1- bzw. P-Protein bisher sowohl aus prokaryotischen als auch aus eukaryotischen Organismen isoliert. Die meisten Proteine bakterieller Herkunft liegen als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vor, Ausnahmen sind hier die Proteine aus *E. coli* und *Synechocystis* sp. Stamm PCC 6803 (HASSE *et al.*, 2007; OKAMURA- IKEDA *et al.*, 1993). Die Proteine der beiden letztgenannten Organismen sind genau wie die eukaryotischen Proteine aus einem Homodimer aufgebaut. Für das Protein aus *E. acidaminophilum* wurde von FREUDENBERG und ANDREESEN (1989) über SDS-PAGE eine Größe von 49 kDa für die α -Untereinheit und 54,1 kDa für die β -Untereinheit und Größen von 113,6 kDa bzw. 225 kDa für das dimere bzw. tetramere Protein bestimmt. Durch die Analyse der unter Anhang A. II. dargestellten Sequenzen wurde für die P1 α -Untereinheit eine Größe von 49 kDa und für die P1 β -Untereinheit eine Größe von 53,1 kDa kalkuliert. Diese Werte konnten auch für die heterolog synthetisierten Proteine mittels SDS-PAGE bestimmt werden (s. S. 78, Abb. 25). Diese Werte sind mit den 230 kDa, die für das aus zwei α -Untereinheiten mit je einer Größe von 58 kDa und zwei β -Untereinheiten mit je 65 kDa bestehende $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vergleichbar, was von GARIBOLDI und DRAKE (1983) für das P1-Protein von *C. acidurici* beschrieben wurde. Dieser Organismus ist in der Lage, Purine zu Formiat und Glycin abzubauen. Auch das P-Protein aus *T. thermophilus*, welches ebenfalls eine $\alpha_2\beta_2$ -Struktur besitzt, weist eine molekulare Masse von 200 kDa auf, wobei der α -Untereinheit 47,1 kDa und der β -Untereinheit 52,7 kDa zuzuschreiben sind (NAKAI *et al.*, 2003b; 2005). Auch für *Aquifex aeolicus* (DECKERT *et al.*, 1998) und *B. subtilis* (KUNST *et al.*, 1997) wurde eine $\alpha_2\beta_2$ Konformation für das native P1-Protein beschrieben.

Homodimere ähnlicher Größe wie die zuvor beschriebenen Tetramere findet man u. a. bei *E. coli*. Für das monomere Protein wird hier eine Größe von 104,2 kDa und für das Dimer eine Größe von ca. 180 kDa angenommen (OKAMURA- IKEDA *et al.*, 1993). Ebenfalls als Homodimer liegen die Proteine aus *M. tuberculosis* (COLE *et al.*, 1998) und *S. thyphimurium* (STAUFFER *et al.*, 1989) vor. In Eukaryoten hingegen

liegen die P-Proteine generell als Homodimer vor und sind durch eine aus 35-86 Aminosäuren bestehende mitochondriale *leader*-Sequenz gekennzeichnet. Die Größen der eukaryotischen Monomere sind mit denen der prokaryotischen Dimere zu vergleichen. So wurde u. a. für das humane P-Protein eine Größe von 112,9 kDa und für das Pendant aus Huhn eine Größe von 111,8 kDa für die jeweiligen Monomere bestimmt (HIRAGA and KIKUCHI 1980b; KUME *et al.*, 1991). Auch aus Pflanzen wurden P-Proteine isoliert und beschrieben, so wurde z. B. für das monomere Protein aus *Pisum sativum* eine Größe von ca. 105 kDa und eine ungewöhnlich lange mitochondriale *leader*-Sequenz von 86 Aminosäuren und für zwei der fünf in *Flaveria pringlei* vorkommenden P-Proteine eine molekulare Masse von 106 kDa und eine *leader*-Sequenz von 33 bzw. 36 Aminosäuren aufgezeigt (BAUWE *et al.*, 1995; OLIVER *et al.*, 1990; TURNER *et al.*, 1992).

Wie bereits erwähnt, ist das P1-Protein der Glycin-Decarboxylase ein PLP-abhängiges Enzym. Vertreter dieser Gruppe werden in Faltungstypklassen (I-V) eingeteilt, wobei das P1- bzw. P-Protein auf Grund von Sequenzhomologien zur Klasse I zu zählen ist (GRISHIN *et al.*, 1995; JANSONIUS 1998; MEHTA and CHRISTEN 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2000). Enzyme der Faltungsklasse I wurden bisher immer genau wie die P-Proteine aus Eukaryoten als Homodimer beschrieben. Die α - und β -Untereinheit der tetrameren Proteine weisen starke Sequenzhomologien zu den aminoterminalen bzw. carboxyterminalen Bereichen der nur aus einer Untereinheit bestehenden Proteine auf. Aber auch beide Proteine untereinander sind strukturell sehr ähnlich, so zeigt die α -Untereinheit des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum* eine 26%ige Ähnlichkeit zur β -Untereinheit desselben Proteins. Wahrscheinlich sind die beiden Untereinheiten durch Genspaltung und anschließende Veränderung, welche mit dem Verlust eines aktiven Zentrums einherging, entstanden (ANDREESEN 1994a; NAKAI *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur des aus einem $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer bestehenden P-Proteins aus *T. thermophilus* wird daher auch eher als Homotetramer und nicht als Heterotetramer beschrieben (NAKAI *et al.*, 2003b; 2005).

NAKAI *et al.* (2005) beschreiben eine große hydrophobe Oberfläche von 11058 Å² zwischen der α - und β -Untereinheit des P-Proteins aus *T. thermophilus*, was die Coexpression der Gene beider Untereinheiten unumgänglich macht und erklärt, dass bei getrennter Synthese beide Proteine nur in unlöslicher Form vorlagen (NAKAI *et al.*, 2003b). Wie in Tabelle 11 und Abbildung 33 (s. S. 108-110) zu erkennen ist, weisen die Proteine aus *E. acidaminophilum* und *T. thermophilus* starke Sequenzhomologien auf, was eine ähnliche Struktur der Proteine beider Organismen vermuten lässt, vor allem aber auch erklärt, warum beide Untereinheiten des P1-Proteins aus *E. acidaminophilum* auch nur bei gemeinsamer Expression der Gene in löslicher Form vorlagen und bei einzelner Synthese die α -Untereinheit nur als *inclusion bodies* vorzufinden gewesen ist.

Das tetramere P-Protein von *T. thermophilus* besitzt zwei aktive Zentren, die jeweils an der Grenzfläche zwischen der α - und β -Untereinheit lokalisiert sind. Der Boden der aktiven Zentren wird hauptsächlich durch Aminosäuren der β -Untereinheit (Gly^{570 β} , Ala^{571 β} , Glu^{574 β} , His^{604 β} , Ser^{606 β} , Thr^{648 β} , Thr^{652 β} , Asp^{677 β} , Ala^{679 β} , Asn^{680 β} , His^{699 β} , Asn^{701 β} , His^{703 β} und Lys^{704 β}), der obere Bereich hingegen nur von einer sehr kleinen Domäne der β -Untereinheit (Ser^{511 β} und Cys^{512 β}) und einer großen Domäne der α -Untereinheit (Tyr^{95 α} , Thr^{96 α} , Tyr^{98 α} ,

Gln^{308 α} , Tyr^{309 α} , Thr^{320 α} and Thr^{321 α}) gebildet. Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, sind diese Bereiche sowohl bei den Eukaryoten als auch den Prokaryoten hoch konserviert. Die Bindung des Cofaktors PLP induziert eine *open-closed*-Konformationsänderung zweier Regionen, die den aktiven Zentren benachbart sind. Die erste Region ist ein mobiler *loop*, der durch die Aminosäuren 305-322 der α -Untereinheit gebildet wird, die zweite ist eine mobile Subdomäne, welche von den Aminosäuren 591-671 der β -Untereinheit gebildet wird. Auch diese Bereiche sind, wie man in Abbildung 33 erkennen kann, stark konserviert. Der Cofaktor tritt durch extensive nichtkovalente Bindungen mit den Aminosäureresten der aktiven Zentren in Wechselwirkung und ist im aktiven Zustand durch ein internes Aldimin (Schiff'sche Base) kovalent mit einem stark konservierten Lysinrest verbunden. Die Phosphatgruppe des PLP ist in eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenpaarungen involviert und fixiert so u. a. den Cofaktor im aktiven Zentrum des Enzyms (NAKAI *et al.*, 2005). Der für die Bindung des PLP essentielle Lysin-Rest ist meist im Abstand von sechs Aminosäuren zu einem drehbaren tetrameren Glycin-Motiv lokalisiert, weil so ein beweglicher Arm entsteht. Dieses Motiv befindet sich wiederum in einem Glycin-reichen Bereich der β -Untereinheit der tetrameren Proteine bzw. dem C-terminalen Bereich der aus einem Homodimer aufgebauten Proteine (ANDREESEN 1994a; NAKAI *et al.*, 2005; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993). Die hier beschriebenen Sequenz-Motive konnten bei allen in Abbildung 33 aufgeführten und miteinander verglichenen Organismen gefunden werden. Bei *E. acidaminophilum* konnte der an der PLP-Bindung beteiligte stark-konservierte Lysinrest an Position 272 und das tetramere Glycin-Motiv an den Positionen 279-282 der β -Untereinheit identifiziert werden (s. S. 110, Abb. 33). Die Bindung von Glycin, dem Substrat der P1-bzw. P-Proteine, erfolgt über die aktiven Zentren, über van der Waals Kräfte mit Aminosäure-Resten der oberen Teile der Zentren. Es kommt hierbei zur Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Cofaktor PLP und dem Substrat Glycin, die dadurch wieder freiwerdende ϵ -Aminogruppe des zuvor an der Bindung von PLP beteiligten Lysin-Restes geht nun eine Ionen-Paar-Bindung mit der Phosphatgruppe des PLP ein (NAKAI *et al.*, 2005). Bevor jedoch die eigentliche von diesem Enzym katalysierte Reaktion, die Decarboxylierung und Aminomethylierung der Liponsäure des P2-Proteins, abläuft, kommt es zur Ausbildung eines ternären Komplexes, bestehend aus P1-Protein, PLP, Glycin und der an das P2-Protein gebundenen Liponsäure (FUJIWARA and MOTOKAWA 1983). Die Erkennung der Liponsäure-Gruppe erfolgt über einen 18 Å tiefen, dem aktiven Zentrum benachbart liegenden Kanal, welcher aus Aminosäureresten der α - und β -Untereinheit gebildet wird. Er besteht aus meist hydrophoben Resten, die mit der aliphatischen Kette des Lipoamid-Armes in Wechselwirkung treten können. Die Disulfid-Brücke des Lipoamid liegt so den Seitenketten der Aminosäure-Reste Tyr^{95 α} , Tyr^{98 α} , Gln^{308 α} und His^{604 β} (aus *T. thermophilus*, Abb. 33) sehr nahe, wobei einer dieser Aminosäure-Reste als möglicher Protonen-Donor für die Reduktion der Disulfid-Brücke fungieren kann (NAKAI *et al.*, 2005). Die am Eingang diese Kanals gelegenen positiv geladenen Aminosäure-Reste Lys^{146 α} , Arg^{280 α} , Arg^{306 α} , Arg^{311 α} , Arg^{312 α} , Lys^{314 α} , Lys^{316 α} , Arg^{894 β} and Lys^{902 β} (Protein aus *T. thermophilus*) sind, wie in Abbildung 33 zu erkennen, bei allen Organismen stark konserviert. Eine Ausnahme bildet hier das Lys^{316 α} , das nur bei *T. thermophilus* zu finden ist.

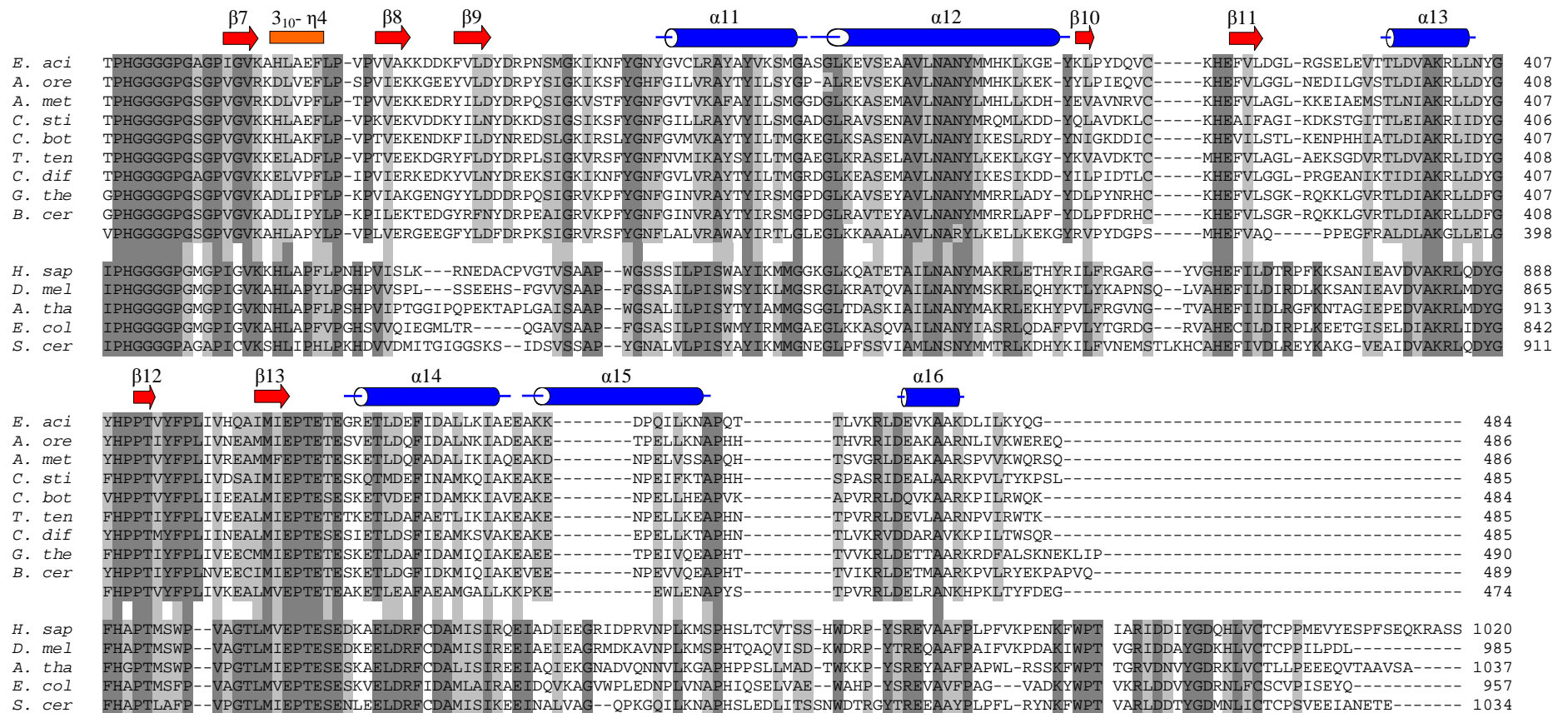


Abb. 33: Aminosäure-Alignments verschiedener P1- bzw. P-Proteine: Gezeigt ist ein Alignment prokaryotischer P1-Proteinen aus *E. acidaminophilum* (POEHLIN 2003), *A. oremlandii* OhILAs, *A. metalliredigens* QYMF, *C. sticklandii*, *C. botulinum* A3 str. Loch Maree, *T. tengcongensis* MB4 (BAO *et al.*, 2002), *C. difficile* (SEBAIHIA *et al.*, 2006), *G. thermodenitrificans* NG80-2 (FENG *et al.*, 2007), *B. cereus* (IVANOVA *et al.*, 2003) *T. thermophilus* HB8 (NAKAI *et al.*, 2003b) und *E. coli* (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993) sowie eukaryotischer P-Proteinen aus *H. sapiens* (KUME *et al.*, 1991), *D. melanogaster* (ADAMS *et al.*, 2000), *A. thaliana* (LIN *et al.*, 1999) und *S. cerevisiae* YJM789 (WEI *et al.*, 2007). Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Unter A sind die jeweiligen α -Untereinheiten bzw. der N-Terminus der entsprechenden Proteine, die nur aus einer Untereinheit aufgebaut sind, dargestellt. Unter B sind die jeweiligen β -Untereinheiten bzw. der C-Terminus der entsprechenden Proteine aufgezeigt. Blaue Röhren oberhalb der Sequenzen kennzeichnen α -Helices, rote Pfeile β -Faltblätter und orangefarbene Balken 3_{10} -Helices.

Die Aminosäure-Reste des P2-Proteins, die den Liponsäure-Arm umgeben, sind meist negativ geladen und ebenfalls hochkonserviert (NAKAI *et al.*, 2003b), hierauf wird jedoch im folgenden Abschnitt bei der Besprechung des P2-Proteins näher eingegangen.

P1-Holoenzyme weisen charakteristische Absorptionsspektren mit Maxima bei 330 nm und 428 nm auf, die Apoenzyme, welche also kein PLP gebunden haben, hingegen zeigen kein entsprechendes Absorptionsmaximum (HIRAGA and KIKUCHI 1980a; KLEIN and SAGERS 1967b). Durch Zugabe des Substrates, also von Glycin, kommt es zur Verschiebung des 430 nm Peaks zu 420 nm (HIRAGA and KIKUCHI 1980b) und durch Zugabe des P2-Proteins, dem Cosubstrat des P1-Proteins (NAKAI *et al.*, 2005; OLIVER *et al.*, 1990), kommt es zur Abschwächung des Peaks bei 428 nm und im Zuge dessen zur Intensivierung des Absorptionsmaximums bei 330 nm (HIRAGA and KIKUCHI 1980a; 1982). Während das P-Proteins aus Mensch als Holoenzym gereinigt werden konnte und der Cofaktor PLP nicht durch Dialyse, sondern nur durch Reduktion mit Borhydrid entfernt werden konnte (HIRAGA and KIKUCHI 1980a), wurde das P1-Protein aus *Micromonas micros* (*Peptococcus glycinophilus*) nur als Apoenzym gereinigt, welches sich aber durch die Zugabe von PLP reaktivieren ließ (KLEIN and SAGERS 1967b). Das native P1-Protein aus *E. acidaminophilum* konnte auch nur durch Zugabe von PLP zum Aufreinigungspuffer in aktiver Form gereinigt werden, der Verlust des Cofaktors führte hier jedoch zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989). Da für das in dieser Arbeit heterolog synthetisierte P1-Protein aus diesem Organismus nicht die typischen Absorptionsspektren detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass es zum Verlust des PLP während der Aufreinigung gekommen sein muss, was auch durch Zugabe des Cofaktors zum Puffer nicht verhindert werden konnte.

4.2.2. Das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase-das *hydrogen carrier* Protein

GcvP2 codiert für das P2-Protein aus *E. acidaminophilum*, welches ein Molekulargewicht von 14,1 kDa aufweist (*accession number* AAU84892.1). Eine Auswahl aus in der EMBL-Datenbank aufgeführten Proteinen, welche signifikante Homologien zu dem P2-Protein aus *E. acidaminophilum* aufweisen, wurde in Tabelle 12 aufgeführt. Zum Vergleich wurden auch Proteine eukaryotischer Herkunft, wie z. B. aus *H. sapiens*, *A. thaliana*, *D. melanogaster* oder *Pisum sativum* herangezogen. Eine 57%ige Identität zeigte das Protein aus *E. acidaminophilum* zu dem Polypeptid aus *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF, aber auch zu *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* ATCC und *Moorella thermoacetica* ATCC, die alle drei ebenso in die Gruppe der Clostridien einzuordnen sind. Auch hier zeigen die P2-Proteine aus *C. difficile* und *C. sticklandii* nicht die höchste Identität im Vergleich zu dem P2-Protein aus *E. acidaminophilum*. Das Protein aus *C. difficile* weist im Vergleich zu den anderen aufgeführten prokaryotischen Proteinen die geringste Identität auf.

Tab. 12: Vergleich des P2-Proteins aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken

Organismus	Protein: AS/MG (kDa)	accession- number	Identität (%) ¹
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	127 / 14,1	A6TMY7	57
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC	126 / 13,9	ABY95615.1	57
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC	130 / 14,1	Q2RH47	57
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	446 / 49,7	Q8ENT9	55
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC	127 / 14,3	Q65F75	55
<i>Clostridium botulinum</i> A3 str. Loch Maree	130 / 14,6	ACA56591.1	54
<i>Clostridium sticklandii</i>	126 / 14,2		53
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	128 / 14,1	Q5SKW9	49
<i>Escherichia coli</i> K12	130 / 13,8	P0A6T9	48
<i>Clostridium difficile</i> 630	120 / 13,5	Q186L3	47
<i>Arabidopsis thaliana</i>	156 / 17,1	O82179	51
<i>Drosophila melanogaster</i>	165 / 18,2	Q9U616	48
<i>Homo sapiens</i>	173 / 18,9	NM_004483.3	44
<i>Pisum sativum</i>	165 / 17,8	P16048	44

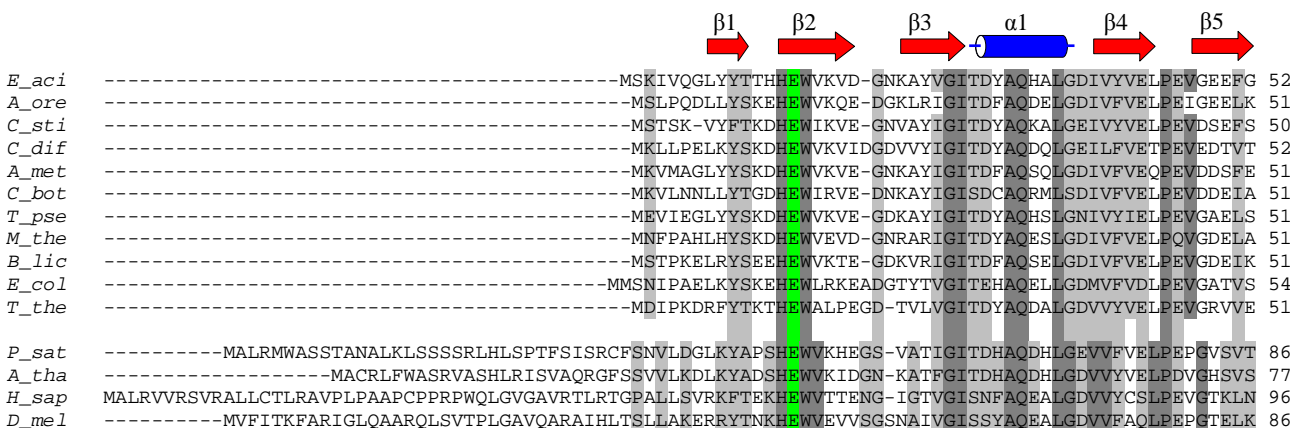
¹ im Vergleich zum des P2-Proteins aus *E. acidaminophilum*

Das P2- bzw. H-Protein ist ein kleines, saures und hitzestabiles Protein mit Liponsäure (6,8-Dithioloctansäure) als funktionelle Gruppe (ANDREESEN 1994b; FUJIWARA *et al.*, 1979; MACHEREL *et al.*, 1990). Das P2-Protein der Glycin-Decarboxylase ist das entscheidende Enzym in der Abfolge der durch die einzelnen Komponenten des Enzymkomplexes katalysierten Reaktionen. Mit seinem bei *Pisum sativum* ca. 14 Å langen Lipoamid-Arm tritt es mit den anderen drei Komponenten in Wechselwirkung und ist somit der zentrale Punkt (COHEN-ADDAD *et al.*, 1997; COHEN-ADDAD *et al.*, 1995). Es wird sogar als Cosubstrat der anderen Proteine, speziell des P1-Proteins, angesehen (FUJIWARA and MOTOKAWA 1983; KIM and OLIVER 1990; NAKAI *et al.*, 2005; OLIVER *et al.*, 1990). Die bei der Decarboxylierung des Glycins freiwerdende Aminomethylgruppe wird durch das P1-Protein auf das distale Schwefelatom der oxidiert vorliegenden Liponsäuregruppe des P2-Proteins übertragen, welche dadurch in die methylinierte Form übergeht und zum Substrat für das P4-Protein wird. Dieses katalysiert die Spaltung der Aminomethylgruppe und die Übertragung der C₁-Einheit als Methylengruppe auf THF und die Freisetzung von NH₃. Die nun im reduzierten Zustand vorliegende funktionelle Liponsäuregruppe des P2-Proteins wird durch die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, dem P3-Protein, oxidiert, wobei das NAD(P) reduziert wird (ANDREESEN 1994a; 1994b).

Das P2-bzw. H-Protein wurde bisher für Prokaryoten und Eukaryoten beschrieben. Die Proteine aus *C. acidurici* und *A. globiformis* wurden mit einer Größe von ca. 20 kDa beschrieben (GARIBOLDI and DRAKE 1984; KOCHI and KIKUCHI 1976), was von der Größe des von FREUDENBERG und ANDREESEN

(1989) aus *E. acidaminophilum* isolierten P2-Proteins (ca. 13 kDa), abweicht. Die Größe von 13 kDa konnte anhand der Sequenzdaten (siehe Anhang A.II.) und SDS-Page nach heterologer Synthese des P2-Proteins aus *E. acidaminophilum* (s. S. 73, Abb. 21 B) bestätigt werden. Proteine anderer prokaryotischer Vertreter weisen ähnliche molekulare Gewichte auf, so wurde z. B. das Protein aus *M. micros* (*P. glycinophilus*) mit einer Größe von 12,6 kDa (ROBINSON *et al.*, 1973) oder das Enzym aus *T. thermophilus* mit einer Größe von ca. 14,1 kDa (NAKAI *et al.*, 2003a) beschrieben. Die Proteine aus Eukaryoten werden mit Größen von 12 kDa für das humane H-Protein (FUJIWARA *et al.*, 1991a; HIRAGA and KIKUCHI 1980a), 17 kDa für das Protein aus der Ratte (MOTOKAWA and KIKUCHI 1969), 13,9 kDa für die Enzyme diverser *Flaveria*-Arten (KOPRIVA *et al.*, 1996a; KOPRIVA *et al.*, 1996b), 13,9 kDa für das H-Protein aus dem Huhn (FUJIWARA *et al.*, 1986) und mit 14,1 kDa für den Vertreter aus *P. sativum* (KIM and OLIVER 1990; MACHEREL *et al.*, 1990) beschrieben. Anhand dieser Aufzählung ist zu erkennen, dass dieses Protein ubiquitär verbreitet ist und alle beschriebenen Vertreter ähnliche Größen aufweisen. Die Abbildung 34 zeigt, dass es Sequenzbereiche gibt, die zwischen allen Domänen des Lebens stark konserviert sind.

Die bisher aufgelösten Strukturen der H-Proteine aus *P. sativum* und *T. thermophilus* werden beide als *hybrid-barrel sandwich* Struktur beschrieben, die aus zwei antiparallelen β -Faltblättern besteht, welche um 140° gedreht sind. Die beiden aus sechs bzw. drei β -Strängen bestehenden Faltblätter sind durch einen flexiblen *loop* einer *hairpin*-Struktur, die aus einer α -Helix besteht, verbunden (COHEN-ADDAD *et al.*, 1997; COHEN-ADDAD *et al.*, 1995; GUILHAUDIS *et al.*, 1999a; NAKAI *et al.*, 2003a; PARES *et al.*, 1994; PARES *et al.*, 1995). Mit der ϵ -Aminogruppe eines in dieser Struktur lokalisierten Lysin-Restes ist die funktionelle Gruppe, die Liponsäure, über eine Amidbindung verknüpft und somit an der Oberfläche des Proteins lokalisiert. Dieser Aminosäure-Rest ist bei allen bisher beschriebenen Organismen hoch konserviert (Abb. 34, rot unterlegt) und essentiell für die Funktionalität des Proteins (COHEN-ADDAD *et al.*, 1995; FUJIWARA *et al.*, 1986; 1991b; FUJIWARA *et al.*, 1979; NAKAI *et al.*, 2003a; PARES *et al.*, 1994; PARES *et al.*, 1995). Dieser stark konservierte Lysin-Rest konnte auch für das Protein aus *E. acidaminophilum* identifiziert werden und ist in der Abbildung 34 rot unterlegt.



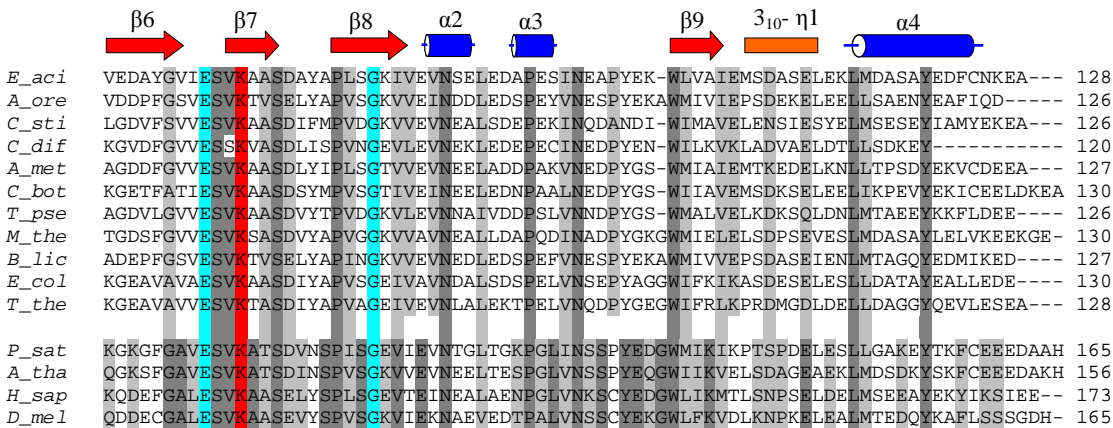


Abb. 34: Aminosäure-Alignment verschiedener P2- bzw. H-Proteine: Gezeigt ist ein Alignment prokaryotischer P2-Proteinen aus *E. acidaminophilum* (POEHLEIN 2003), *A. metalliredigens* QYMF, *T. pseudethanolicus* ATCC, *M. thermoacetica* ATCC, *O. iheyensis* HTE831 (LU *et al.*, 2001), *C. botulinum* A3 str. Loch Maree, *B. licheniformis* ATCC (REY *et al.*, 2004), *C. sticklandii*, *C. difficile* (SEBAIHIA *et al.*, 2006), *T. thermophilus* HB8 (NAKAI *et al.*, 2003a) und *E. coli* (OKAMURA-İKEDA *et al.*, 1993) sowie eukaryotischer H-Proteinen aus *H. sapiens* (LEVY *et al.*, 2007), *D. melanogaster* (ADAMS *et al.*, 2000), *A. thaliana* (HEAZLEWOOD *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 1999) und *P. sativum* (KIM and OLIVER 1990). Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Blaue Röhren oberhalb der Sequenzen kennzeichnen α -Helices, rote Pfeile β -Faltblätter und orangefarbene Balken 3_{10} -Helices. Der für die Stabilisierung des Liponsäure-Armes wichtige Glutamat-Rest wurde grün unterlegt, der für die Erkennung der Liponsäure-Bindedomäne wichtige Glutamat- bzw. Glycin-Rest wurden blau markiert.

Die sich an der Oberfläche des Proteins befindende oxidierte und reduzierte Form des Lipoamid-Armes ist frei beweglich. Nach Beladung mit der Aminomethylgruppe kommt es zu einer 90° -Drehung (COHEN-ADDAD *et al.*, 1995) und einer damit verbundenen Verlagerung der Methylamin-tragenden prosthetischen Gruppe in eine Vertiefung auf der Oberfläche des Proteins. Durch Wechselwirkungen mit einem stark konservierten Glutamat-Rest kommt es zur Stabilisierung des Lipoamid-Armes in dieser Spalte. Dieser Aminosäure-Rest konnte bei allen in Abbildung 34 (grün unterlegt) dargestellten Organismen identifiziert werden. Durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Resten Ser¹², Ala²⁷, Ala³¹, Leu³⁵, Ala⁶⁴ und Asp⁶⁷ (bezogen auf das Protein aus *P. sativum*) wird der Liponsäure-Arm vor nucleophilen Angriffen von OH-Ionen geschützt und so die nichtenzymatische Freisetzung von NH₃ und Formaldehyd verhindert (COHEN-ADDAD *et al.*, 1997; COHEN-ADDAD *et al.*, 1995; GUILHAUDIS *et al.*, 1999b; NAKAI *et al.*, 2003a; PARES *et al.*, 1994; PARES *et al.*, 1995; ROCHE *et al.*, 1999). Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt durch die Bindung der Liponsäure an den Lysin-Rest und Interaktion mit dem His³⁴. Dieser Rest ist jedoch nur wenig konserviert, was den Liponsäure-Arm des Proteins aus *P. sativum* weniger beweglich macht im Vergleich zu anderen Proteinen, wie z. B. dem Protein aus *T. thermophilus* (COHEN-ADDAD *et al.*, 1997; COHEN-ADDAD *et al.*, 1995; NAKAI *et al.*, 2003a).

Während Ser¹² nur bei *P. sativum* und *A. thaliana* und Asp⁶⁷ bei 2/3 der in Abbildung 34 aufgezeigten Organismen zu finden ist, sind die anderen hier beschriebenen Aminosäuren sehr stark konserviert oder wie im Fall von Ala⁶⁴ durch die eine ähnliche Ladung aufweisende Aminosäure Glutamat substituiert. Das lässt vermuten, dass die Methylamin-tragende funktionelle Gruppe, bei allen P2-bzw. H-Proteinen, geschützt in

einer Vertiefung des Proteins liegt. Die H-Proteine aus *T. thermophilus* bzw. *P. sativum* sind zu 44 % identisch und haben nachweislich eine nahezu identische Struktur (NAKAI *et al.*, 2003a). Da das P2-Protein aus *E. acidaminophilum* eine 49%ige bzw. 44%ige Identität zu beiden Proteinen aufweist, kann auch hier vermutet werden, dass alle drei Proteine ähnliche Strukturen aufweisen.

Die Übertragung der funktionellen Gruppe auf das Apoprotein kann zumindest bei *E. coli* auf zwei getrennten Wegen erfolgen, einem endogenen und einem exogenen. Bei ersterem wird Octansäure aus dem Fettstoffwechsel an ACP (Acyl-Carrier-Protein) gebunden und somit aktiviert und anschließend durch das *lipA*-Genprodukt durch zweimalige Sulfurierung in Liponsäure umgewandelt und durch LipB (Lipoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Protein-N-Lipoyltransferase) auf das Apoprotein, im Fall der Glycin-Decarboxylase auf das P2-bzw. H-Protein übertragen. Extrazelluläre, über die Zellmembran aufgenommene Liponsäure, wird durch LplA, die Lipoat-Ligase A, in einem ATP und Mg^{2+} -abhängigen Prozess auf das Zielprotein übertragen (MILLER *et al.*, 2000; MORRIS *et al.*, 1994; 1995). Ein in Abstand von elf Aminosäuren C-terminal von dem für die Bindung der Liponsäure essentiellen Lysin-Restes gelegener Glycin-Rest ist laut FUJIWARA *et al.* (1996) essentiell für die Faltung lipoylierter Proteine, wie z. B. die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und die Beladung dieser mit Liponsäure. Eine gerichtete Mutation dieses Glycin-Restes beim Protein aus dem Rind führte zu einer stark verminderten Synthese des Proproteins (nur 12-17 %). Ein Glutamat-Rest, welcher drei Aminosäure-Reste und ein Glycin-Rest (Abb. 34, türkis unterlegt), welcher 15 Aminosäuren N-terminal des essentiellen Lysin-Restes gelegen ist, sind ebenfalls sehr wichtig für die Struktur des Proteins und für die Erkennung der Liponsäure-Bindedomäne durch die Liponsäure-übertragenden Proteine (FUJIWARA *et al.*, 1991a; FUJIWARA *et al.*, 1996). Die Liponsäure-Bindedomäne diverser lipoylierter Proteine weisen starke Sequenzhomologien auf, sodass dass die Erkennung dieser bei allen Proteinen sehr ähnlich ist (BROCKLEHURST and PERHAM 1993). Das hier beschriebene Glutamat und erstgenanntes Glycin sind, wie in Abbildung 34 zu erkennen, bei allen Organismen stark konserviert, das 15 Aminosäuren N-terminal des essentiellen Lysin-Restes gelegene Glycin hingegen ist nur bei den Eukaryoten stark konserviert, bei den Prokaryoten weisen neben dem Protein aus *E. acidaminophilum* nur sechs der aufgeführten Proteine diesen Aminosäure-Rest auf.

Ähnlich verläuft die Lipoylierung der Apoproteine von Eukaryoten. Nach dem Transfer der *precursor* in die Mitochondrien erfolgt die Aktivierung durch das Lipoat-aktivierende Enzym und die Übertragung der funktionellen Gruppe durch die Lipoyl-AMP: N^{ϵ} -Lysin-Lipoyl-Transferase (FUJIWARA *et al.*, 1990; 1991b; 1994; FUJIWARA *et al.*, 1999; FUJIWARA *et al.*, 2001). Aus *E. coli* konnten bisher die an der *de novo* Biosynthese der Liponsäure beteiligten Genprodukte LipA und LipB sowie die Lipoat-Protein-Ligase A nachgewiesen werden (BROOKFIELD *et al.*, 1991; FUJIWARA *et al.*, 2005; HAYDEN *et al.*, 1992; MORRIS *et al.*, 1994; 1995; VANDEN BOOM *et al.*, 1991). Bei fehlender Supplementation des Kultivierungsmediums (mit Liponsäure) des Stammes zur heterologen Expression von *gcvP2* aus *E. acidaminophilum* konnten keine lipoylierten P2-Derivate nachgewiesen werden. Erst nach Zugabe von Liponsäure während der Kultivierung dieses Stammes konnte durch MALDI-MS-Analyse gezeigt werden, dass ca. 40 % des heterolog synthetisierten Proteins in der Lipoamid-tragenden Form vorlagen. Somit wurde gezeigt, dass die *de novo*

Synthese von Liponsäure durch die Proteine LipA und LipB nicht ausreichend war, um das heterolog synthetisierte Protein zu lipoylieren, sondern extrazellulär verfügbare Liponsäure genutzt und wahrscheinlich durch das *lplA*-Genprodukt auf das Apoprotein übertragen wurde. MACHEREL *et al.* (1996) beschrieben für das heterolog in *E. coli* synthetisierte H-Protein aus *P. sativum* eine 70%ige, FUJIWARA (1992) hingegen nur eine 10%ige Lipoylierung für das aus Rind stammende H-Protein bei Überproduktion in *E. coli* und Supplementation des Kultivierungsmediums mit Liponsäure.

Dieser verhältnismäßig geringe Anteil an lipoyliert vorliegendem P2-Protein aus *E. acidaminophilum* kann ein möglicher Grund für die nicht vorhandene Aktivität der Glycin-Decarboxylase des gesamten aus heterolog synthetisierten Proteinen bestehenden Komplexes sein, da das P2-Apoprotein als kompetitiver Inhibitor des P1-Proteins beschrieben wird (FAURE *et al.*, 2000; NEUBURGER *et al.*, 2000). So war es auch schwierig, das in einem funktionalen Enzymkomplexes gefundene molare Verhältnis von 1,0:15,3:1,3 für die Proteine P1, P2 und Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin (FREUDENBERG *et al.*, 1989b) im enzymatischen Test einzustellen. Auch für Eukaryoten, so z. B. für *P. sativum*, wurde ein vergleichbares Verhältnis von 1:14:4,5:0,5 (2:27:9:1) für die P-, H-, T- und L-Proteine gezeigt (BOURGUIGNON *et al.*, 1993; OLIVER *et al.*, 1990). Fraglich ist hier jedoch, ob diese Verhältnisse zufällige Artefakte darstellen oder ob sie tatsächlich so *in vivo* zu finden sind. Da aber die für beide Organismen beschriebenen Protein-Verhältnisse (P- und H-Protein) sehr ähnlich sind, spricht einiges dafür, dass die tatsächliche *in vivo*-Situation wiedergegeben ist. Fest steht, dass der Anteil an P2-Protein deutlich höher ist im Vergleich zu den anderen Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum*. Von FREUDENBERG *et al.* (1989) wurde gezeigt, dass das P2-Protein aus *E. acidaminophilum* sowohl im Cytoplasma aber auch an der Zellmembran lokalisiert ist und sowohl mit der Glycin-Decarboxylase aber auch mit der Glycin-Reduktase assoziiert ist. Dies mag eine mögliche Erklärung für die stark erhöhte Anzahl an P2-Proteinen im Vergleich zu den Proteinen der Glycin-Decarboxylase von *E. acidaminophilum* sein. Die Proteine P1, P2 und P4 der Glycin-Decarboxylase bilden 3,1 %, 3,5 % bzw. 4 % der löslichen Proteine des Rohextraktes Glycin-gewachsener Zellen von *E. acidaminophilum* (ANDREESEN 1994b; FREUDENBERG and ANDREESEN 1989).

Ein nicht zu vernachlässigender Teil des Aktivitätsverlustes den heterolog synthetisierten P2-Proteines aus *E. acidaminophilum* ist sicherlich dem *Strep*-tag[®] II zu schulden, HASSE *et al.* (2007) beschreiben einen Aktivitätsverlust des mit einem His-Tag fusionierten H-Proteins aus *Synechocystis* sp. von 35-45 % gegenüber dem Derivat ohne Tag.

In einigen *Flaveria*-Arten wurden vier bis fünf Kopien des für das H-Protein codierenden Gens identifiziert (KOPRIVA and BAUWE 1995; KOPRIVA *et al.*, 1996a), für *Flaveria trinervia* wurde ein Gen beschrieben, nach dessen Transkription durch Nutzung zweier verschiedener *splice*-Akzeptorstellen (alternatives *splicing*) zwei unterschiedliche H-Proteine translatiert werden (KOPRIVA *et al.*, 1996b; KOPRIVA *et al.*, 1995). Für andere *Flaveria*-Arten hingegen, wurde genau wie für *E. coli* und die meisten annotierten Organismen nur ein Gen identifiziert, was für das H-Protein codiert (KOPRIVA *et al.*, 1996a; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993). Durch Southern-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass auch in *E. acidaminophilum* nur ein singuläres Gen existiert, welches für das P2-Protein codierend.

4.2.3. Das P4-Protein der Glycin-Decarboxylase-die Aminomethyl-Transferase

Das 1,1 kb umfassende nur einmal vorkommende Gen *gcvP4* codiert für das P4-Protein der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum*. Dieses ca. 41,1 kDa große Protein zeigt genau wie das P1-Protein aus diesem Organismus die höchste Identität zu dem Homologen aus *A. oremlandii* OhILAs, diese ist hier mit 61 % zu beziffern. Wie aus Tabelle 13 ersichtlich wird, konnten auch signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Prokaryoten, aber auch zu denen aus Eukaryoten verifiziert werden.

Tab. 13: Vergleich des P4-Proteins aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken

Organismus	Protein: AS/MG (kDa)	accession- number	Identität (%) ¹
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	368 / 41,2	A8MEG4.1	61
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	374 / 42,2	Q8RCV9	59
<i>Thermosinus carboxydivorans</i> Nor1	365 / 40,2	EAX48994.1	57
<i>Peptostreptococcus micros</i> ATCC 33270	367 / 40,3	EDP24232.1	56
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	365 / 40,3	Q65F75	55
<i>Clostridium difficile</i> 630	367 / 40,8	Q186L1	54
<i>Clostridium sticklandii</i>	365 / 41,4		54
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	364 / 40,3	Q5SKW9	44
<i>Escherichia coli</i> K12	364 / 40,1	P0A6T9	38
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	401 / 46,2	O58888	36
<i>Pisum sativum</i>	408 / 44,3	P49364	37
<i>Drosophila melanogaster</i>	405 / 43,4	Q9VKR4	36
<i>Arabidopsis thaliana</i>	408 / 44,4	O65396	35
<i>Homo sapiens</i>	403 / 43,9	A8K3I5	33

¹ im Vergleich zum des P4-Proteins aus *E. acidaminophilum*

Das P4 bzw. T-Protein der Glycin-Decarboxylase ist eine Tetrahydrofolat-abhängige Aminomethyl-Transferase. Sie katalysiert die Spaltung der an die Liponsäure-Gruppe des P2-Proteins gebundenen Aminomethylgruppe und den Transfer der Methylengruppe auf THF sowie die damit verbundene Freisetzung von NH₃. Bei Abwesenheit von THF kommt es mit einer bis zu 2000-fach erniedrigten Reaktionsgeschwindigkeit zur Freisetzung von NH₃ und Formaldehyd (ANDREESEN 1994a; 1994b; FUJIWARA *et al.*, 1984). FREUDENBERG und ANDREESEN (1989) isolierten das P4-Protein aus *E. acidaminophilum* und bestimmten ein molekulares Gewicht von 42 kDa. Dieser Wert konnte anhand der für das entsprechende Gen ermittelten Sequenzdaten, welche unter Anhang A.II. dargestellt sind, bestätigt werden. Während die T-Proteine aus *H. sapiens* und der Ratte Größen von ca. 44 kDa bzw. 33 kDa aufweisen (HAYASAKA *et al.*, 1993; MOTOKAWA and KIKUCHI 1974), wurden für die entsprechenden

Vertreter aus dem Huhn und dem Rind Größen von ca. 41 kDa und 37 kDa beschrieben (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1982; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1991). Auch die aus den Pflanzen *Solanum tuberosum* und *P. sativum* isolierten Aminomethyl-Transferasen haben ein molares Gewicht von ca. 45 kDa (KOPRIVA and BAUWE 1994b; WALKER and OLIVER 1986) und sind somit mit den hier aufgeführten Proteinen (ohne mitochondriale Leadersequenz), speziell auch mit dem aus *E. acidaminophilum* stammenden zu vergleichen. Die bisher aufgelösten Strukturen von T-Proteinen aus dem Menschen und *T. maritima* werden als Kleeblatt-Struktur mit einer zentralen Vertiefung beschrieben, welche von drei Domänen gebildet wird. Die erste Domäne besteht aus einem sechssträngigen β -Faltblatt, welches ein einfaches *greek-key* Motiv enthält sowie auf einer Seite von drei und der anderen Seite von zwei α -Helices umgeben ist. Die zweite Domäne besteht aus einem aus fünf Strängen bestehenden antiparallelen β -Faltblatt, welches ebenfalls von α -Helices flankiert wird. Die dritte Domäne wird als verdrehtes sechssträngiges *jelly-roll* Motiv beschrieben, das in engem Kontakt zu den β -Faltblättern der anderen beiden Domänen steht und somit die ringartige Struktur des Proteins schließt (LEE *et al.*, 2004; LOKANATH *et al.*, 2004; 2005; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 2005; ORUN *et al.*, 2003).

Hierbei sind bei dem *E. coli* T-Protein mind. die ersten 16 Aminosäuren des N-Terminus essentiell für die Faltung und die damit verbundene Aktivität des Proteins. Bei T-Proteinen, die N-terminal um 4, 7 bzw. 11 Aminosäuren verkürzt waren, konnten nur Aktivitäten von 42, 9 bzw. 4 % gegenüber dem Wildtyp-T-Protein gemessen werden, bei einer Verkürzung um 16 Aminosäure-Reste war ein vollständiger Aktivitätsverlust aufgetreten. Speziell für die $\Delta 7$ -Mutante war ein 25-fach erhöhter K_M -Wert und ein 10-fach erniedrigter k_{cat} -Wert in Bezug auf das aus *E. coli* stammende H-Protein zu finden (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1999a). Das THF, welches für die Funktionalität des P4 bzw. T-Proteins essentiell ist, wird im aktiven Zentrum gebunden, welches bei dem humanen Protein primär durch die Aminosäure-Reste Met⁵⁶, Leu¹⁰², Ile¹⁰³, Val¹¹⁵, Glu²⁰⁴ und Arg²³³ gebildet wird (Abb. 35). Dabei kommt es über Wassermoleküle bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zur direkten Interaktion mit den Aminosäure-Resten Leu⁸⁸, Arg²⁹² und Tyr³⁷¹. Dieses Ergebnis von OKAMURA-IKEDA *et al.* (2005) deckt sich im Wesentlichen mit den Resultaten von OKAMURA-IKEDA *et al.* (1999a), die durch *cross-linking* Versuche mit rekombinantem T-Protein aus *E. coli* und dem mit ¹⁴C-markiertem THF-Analogon Methylentetrahydropteroyltetraglutamat (5,10-CH₂-H₄PteGlu₄) die Aminosäure-Reste Lys⁷⁸, Lys⁸¹ und Lys³⁵² als essentiell für die Bindung des Substrates beschrieben haben. Wie anhand des in Abbildung 35 dargestellten Alignments diverser P4-bzw. T-Proteine zu erkennen ist, sind die an der Ausbildung des aktiven Zentrums des humanen T-Proteins beteiligten Aminosäure-Reste Met⁵⁶, Val¹¹⁵, Glu²⁰⁴ und Arg²³³ und das an der Bindung von THF beteiligte Leu⁸⁸ bei allen aufgeführten Proteinen, so auch bei P4 aus *E. acidaminophilum* konserviert. Die Reste Leu¹⁰², Ile¹⁰³ sowie die an der Bindung von THF beteiligten Reste Arg²⁹² und Tyr³⁷¹, aber auch die drei für das aus *E. coli* stammende T-Protein beschriebenen Lysin-Reste, sind hingegen nur sehr schwach konserviert.

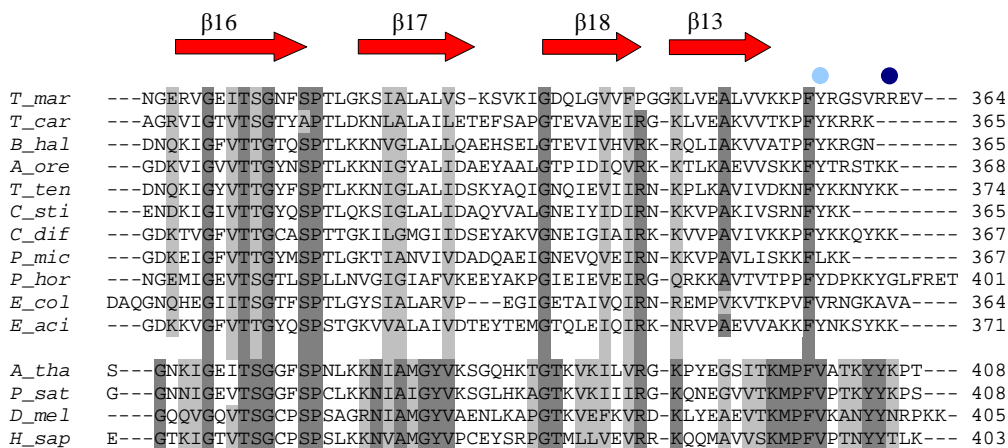


Abb. 35: Aminosäure-Alignment verschiedener P4- bzw. T-Proteine: Gezeigt ist ein Alignment von prokaryotischen P4-Proteinen aus *E. acidaminophilum* (diese Arbeit; POEHLEIN 2003) *A. oremlandii* OhILAs, *T. tengcongensis* MB4 (BAO *et al.*, 2002), *T. carboxydivorans* Nor1, *P. micros* ATCC 33270, *B. halodurans* C-125 (TAKAMI *et al.*, 2000), *C. sticklandii*, *C. difficile* (SEBAIHIA *et al.*, 2006), *T. maritima* MSB8 (LEE *et al.*, 2004), *E. coli* K12 (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1993) und *P. horikoshii* OT3 (LOKANATH *et al.*, 2005) sowie von T-Proteinen aus eukaryotischen Quellen wie *H. sapiens* (HAYASAKA *et al.*, 1993), *D. melanogaster* (ADAMS *et al.*, 2000), *A. thaliana* (THEOLOGIS *et al.*, 2000) und *P. sativum* (BOURGUIGNON *et al.*, 1993). Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Blaue Röhren oberhalb der Sequenzen kennzeichnen α -Helices, rote Pfeile β -Faltblätter. Die an der Bindung des THF beteiligten Aminosäure-Reste wurden durch dunkelblaue (Protein aus *T. maritima*) bzw. hellblaue (Protein aus *H. sapiens*) Kreise oberhalb und die an der Bindung der Liponsäuregruppe beteiligten Aminosäuren durch dunkelrote Vierecke unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.

Laut LEE *et al.* (2004) interagieren die Seiten-Ketten der Aminosäure-Reste Asp⁹⁶, Tyr¹⁰⁰, Tyr¹⁶⁹, Tyr¹⁸⁸, Glu¹⁹⁵, Arg²²⁷ und Arg³⁶² sowie der Carbonyl-Sauerstoff des Val¹¹⁰ direkt mit THF. Die Aminosäuren Tyr⁸³, Asn¹¹², Tyr¹⁶⁸, Tyr²³⁶, Leu²³⁷ sowie Tyr²³⁹ hingegen interagieren nur indirekt über Wassermoleküle mit THF. Während Tyr¹⁶⁸, Tyr¹⁶⁹, Tyr²³⁶, Leu²³⁷ und Arg³⁶² spezifisch für das aus *T. maritima* stammende T-Protein sind, konnte gezeigt werden, dass Tyr⁸³ und Tyr¹⁰⁰ innerhalb der Prokaryoten stark konserviert, also auch bei *E. acidaminophilum* zu finden sind (Abb. 35). Die anderen hier aufgeführten Aminosäure-Reste sind bei allen in Abbildung 35 verglichenen Proteinen stark konserviert.

Durch Interaktion der Aminomethyl-Transferase mit dem *hydrogen carrier* Protein kommt es zur Destabilisierung desselben und somit zur Lockerung der Wechselwirkung des Methylamin-tragenden Liponsäure-Arms mit der Vertiefung auf der Oberfläche des P2-Proteins (GUILHAUDIS *et al.*, 2000). Es kommt danach zur Bindung der Liponsäure in einer 15 Å tiefen Tasche auf der Oberfläche des T-Proteins, welche direkt neben der Binde-Tasche des THF gelegen ist. Hierbei interagiert die Seitenkette des Asp²²⁸ direkt über eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit der Liponsäure, und die Aminosäuren Phe²⁰, Tyr¹⁸⁸, Leu²²⁴, Arg²²⁷ und Leu²³⁸ umgeben den aliphatischen Teil des Cofaktors (LEE *et al.*, 2004). Die hier beschriebenen Reste sind bei allen in Abbildung 35 gezeigten Proteinen, also auch bei dem aus *E. acidaminophilum* stammenden, zu finden.

Der Transfer der C₁-Einheit auf THF wird wahrscheinlich durch einen nukleophilen Angriff auf den Methylen-Kohlenstoff des mit der Aminomethylgruppe beladenen Liponsäure-Armes durch das THF

initiiert. Hierbei scheint das Asp¹⁰¹ des humanen T-Proteins, welches dem Asp⁹⁶, des aus *T. maritima* stammenden T-Protein entspricht, essentiell zu sein und wurde auch für das aus *P. horikoshii* stammende Protein als Initiator beschrieben (LEE *et al.*, 2004; LOKANATH *et al.*, 2005; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 2005). Dieser Aminosäure-Rest, der sich im P4-Protein aus *E. acidaminophilum* an Position 104 befindet, ist auch bei allen anderen aufgeführten Proteinen zu finden (Abb. 35).

In der Literatur wird das P4- bzw. T-Protein als ein sehr instabiles und leicht aggregierendes Protein beschrieben (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; GUILHAUDIS *et al.*, 2000). Das P4-Protein aus *E. acidaminophilum* ließ sich nur sehr schwer nativ bis zur Homogenität reinigen, und dies war oft mit einem sehr hohen Aktivitätsverlust verbunden (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989). GUILHAUDIS *et al.* (2000) berichteten, dass sich das T-Protein aus *P. sativum* nur in Gegenwart des H-Proteins aus diesem Organismus oder bei hohen Ammonium-Acetat Konzentrationen als lösliches Protein synthetisieren und reinigen ließ. COHEN-ADDAD *et al.* (1997) berichteten Gleiches über das nativ gereinigte T-Protein aus diesem Organismus. Auch das T-Protein aus Rattenleber-Mitochondrien wird als sehr instabil beschrieben (MOTOKAWA and KIKUCHI 1974).

Während der heterologen Synthese und Reinigung des *Strep-tag*[®] II-fusionierten P4-Proteins aus *E. acidaminophilum* war keine Aggregation des Proteins festzustellen. Da die Aktivität dieses Proteins aber nur mit Hilfe der anderen drei Komponenten des Glycin-Decarboxylase-Komplexes nachzuweisen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch dieses Protein nur in inaktiver Form gereinigt werden konnte und die Etablierung des Glycin-Decarboxylase-Tests mit den heterolog synthetisierten Komponenten aus diesem Grund nicht möglich war.

4.3. Interaktionsstudien mit Hilfe von bakteriellen *two-hybrid*-Systemen und *pull-down-assays*

Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt ist, sollte mit Hilfe von bakteriellen *two-hybrid*-Systemen nach möglichen Interaktionspartnern von PrpU gesucht werden. Als mögliche Kandidaten wurden hier die Komponenten der Glycin-Decarboxylase, des Thioredoxin-Systems und das Selenoprotein A der Glycin-Reduktase gewählt, weil hier ebenfalls redoxaktive Zentren vorhanden sind. Beide bakteriellen *two-hybrid*-Systeme die hierbei zur Anwendung kommen sollten, bedienen sich einer unterschiedlichen Art der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Während beim BacterioMatch[®]Two-Hybrid-System durch Translationsfusionen mit dem λ cI-Repressor-Protein (*bait*-Protein) und der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (*target*-Protein) bei Interaktion beider Proteine eine Transkriptionsinitiation der Reportergene *amp^R* und *lacZ* induziert wird (DOVE and HOCHSCHILD 1998; DOVE *et al.*, 1997), kommt es bei dem *lexA*-basierenden *two-hybrid*-System zu einer Repression des *lacZ* bei Protein-Protein-Interaktion. Bei letzterem System erfolgt eine Translationsfusion des einen Proteins mit der Wildtyp DNA-Bindedomäne eines LexA-Repressors, während das zweite Protein mit einer mutierten Variante fusioniert wird (DMITROVA *et al.*,

1998). Bei diesem System kann es nur zur Repression der Transkription kommen, wenn beide Varianten des Repressors an den entsprechenden, vor dem Reportergen lokalisierten LexA-Hybrid-Operator binden (s. S. 57, Abb. 16) (DMITROVA *et al.*, 1998; LADANT and KARIMOVA 2000). Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber dem BacterioMatch[®]Two-Hybrid-System, für das gleich zwei entscheidende Nachteile aufzuzählen sind. Zum einen besitzt die N-terminale DNA-Bindedomäne des λ C1-Repressor-Proteins eine langsame, aber immanente Neigung zur Dimer-Bildung, was eine Repression der Transkription der Reportergene zur Folge hat. Zum anderen, und das ist für die hier geschilderten Untersuchungen ausschlaggebend, ist dieses System für Proteine ungeeignet, welche zur Homodimer-Bildung neigen, da es durch λ C1-Repressor-Dimere ebenfalls zur Repression der Transkription kommt, welche sich auch durch Heterodimer-Bildung mit dem *target*-Protein nicht aufheben lässt (LADANT and KARIMOVA 2000). Die Daten, welche durch Interaktionsstudien mit dem *lexA*-basierenden *two-hybrid*-System erhalten wurden (3.3.8; 3.3.9), zeigen, dass nahezu alle untersuchten Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit Homodimere ausbilden. Auch durch Vorversuche mit dem BacterioMatch[®]Two-Hybrid-System konnte dieses bestätigt werden, was zum Ausschluss dieses Systems führte, sodass die in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen nur mit dem von DMITROVA *et al.* (1998) etablierten *lexA*-System vorgenommen wurden.

4.3.1. Interaktionen der Komponenten der Glycin-Decarboxylase

Bisher wurde in der Literatur nur einmal ein hochmolekularer Komplex, welcher aus Mitochondrien von *P. sativum* isoliert wurde und Glycin-Decarboxylase-Aktivität zeigte, beschrieben. Dieser Komplex bestand vermutlich aus den Komponenten der Glycin-Decarboxylase und der Serin-Hydroxymethyltransferase (NEUBURGER *et al.*, 1989). Alle weiteren Versuche, die vier Komponenten der Glycin-Decarboxylase im Komplex zu isolieren, schlugen fehl (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; GUILHAUDIS *et al.*, 2000; NEUBURGER *et al.*, 1991; OLIVER *et al.*, 1990), was auf eine eher weniger stark ausgeprägte Interaktion der einzelnen Komponenten schließen lässt.

Das P1-Protein der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* besteht aus zwei Untereinheiten, und das aktive Protein stellt sich als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer dar, welches sich auch in dieser Form nativ aus erwähntem Organismus isolieren ließ (FREUDENBERG and ANDREESEN 1989). Mit Hilfe des bakteriellen *two-hybrid*-Systems konnten bei getrennter Expression der entsprechenden Gene schwache Interaktionen, sowohl der α - als auch der β -Untereinheit des P1-Proteins mit sich selbst, und eine starke Interaktion der α - mit der β -Untereinheit gezeigt werden. Bei gemeinsamer Expression von *gcvP1 α* und *gcvP1 β* durch die Plasmide pMSP1 $\alpha\beta$ sowie pDPP1 $\alpha\beta$ konnte die Bildung von Homodimeren hingegen nicht gezeigt werden. Da aber, wie bereits erwähnt, das mature Protein die Struktur eines $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer aufweist, ist es möglich, dass die mit den beiden Untereinheiten fusionierten LexA-Domänen auf Grund der Ausbildung des Tetramers nicht an den LexA-Hybridoperator binden konnten oder dass durch die Translationsfusionen bedingt, die korrekte Faltung und die damit verbundene Tetramer-Bildung nicht möglich gewesen ist. Allerdings konnte eine

Interaktion der β -Untereinheit mit dem P1-Protein bei gemeinsamer Überproduktion der α - und β -Untereinheit durch das pDP-Derivat (pDPP1 $\alpha\beta$) gezeigt werden. Bei dieser Konstellation ist die α -Untereinheit über das pDP-Derivat mit der DNA-Bindedomäne des Wild-Typ LexA-Repressors fusioniert. Möglich ist, dass in diesem Fall eine Interaktion der α - mit der β -Untereinheit gezeigt wurde, da die resultierenden Werte mit denen, die bei getrennter Überproduktion beider Untereinheiten (pMSP1 β +pDPP1 α) erhalten wurden, zu vergleichen sind.

Das P2- bzw. H-Protein wird als zentraler Punkt der Glycin-Decarboxylase beschrieben, da es mit den anderen drei Komponenten in Wechselwirkung tritt, es wird sogar zusammen mit dem Glycin als Cosubstrat des P1-Proteins bezeichnet (ANDREESEN 1994a; COHEN-ADDAD *et al.*, 1997; FUJIWARA and MOTOKAWA 1983; NAKAI *et al.*, 2005). Durch direkte Interaktion von zwei P2- und einem P1-Protein kommt es wahrscheinlich zu einer geringfügigen Konformationsänderung des P1-Proteins, was zur Aktivierung desselben führt (HIRAGA and KIKUCHI 1980a; NEUBURGER *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 1991). Die Interaktion beider Proteine scheint zumindest bei den Vertretern aus *P. sativum* so stark zu sein, dass diese sich durch Gelfiltration oder Sucrosedichtezentrifugation nicht löste (HIRAGA and KIKUCHI 1980a). Eine zwar nur sehr schwach ausgeprägte Interaktion des aus *E. acidaminophilum* stammenden P2-Proteins konnte zumindest mit der α -Untereinheit des P1-Proteins aus diesem Organismus gezeigt werden. Durch dieses Resultat konnten die Ergebnisse von FREUDENBERG *et al.* (1989) bestätigt werden, die durch *immunogold labeling* Experimente eine starke Assoziation dieser beiden Proteine gezeigt haben. NAKAI *et al.* (2003) beschreiben auf der Oberfläche des H-Protein aus *T. thermophilus* eine stark negativ geladene Region, welche primär durch die α -Helices 1 und 3 sowie das β -Faltblatt 4 (s. S. 114, Abb. 34) gebildet wird und ihre Ladung durch die Aminosäure-Reste Asp², Asp²⁹, Asp³³, Asp³⁷, Glu⁸⁸, Asp⁹³ sowie Glu⁹⁷ bedingt ist, als möglichen Bereich der Interaktion zwischen dem H- und dem P-Protein aus diesem Organismus.

Am stärksten ausgeprägt war die Interaktion zwischen dem P2- und dem P4-Protein. Bei Expression von *gcvP2* durch das pDP-Derivat und Expression von *gcvP4* durch das pMS-Derivat war eine fast vollständige Repression der Transkription des *lacZ*-Gens im Reporterstamm *E. coli* SU202 zu erkennen (3.3.8; Anhang A.IX.4.). Die Stärke der Interaktion dieser beiden Proteine ist mit der der beiden Leucin-Zipper Jun und Fos zu vergleichen, die bei dem *lexA*-basierenden *two-hybrid*-System als Positivkontrolle anzusehen ist (Anhang A.IX.12.) (DMITROVA *et al.*, 1998). Bei Expression der beiden Gene durch das jeweils andere Plasmidderivat war jedoch keine Interaktion der beiden Proteine zu erkennen, was möglicherweise durch die unterschiedliche Kopienzahl der beiden Plasmide und der dadurch resultierenden unterschiedlichen Konzentration der entsprechenden Genprodukte zu erklären ist (DMITROVA *et al.*, 1998). Die Aminomethyl-Transferase und das *hydrogen carrier* Protein gehen meist einen sehr stabilen Komplex (COHEN-ADDAD *et al.*, 1997) mit einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 ein (COHEN-ADDAD *et al.*, 1997; GUILHAUDIS *et al.*, 1999a; OLIVER *et al.*, 1990) ein. Die Interaktion des H-Proteins mit dem T-Protein erfolgt dabei wahrscheinlich über eine Region, die direkt neben der Spalte gelegen ist, über welche die Methylamin-tragende Liponsäuregruppe des H-Proteins gebunden wird. Diese Vertiefung auf der Oberfläche des Proteins wird zum einen durch den N-Terminus der Domäne 1 (4.2.3.) und zum anderen durch einen Bereich der

Domäne 3 gebildet (LEE *et al.*, 2004). Dem N-terminalen Bereich des T-Proteins scheint bei der Ausbildung dieser Vertiefung, aber vor allem bei der Interaktion mit dem H-Protein, eine essentielle Funktion zuzukommen. Ein intermolekulares *cross-linking* zwischen dem Lys²⁸⁸ des T-Proteins und dem Asp⁴³ des H-Proteins; beide aus *E. coli* stammend, war nur bei den Wildtyp-Proteinen zu beobachten. Das um sieben Aminosäuren N-terminal verkürzte T-Protein zeigte kein *cross-linking* mit dem H-Protein. Auch eine intramolekulare Verknüpfung zwischen dem Asp³⁴ und dem Lys²¹⁶ des *E. coli*-T-Proteins war nur in Gegenwart des H-Proteins zu beobachten. Diese Resultate deuten darauf hin, dass das H-Protein bei Interaktion mit der Aminomethyl-Transferase eine Konformationsänderung am T-Protein hervorruft und dass die N-terminale Region des T-Proteins essentiell für diese Strukturänderung und der damit verbundenen Interaktion mit dem H-Protein ist (OKAMURA-IKEDA *et al.*, 1999a; OKAMURA-IKEDA *et al.*, 2003). Bei dem T-Protein aus *P. horikoshii* scheint ein Bereich der Domäne III, hier besonders die konservierten Aminosäure-Reste Arg³²⁷, Tyr³³⁰ und Arg³⁷⁶, sowie die Reste Lys²⁰, Phe²⁴, Gly²⁶, Ser³⁵, Ile³⁶, Leu²⁴⁸, Gly²⁴⁹, Asp²⁵², Thr²⁵³, Arg²⁵⁵ und Leu²⁶² der Domänen I und II an der Interaktion mit dem H-Protein beteiligt zu sein (LOKANATH *et al.*, 2005). Auch für das T-Protein aus *T. maritima* wurde eine sehr ähnlich gelagerte Region beschrieben, welche maßgeblich durch die Aminosäure-Reste Phe²⁰, Leu²²⁴, Arg²²⁷, Asp²²⁸, Leu²³⁸ sowie Tyr²³⁹ gekennzeichnet ist (LEE *et al.*, 2004). Das durch oben erwähnte *cross-linking* Versuche charakterisierte Lys²⁸⁸ des *E. coli*-T-Proteins befindet sich innerhalb der beiden hier beschriebenen möglichen Interaktionsflächen zwischen T- und H-Protein, was die erwähnten Aussagen bestätigt (LEE *et al.*, 2004; LOKANATH *et al.*, 2005). Auch das durch diese *cross-linking* Experimente bestimmte Asp⁴³ des *E. coli* H-Proteins befindet sich innerhalb eines Bereiches, der als mögliche Interaktionsfläche des H-Proteins aus *T. thermophilus* mit dem T-Protein angesehen wird. Diese Region wird hauptsächlich durch die β -Faltblätter 4, 6 und 7 gebildet, wobei deren negativer Charakter den Aminosäure-Resten Glu⁴², Glu⁶⁰ sowie dem Asp⁶⁷ zuzuschreiben ist, die bei in nahezu allen in Abbildung 34 (s. S. 114) verglichenen Proteinen an dieser Stelle lokalisiert sind, (NAKAI *et al.*, 2003a).

Die hier beschriebenen, als relativ spezifisch einzuordnenden Interaktionen der Komponenten der Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* zeugen von der Funktionalität des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems (DMITROVA *et al.*, 1998) bei der Untersuchung von Interaktionen von Proteinen aus diesem Organismus.

4.3.2. Interaktionsstudien von PrpU und den Vertretern des Thioredoxin-Systems sowie mit GrdA

Die Glycin-Decarboxylase aus *E. acidaminophilum* ist durch das bislang einzigartige Fehlen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase gekennzeichnet. Dieser Organismus besitzt eine NADP⁺-abhängige Thioredoxin-Reduktase (TR) mit Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität, welche die Funktion des P3-Proteins übernimmt und die Elektronen über das Thioredoxin-System dem reduktiven Weg des Glycin-Abbaus zuführt. Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase kann *in vitro*

durch das Thioredoxin und das Selenoprotein A (GrdA) der Glycin-Reduktase stimuliert werden. (ANDREESEN 1994a; 1994b; DIETRICH *et al.*, 1991; HARMS *et al.*, 1998a; MEYER *et al.*, 1991). Weiterhin ist dieser Organismus durch das Vorhandensein des 11 kDa großen putativen redoxaktiven Selenoproteins PrpU gekennzeichnet, zu dem bis zum heutigen Tag kein homologes Protein in den Datenbanken zu finden ist (ANDREESEN *et al.*, 1999; LEHEL 1999; POEHLEIN 2003; WAGNER 1997).

Durch Interaktionsstudien von PrpU mit den Komponenten der Glycin-Decarboxylase, des Thioredoxin-Systems und GrdA sollte eine mögliche Beteiligung dieses bislang nur für *E. acidaminophilum* beschriebenen Proteins an dem Glycin-Metabolismus dieses Organismus gezeigt werden. Bei den durchgeführten Interaktionsstudien zeigten sich deutliche Interaktionen von PrpU mit dem P2-Protein der Glycin-Decarboxylase, mit dem GrdA der Glycin-Reduktase und mit dem Thioredoxin des Thioredoxin-Systems. Auch das P2-Protein mit Liponsäure als Dithiol-haltige Verbindung zeigte eine deutliche Interaktion mit PrpU, aber auch mit GrdA (CxxU) und dem besonderen Thioredoxin (GCxxC), wo das Tryptophan des redoxaktiven Motivs gegen ein kleines Glycin ausgetauscht ist (HARMS *et al.*, 1998b). Diese beiden Proteine zeigten wiederum ebenfalls eine Interaktion miteinander, aber auch mit PrpU und dem P2-Protein der Glycin-Decarboxylase. GrdA und das P2-Protein wurden auch durch die durchgeführten *pull-down-assays* als mögliche direkte Interaktionspartner von PrpU bestätigt.

Das Selenoprotein PrpU ist durch das putativ redoxaktive Sequenzmotiv -A-C-A-T-U-D- gekennzeichnet, welches dem der Thioredoxin-Reduktase (x-C-A-T-C-D) sehr ähnlich ist. Dieses Motiv ist genau wie andere Sequenzmotive, wo zwei Cystein-Reste durch zwei andere Aminosäure-Reste getrennt ist (oder eines dieser Cysteine durch ein Serin, ein Threonin bzw. ein Selenocystein ersetzt ist), bei Proteinen zu finden, die für die Formierung, die Isomerisierung und Reduktion von Disulfid-Bindungen oder andere Redox-Funktionen verantwortlich sind (FOMENKO and GLADYSHEV 2003). Die ubiquitär von den Archaeen bis zum Menschen vorkommenden Thioredoxine weisen ebenfalls ein redoxaktives Sequenzmotiv in der Form CxxC auf. Neben ihrer Hauptfunktion als Protein-Disulfid-Reduktasen/Isomerasen dienen sie als Elektronen-Donor für diverse Enzyme wie die Ribonukleotid-Reduktase, Peroxiredoxin oder Methionin-Sulfoxid-Reduktase (ARNER and HOLMGREN 2000). In anaeroben, Aminosäure-verwertenden Mikroorganismen stellen sie zusammen mit der Thioredoxin-Reduktase einen wichtigen Elektronencarrier dar (HARMS *et al.*, 1998b). Bei der Verstoffwechslung von Glycin durch die Stickland-Reaktion werden die bei der Oxidation von Glycin durch die Glycin-Decarboxylase auf der Liponsäure übertragenen Redoxäquivalente über das Thioredoxin-System, bestehend aus Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin, der Glycin-Reduktase zugeführt (ANDREESEN 1994a; 1994b; 2004; MEYER *et al.*, 1991; STICKLAND 1934). Das nach der Reduktion von Glycin, Betain oder Sarcosin oxidiert vorliegenden GrdA kann so über das Thioredoxin-System wieder reduziert werden.

Das Selenoprotein PrpU weist auf Aminosäure-Ebene deutliche Sequenzhomologien zu dem Thioredoxin aus *E. acidaminophilum*, aber auch zu einem Selenocystein-haltigem Thioredoxin aus *T. denticola*

(SESHADRI *et al.*, 2004) auf (Abb. 36). Dies legt die Vermutung nahe, dass PrpU eine ähnliche Funktion wie das Thioredoxin besitzt und als möglicher Elektronencarrier fungieren kann.

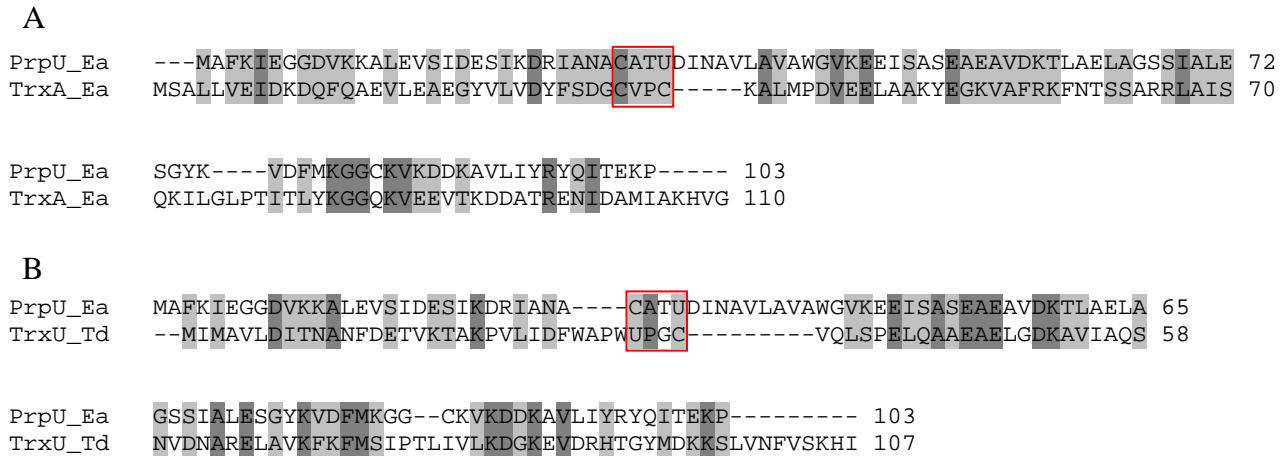


Abb. 36: Aminosäure-Alignments von PrpU mit Thioredoxinen aus *E. acidaminophilum* (A) und *T. denticola* (B). Gezeigt ist ein Alignment von PrpU mit dem Thioredoxin (TrxA) aus *E. acidaminophilum* (A) und PrpU mit dem selenocysteinhaltigen Thioredoxin (TrxU) aus *T. denticola* (B). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Die redoxaktiven Sequenzmotive wurden rot umrandet.

Auffällig ist, dass PrpU bisher nur für *E. acidaminophilum*, sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäure-Ebene als ⁷⁵Se-markierte Verbindung nachgewiesen wurde (LECHEL 1999; WAGNER 1997) und mit großer Wahrscheinlichkeit bei *C. litorale* durch Southern-Hybridisierungen ebenfalls auf Nukleinsäure-Ebene nachgewiesen werden konnte (LECHEL 1999). Eine Isolierung des entsprechenden Gens aus *C. litorale* war auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Im Gegensatz zu *E. acidaminophilum* konnte für *C. litorale* eine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase als mögliche P3-Komponente der Glycin-Decarboxylase nachgewiesen werden, aber auch dieser Organismus besitzt eine Thioredoxin-Reduktase mit einer für dieses Enzym normalerweise atypischen Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität (MEYER *et al.*, 1991). Beide Organismen besitzen also eine Thioredoxin-Reduktase mit Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität und mit großer Wahrscheinlichkeit das Selenoprotein PrpU. Dieses und die Tatsache, dass *prpU* in *E. acidaminophilum* in einem gemeinsamen Operon mit den Genen der Glycin-Decarboxylase organisiert ist und zusammen mit diesen transkribiert wird, legt die Vermutung nahe, dass PrpU als Vermittler zwischen Glycin-Decarboxylase und Glycin-Reduktase fungiert. Möglicherweise ist es direkt oder auch indirekt an der Reoxidation der Liponsäure-Gruppe des P2-Proteins der Glycin-Decarboxylase beteiligt. Eine Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der heterolog synthetisierten Thioredoxin-Reduktase konnte durch ebenfalls heterolog überproduziertes Thioredoxin und GrdA aufgezeigt werden. Eine mögliche Aktivitätssteigerung durch die Zugabe von PrpU zum Reaktionsansatz mit Thioredoxin-Reduktase, Thioredoxin und GrdA oder durch PrpU, Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin anstelle von GrdA konnte nicht nachgewiesen werden. In *Tissierella*

creatinophila konnte GrdA keine Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität bewirken (HARMS *et al.*, 1998b; HARMS *et al.*, 1998c).

Bekräftigt wird diese zuvor getroffene Aussage durch die Ergebnisse von FREUDENBERG und ANDREESEN (1989), die zeigten, dass das P2-Protein nicht nur mit den Glycin-Decarboxylase-Komponenten, sondern auch mit dem Glycin-Reduktase-Komplex assoziiert ist, wo P2 mit dem Thioredoxin-System, GrdA und auf Grund dieser Ergebnisse auch mit PrpU interagiert und die für die Reduktion von Glycin notwendigen Elektronen liefert, wodurch P2 reduziert wird.

So ergibt sich für *E. acidaminophilum* der in Abbildung 37 dargestellte hypothetische Reaktionsmechanismus.

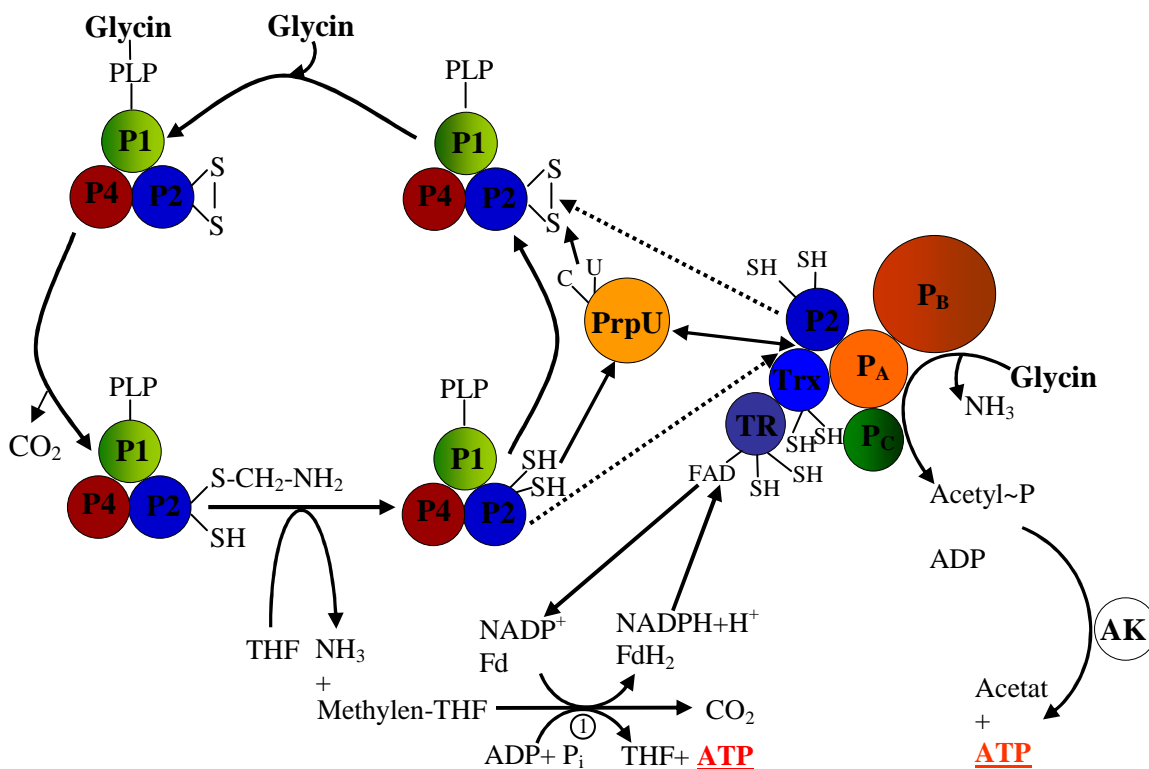


Abb. 37: Ausschnitt aus dem Glycin-Metabolismus von *E. acidaminophilum* (ANDREESEN 1994a, 2004; GRAENTZDOERFFER *et al.* 2003; modifiziert): Wichtige Proteine wurden durch Kreise gekennzeichnet. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: P1, P2, P4-Proteinkomponenten der Glycin-Decarboxylase, PrpU_Selenoprotein PrpU (mit dem redoxaktiven Motiv CxxU), P_A, P_B, P_C-Komponenten der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase (wobei P_A das redoxaktive Motiv CxxU und P_B redoxaktive Motiv UxxC enthält), Trx_Thioredoxin, TR_Thioredoxin-Reduktase, AK_Acetatkinase, PLP_Pyridoxalphosphat, THF_Tetrahydrofolat. ①: Stoffwechselwege, die durch Methyl-THF-Dehydrogenase, Methyl-THF-Cyclohydrolase, Formyl-THF-Synthetase und Formiat-Dehydrogenase katalysiert werden. Die als gestrichelte Pfeile dargestellten Reaktionen stellen die von FREUDENBERG und ANDREESEN (1989) gezeigte freie Form des P2-Proteins, welches vom Decarboxylase-Komplex dissoziiert und mit dem Reduktase-Komplex.

E. acidaminophilum ist bisher der einzige Organismus, für den keine eigenständige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase beschrieben werden konnte (ANDREESEN 1994b; FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991) und in dessen Genom das Selenoprotein PrpU nachgewiesen werden konnte (GRÖBE 2001; LECHER 1999; WAGNER 1997). Im Rahmen vorangegangener Arbeiten (LECHER 1999; POEHLIN 2003) konnte gezeigt werden, dass das Gen des 11 kDa Selenoproteins

PrpU *downstream* der Gene der Glycin-Decarboxylase lokalisiert ist. Die Gene *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* , *gcvP1 β* sowie die Gene *thf* (Formyl-THF-Synthetase) und *prpU* sind in einem Operon, dem Glycin-Decarboxylase-Operon, organisiert und werden polycistronisch transkribiert. Die Gene dieser Transkriptionseinheit, somit auch *prpU*, sind zwar konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert, es ist aber eine deutliche Induktion der Transkription durch Glycin zu erkennen (s. S. 54, Abb. 14 A). Durch das *lexA*-basierende *two-hybrid*-System konnte eine deutliche Interaktion von PrpU mit dem P2-Protein der Glycin-Decarboxylase, dem Thioredoxin des Thioredoxin-Systems und mit dem Selenoprotein GrdA der Glycin-Reduktase gezeigt werden (s. S. 63, Abb. 17). Durch *pull-down*-Experimente konnten ebenfalls die Proteine GcvP2 und GrdA als Interaktionspartner identifiziert werden (s. S. 88, Abb. 28).

Die hier zusammengefassten Resultate und die Tatsache der fehlenden eigenständigen Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in *E. acidaminophilum* (ANDREESEN 1994b; FREUDENBERG and ANDREESEN 1989; FREUDENBERG *et al.*, 1989a; MEYER *et al.*, 1991) zeigen, dass PrpU sicherlich eine Vermittlerrolle zwischen der Glycin-Decarboxylase und der Glycin-Reduktase zukommt. Denkbar wäre hier eine direkte Übertragung der an die Liponsäuregruppe des P2-Proteins gebundenen Elektronen auf GrdA, oder die Übertragung dieser Elektronen über das Thioredoxin-System (Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin) und PrpU. Hierbei würde PrpU die Funktion von GrdA als Elektronenüberträger ersetzen, denn MEYER *et al.* (1991) zeigten, dass GrdA die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase im Zusammenspiel mit dem Thioredoxin zumindest *in vitro* steigern konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Steigerung dieser Aktivität der Thioredoxin-Reduktase durch Thioredoxin und PrpU nicht gezeigt werden, was eine solche Funktion des Proteins jedoch nicht ausschließt. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Inaktivität des Proteins auf die heterologe Expression von *prpU* durch das *Strep-tag*[®] II-System zurückzuführen. PrpU kann möglicherweise auch an der Reaktivierung von GrdA, d. h. an der Vorbereitung dieses Proteins zur Aufnahme eines weiteren, bei der Reduktion von Glycin durch die Glycin-Reduktase entstehenden Carboxymethyl-Selenoethers (ANDREESEN 2004; ARKOWITZ and ABELES 1990) beteiligt sein.

4.4. Glycin-, Sarcosin- und Betain-spezifische Gencluster

In *E. acidaminophilum* sind häufig Gene, die für die einzelnen Komponenten eines bestimmten Stoffwechselweges codieren, in spezifischen Genclustern organisiert. So sind neben den Genen der Glycin-Decarboxylase, die, wie bereits in Abbildung 8 (s. S. 46) beschrieben, in einem Operon organisiert sind, auch die Gene der Glycin-, Sarcosin, bzw. Betain-Redukase in spezifischen Genclustern angeordnet (s. S. 43, Abb. 7). So findet man in *E. acidaminophilum* zwei für die Glycin-Reduktase spezifische Gencluster. In Gensatz I sind die Gene des Glycin-spezifischen Protein B (P_{BGlycin}) der Glycin-Reduktase (*grdB₁*) sowie das Gen des Proproteins der 22 und 25 kDa Untereinheit dieser Komponente (*grdE₂*) zu finden. Beide Gene werden durch eines der vier *grdA*-Gene, die anscheinend Substrat-unspezifische redoxaktive Komponente

der Glycin-Reduktase, getrennt. *Downstream* sind die Gene des Thioredoxin-Systems (*trxA* und *trxB*) lokalisiert, gefolgt von einer weiteren Kopie von *grdA* sowie den Genen beider Untereinheiten der ebenfalls anscheinend Substrat-unspezifischen Komponenten des Protein C der Glycin-Reduktase (*grdC* und *grdD*) (KOHLSTOCK *et al.*, 2001; LÜBBERS and ANDREESEN 1993; SONNTAG 1998; WAGNER *et al.*, 1999). Ein zweites, ebenfalls Glycin-spezifisches *grdE₁A₂B₂*-Gencluster, ist von Genen hypothetischer Proteine flankiert, und die Transkription dieses Operons ist nach Northern-Blot-Analysen bzw. RT-PCRs in Frage zu stellen (SONNTAG 1998). Des Weiteren ist in *E. acidaminophilum* ein Sarcosin-spezifisches Gencluster zu finden, welches ebenfalls von Genen hypothetischer Proteine und Genen für einen Zwei-Komponenten-Regulator umgeben ist (SONNTAG 1998). Wie bereits erwähnt, kann *E. acidaminophilum* auch Betain als Elektronen-Akzeptor verwerten, die Gene des für Betain spezifischen Protein B (P_{BBetain}) sind ebenfalls in einem Gencluster organisiert. In diesem Gensatz sind die Gene beider Untereinheiten von P_{BBetain} (*grdI* sowie *grdH*), das Gen eines möglicherweise für diesen Gensatz spezifischen Regulatorproteins (*grdR*) sowie das eines Aminosäuretransporters (*grdT₁*), die Gene des Thioredoxin-Systems (*trxA* und *trxB*) sowie jeweils eine zweite Kopie der Gene (*grdC* und *grdD*) beider Untereinheiten des Substrat-unspezifischen Protein C der Glycin-Reduktase lokalisiert (LÜBBERS and ANDREESEN 1993; SONNTAG 1998; STEINER 2004). In *E. acidaminophilum* ist in einem für die Creatin-Reduktase spezifischen Gensatz das Gen einer Creatinase (*creA*) und die zweite Kopie eines für einen Aminosäuretransporter (*grdT₂*) codierenden Gens lokalisiert (RUDOLF 2003). Zudem ist nach den hier berichteten Ergebnissen jeweils eine weitere Kopie der Gene codierend für das Proprotein der 22 und 25 kDa Untereinheit (*grdG₂*) und der 47 kDa-Untereinheit (*grdF₂*) des Protein B ($P_{\text{BSarcosin}}$) der Sarcosin-spezifischen Reduktase zu finden. *E. acidaminophilum* kann Creatin durch eine Creatinase zu Sarcosin und Harnstoff metabolisieren, wobei Sarcosin dann über die Sarcosin-Reduktase weiter zu Methylamin und Acetylphosphat reduziert wird, welches anschließend zu Acetat umgewandelt wird und mit der Energiekonservierung in Form von ATP verbunden ist (HARMS *et al.*, 1998c; ZINDEL *et al.*, 1988). Die Creatinase aus *E. acidaminophilum* zeigt eine 79%ige Identität zu dem Protein von *Bacillus* sp. BSD-8 und eine 77%ige Identität zu der Creatinase aus *Arthrobacter* sp. (NISHIYA *et al.*, 1998; RUDOLF 2003). In *C. difficile*, einem humanpathogenen Organismus (SEBAIHA *et al.*, 2006), der ebenso in die Gruppe XI der Clostridien einzuordnen ist (BAENA *et al.*, 1999), sind die Gene der Glycin-Reduktase ebenfalls in einem Gencluster organisiert. Auch hier sind wie bei *E. acidaminophilum* die Gene des Glycin-spezifischen Protein B (P_{BGlycin}) der Glycin-Reduktase (*grdB*) sowie das Gen des Proproteins der 22 und 25 kDa Untereinheit dieser Komponente (*grdE*) durch das Gen des Substrat-unspezifischen Selenoprotein A (*grdA*) der Glycin-Reduktase getrennt (s. S. 130, Abb. 38). *Downstream* sind die Gene *trxB* und *trxA* des Thioredoxin-Systems sowie *grdC* und *grdD* der beiden Untereinheiten von Protein C der Glycin-Reduktase lokalisiert. In diesem Organismus sind ebenfalls die Gene *grdG* und *grdF* der Sarcosin-spezifischen Reduktase zu finden, diese sind jedoch nur mit Genen hypothetischer Proteine assoziiert. In *C. sticklandii*, welches ebenfalls dem Cluster XI der Clostridien zuzuordnen ist (BAENA *et al.*, 1999; PASTER *et al.*, 1993), sind die Gene der Glycin-Reduktase ebenfalls in einem Gencluster organisiert (Abb. 38). *Upstream* der Gene *trxB* und *trxA* des Thioredoxin-Systems liegen die Gene *grdE* und *grdB* des Glycin-spezifischen Protein B,

welche genau wie bei *E. acidaminophilum* und *C. difficile* durch *grdA* getrennt werden (Abb. 38). Auch die Gene *grdC* und *grdD* beider Untereinheiten des Protein C sind in diesem Cluster lokalisiert (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001).

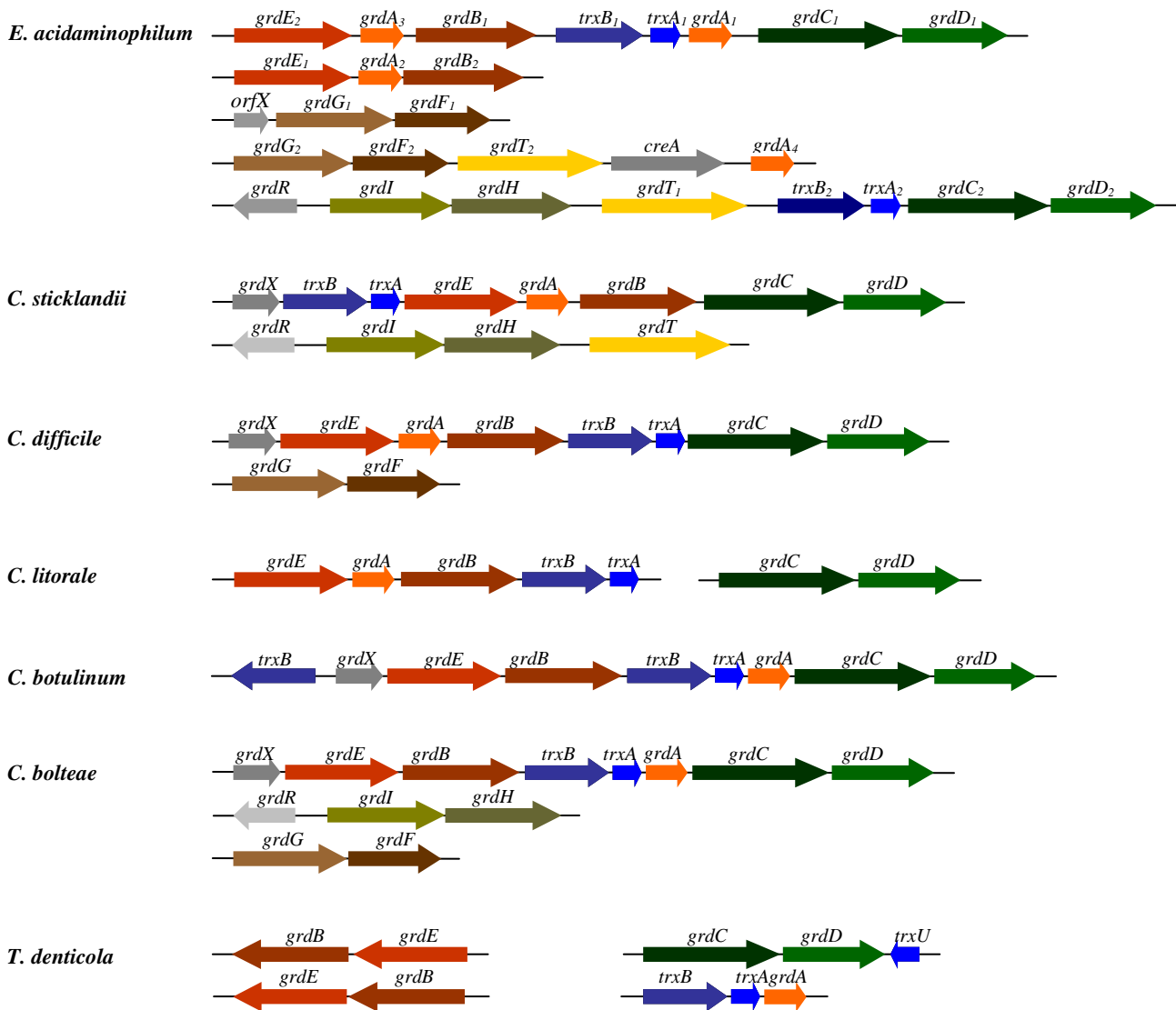


Abb. 38: Möglichkeiten der Organisation der Gene der Glycin-, Sarcosin- und Betain-spezifischen Genclustern: Die Anordnung der Gene der Glycin-, Sarcosin- und Betain-spezifischen Genclustern und des Thioredoxin-Systems in den Genomen folgender Organismen ist dargestellt: *C. sticklandii* (S. KREIMEYER, pers. Mitteilung), *C. litorale* (KREIMER and ANDREESEN 1995; KREIMER *et al.*, 1997), *C. botulinum* (SEBAIHIA *et al.*, 2007), *C. botteae* (SONG *et al.*, 2003) sowie *T. denticola* (ROTHER *et al.*, 2001) Assoziierte Gene sind durch eine Linie verbunden. Bei nicht-assoziierten Genen erfolgten ebenfalls eine Beachtung der Transkriptionsrichtung und die relative Lokalisation im jeweiligen Genom gesehen zu den entsprechenden anderen Genen.

In *Clostridium litorale*, ebenfalls ein Vertreter des Clostridiencluster XI, der eine 96%ige Ähnlichkeit auf 16S rDNA-Ebene im Vergleich zu *E. acidaminophilum* aufweist (BAENA *et al.*, 1999; FENDRICH *et al.*, 1990), sind die Gene der Glycin-Reduktase ebenfalls in einem Cluster mit der Anordnung *grdEABtrxBA* organisiert (KREIMER and ANDREESEN 1995; KREIMER *et al.*, 1997). Ob die Gene *grdC* und *grdD*, die beide mit großer Wahrscheinlichkeit benachbart liegen (KOHLESTOCK *et al.*, 2001), ebenfalls mit den anderen

Genen der Glycin-Reduktase assoziiert sind, konnte bisher nicht geklärt werden (Abb. 38). Auf Grund des hohen Verwandtschaftsgrades zu *E. acidaminophilum*, *C. difficile* sowie zu *C. sticklandii* wäre aber davon auszugehen. Da *C. litorale* sowohl auf Medien mit Sarcosin als auch mit Betain unter Zugabe von Elektronen-Donatoren in Form von Aminosäuren bzw. H_2 wächst (FENDRICH *et al.*, 1990), müssen im Genom dieses Organismus auch die Gene der Sarcosin-bzw. Betain-Reduktase vorhanden sein. *C. litorale* zeigte jedoch Probleme bei der Anzucht, auch wenn der Stamm von der DSMZ erneut bezogen wurde, daher war eine nähere Untersuchung an dieser Stelle nicht möglich. In *Clostridium botulinum* sind die Gene der Glycin-Reduktase ebenfalls in einem Cluster organisiert. Im Genom (SEBAIHA *et al.*, 2007) dieses Organismus sind die Gene *grdE* und *grdB* im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Clostridien direkt assoziiert und nicht durch *grdA* getrennt. Letzteres ist *upstream* der Gene *trxB* und *trxA* des Thioredoxin-Systems wie bei *E. acidaminophilum* zu finden, welche wiederum *upstream* der Gene *grdE* und *grdB* lokalisiert sind. Wie bei allen hier beschriebenen Genanordnungen sind auch die Gene *grdC* und *grdD* in diesem Gencluster organisiert (Abb. 38), deren Genprodukte aus dem z. B. während der Reduktion von Glycin durch die Glycin-Reduktase entstehenden Selenoether einen Thioester bilden, der anschließend phosphorylytisch gespalten wird (KOHLSTOCK *et al.*, 2001). In diesem Gencluster, *upstream* des Gens eines hypothetischen Proteins (*grdX*), ist mit entgegengesetzter Transkriptionsrichtung eine weitere Kopie des Gens der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) lokalisiert. Die gleiche Anordnung der Gene der Komponenten der Glycin-Reduktase ist in *Clostridium bolteae* zu finden (Abb. 38), ein Organismus, der auf Grund von 16S-rDNA-Analysen in das Clostridiencluster XIVa einzuordnen ist (SONG *et al.*, 2003). Im Genom dieses Clostridien-Vertreters sind auch die Gene *grdI* und *grdH* der Betain-Reduktase sowie *grdG* und *grdF* der Sarcosin-Reduktase zu finden. Bisher wurden die Komponenten der Glycin-, Sarcosin- bzw. Betain-Reduktase nur für Gram-positive Organismen und hier ausschließlich für Vertreter der Clostridien beschrieben (ANDREESEN 1994b; 2004; ARKOWITZ and ABELES 1991; STADTMAN 1978). Für *Treponema denticola*, ein gram negatives, den Spirochäten zugehöriges Bakterium, wurden die Komponenten der Glycin-Reduktase beschrieben (ROTHER *et al.*, 2001). Im Genom dieses Organismus (SESHADRI *et al.*, 2004) sind jeweils zwei Kopien beider Gene des Protein B einmal in der Anordnung *grdBE* und einmal in der Anordnung *grdEB* zu finden. *GrdA* ist auch hier, genau wie in *C. botulinum* und *C. bolteae*, *downstream* von *trxB* und *trxA* lokalisiert, diese sind hier jedoch nicht mit *grdB* und *grdE* assoziiert. In einem weiteren, nicht assoziierten Abschnitts des Genoms sind die Gene *grdC* und *grdD* lokalisiert, *downstream* beider Gene ist mit entgegengesetzter Transkriptionsrichtung eine zweite Kopie eines Gens eines in diesem Fall Selenocystein-haltigen Thioredoxins (*trxU*) lokalisiert (Abb. 38). Dieses Thioredoxin zeigt, wie bereits erwähnt, signifikante Homologie zu PrpU aus *E. acidaminophilum* (s. S. 126, Abb. 36 B).

In *E. acidaminophilum* konnten insgesamt vier Genkopien des Selenoprotein A der Glycin-Reduktase vollständig kloniert und sequenziert werden. Alle vier weisen ein *in-frame*-TGA-Codon auf, was für den cotranslationalen Einbau von Selenocystein codiert (GURSINSKY *et al.*, 2007; GURSINSKY *et al.*, 2000). Dieses Selenocystein ist Teil des redoxaktiven Zentrums (CxxU) von GrdA. An dieser Position des Proteins

kommt es wahrscheinlich zur Ausbildung des Carboxymethyl-Selenoethers (ARKOWITZ and ABELES 1990), welcher anschließend in einen Thioester überführt wird, der an Protein C gebunden ist (ANDREESEN 2004; ARKOWITZ and ABELES 1991; KOHLSTOCK *et al.*, 2001). Die vier resultierenden, ca. 17 kDa großen Genprodukte unterscheiden sich nur sehr wenig in ihrer Aminosäuresequenz. Auffallend ist ein 16 Aminosäuren N-terminal der redoxaktiven Sequenz (CxxU) lokalisiertes stark konserviertes Cystein, dem bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (ANDREESEN 2004). Die durch *grdA*₂ und *grdA*₃ codierten Proteinvarianten unterscheiden sich nur in einer Aminosäure, im Vergleich dazu unterscheiden sich die Genprodukte von *grdA*₁ bzw. *grdA*₄ in acht bzw. drei Aminosäuren von den anderen beiden Varianten (Abb. 39). Es erfolgte allerdings ein Austausch gegen Aminosäuren ähnlicher biophysikalischer Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) bzw. zu Aminosäuren, die in den GrdA-Varianten der in Abbildung 39 verglichenen Organismen ebenfalls an dieser Position zu finden sind.

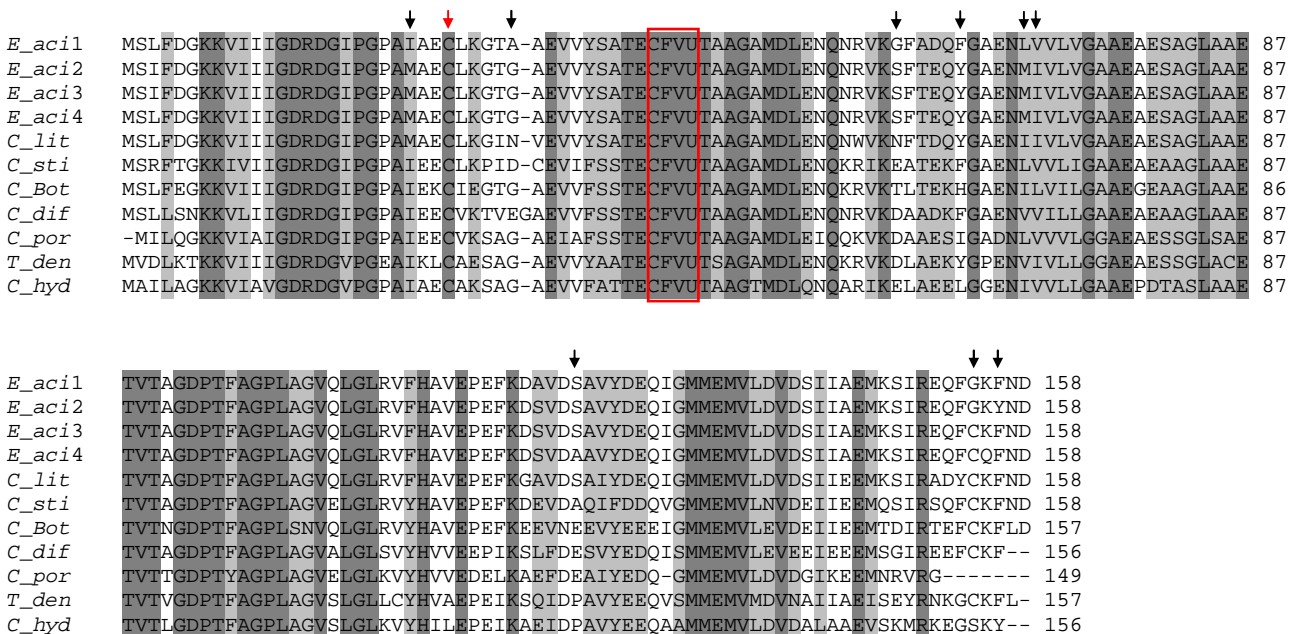


Abb. 39: Aminosäure-Alignment verschiedener GrdA-Proteine: Gezeigt ist ein Alignment der vier GrdA-Varianten aus *E. acidaminophilum* sowie der Proteine aus *C. litorale* (KREIMER and ANDREESEN 1995), *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001), *C. botulinum* (SEBAIHIA *et al.*, 2007), *C. difficile* (SEBAIHIA *et al.*, 2006), *Clostridium purinolyticum* (GARCIA and STADTMAN 1991), *T. denticola* (ROTHER *et al.*, 2001), *Carboxydotherrnus denitrificans* (WU *et al.*, 2005). Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Das redoxaktive-Motiv (CxxU) ist rot umrandet. Die Aminosäure-Austausche in den vier GrdA-Varianten von *E. acidaminophilum* sind durch schwarze Pfeile über den entsprechenden Aminosäuren gekennzeichnet. Ein weiteres, stark konserviertes Cystein ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Während das aus einer Untereinheit aufgebaute Selenoprotein A gemeinsamer Bestandteil der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase ist, sind für das spezifische Substrat-bindende Selenoprotein GrdB große Substrat-spezifische Varianten zu finden. Während das P_{BGlycin} und das $P_{\text{BSarcosin}}$ trimere Untereinheitenstrukturen von 47, 25 und 22 kDa aufweisen, ist das P_{BBetain} nur ein Dimer aus einer 45 und einer 48 kDa Untereinheit (MEYER *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 1999) das keine substratbindende

Carbonylgruppe enthält (ANDREESEN 2004). Die Unterschiede in der Untereinheitenstruktur dieser drei Proteine sind möglicherweise in der Art der Bindung der Substrate zu sehen, die im Fall von Glycin und Sarcosin über die Ausbildung einer Schiff'schen Base mit der 47 kDa Untereinheit verwirklicht wird, während Betain als tertiäre Ammoniumverbindung über ionische Wechselwirkungen an die 45 kDa Untereinheit gebunden wird.

Die Glycin-Reduktase und Sarcosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* sowie die Glycin-Reduktase und D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* gehören der Gruppe der pyruvoylhaltigen Reduktasen an, die die Reduktion von Aminosäuren oder Aminosäurederivate (Glycin, Sarcosin, D-Prolin) katalysieren. Die 25 und 22 kDa Untereinheiten des Selenoprotein B der Glycin- und Sarcosin-Reduktase gehen durch Spaltung der *grdE* bzw. *grdG*-Genprodukte hervor. *In vivo* erfolgt die autokatalytische Spaltung der Proproteine posttranslational durch Cysteinolyse an einem Cystein-Rest, der zugleich als *precursor* einer Pyruvoylgruppe dient. Zur Spaltung ist ein zweites Cystein essentiell, welches in einem Abstand von vier Aminosäuren (C-terminal) der Spaltstelle lokalisiert ist (BEDNARSKI *et al.*, 2001; EVERS-MANN 2004). Diese Art der Spaltung konnte ebenfalls für das Proprotein (PrdA) der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* gezeigt werden (KABISCH *et al.*, 1999). Denkbar wäre jedoch auch eine Beteiligung von GrdA an der Spaltung der Proproteine, da *grdA* mit Ausnahme von *C. botulinum* und *T. denticola* (s. S. 130, Abb. 38) immer zwischen *grdE* und *grdB* lokalisiert ist. GrdA könnte durch sein Redoxmotiv CxxU als reduzierendes System der Proteinspaltung dienlich sein. Allerdings konnte *in vitro* keine Beteiligung dieses Proteins an der Spaltung von GrdE bzw. PrdA gezeigt werden. Dies war jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine inkorrekte Faltung der heterolog synthetisierten Proteinvarianten zurückzuführen (BEDNARSKI *et al.*, 2001; EVERS-MANN 2004).

GrdE bzw. die aus dem Proprotein resultierenden Spaltprodukte scheinen eine stabilisierende Wirkung auf die Expression von *grdB* zu haben. Nur bei Coexpression von *grdE* und *grdB* konnte bei der heterologen Synthese von GrdB der Zerfall des Proteins verhindert bzw. stark reduziert werden (GRÖBE *et al.*, 2007; PARTHER 2003). Den aus dem Proprotein GrdE resultierenden 22- und 25 kDa-Untereinheiten der Glycin-Reduktase, aber auch denen der Sarcosin-Reduktase sowie dem GrdI der Betain-Reduktase sind somit sicherlich u. a. eine Chaperon-ähnliche Funktion zuzuschreiben.

Die aus den beiden Kopien des *grdB*-Gens resultierenden Genprodukte weisen eine Identität von 98,4 % auf (SONNTAG 1998). Auch das Genprodukt des im Rahmen dieser Arbeit klonierten *grdE*₂ zeigt eine vergleichbare Identität von 96,8 % zu dem Genprodukt des von SONNTAG (1998) klonierten *grdE*₁. Die Genprodukte der Gene *grdG*₁ und *grdG*₂, welche für das Proprotein der 22 und 25 kDa-Untereinheit der Sarcosin-spezifischen Reduktase codieren, sind im Vergleich dazu nur zu 86 % identisch (s. S. 134, Abb. 40). Beide Proteine zeigen jedoch signifikante Ähnlichkeiten von 59,5 % (GrdG₁) bzw. 62,7 % (GrdG₂) zu GrdE₁, dem Proprotein der 22 und 25 kDa-Untereinheit der Glycin-spezifischen Reduktase.

GrdG1	MRLELGKIFIKDVQFGEKTTVEKGVLYVNKQEIIDLAMQDDRIKSVNVELARPGESVRIAPVKDVEPRVKVEGSGAMFPGMTNKVKVT	89	
GrdG2	MRLELGKIKITDVQFGEKTKVENGTLYVNKKELVDIAMKDDRIKLSVNIELARPGESVRIAPVKDVEPRVKVDGSGGMFPGMISKVKVT	89	
GrdG1	VGSGRTHALVGSTVLTTCGKIVGFQEGVIDMSGPIAKYCPFSETNNVCIIVVEPVEGLETHAYEAAARMVGLKAAEYVHGKAGLDVEPDEV	176	
GrdG2	VGSGRTHALVGAAVLTTCGSIVGFQEGIIDMSGPAAKYTFPSETFNVCVVIKPKGLETHAYEEAARMAGLKIIGTFVGEAGRHRVPEPDEV	176	
	22 kDa-Untereinheit	↓	25 kDa-Untereinheit
GrdG1	VVYETKPLLEQIKIKEYPDLPKVAIVHMLQSQGLLHDTYYGVDAKQFIPTFMYPTEIMDGAITSGNCVAPCDKVTTFHHLNPNVIEDLY	264	
GrdG2	VVYETKPLLEQVAQYVDPDLPKVGYIHMLQSQGLLHDTYYGVDAKQMVPTFMYPTEIMDGAITSGNCVAPCDKVTTFHHLNPNVIEDLY	264	
GrdG1	KRHGKDLNSVGVILTNNENVYLADKERCSDMVGKLVFEFLGIDGVLITEEGYGNDPDTLMMNCKKCTQAGAKVVLITDEFPPGRDGKSQSV	353	
GrdG2	KRHGKDLNFIGVILTNNENVFLADKERSSDMVGKLVFEFLGDGVLITEEGYGNDPDTLMMNCKKATDAGASVVLITDEFPPGRDGKSQSL	353	
GrdG1	ADATPEADAVASCGQGNLIEHFPAMDKVI GMLDYVETMIGGYKGCINE DGSFDAELQII IASTIANGYNKLTARFY	428	
GrdG2	ADAVTEADALVSCGQGNLIEHFPMDKII GTLDYIETMIGGYEGSLRP DGSIEAELQIV IASTIANGYNKLAARTY	428	

Abb. 40: Aminosäure-Alignment der zwei GrdG-Varianten der Sarcosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum*: Gezeigt ist ein Alignment von GrdG₁ (SONNTAG 1998) und GrdG₂ (diese Arbeit) aus *E. acidaminophilum*. Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Der Cystein-Rest der Spaltstelle ist rot dargestellt.

Auch die beiden durch *grdF*₁ und *grdF*₂ codierten 47 kDa-Untereinheiten der Sarcosin-Reduktase unterscheiden sich stärker voneinander als die beiden Varianten der 47 kDa-Untereinheit der Glycin-Reduktase. Beide Genprodukte weisen nur eine 76,5%ige Identität zueinander auf und zeigen signifikante Homologien zu der 47 kDa-Untereinheit der Glycin-spezifischen Reduktase. Für GrdF₁ konnte eine Identität von 63,3 % und für GrdF₂ eine von 64,2 % gegenüber GrdE₂ (SONNTAG 1998) festgestellt werden. Auch zu der 48 kDa-Untereinheit der Betain-Reduktase sind signifikante Ähnlichkeiten von 47,4 % (GrdF₁) bzw. 49,4 % (GrdF₂) zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich durch die Art des Reaktionsmechanismus aller drei Reduktasen, der in der Spaltung einer C-N-Bindung des Substrates liegt, zu begründen. Die stärkere Ähnlichkeit der Komponenten der Glycin-Reduktase und Sarcosin-Reduktase zueinander als zu den der Betain-Reduktase ist durch die unterschiedliche Struktur der Substrate und die Unterschiede in der Bindung (s. o.) dieser an die jeweiligen Enzyme zu begründen.

Das redoxaktive Motiv UxxCxxC ist sowohl in der 47 kDa-Untereinheit der Glycin- und Sarcosin-Reduktase als auch der 48 kDa-Untereinheit der Betain-Reduktase zu finden. Im Vergleich von GrdF₁ und GrdF₂ ist in diesem Bereich eine besonders hohe Ähnlichkeit beider Proteine zu erkennen (Abb. 41). Auch die Glycin- und Betain-Reduktase weisen dieses charakteristische Sequenzmotiv auf.

GrdF1	MKRLKVVHYINNFAGVGGEEKANIPPEMREGAVGPGMALAAALGDEAEVVATVICGDSYYGENMDSARKETILEMIKDAQPDFAVAGPA	89
GrdF2	MRKLKVVHYINNFAGVGGEEKADIPPDVREEAVGPGMALNAAFNGEAEVVATVVCGDYYGENMEDAKAKILEMIKKYNPDLFVAGPA	89
GrdF1	FNAGRYGVACGSIKAVEEDLGIPSVTGMVVENPGVDMYRKDIQIIEETGNSAADLRNSMPKLAKLVMMKKAKGELVGPPEVEGYHMMGI	176
GrdF2	FNAGRYGVACGSIKAVEDELGIPVVSAMYKENPGTDMYKKDIHIIETEISAADMRNAVPKLARLGLKLLAKGEEIGSPQEEGYHVRGI	176
GrdF1	RTNFFHEKRGSERAIDMLVNLNGEKFEITYEYMPVDFRVPNPVAVKDMSKVKVAIVTSGGIVPHDNPDRIESSSATRYGIYDITGMDS	264
GrdF2	RVNYFNEKRASERGIIDMLVKKMKGEEFIITYEYMPVDFRVPNPVAVKDISKVKIADTSGGIVPQGNPDRIESSSATKYGIYYISAMDS	264
GrdF1	MSADDFTSIHGGYDRAFFVVKDPNLVVPLDVMRDLEREGVIGELANYFVSTTGTGTSVGNAGKFGESFSKKLIEDGVGAVILTSTUGTC	353
GrdF2	LGAGRFMTIHGGYDRRLSQRTPNLVVPLDVMREMEKEGTIGELADYFISTTGTGTSVGNAGKDFSKKLEEDGVGAVILTSTUGTC	353
GrdB1		AVILTSTUGTC
GrdB2		AVILTSTUGTC
GrdH		GVIMTSTUGTC
GrdF1	TRCGATMVKEIERAGIPVVHLATVVPISLTIGANRIVPAIGIPHPLGDEALDAKGDKKLRRELVMRGLKALQTEVDEQTVFEG	436
GrdF2	TRCGATMVKEIERVVGIPVVHVATVVPISLTIGANRIVPAVGIPYPLGNENLGPDGKKIRRALVEKALRALQTEVEEQTVFED	436
GrdB1	TRCGASMVKEIER	
GrdB2	TRCGASMVKEIER	
GrdH	TRCGATMVKEIER	

Abb. 41: Aminosäure-Alignment der zwei GrdF-Varianten der Sarcosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum*: Gezeigt ist ein Alignment von GrdF₁ (SONNTAG 1998) und GrdF₂ (diese Arbeit) aus *E. acidaminophilum*. Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt. Zusätzlich ist ein Sequenzausschnitt der aktiven Zentren beider GrdB-Varianten der Glycin-Reduktase und von GrdH der Betain-Reduktase dargestellt.

In den 47 bzw. 48 kDa-Untereinheiten der Glycin- und Sarcosin-Reduktase bzw. Betain-Reduktase diverser Organismen, wie z. B. *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001), *C. litorale* (KREIMER and ANDREESEN 1995) oder *C. difficile* (SEBAIHA *et al.*, 2006) ist ebenfalls dieses redoxaktive Motiv zu finden. Auffallend hierbei ist, dass innerhalb des aktiven Zentrums neben dem charakteristischen UxxCxxC-Motiv eine Vielzahl an konservierten Serinen und Threoninen zu finden ist (Abb. 41). Diesen konnte im Fall der Glycin- und der Sarcosin-Reduktase bzw. der Betain-Reduktase bislang keine Funktion zugeordnet werden (ANDREESEN 2004). Nach Bindung des jeweiligen Substrates an diese Untereinheit der entsprechenden Reduktasen kommt es zu einem nucleophilen Angriff der Selenolgruppe des im aktiven Zentrum lokalisierten Selenocysteins auf das α -C-Atom der C-N-Bindung, was zu einem an Protein B gebundenen Carboxymethylselenoether führt. Anschließend erfolgt eine Umetherung auf das Selenoprotein A, was dadurch zum Substrat für GrdC und GrdD wird. Durch Reduktionsäquivalente wie z. B. NADPH+H⁺, die u. a. aus der Oxidation von Aminosäuren stammen und über das Thioredoxin-System bereit gestellt werden, kommt es zur Reduktion des Selenid-Sulfides an Selenoprotein A zur Selenol/Thiol-Gruppe. GrdA ist hiernach zur Aufnahme eines neuen Carboxymethylselenoether bereit (ANDREESEN 2004).

GrdA und GrdF sind zwei von bisher acht verschiedenen für *E. acidaminophilum* beschriebenen Selenoproteinen (ANDREESEN *et al.*, 1999; GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2003; GRÖBE *et al.*, 2007; GURSINSKY 2002; GURSINSKY *et al.*, 2008; GURSINSKY *et al.*, 2000; SÖHLING *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 1999). Die Gene *grdA* und *grdF* weisen beide ein *in-frame* UGA-Codon auf, was den cotranslationalen Einbau von Selenocystein in das entsprechende Genprodukt vermittelt. Essentiell ist eine bei Prokaryoten unmittelbar

downstream des UGA-Codons lokalisierte mRNA-Sekundärstruktur. Durch Bindung des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors SelB an diese Struktur kommt es zur Konformationsänderung desselben und der damit verbundenen Wechselwirkung mit dem Ribosom, wodurch die Inkorporation von Selenocystein in die Polypeptidkette ermöglicht wird. Diese als SECIS-Element (*selenocystein insertion sequence*) bezeichnete Struktur konnte *downstream* des für Selenocystein codierenden UGA-Codons der im Rahmen dieser Arbeit klonierten Gene von *grdA₃* bzw. *grdF₂* lokalisiert werden. Das potentielle SECIS-Element von *grdA₃* zeigt eine 100%ige Übereinstimmung in der Sequenz und damit verbunden in der Sekundärstruktur mit den von GURSINSKY (2002) für *grdA₂* und *grdA₁* postulierten SECIS-Elementen. Im Vergleich dazu zeigt das SECIS-Element von *grdA₄* einen Basenaustausch (G-A) an Position +6 (UGA = +1), was jedoch keine Änderung der Sekundärstruktur im Vergleich zu den anderen *grdA*-Varianten zur Folge hat. Die potentiellen SECIS-Elemente von *grdF₁* (GURSINSKY 2002; SONNTAG 1998) und *grdF₂* (diese Arbeit) sind in Sequenz und somit auch in der Sekundärstruktur identisch. Die aus der Sequenz resultierenden mRNA-Sekundärstrukturen der Gene *grdA₃* bzw. *grdF₂* sind in Abbildung 42 dargestellt.

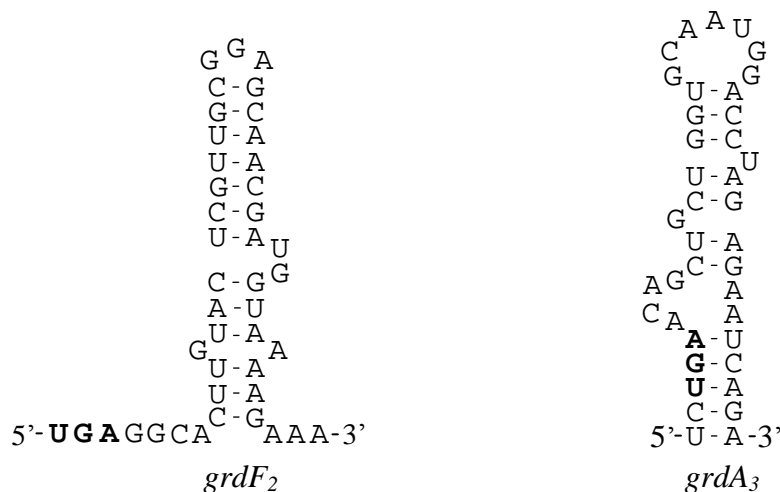


Abb. 42: Putative mRNA-Sekundärstrukturen der Selenoproteine GrdA und GrdF: Das Selenocystein-spezifische UGA-Codon ist fett dargestellt. *grdA*_Gen des Selenoprotein A, *grdF*_Gen der 47 kDa-Untereinheit des P_{BSarcosin}.

Die mRNA-Sekundärstruktur von *grdA* zeigt im Vergleich zu *grdF* nicht die typische Struktur eines SECIS-Elementes. Diese sind durch einen apikalen *loop*, bestehend aus 3-14 Nukleotiden, welche im Abstand von 16 - 37 Nukleotide vom UGA-Codon lokalisiert ist, gekennzeichnet. Zudem ist mindestens eine der ersten beiden Basen dieser Schleife ein Guanin (ZHANG and GLADYSHEV 2005). Während im SECIS-Element von *grdF* ein Abstand von 18 Nukleotiden zwischen UGA und der apikalen Schleife zu finden ist, sind es im *grdA*-SECIS-Element nur 12. Jedoch ist die erste Base dieser Schleife auch hier ein Guanin. Die Strukturen der potentiellen SECIS-Elemente der *grdA*-Gene aus *C. difficile*, *C. sticklandii* und *C. litorale* weisen ebenfalls nicht die hier beschriebenen Charakteristika auf. GURSINSKY *et al.* (2008) postulierte jedoch für das SelB aus *E. acidaminophilum*, eine wesentlich geringere Sequenzspezifität bzw. größere Toleranz gegenüber

strukturellen Variationen im Vergleich zu SelB aus *E. coli* und anderen Organismen. Veränderungen in der Sequenz der apikalen Schleife hatten kaum Auswirkungen auf die Effizienz der Selenocystein-Inkorporation (GURSINSKY 2002; GURSINSKY *et al.*, 2008).

Die Resultate von SONNTAG (1998) zeigen eine spezifische Induktion der Transkription der Glycin-, Sarcosin- und Betain-spezifischen Gensätze durch die jeweiligen Substrate Glycin, Sarcosin und Betain. So wurde u. a. postuliert, dass die Transkription des Betain-spezifischen Gensatzes durch GrdR, ein mögliches Regulatorprotein, in Gegenwart von Betain induziert wird. Die mögliche Beteiligung von GrdR an der Transkriptionsregulation wurde jedoch nicht experimentell belegt (SONNTAG 1998). Datenbankrecherchen zeigten, dass u. a. in *C. bolteae* (SONG *et al.*, 2003), ebenfalls *upstream* der Gene *grdI* und *grdH* ein offener Leserahmen lokalisiert ist, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz signifikante Homologien zu GrdR aus *E. acidaminophilum* aufweist. Auch in den Genomen anderer Organismen, in denen die Gene *grdI* und *grdH* identifiziert werden konnten, ist ein mögliches GrdR-Analogon direkt assoziiert. Diese Erkenntnisse unterstreichen die von SONNTAG (1998) aufgestellte Hypothese. Des Weiteren wurde dem Genprodukt von *orfX*, welcher *upstream* der Gene der Sarcosin-spezifischen Reduktase lokalisiert wird, eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Transkription dieser Gene zugeschrieben, da es gemeinsam mit diesen transkribiert wird (SONNTAG 1998). Auffällig ist, dass dieses hypothetische Protein eine signifikante Ähnlichkeit von 39,7 % zu dem Genprodukt von *grdX* hat (Abb. 43), einem Gen, welches *upstream* der Gene der Glycin-Reduktase im Gencluster I von *E. acidaminophilum* (s. S. 43, Abb. 7) lokalisiert ist.

```

OrfX  MDKLIITNNSLVYKFNKDIET-----LYLDKSSLYQLLECVRDLVYMGHSLYTHPLSSSIKPNETPYKSVVISKSKGVLMLESVAIT 83
GrdX  --MEIITNNPLVKEKLLQKAERPDRVKNITFLSDCDYIGVLHNVRNLVHSGYKILTHPLYGSVKPNETPYRTIFVEPGTG-IDMDSLKLI 87

OrfX  EKSMDSALRFMKNYPTPPWTENILKDFRIVDLSLIENAVSRMGNI 128
GrdX  ESAIQTVETFQKNYKTPVWDEKVTDDFQVVDLDLIAHTLNGIKF- 131

```

Abb. 43: Aminosäure-Alignment der Genprodukte von *orfX* und *grdX* aus *E. acidaminophilum*: Gezeigt ist ein Alignment von OrfX (SONNTAG 1998) und GrdX (diese Arbeit) aus *E. acidaminophilum*. Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt.

Denkbar ist, dass beide Proteine als Sensor der Substrate Glycin und Sarcosin, die beide eine sehr ähnliche Struktur aufweisen, agieren und so gezielt an Regulation der Transkription der entsprechende Gene beteiligt sind. Diese Aussage könnte dadurch bekräftigt werden, dass *grdX* immer *upstream* der Glycin-spezifischen Reduktase und des Thioredoxin-Systems, falls diese assoziiert sind, lokalisiert ist. Dies erstreckt sich nicht nur auf die Organismen der in Abbildung 38 (s. S. 130) dargestellten Gencluster, sondern ist bei allen Organismen mit Glycin-Reduktase-spezifischen Genen, deren Sequenzen in den Datenbanken gespeichert sind, zu finden.

Die aus den jeweiligen Genen resultierenden Genprodukte zeigen signifikante Homologien zueinander. Dabei ist ein konserviertes Sequenzmotiv (I/EI/MI/VTNNxxVxE) nahe dem N-Terminus des Proteins zu erkennen. Des Weiteren ist ein konserviertes Motiv (LT/SHPLM/S/YGSVKPNETPY/FR/K) im zentralen

Bereich der Proteine zu finden (Abb. 44), wobei die drei konservierten Proline auffallen, die möglicherweise als Helixbrecher agieren können. Bisher konnte diesen Sequenzmotiven jedoch keine Funktion zugeordnet werden, diese ist auch nur in den hypothetischen GrdX-Proteinen zu finden.

```

C_dif  ---MIIITNNPKVKEEVQGRE-----VLFKDTTYIGILEASRDLIHEGYELLSHPLYGSVKPNETPYRTVILKKGNR--LDINS 76
E_aci  ---MEIITNNPLVKEKLLQKAERPDRVKNITFLSDCDYIGVLHNVRNLVHSGYKILTHPLYGSVKPNETPYRTIFVEPGTG--LDMS 85
C_sti  ---MIIITNNKLVDEYYGGKN-----VELLEGSYQDVLYSVRDYVHKNYKLLTHPLSGSVKPNETPFKSVALEIGDK--LDFNS 76
C_bot  MNNKVMVVTNNKLVSEKFNEKCQ-----VEFVLGDVNEVFNTVRDYVHKGHHELLTHPLMSSVKPNETPYRTVVLISKYYKNVDMES 83

C_dif  LTLLEEAITITASKFQNNKKTPKWTESVQDDFRVIDYDIFYNTIQRMQYE 123
E_aci  LKLIESAIQTVETFQKNYKTPVWDEKVTDDFQVVDLDLIAHTLNGIKF- 131
C_sti  VEMTENAITYTYSKLNDSITPNWTETVLEDFKVIDLDLIKHALKI---- 119
C_bot  LNYLEESLHSLEKFKSCGTPAANDNLIKDFRLIDYDLIYNALN----- 125

```

Abb. 44: Aminosäure-Alignment verschiedener putativer GrdX-Proteine: Gezeigt ist ein Alignment von putativen GrdX-Proteinen aus *C. difficile* (SEBAIHIA *et al.*, 2006), *E. acidaminophilum* (diese Arbeit), *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001) und *C. botulinum* (SEBAIHIA *et al.*, 2007). Die Sequenzen wurden mit CLUSTALW verglichen (2.8.2.). Identische Aminosäuren wurden dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) wurden hellgrau unterlegt.

Im 5'-nichttranslatierten Bereich der sechs im Genom von *E. acidaminophilum* identifizierten Gensätze der Komponenten der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase bzw. des Gencluster III und VI (s. S. 43, Abb 7) konnten keine Sequenzen bzw. Sequenzbereiche identifiziert werden, die einen Hinweis auf eine Riboswitch, wie er für die Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons (4.1.) diskutiert wurde, geben. Ein Glycin-abhängiger Riboswitch ist teilweise auch *upstream* der Gene des Thioredoxin-Systems zu finden (MANDAL *et al.*, 2003; MANDAL *et al.*, 2004), jedoch konnten auch *upstream* von *trxB₁* oder *trxB₂*, die unter 4.1. beschriebenen signifikanten Sequenzhomologien, nicht gefunden werden. Auffällig jedoch ist, dass *upstream* von *grdX* in allen in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen putative rho-unabhängige Terminatorstrukturen (PLATT 1986) zu finden sind, die nicht dem *upstream* lokalisierten Gen zugeordnet werden können. Möglicherweise ist die Transkription dieser Gensätze durch einen bisher noch nicht beschriebenen Riboswitch reguliert.

4.5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse geben einen Hinweis auf die Funktion von PrpU und dessen Beteiligung am Glycin-Metabolismus von *E. acidaminophilum*. Um einen detaillierteren Einblick in die Funktionsweise von PrpU zu erlangen, sind jedoch weiterführende Experimente notwendig, von denen im Folgenden einige vorgeschlagen werden sollen.

Zunächst ist es sehr wichtig, die Gene der Glycin-Decarboxylase in aktiver Form in *E. coli* zu exprimieren und die einzelnen Komponenten auf ihre Aktivität z. B. durch den Einsatz radioaktiver Agenzien wie $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin bzw. ^{14}C -Bicarbonat zu testen. Auch eine Coexpression von *gcvP2* und *gcvP4* mit Hilfe des Plasmides pASK-IBA53a bzw. die Kultivierung der Expressionsstämme und die sich anschließende

Reinigung der einzelnen Proteine unter anaeroben Bedingungen wären hier denkbar. Wenn dies jedoch nicht zum Erfolg führt, ist auch eine native Reinigung der einzelnen Proteine aus *E. acidaminophilum* möglich. Weiterhin ist die Optimierung der Testbedingungen zur Bestimmung der Glycin-Decarboxylase-Aktivität zum einen für die heterolog synthetisierten Genprodukte und zum anderen für die nativ gereinigten Proteine sehr wichtig. Auch der Einsatz von nativ aus *E. acidaminophilum* gereinigtem PrpU in diesen Test ist denkbar, um nur das Wildtyp-Selenoprotein und nicht ein Gemisch aus Cystein-, Selenocystein- und Tryptophan-Varianten (durch Cystein- bzw. Tryptophan-Suppression) zu haben.

Durch Immunopräzipitation von PrpU aus dem Rohextrakt von *E. acidaminophilum* und anschließender Bestimmung der Glycin-Decarboxylase-Aktivität des verbleibenden Rohextraktes könnte eine direkte Beteiligung von PrpU an der Glycin-Oxidation gezeigt werden. Durch die Bestimmung von Proteinen, die bei diesem Versuch möglicherweise mit PrpU copräzipitieren, könnten die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Interaktionsstudien (*two-hybrid-System* und *pull-down-assay*) bestätigt werden. Durch Kristallisation und Aufklärung der Struktur von PrpU sind Vergleiche mit anderen Proteinen möglich und so könnten möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion des bisher einzigartigen Proteins gezogen werden. Durch heterologe Expression von *trxU* aus *T. denticola* und anschließende Aktivitätstests könnte PrpU mit diesem Protein verglichen werden. Interessant wäre es zu klären, ob die Expression der Gene des Glycin-Decarboxylase-Operons tatsächlich durch einen *upstream* des Operons gelegenen Glycin-sensitiven Riboswitch reguliert wird. Dazu wären *lacZ*-Fusionen mit der den Bereich des Riboswitches umfassenden Region denkbar, um die Induktion der Transkription durch Glycin zu zeigen. So könnte auch geklärt werden, ob der potentielle Riboswitch eine stark verminderte Affinität gegenüber den Glycin-Derivaten Sarcosin und Betain, aber auch anderen Aminosäuren wie z. B. Alanin oder Aspartat zeigt. Durch *in vitro* Transkription der den Riboswitch umfassenden mRNA-Fragmente könnten Bindestudien mit Glycin, seinen Derivaten Sarcosin und Betain, aber auch anderen Aminosäuren wie Alanin, Aspartat, Valin u. a. durchgeführt werden, um so die spezifische Bindung von Glycin durch diesen potentiellen Riboswitch zu zeigen.

Da es nach bisherigem Stand so aussieht, dass das Genom von *E. acidaminophilum* nicht in absehbarer Zeit sequenziert wird, wäre es interessant zu schauen, ob tatsächlich alle Gene der Reduktase-Gensätze kloniert wurden. So sollte z. B. *downstream* von *grdD₂* ein Anschlussklon gesucht werden, aber auch speziell die Bereiche *upstream* von *grdX* und *grdG₂* sollten durch Anschlussklone identifiziert werden. Weiterhin sollte durch RT-PCRs und anschließende Sequenzierung der erhaltenen Produkte geklärt werden, welche Gene tatsächlich transkribiert werden, da sich nahezu alle Genkopien auf DNA-Ebene geringfügig unterscheiden. Die beiden Kopien von *grdC* und *grdD* unterscheiden sich jedoch nicht, daher wäre hier eine Aussage durch diesen Versuch nicht möglich. Entscheidend wäre es auch, zu klären ob *grdX* überhaupt transkribiert wird und möglicherweise polycistronisch mit weiteren Genen des Gensatzes I transkribiert wird. Durch *primer-extension*-Analysen könnte man die Transkriptionsstartpunkte speziell der Gensätze I und VI identifizieren um so möglicherweise Hinweise auf die Regulation der Transkription der einzelnen Gensätze zu erhalten und zu schauen, ob diese auch hier durch einen bislang jedoch noch nicht beschriebenen Riboswitch reguliert werden.

5. Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das für das P4-Protein der Glycin-Decarboxylase codierende *gcvP4*-Gen vollständig kloniert, sequenziert und ein ca. 2400 bp umfassender Bereich *upstream* dieses Gens identifiziert werden. Die Gene *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* und *gcvP1 β* der Komponenten der Glycin-Decarboxylase sind gemeinsam mit den Genen *thf* (Formyl-THF-Synthetase) und *prpU* (PrpU) in einem Operon organisiert. *Upstream* davon sind die Gene *nlpP* (Zellwand-assoziierte Reduktase mit SH3-Domäne) und *fabG'* (3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktasen) lokalisiert.
2. Durch *primer-extension*-Analysen konnte ein Transkriptionsstartpunkt 1120 Nukleotide *upstream* des Startcodons von *gcvP4* identifiziert werden. *Upstream* der Gene *gcvP2*, *gcvP1 α* und *gcvP1 β* wurden keine Transkriptionsstartpunkte gefunden. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen Diplomarbeit, dass die Gene der Glycin-Decarboxylase polycistronisch transkribiert werden. Dies konnte ebenfalls durch RT-PCRs bestätigt werden.
3. Durch Analyse des großen *upstream* von *gcvP4* lokalisierten Bereiches konnten signifikante Sequenzhomologien zu der Konsensussequenz des Glycin-abhängigen Riboswitches gefunden werden. Diese Homologien konnten ebenfalls *upstream* der *gcvP4*-Gene von *C. difficile* und *C. sticklandii* identifiziert werden.
4. Durch Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Gene *gcvP4*, *gcvP2*, *gcvP1 α* und *gcvP1 β* der Glycin-Decarboxylase sowie die Gene *thf* und *prpU* während aller Wachstumsphasen von *E. acidaminophilum* auf Glycin-haltigem Medium stark exprimiert wurden. Eine vergleichsweise schwache Transkription dieser Gene war während der stationären Phase zu erkennen.
5. Bei Kultivierung von *E. acidaminophilum* auf unterschiedlichen C-Quellen konnte eine deutliche Induktion des Glycin-Decarboxylase-Operons durch Glycin gezeigt werden. Eine schwächere Transkription dieser Gene konnte nach Kultivierung auf Betain-haltigen Medien gezeigt werden. Diese war nach Anzucht von *E. acidaminophilum* auf Sarcosin-haltigen Medien noch schwächer ausgeprägt. Die Resultate der Transkriptionsanalysen konnten durch Western-Blot-Analyse mit spezifischem Anti-PrpU-Antikörper bestätigt werden.
6. Durch Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-Systems konnten Interaktionen von PrpU mit GcvP2 der Glycin-Decarboxylase, dem Thioredoxin des Thioredoxin-Systems und dem Selenoprotein GrdA der Glycin-Reduktase gezeigt werden. Das BacterioMatch® Two-Hybrid-System (Stratagene) erwies sich als ungeeignet.
7. Mit Hilfe des *lexA*-basierenden *two-hybrid*-System konnten Interaktionen der Komponenten der Glycin-Decarboxylase untereinander identifiziert werden, d. h. der α - und β -Untereinheit des P1-Proteins, bzw.

des P2-Proteins mit diesen Untereinheiten, aber auch des P2-Proteins mit dem P4-Protein der Glycin-Decarboxylase. Des Weiteren wurden Interaktionen der Proteine GcvP2, PrpU, GrdA sowie Thioredoxin jeweils untereinander gezeigt. Es konnten auch Interaktionen der beiden Komponenten des Thioredoxin-Systems (Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin) gezeigt werden.

8. Die Gene der Komponenten der Glycin-Decarboxylase konnten heterolog in *E. coli* als *Strep-tag*[®] II-Fusionsproteine exprimiert werden. Die beiden Untereinheiten des P1-Proteins konnten nur durch gemeinsame Synthese mit Hilfe des Plasmides pASK-IBA53a als lösliche Form überproduziert werden. Das in Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmid pASK-IBA53a ermöglicht die gemeinsame Synthese von zwei Proteinen, wobei das eine N-terminal und das zweite C-terminal mit dem *Strep-tag*[®] II fusioniert ist. Das P2-Protein konnte als lipoyliertes Holoenzym heterolog synthetisiert werden. Alle vier Proteine lagen nach heterologer Synthese und Affinitätschromatographie im Glycin-Decarboxylase-Test nur in der inaktiven Form vor.
9. Die Gene *trxB* und *trxA* sowie die Gene der Selenoproteine PrpU und GrdA konnten heterolog als *Strep-tag*[®] II-Translationsfusionen in *E. coli* exprimiert werden. Die Proteine PrpU und GrdA konnten als Cystein-Mutanten, aber dank des von GURSINSKY *et al.* (2008) entwickelten Systems auch in der Wildtyp-Form synthetisiert werden, wobei jedoch ein Protein-Gemisch aus Cystein-, Selenocystein- und Tryptophan-Varianten entstand.
10. Die Stimulierung der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität der Thioredoxin-Reduktase durch Thioredoxin und GrdA konnte mit den heterolog synthetisierten Proteinen gezeigt werden, eine Beteiligung von PrpU an dieser Reaktion konnte hingegen nicht detektiert werden.
11. Im Gensatz I konnte der zu Beginn dieser Arbeit unvollständig vorliegende offene Leserahmen einer dritten Kopie von *grdA* vollständig kloniert und sequenziert und *upstream* davon eine zweite Kopie von *grdE* und das Gen *grdX* identifiziert werden. Im Creatin-spezifischen Gensatz VI konnten jeweils eine zweite Kopie der Gene *grdF* und *grdG* für eine Sarcosin-Reduktase identifiziert werden. *Downstream* des im Gensatz VI gelegenen *grdA*₄ konnte das Gen einer DNA-Methyltransferase identifiziert werden. Im Gensatz V/II ist *downstream* von *grdC*₂ eine zweite Kopie von *grdD* lokalisiert. Somit enthält das Genom von *E. acidaminophilum* jeweils zwei Kopien der Gene der Glycin-Reduktase und der Sarcosin-Reduktase sowie des Thioredoxin-Systems und beider Untereinheiten des Protein C, sowie vier Kopien von *grdA*, dem gemeinsamen Selenoprotein aller drei Reduktasen. Dieses Protein hat mindestens eine duale Funktion: Träger des gebildeten Carboxymethyl-Intermediates und redoxaktives Protein, das mit GrdC und dem Thioredoxin und eventuell mit beiden Proproteinen GrdE und GrdG interagiert, um eine Cysteinolyse zu induzieren.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A. *et al.*, (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W. *et al.*, (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A. *et al.*, (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- ANDREESEN, J. R. (1994a) Acetate via glycine: A different form of acetogenesis. DRAKE, H. L. (ed) *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York, London, pp 568-629
- ANDREESEN, J. R. (1994b) Glycine metabolism in anaerobes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:223-237
- ANDREESEN, J. R. (2004) Glycine reductase mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:454-461
- ANDREESEN, J. R., WAGNER, M., SONNTAG, D. *et al.*, (1999) Various functions of selenols and thiols in anaerobic gram-positive, amino acids-utilizing bacteria. *Biofactors* 10:263-270
- ARKOWITZ, R. A., ABELES, R. H. (1990) Isolation and characterization of a covalent selenocysteine intermediate in the glycine reductase system. *J. Am. Chem. Soc.* 112:870-872
- 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
- ARNER, E. S., HOLMGREN, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267:6102-6109
- ARNER, E. S., NORDBERG, J., HOLMGREN, A. (1996) Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:268-274
- BAENA, S., FARDEAU, M. L., WOO, T. H. *et al.*, (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. Syst. Bacteriol.* 49:969-974
- BAO, Q., TIAN, Y., LI, W. *et al.*, (2002) A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res.* 12:689-700
- BARRICK, J. E., BREAKER, R. R. (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* 8:239
- BARRICK, J. E., CORBINO, K. A., WINKLER, W. C. *et al.*, (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6421-6426
- BATEY, R. T., GILBERT, S. D., MONTANGE, R. K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* 432:411-415
- BAUWE, H., CHU, C. C., KOPRIVA, S. *et al.*, (1995) Structure and expression analysis of the *gdcsPA* and *gdcsPB* genes encoding two P-isoproteins of the glycine-cleavage system from *Flaveria pringlei*. *Eur. J. Biochem.* 234:116-124

- BEDNARSKI, B., ANDREESSEN, 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*: formation of a pyruvoyl group from a cysteine residue. *Eur. J. Biochem.* 268:3538-3544
- BERRY, J. A., OSMOND, C. B., LORIMER, G. H.** (1978) Fixation of O₂ during photorespiration: Kinetic and steady-state studies of the photorespiratory carbon oxidation cycle with intact leaves and isolated chloroplasts of C(3) plants. *Plant Physiol.* 62:954-967
- BERTRAM, S., GASSEN, H. G.** (1991) *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Gustav Fischer Verlag, Jena
- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523
- BOURGUIGNON, J., NEUBURGER, M., DOUCE, R.** (1988) Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase. *Biochem. J.* 255:169-178
- BOURGUIGNON, J., VAUCLARE, P., MERAND, V. et al.,** (1993) Glycine decarboxylase complex from higher plants. Molecular cloning, tissue distribution and mass spectrometry analyses of the T protein. *Eur. J. Biochem.* 217:377-386
- BRADFORD, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- BROCKLEHURST, S. M., PERHAM, R. N.** (1993) Prediction of the three-dimensional structures of the biotinylated domain from yeast pyruvate carboxylase and of the lipoylated H-protein from the pea leaf glycine cleavage system: a new automated method for the prediction of protein tertiary structure. *Protein Sci.* 2:626-639
- BROOKFIELD, D. E., GREEN, J., ALL, S. T. et al.,** (1991) Evidence for two protein-lipoylation activities in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 295:13-16
- BUSBY, S., EBRIGHT, R. H.** (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293:199-213
- CALVO, J. M., MATTHEWS, R. G.** (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58:466-490
- COHEN-ADDAD, C., FAURE, M., NEUBURGER, M. et al.,** (1997) Structural studies of the glycine decarboxylase complex from pea leaf mitochondria. *Biochimie* 79:637-643
- COHEN-ADDAD, C., PARES, S., SIEKER, L. et al.,** (1995) The lipoamide arm in the glycine decarboxylase complex is not freely swinging. *Nature Struct. Biol.* 2:63-68
- COLE, S. T., BROSCH, R., PARKHILL, J. et al.,** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544
- COLLINS, M. D., LAWSON, P. A., WILLEMS, A. et al.,** (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:812-826
- CORBINO, K. A., BARRICK, J. E., LIM, J. et al.,** (2005) Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol.* 6:70

- CRONAN, J. E., LA PORTE, D.** (eds) (1996) Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC
- DECKERT, G., WARREN, P. V., GAASTERLAND, T. et al.**, (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392:353-358
- DIETRICH, D., MEYER, M., RIETH, M. et al.**, (1991) Interaction of selenoprotein P_A and the thioredoxin system, components of the NADPH-dependent reduction of glycine in *Eubacterium acidaminophilum* and *Clostridium litorale*. *J. Bacteriol.* 173:5983-5991
- DINOPOULOS, A., KURE, S., CHUCK, G. et al.**, (2005) Glycine decarboxylase mutations: a distinctive phenotype of nonketotic hyperglycinemia in adults. *Neurology* 64:1255-1257
- DMITROVA, M., YOUNES-CAUET, G., OERTEL-BUCHHEIT, P. et al.**, (1998) A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 257:205-212
- DÖRING, V., MOOTZ, H. D., NANGLE, L. A. et al.**, (2001) Enlarging the amino acid set of *Escherichia coli* by infiltration of the valine coding pathway. *Science* 292:501-504
- DOVE, S. L., HOCHSCHILD, A.** (1998) Conversion of the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target. *Genes Dev.* 12:745-754
- DOVE, S. L., JOUNG, J. K., HOCHSCHILD, A.** (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* 386:627-630
- DOWER, W. J., MILLER, J. F., RAGSDALE, C. W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145
- ENGELMANN, S., WILUDDA, C., BURSCHEIDT, J. et al.**, (2008) The gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from the C4 species *Flaveria trinervia*: Analysis of transcriptional control in transgenic *Flaveria bidentis* (C4) and *Arabidopsis thaliana* (C3). *Plant Physiol.* 146:1773-1785
- ENGLER-BLUM, G., MEIER, M., FRANK, J. et al.**, (1993) Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* 210:235-244
- EVERSMANN, B.** (2004) Molekulare und biochemische Untersuchungen zu Komponenten der D-Prolin-Reduktase und Glycin-Reduktase von *Clostridium sticklandii*: Analyse der Pyruvyl-bildenden Proenzyme GrdE und PrdA der Glycin und D-Prolin-Reduktase. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/04/04H208/index.htm>
- FAURE, M., BOURGUIGNON, J., NEUBURGER, M. et al.**, (2000) Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system 2. Crystal structures of H- and L-proteins. *Eur. J. Biochem.* 267:2890-2898
- FEDORCSAK, I., EHRENBERG, L.** (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* 20:107-112
- FENDRICH, C., HIPPE, H., GOTTSCHALK, G.** (1990) *Clostridium halophilum* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. *Arch. Microbiol.* 154:127-132

- FENG, L., WANG, W., CHENG, J. *et al.*, (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:5602-5607
- FLEISCHMANN, R. D., ALLAND, D., EISEN, J. A. *et al.*, (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 184:5479-5490
- FOMENKO, D. E., GLADYSHEV, V. N. (2003) Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry* 42:11214-11225
- FORCHHAMMER, K., BOESMILLER, K., BÖCK, A. (1991) The function of selenocysteine synthase and SELB in the synthesis and incorporation of selenocysteine. *Biochemie* 73:1481-1486
- FORCHHAMMER, K., LEINFELDER, W., BÖCK, A. (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 342:453-456
- FORSÉN, S., LINSE, S. (1995) Cooperativity: over the Hill. *Trends Biochem. Sci.* 20:495-497
- FREUDENBERG, W., ANDREESEN, J. R. (1989) Purification and partial characterization of the glycine decarboxylase multienzyme complex from *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Bacteriol.* 171:2209-2215
- FREUDENBERG, W., DIETRICH, D., LEBERTZ, H. *et al.*, (1989a) Isolation of an atypically small lipoamide dehydrogenase involved in the glycine decarboxylase complex from *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Bacteriol.* 171:1346-1354
- FREUDENBERG, W., MAYER, F., ANDREESEN, J. R. (1989b) Immunocytochemical localization of proteins P1, P2, P3 of glycine decarboxylase and of the selenoprotein P_A of glycine reductase, all involved in anaerobic metabolism of *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* 152:182-188
- FUCHS, R. T., GRUNDY, F. J., HENKIN, T. M. (2006) The S_(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13:226-233
- FUCHS, R. T., GRUNDY, F. J., HENKIN, T. M. (2007) S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the S_{MK} box translational riboswitch RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:4876-4880
- FUJIWARA, K., MOTOKAWA, Y. (1983) Mechanism of the glycine cleavage reaction. Steady state kinetic studies of the P-protein-catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* 258:8156-8162
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., HAYASAKA, K. *et al.*, (1991a) The primary structure of human H-protein of the glycine cleavage system deduced by cDNA cloning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:711-716
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1984) Mechanism of the glycine cleavage reaction. Further characterization of the intermediate attached to H-protein and of the reaction catalyzed by T-protein. *J. Biol. Chem.* 259:10664-10668
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1986) Chicken liver H-protein, a component of the glycine cleavage system. Amino acid sequence and identification of the N epsilon-lipoyllysine residue. *J. Biol. Chem.* 261:8836-8841
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1990) cDNA sequence, in vitro synthesis, and intramitochondrial lipoylation of H-protein of the glycine cleavage system. *J. Biol. Chem.* 265:17463-17467

- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1991b) Lipoylation of H-protein of the glycine cleavage system. The effect of site-directed mutagenesis of amino acid residues around the lipoyllysine residue on the lipoate attachment. *FEBS Lett.* 293:115-118
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1992) Expression of mature bovine H-protein of the glycine cleavage system in *Escherichia coli* and *in vitro* lipoylation of the apoform. *J. Biol. Chem.* 267:20011-20016
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1994) Purification and characterization of lipoyl-AMP:N epsilon-lysine lipoyltransferase from bovine liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 269:16605-16609
- FUJIWARA, K., OKAMURA-IKEDA, K., MOTOKAWA, Y. (1996) Lipoylation of acyltransferase components of alpha-ketoacid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.* 271:12932-12936
- FUJIWARA, K., OKAMURA, K., MOTOKAWA, Y. (1979) Hydrogen carrier protein from chicken liver: purification, characterization, and role of its prosthetic group, lipoic acid, in the glycine cleavage reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 197:454-462
- FUJIWARA, K., SUZUKI, M., OKUMACHI, Y. *et al.*, (1999) Molecular cloning, structural characterization and chromosomal localization of human lipoyltransferase gene. *Eur. J. Biochem.* 260:761-767
- FUJIWARA, K., TAKEUCHI, S., OKAMURA-IKEDA, K. *et al.*, (2001) Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver. *J. Biol. Chem.* 276:28819-28823
- FUJIWARA, K., TOMA, S., OKAMURA-IKEDA, K. *et al.*, (2005) Crystal structure of lipoate-protein ligase A from *Escherichia coli*. Determination of the lipoic acid-binding site. *J. Biol. Chem.* 280:33645-33651
- GARCIA, G. E., STADTMAN, T. C. (1991) Selenoprotein A component of the glycine reductase complex from *Clostridium purinolyticum*: nucleotide sequence of the gene shows that selenocysteine is encoded by UGA. *J. Bacteriol.* 173:4908
- GARIBOLDI, R. T., DRAKE, H. L. (1984) Glycine synthase of the purinolytic bacterium, *Clostridium acidurici*. Purification of the glycine-CO₂ exchange system. *J. Biol. Chem.* 259:6085-6089
- GHRIST, A. C., HEIL, G., STAUFFER, G. V. (2001) GcvR interacts with GcvA to inhibit activation of the *Escherichia coli* glycine cleavage operon. *Microbiology* 147:2215-2221
- GHRIST, A. C., STAUFFER, G. V. (1995) Characterization of the *Escherichia coli* gcvR gene encoding a negative regulator of gcv expression. *J. Bacteriol.* 177:4980-4984
- GHRIST, A. C., STAUFFER, G. V. (1998) Promoter characterization and constitutive expression of the *Escherichia coli* gcvR gene. *J. Bacteriol.* 180:1803-1807
- GILBERT, S. D., RAMBO, R. P., VAN TYNE, D. *et al.*, (2008) Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15:177-182
- GOLLNICK, P., BABITZKE, P. (2002) Transcription attenuation. *Biochim. Biophys. Acta* 1577:240-250
- GOSLINE, J. M., DEMONT, M. E., DENNY, M. W. (1986) The structure and properties of spider silk. *Endeavour* 10:37-43
- GRAENTZDOERFFER, A., RAUH, D., PICH, A. *et al.*, (2003) Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Arch. Microbiol.* 179:116-130

- GRAHAM, L. A., DAVIES, P. L.** (2005) Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas. *Science* 310:461
- GRANDERATH, K.** (1988) Physiologische und enzymatische Untersuchungen zum Abbau von Aminosäuren und organischen Säuren durch *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Georg-August-Universität zu Göttingen
- GRÄNTZDÖRFFER, A., RAUH, D., PICH, A. et al.,** (2003) Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Arch. Microbiol.* 179:116-130
- GRÄNTZDÖRFFER, A., PICH, A., ANDREESSEN, J. R.** (2001) Molecular analysis of the *grd* operon coding for genes of the glycine reductase and of the thioredoxin system from *Clostridium sticklandii*. *Arch. Microbiol.* 175:8-18
- GRAVES, M. C., RABINOWITZ, J. C.** (1986) *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms. *J. Biol. Chem.* 261:11409-11415
- GRIFFITH, K. L., WOLF, R. E., JR.** (2002) Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:397-402
- GRISHIN, N. V., PHILLIPS, M. A., GOLDSMITH, E. J.** (1995) Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci.* 4:1291-1304
- GRÖBE, D.** (2001) Analysen zur Translation von Seleno-Proteinen aus *Eubacterium acidaminophilum* in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- GRÖBE, T., REUTER, M., GURSINSKY, T. et al.,** (2007) Peroxidase activity of selenoprotein GrdB of glycine reductase and stabilisation of its integrity by components of proprotein GrdE from *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* 187:29-43
- GRUNDY, F. J., HENKIN, T. M.** (1998) The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 30:737-749
- GRUNDY, F. J., HENKIN, T. M.** (2003) The T box and S box transcription termination control systems. *Front. Biosci.* 8:d20-31
- GRUNDY, F. J., HENKIN, T. M.** (2006) From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41:329-338
- GRUNDY, F. J., LEHMAN, S. C., HENKIN, T. M.** (2003) The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12057-12062
- GUILHAUDIS, L., SIMORRE, J. P., BLACKLEDGE, M. et al.,** (2000) Combined structural and biochemical analysis of the H-T complex in the glycine decarboxylase cycle: evidence for a destabilization mechanism of the H-protein. *Biochemistry* 39:4259-4266
- GUILHAUDIS, L., SIMORRE, J. P., BLACKLEDGE, M. et al.,** (1999a) Investigation of the local structure and dynamics of the H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase using heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry* 38:8334-8346
- GUILHAUDIS, L., SIMORRE, J. P., BOUCHAYER, E. et al.,** (1999b) Backbone and sequence-specific assignment of three forms of the lipoate-containing H-protein of the glycine decarboxylase complex. *J. Biomol. NMR* 15:185-186

- 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
- GURSINSKY, T.,GRÖBE, D.,SCHIERHORN, A. et al.,** (2007) Factors and SECIS requirements for the synthesis of selenoproteins from a Gram-positive anaerobe in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- GURSINSKY, T.,GRÖBE, D.,SCHIERHORN, A. et al.,** (2008) Factors and SECIS requirements for the synthesis of selenoproteins from a Gram-positive anaerobe in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- GURSINSKY, T.,JÄGER, J.,ANDREESEN, J. R. et al.,** (2000) A *selDABC* cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* 174:200-212
- HAGEMANN, M.,VINNEMEIER, J.,OBERPICHLER, I. et al.,** (2005) The glycine decarboxylase complex is not essential for the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Biol.* 7:15-22
- HARLEY, C. B., REYNOLDS, R. P.** (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15:2343-2361
- HARMS, C.,LUDWIG, U., ANDREESEN, J. R.** (1998a) Sarcosine reductase of *Tissierella creatinophila*: purification and characterization of its components. *Arch. Microbiol.* 170:442-450
- HARMS, C.,MEYER, M. A., ANDREESEN, J. R.** (1998b) Fast purification of thioredoxin reductases and of thioredoxins with an unusual redox-active centre from anaerobic, amino-acid-utilizing bacteria. *Microbiology* 144 793-800
- HARMS, C.,SCHLEICHER, A.,COLLINS, M. D. et al.,** (1998c) *Tissierella creatinophila* sp. nov., a gram-positive, anaerobic, non-spore-forming, creatinine-fermenting organism. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 983-993
- HASSE, D.,MIKKAT, S.,THRUN, H. A. et al.,** (2007) Properties of recombinant glycine decarboxylase P- and H-protein subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett.* 581:1297-1301
- HAYASAKA, K.,NANAO, K.,TAKADA, G. et al.,** (1993) Isolation and sequence determination of cDNA encoding human T-protein of the glycine cleavage system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:766-771
- HAYDEN, M. A.,HUANG, I.,BUSSIÈRE, D. E. et al.,** (1992) The biosynthesis of lipoic acid. Cloning of *lip*, a lipoate biosynthetic locus of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267:9512-9515
- HEAZLEWOOD, J. L.,TONTI-FILIPPINI, J. S.,GOUT, A. M. et al.,** (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16:241-256
- HEIL, G.,STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V.** (2002) Glycine binds the transcriptional accessory protein GcvR to disrupt a GcvA/GcvR interaction and allow GcvA-mediated activation of the *Escherichia coli* *gcvTHP* operon. *Microbiology* 148:2203-2214
- HELMANN, J. D.** (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* 23:2351-2360
- HENKIN, T. M., YANOFSKY, C.** (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* 24:700-707

- HIRAGA, K., KIKUCHI, G.** (1980a) The mitochondrial glycine cleavage system. Functional association of glycine decarboxylase and aminomethyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* 255:11671-11676
- HIRAGA, K., KIKUCHI, G.** (1980b) The mitochondrial glycine cleavage system. Purification and properties of glycine decarboxylase from chicken liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 255:11664-11670
- HIRAGA, K., KIKUCHI, G.** (1982) The mitochondrial glycine cleavage system: inactivation of glycine decarboxylase as a side reaction of the glycine decarboxylation in the presence of aminomethyl carrier protein. *J. Biochem.* 92:1489-1498
- HIRSH, D., GOLD, L.** (1971) Translation of the UGA triplet in vitro by tryptophan transfer RNA's. *J. Mol. Biol.* 58:459-468
- HORMANN, K., ANDREESSEN, J. R.** (1989) Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Arch. Microbiol.* 153:50-59
- HUANG, X., MILLER, W.** (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12:12337-12357
- HUNGATE, R. E.** (1969) A role tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 3b:117-132, Academic Press, New York, London
- IVANOVA, N.,SOROKIN, A.,ANDERSON, I. et al.,** (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423:87-91
- JANSONIUS, J. N.** (1998) Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:759-769
- JOURDAN, A. D., STAUFFER, G. V.** (1998) Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: amino acids important for activation, repression, and DNA binding. *J. Bacteriol.* 180:4865-4871
- JOURDAN, A. D., STAUFFER, G. V.** (1999a) GcvA-mediated activation of *gcvT-lacZ* expression involves the carboxy-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase. *FEMS Microbiol. Lett.* 181:307-312
- JOURDAN, A. D., STAUFFER, G. V.** (1999b) Genetic analysis of the GcvA binding site in the *gcvA* control region. *Microbiology* 145:2153-2162
- KABISCH, U. C.,GRANTZDORFFER, A.,SCHIERHORN, A. et al.,** (1999) Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. *J. Biol. Chem.* 274:8445-8454
- KIKUCHI, G.** (1973) The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol. Cell. Biochem.* 1:169-187
- KIKUCHI, G., HIRAGA, K.** (1982) The mitochondrial glycine cleavage system. Unique features of the glycine decarboxylation. *Mol. Cell. Biochem.* 45:137-149
- KIM, J. N.,ROTH, A., BREAKER, R. R.** (2007) Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:16092-16097
- KIM, Y., OLIVER, D. J.** (1990) Molecular cloning, transcriptional characterization, and sequencing of cDNA encoding the H-protein of the mitochondrial glycine decarboxylase complex in peas. *J. Biol. Chem.* 265:848-853

- KLEIN, S. M., SAGERS, R. D.** (1966a) Glycine metabolism. I. Properties of the system catalyzing the exchange of bicarbonate with the carboxyl group of glycine in *Peptococcus glycinophilus*. *J. Biol. Chem.* 241:197-205
- KLEIN, S. M., SAGERS, R. D.** (1966b) Glycine metabolism. II. Kinetic and optical studies on the glycine decarboxylase system from *Peptococcus glycinophilus*. *J. Biol. Chem.* 241:206-209
- KLEIN, S. M., SAGERS, R. D.** (1967a) Glycine metabolism. III. A flavin-linked dehydrogenase associated with the glycine cleavage system in *Peptococcus glycinophilus*. *J. Biol. Chem.* 242:297-300
- KLEIN, S. M., SAGERS, R. D.** (1967b) Glycine metabolism. IV. Effect of borohydride reduction on the pyridoxal phosphate-containing glycine decarboxylase from *Peptococcus glycinophilus*. *J. Biol. Chem.* 242:301-305
- KOCHHAR, S., PAULUS, H.** (1996) Lysine-induced premature transcription termination in the *lysC* operon of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 142:1635-1639
- KOCHI, H., KIKUCHI, G.** (1969) Reactions of glycine synthesis and glycine cleavage catalyzed by extracts of *Arthrobacter globiformis* grown on glycine. *Arch. Biochem. Biophys.* 132:359-369
- KOCHI, H., KIKUCHI, G.** (1974) Mechanism of the reversible glycine cleavage reaction in *Arthrobacter globiformis*. I. Purification and function of protein components required for the reaction. *J. Biochem.* 75:1113-1127
- KOCHI, H., KIKUCHI, G.** (1976) Mechanism of reversible glycine cleavage reaction in *Arthrobacter globiformis*. Function of lipoic acid in the cleavage and synthesis of glycine. *Arch. Biochem. Biophys.* 173:71-81
- KOHLSTOCK, M.** (2001) Protein C von *Eubacterium acidaminophilum*: Sequenzanalyse und Funktion der Thiole von GrdD für die Freisetzung von Acetylphosphat. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/01/01H132/index.htm>
- KOHLSTOCK, U. M., RÜCKNAGEL, K. P., REUTER, M. et al.,** (2001) Cys359 of GrdD is the active-site thiol that catalyses the final step of acetyl phosphate formation by glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 268:6417-6425
- KOPRIVA, S., BAUWE, H.** (1994a) P-protein of glycine decarboxylase from *Flaveria pringlei*. *Plant Physiol.* 104:1077-1078
- KOPRIVA, S., BAUWE, H.** (1994b) T-protein of glycine decarboxylase from *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol.* 104:1079-1080
- KOPRIVA, S., BAUWE, H.** (1995) H-protein of glycine decarboxylase is encoded by multigene families in *Flaveria pringlei* and *F. cronquistii* (Asteraceae). *Mol. Gen. Genet.* 249:111-116
- KOPRIVA, S., CHU, C.-C., BAUWE, H.** (1996a) Molecular phylogeny of *Flaveria* as deduced from the analysis of nucleotide sequences encoding the H-protein of the glycine cleavage system. *Plant, Cell and Environ.* 19:1028-1036
- KOPRIVA, S., CHU, C. C., BAUWE, H.** (1996b) H-protein of the glycine cleavage system in *Flaveria*: alternative splicing of the pre-mRNA occurs exclusively in advanced C4 species of the genus. *Plant J.* 10:369-373
- KOPRIVA, S., COSSU, R., BAUWE, H.** (1995) Alternative splicing results in two different transcripts for H-protein of the glycine cleavage system in the C4 species *Flaveria trinervia*. *Plant J.* 8:435-441

- KREIMER, S., ANDREESEN, J. R.** (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
- KREIMER, S., SÖHLING, B., ANDREESEN, J. R.** (1997) Two closely linked genes encoding thioredoxin and thioredoxin reductase in *Clostridium litorale*. *Arch. Microbiol.* 168:328-337
- KUBODERA, T., WATANABE, M., YOSHIUCHI, K. et al.,** (2003) Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* 555:516-520
- KUMAR, A., LINDBERG, U.** (1972) Characterization of messenger ribonucleoprotein and messenger RNA from KB cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:681-685
- KUME, A., KOYATA, H., SAKAKIBARA, T. et al.,** (1991) The glycine cleavage system. Molecular cloning of the chicken and human glycine decarboxylase cDNAs and some characteristics involved in the deduced protein structures. *J. Biol. Chem.* 266:3323-3329
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I. et al.,** (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390:249-256
- KURE, S., TADA, K., NARISAWA, K.** (1997) Nonketotic hyperglycinemia: biochemical, molecular, and neurological aspects. *Jpn. J. Hum. Genet.* 42:13-22
- KWON, M., STROBEL, S. A.** (2008) Chemical basis of glycine riboswitch cooperativity. *RNA* 14:25-34
- LADANT, D., KARIMOVA, G.** (2000) Genetic systems for analyzing protein-protein interactions in bacteria. *Res. Microbiol.* 151:711-720
- 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 Gens *prpU* und seiner angrenzenden Genregion aus *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
- LEE, H. H., KIM, D. J., AHN, H. J. et al.,** (2004) Crystal structure of T-protein of the glycine cleavage system. Cofactor binding, insights into H-protein recognition, and molecular basis for understanding nonketotic hyperglycinemia. *J. Biol. Chem.* 279:50514-50523
- LEINFELDER, W., FORCHHAMMER, K., ZINONI, F. et al.,** (1988) *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *J. Bacteriol.* 170:540-546
- LEMAY, J. F., PENEDO, J. C., TREMBLAY, R. et al.,** (2006) Folding of the adenine riboswitch. *Chem. Biol.* 13:857-868
- LEVY, S., SUTTON, G., NG, P. C. et al.,** (2007) The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.* 5:e254
- LIM, J., WINKLER, W. C., NAKAMURA, S. et al.,** (2006) Molecular-recognition characteristics of SAM-binding riboswitches. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45:964-968
- LIN, X., KAUL, S., ROUNSLEY, S. et al.,** (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402:761-768
- LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E.** (2003) Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag, Heidelberg

- LOKANATH, N. K., KUROISHI, C., OKAZAKI, N. *et al.*, (2004) Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the glycine-cleavage system component T-protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60:1450-1452
- LOKANATH, N. K., KUROISHI, C., OKAZAKI, N. *et al.*, (2005) Crystal structure of a component of glycine cleavage system: T-protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 1.5 Å resolution. *Proteins* 58:769-773
- LU, J., NOGI, Y., TAKAMI, H. (2001) *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol. Lett.* 205:291-297
- 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.* 217:791-798
- MACHEREL, D., BOURGUIGNON, J., DOUCE, R. (1992) Cloning of the gene (*gdcH*) encoding H-protein, a component of the glycine decarboxylase complex of pea (*Pisum sativum* L.). *Biochem. J.* 286:627-630
- MACHEREL, D., BOURGUIGNON, J., FOREST, E. *et al.*, (1996) Expression, lipoylation and structure determination of recombinant pea H-protein in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 236:27-33
- MACHEREL, D., LEBRUN, M., GAGNON, J. *et al.*, (1990) cDNA cloning, primary structure and gene expression for H-protein, a component of the glycine-cleavage system (glycine decarboxylase) of pea (*Pisum sativum*) leaf mitochondria. *Biochem. J.* 268:783-789
- MANDAL, M., BOESE, B., BARRICK, J. E. *et al.*, (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 113:577-586
- MANDAL, M., BREAKER, R. R. (2004a) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:29-35
- MANDAL, M., BREAKER, R. R. (2004b) Gene regulation by riboswitches. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 5:451-463
- MANDAL, M., LEE, M., BARRICK, J. E. *et al.*, (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 306:275-279
- MAREK, L. F., STEWART, C. R. (1983) Photorespiratory glycine metabolism in corn leaf discs. *Plant Physiol.* 73:118-120
- MARTIN, W., RUJAN, T., RICHLI, E. *et al.*, (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12246-12251
- MARUSYK, R., SERGEANT, A. (1980) A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal. Biochem.* 105:403-404
- MARZI, S., MYASNIKOV, A. G., SERGANOV, A. *et al.*, (2007) Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* 130:1019-1031
- MEHTA, P. K., CHRISTEN, P. (2000) The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 74:129-184
- MEYER, M., DIETRICH, D., SCHMIDT, B. *et al.*, (1991) Thioredoxin elicits a new dihydrolipoamide dehydrogenase activity by interaction with the electron-transferring flavoprotein in *Clostridium litorale* and *Eubacterium acidaminophilum*. *J. Bacteriol.* 173:1509-1513

- MEYER, M., GRANDERATH, K., ANDREESSEN, J. R.** (1995) Purification and characterization of protein P_B of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 234:184-191
- MILLER, J. H.** (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- MILLER, J. R., BUSBY, R. W., JORDAN, S. W. et al.,** (2000) *Escherichia coli* LipA is a lipoyl synthase: *in vitro* biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry* 39:15166-15178
- MIRANDA-RIOS, J.** (2007) The THI-box riboswitch, or how RNA binds thiamin pyrophosphate. *Structure* 15:259-265
- MORRIS, T. W., REED, K. E., CRONAN, J. E., JR.** (1994) Identification of the gene encoding lipoate-protein ligase A of *Escherichia coli*. Molecular cloning and characterization of the *lplA* gene and gene product. *J. Biol. Chem.* 269:16091-16100
- MORRIS, T. W., REED, K. E., CRONAN, J. E., JR.** (1995) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J. Bacteriol.* 177:1-10
- MOTOKAWA, Y., KIKUCHI, G.** (1969) Glycine metabolism by rat liver mitochondria. IV. Isolation and characterization of hydrogen carrier protein, an essential factor for glycine metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 135:402-409
- MOTOKAWA, Y., KIKUCHI, G.** (1972) Isolation and partial characterization of the components of the reversible glycine cleavage system of rat liver mitochondria. *J. Biochem.* 72:1281-1284
- MOTOKAWA, Y., KIKUCHI, G.** (1974) Glycine metabolism by rat liver mitochondria. Isolation and some properties of the protein-bound intermediate of the reversible glycine cleavage reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 164:634-640
- MUDD, S. H., CANTONI, G. L.** (1964) Biological transmethylation, methyl-group neogenesis dependent upon tetrafollic acid. *Comp. biochem.* 15:1-47
- NAHVI, A., BARRICK, J. E., BREAKER, R. R.** (2004) Coenzyme B₁₂ riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 32:143-150
- NAHVI, A., SUDARSAN, N., EBERT, M. S. et al.,** (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* 9:1043
- NAKAI, T., ISHIJIMA, J., MASUI, R. et al.,** (2003a) Structure of *Thermus thermophilus* HB8 H-protein of the glycine-cleavage system, resolved by a six-dimensional molecular-replacement method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59:1610-1618
- NAKAI, T., NAKAGAWA, N., MAOKA, N. et al.,** (2003b) Coexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of glycine decarboxylase (P-protein) of the glycine-cleavage system from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59:554-557
- NAKAI, T., NAKAGAWA, N., MAOKA, N. et al.,** (2005) Structure of P-protein of the glycine cleavage system: implications for nonketotic hyperglycinemia. *Embo J.* 24:1523-1536
- NEIDHARDT, F. D.** (ed) (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC

- NELSON, K. E., EISEN, J. A., FRASER, C. M. (2001) Genome of *Thermotoga maritima* MSB8. *Methods Enzymol.* 330:169-180
- NEUBURGER, M., BOURGUIGNON, J., DOUCE, R. (1989) Isolation of a large complex from the matrix of pea leaf mitochondria involved in the rapid transformation of glycine into serine. *FEBS Lett.* 207:18-22
- NEUBURGER, M., JOURDAIN, A., DOUCE, R. (1991) Isolation of H-protein loaded with methylamine as a transient species in glycine decarboxylase reactions. *Biochem. J.* 278:765-769
- NEUBURGER, M., POLIDORI, A. M., PIETRE, E. *et al.*, (2000) Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system. 1. Biochemical studies. *Eur. J. Biochem.* 267:2882-2889
- NISHIYA, Y., TODA, A., IMANAKA, T. (1998) Gene cluster for creatinine degradation in *Arthrobacter* sp. TE1826. *Mol. Gen. Genet.* 257:581-586
- NOESKE, J., BUCK, J., FURTIG, B. *et al.*, (2007) Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.* 35:572-583
- NOESKE, J., RICHTER, C., GRUNDL, M. A. *et al.*, (2005) An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:1372-1377
- NOESKE, J., RICHTER, C., STIRNAL, E. *et al.*, (2006) Phosphate-group recognition by the aptamer domain of the thiamine pyrophosphate sensing riboswitch. *Chembiochem.* 7:1451-1456
- OKAMURA-IKEDA, K., FUJIWARA, K., MOTOKAWA, Y. (1982) Purification and characterization of chicken liver T-protein, a component of the glycine cleavage system. *J. Biol. Chem.* 257:135-139
- OKAMURA-IKEDA, K., FUJIWARA, K., MOTOKAWA, Y. (1999a) The amino-terminal region of the *Escherichia coli* T-protein of the glycine cleavage system is essential for proper association with H-protein. *Eur. J. Biochem.* 264:446-453
- OKAMURA-IKEDA, K., FUJIWARA, K., MOTOKAWA, Y. (1999b) Identification of the folate binding sites on the *Escherichia coli* T-protein of the glycine cleavage system. *J. Biol. Chem.* 274:17471-17477
- OKAMURA-IKEDA, K., FUJIWARA, K., YAMAMOTO, M. *et al.*, (1991) Isolation and sequence determination of cDNA encoding T-protein of the glycine cleavage system. *J. Biol. Chem.* 266:4917-4921
- OKAMURA-IKEDA, K., HOSAKA, H., YOSHIMURA, M. *et al.*, (2005) Crystal structure of human T-protein of glycine cleavage system at 2.0 Å resolution and its implication for understanding non-ketotic hyperglycinemia. *J. Mol. Biol.* 351:1146-1159
- OKAMURA-IKEDA, K., KAMEOKA, N., FUJIWARA, K. *et al.*, (2003) Probing the H-protein-induced conformational change and the function of the N-terminal region of *Escherichia coli* T-protein of the glycine cleavage system by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 278:10067-10072
- OKAMURA-IKEDA, K., OHMURA, Y., FUJIWARA, K. *et al.*, (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *Eur. J. Biochem.* 216:539-548
- OLIVER, D. J., NEUBURGER, M., BOURGUIGNON, J. *et al.*, (1990) Interaction between the component enzymes of the glycine decarboxylase multienzyme complex. *Plant Physiol.* 94:833-839
- OLIVER, D. J., RAMAN, R. (1995) Glycine decarboxylase: protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:407-414

- OPPERMANN, F. B., SCHMIDT, B., STEINBÜCHEL, A.** (1991) Purification and characterization of acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase, dihydrolipoamide dehydrogenase, and dihydrolipoamide acetyltransferase of the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.* 173:757-767
- ORUN, O., KOCH, M. H., KAN, B. et al.**, (2003) Structural characterization of T-protein of the *Escherichia coli* glycine cleavage system by X-ray small angle scattering. *Cell. Mol. Biol.* 49:453-459
- PARES, S., COHEN-ADDAD, C., SIEKER, L. et al.**, (1994) X-ray structure determination at 2.6-Å resolution of a lipoate-containing protein: the H-protein of the glycine decarboxylase complex from pea leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4850-4853
- PARES, S., COHEN-ADDAD, C., SIEKER, L. C. et al.**, (1995) Refined structures at 2 and 2.2 Å resolution of two forms of the H-protein, a lipoamide-containing protein of the glycine decarboxylase complex. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 51:1041-1051
- PARKHILL, J., ACHTMAN, M., JAMES, K. D. et al.**, (2000) Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 404:502-506
- PARKHILL, J., WREN, B. W., THOMSON, N. R. et al.**, (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413:523-527
- PARTHER, T.** (2003) Die Peroxidase-Aktivität Selenocystein-haltiger Proteine des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/03/03H127/index.htm>
- PASTER, B. J., RUSSELL, J. B., YANG, C. M. et al.**, (1993) Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:107-110
- PEARSON, W. R., LIPMAN, D. J.** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448
- PETERSON, R. B.** (1982) Regulation of glycine decarboxylase and L-serine hydroxymethyltransferase activities by glyoxylate in tobacco leaf mitochondrial preparations. *Plant Physiol.* 70:61-66
- PHAN, T. T., SCHUMANN, W.** (2007) Development of a glycine-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 128:486-499
- PLATT, T.** (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 55:339-372
- POEHLEIN, A.** (2003) Klonierung und Analyse der Gene der Glycin-Decarboxylase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- REGULSKI, E. E., MOY, R. H., WEINBERG, Z. et al.**, (2008) A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Mol. Microbiol.* 68:918-932
- REY, M. W., RAMAIIYA, P., NELSON, B. A. et al.**, (2004) Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5:R77
- RILEY, J., BUTLER, R., OGILVIE, D. et al.**, (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res.* 18:2887-2890

- ROBINSON, J. R., KLEIN, S. M., SAGERS, R. D.** (1973) Glycine metabolism. Lipoic acid as the prosthetic group in the electron transfer protein P2 from *Peptococcus glycinophilus*. *J. Biol. Chem.* 248:5319-5323
- ROCHE, O., HINSEN, K., FIELD, M. J.** (1999) Theoretical study of the conformation of the H-protein lipoamide arm as a function of its terminal group. *Proteins* 36:228-237
- RODIONOV, D. A., VITRESCHAK, A. G., MIRONOV, A. A. et al.,** (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res.* 31:6748-6757
- RODIONOV, D. A., VITRESCHAK, A. G., MIRONOV, A. A. et al.,** (2004) Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* 32:3340-3353
- ROLFES, R. J., ZALKIN, H.** (1988) *Escherichia coli* gene *purR* encoding a repressor protein for purine nucleotide synthesis. Cloning, nucleotide sequence, and interaction with the *purF* operator. *J. Biol. Chem.* 263:19653-19661
- ROTHER, M., BÖCK, A., WYSS, C.** (2001) Selenium-dependent growth of *Treponema denticola*: evidence for a clostridial-type glycine reductase. *Arch. Microbiol.* 177:113-116
- 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-Wittenberg
- SAITO, H., MIURA, K. I.** (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 72:619-629
- SALCEDO, E., SIMS, P. F., HYDE, J. E.** (2005) A glycine-cleavage complex as part of the folate one-carbon metabolism of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 21:406-411
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. MOLAN, N. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- SCHÄGGER, H.** (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protoc.* 1:16-22
- SHELL, M. A.** (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:597-626
- SCHNEIDER, G., KACK, H., LINDQVIST, Y.** (2000) The manifold of vitamin B₆ dependent enzymes. *Structure* 8:R1-6
- SCHRÄDER, T., ANDREESSEN, J. R.** (1992) Purification and characterization of protein P_C, a component of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 206:79-85
- SEBAIHA, M., PECK, M. W., MINTON, N. P. et al.,** (2007) Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Res.* 17:1082-1092
- SEBAIHA, M., WREN, B. W., MULLANY, P. et al.,** (2006) The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genet.* 38:779-786
- SESHADRI, R., MYERS, G. S., TETTELIN, H. et al.,** (2004) Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:5646-5651
- SKERRA, A.** (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151:131-135

- SÖHLING, B., PARTHER, T., RÜCKNAGEL, K. P. *et al.*, (2001) A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism *Eubacterium acidaminophilum*. *Biol. Chem.* 382:979-986
- SONG, Y., LIU, C., MOLITORIS, D. R. *et al.*, (2003) *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:84-89
- SONNTAG, D. (1998) Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Organisation und Transkription der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase-spezifischen Gensätze. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- SOUTHERN, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517
- STADTMAN, T. C. (1966) Glycine reduction to acetate and ammonia: identification of ferredoxin and another low molecular weight acidic protein as components of the reductase system. *Arch. Biochem. Biophys.* 113:9-19
- STADTMAN, T. C. (1978) Selenium-dependent clostridial glycine reductase. *Methods Enzymol.* 53:373-382
- STAUFFER, G. V., STAUFFER, L. T., PLAMANN, M. D. (1989) The *Salmonella typhimurium* glycine cleavage enzyme system. *Mol. Gen. Genet.* 220:154-156
- STAUFFER, L. T., FOGARTY, S. J., STAUFFER, G. V. (1994) Characterization of the *Escherichia coli* *gcv* operon. *Gene* 142:17-22
- STAUFFER, L. T., GHRIST, A., STAUFFER, G. V. (1993) The *Escherichia coli* *gcvT* gene encoding the T-protein of the glycine cleavage enzyme system. *DNA Seq.* 3:339-346
- STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (1994) Characterization of the *gcv* control region from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:6159-6164
- STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (1998a) Roles for GcvA-binding sites 3 and 2 and the Lrp-binding region in *gcvT::lacZ* expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 144:2865-2872
- STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (1998b) Spacing and orientation requirements of GcvA-binding sites 3 and 2 and the Lrp-binding region for *gcvT::lacZ* expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 144:1417-1422
- STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (1999) Role for the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) as a structural protein in regulating the *Escherichia coli* *gcvTHP* operon. *Microbiology* 145:569-576
- STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (2005) GcvA interacts with both the alpha and sigma subunits of RNA polymerase to activate the *Escherichia coli* *gcvB* gene and the *gcvTHP* operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 242:333-338
- STEIERT, P. S., STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (1990) The *lpd* gene product functions as the L protein in the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J. Bacteriol.* 172:6142-6144
- STEINER, D. (2004) Osmotoleranz bei anaeroben Bakterien des *Clostridium*-Clusters XI. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- STICKLAND, L. H. (1934) Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. *Biochem. J.* 28:1746-1759
- STRYER, L. (1996) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- SUDARSAN, N.,HAMMOND, M. C.,BLOCK, K. F. et al.**, (2006) Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science* 314:300-304
- SUDARSAN, N.,WICKISER, J. K.,NAKAMURA, S. et al.**, (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.* 17:2688-2697
- TADA, K.** (1993) Molecular lesion and pathophysiology of hyperglycinemia: glycine cleavage system, physiology and pathology. *Seikagaku* 65:248-259
- TADA, K.,NARISAWA, K.,YOSHIDA, T. et al.**, (1969) Hyperglycinemia: a defect in glycine cleavage reaction. *Tohoku J. Exp. Med.* 98:289-296
- TAKAMI, H.,NAKASONE, K.,TAKAKI, Y. et al.**, (2000) Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 28:4317-4331
- THEOLOGIS, A.,ECKER, J. R.,PALM, C. J. et al.**, (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:816-820
- THOMPSON, J. D.,GIBSON, T. J.,PLEWNIAK, F. et al.**, (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882
- TINSLEY, R. A.,FURCHAK, J. R., WALTER, N. G.** (2007) Trans-acting *glmS* catalytic riboswitch: locked and loaded. *RNA* 13:468-477
- TOONE, J. R.,APPLEGARTH, D. A.,COULTER-MACKIE, M. B. et al.**, (2001) Recurrent mutations in P- and T-proteins of the glycine cleavage complex and a novel T-protein mutation (N145I): a strategy for the molecular investigation of patients with nonketotic hyperglycinemia (NKH). *Mol. Genet. Metab.* 72:322-325
- TOONE, J. R.,APPLEGARTH, D. A.,KURE, S. et al.**, (2002) Novel mutations in the P-protein (glycine decarboxylase) gene in patients with glycine encephalopathy (non-ketotic hyperglycinemia). *Mol. Genet. Metab.* 76:243-249
- TURNER, S. R.,HELLENS, R.,IRELAND, R. et al.**, (1993) The organisation and expression of the genes encoding the mitochondrial glycine decarboxylase complex and serine hydroxymethyltransferase in pea (*Pisum sativum*). *Mol. Gen. Genet.* 236:402-408
- TURNER, S. R.,IRELAND, R., RAWSTHORNE, S.** (1992) Cloning and characterization of the P subunit of glycine decarboxylase from pea (*Pisum sativum*). *J. Biol. Chem.* 267:5355-5360
- VANDEN BOOM, T. J.,REED, K. E., CRONAN, J. E., JR.** (1991) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: isolation of null mutants defective in lipoic acid biosynthesis, molecular cloning and characterization of the *E. coli lip* locus, and identification of the lipoylated protein of the glycine cleavage system. *J. Bacteriol.* 173:6411-6420
- VITRESCHAK, A. G.,RODIONOV, D. A.,MIRONOV, A. A. et al.**, (2002) Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res.* 30:3141-3151
- VITRESCHAK, A. G.,RODIONOV, D. A.,MIRONOV, A. A. et al.**, (2004) Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* 20:44-50
- VOSKUIL, M. I.,VOEPEL, K., CHAMBLISS, G. H.** (1995) The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 17:271-279

- WAGNER, M. (1997) Untersuchungen zu Proteinkomponenten der substratspezifischen Untereinheit der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- WAGNER, M.,SONNTAG, D.,GRIMM, R. *et al.*, (1999) Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 260:38-49
- WALKER, J. L., OLIVER, D. J. (1986) Glycine decarboxylase multienzyme complex. Purification and partial characterization from pea leaf mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261:2214-2221
- WEI, W.,MCCUSKER, J. H.,HYMAN, R. W. *et al.*, (2007) Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:12825-12830
- WEINBERG, Z.,BARRICK, J. E.,YAO, Z. *et al.*, (2007) Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res.* 35:4809-4819
- WICKISER, J. K.,CHEAH, M. T.,BREAKER, R. R. *et al.*, (2005a) The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry* 44:13404-13414
- WICKISER, J. K.,WINKLER, W. C.,BREAKER, R. R. *et al.*, (2005b) The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell* 18:49-60
- WILSON, R. L., STAUFFER, G. V. (1994) DNA sequence and characterization of GcvA, a LysR family regulatory protein for the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J. Bacteriol.* 176:2862-2868
- WILSON, R. L.,STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (1993a) Roles of the GcvA and PurR proteins in negative regulation of the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J. Bacteriol.* 175:5129-5134
- WILSON, R. L.,STEIERT, P. S., STAUFFER, G. V. (1993b) Positive regulation of the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J. Bacteriol.* 175:902-904
- WILSON, R. L.,URBANOWSKI, M. L., STAUFFER, G. V. (1995) DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the *gcv* and *gcvA* control regions of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:4940-4946
- WINKLER, W.,NAHVI, A., BREAKER, R. R. (2002a) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419:952-956
- WINKLER, W. C. (2005) Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9:594-602
- WINKLER, W. C., BREAKER, R. R. (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem.* 4:1024-1032
- WINKLER, W. C., BREAKER, R. R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:487-517
- WINKLER, W. C.,COHEN-CHALAMISH, S., BREAKER, R. R. (2002b) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15908-15913
- WINKLER, W. C.,NAHVI, A.,ROTH, A. *et al.*, (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428:281-286
- WINKLER, W. C.,NAHVI, A.,SUDARSAN, N. *et al.*, (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nature Struct. Biol.* 10:701-707

- WONDERLING, L. D., STAUFFER, G. V. (1999) The cyclic AMP receptor protein is dependent on GcvA for regulation of the *gcv* operon. *J. Bacteriol.* 181:1912-1919
- WONDERLING, L. D., URBANOWSKI, M. L., STAUFFER, G. V. (2000) GcvA binding site 1 in the *gcvTHP* promoter of *Escherichia coli* is required for GcvA-mediated repression but not for GcvA-mediated activation. *Microbiology* 146:2909-2918
- WU, M., REN, Q., DURKIN, A. S. *et al.*, (2005) Life in hot carbon monoxide: the complete genome sequence of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901. *PLoS Genet.* 1:65
- YAMAMOTO, M., KOYATA, H., MATSUI, C. *et al.*, (1991) The glycine cleavage system. Occurrence of two types of chicken H-protein mRNAs presumably formed by the alternative use of the polyadenylation consensus sequences in a single exon. *J. Biol. Chem.* 266:3317-3322
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119
- ZHANG, Y., GLADYSHEV, V. N. (2005) An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. *Bioinformatics* 21:2580-2589
- ZINDEL, U., FREUDENBERG, W., RIETH, M. *et al.*, (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

7. Anhang

A.I. Verwendete Oligonukleotide

Tab. 14: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
Sequenzierung <i>gcv</i> -Operon		
Seqgcvf1	→	TAC ACT AAT GAA GAC TAT CTG
Seqgcvr1	←	TCA ATA AAT TCA TCA AGA GTT
Seqgcvf6	→	CCT TAA TGC CAT AAT GGG CAA
Seqgcvr6	←	TCT TGG GGT TGT ATT TCA TCG
Seqgcvf7	→	ACG GAG GAA CTG TAG ACG ACC
Seqgcvr7	←	CCT CTA AGT CCA TCA AGC ACG
Seqgcv8f	→	AGA TAC TGA TGG CAA GAG AGG
Seqgcvr8	←	CGT CCA TAC CAG TCA AAT CGC
Seqgcvf9	→	ATA CTG ATG GCA AAG AGA GGG
Seqgcvr9	←	CAC GAC ACT CCT ATG CTC TCG
Seqgcvf10/1	→	CGA AAT ACC TCT TCA AGG ACC
Seqgcvf10/2	→	GTC AAA TTC TTC TAC TGC AGG
Seqgcvf10/3	→	CGA AAT AGC TCT TCA AGG ACC
Seqgcvr10/1	←	CCG CCT GCC TCG TGT ATA AGC
Seqgcvr10/2	←	GGT CGC CTC CTT TTT TTG GGG
Seqgcvf11	→	GCC TAC TGA GAC TGA AGG CCG
Seqgcvr11	←	ATC GTA CAA TCG AAT TCC CGC
Seqgcvf12	→	GGC TTC AGA TGC TTA CGC TCC
Seqgcvr12	←	GGA GCG TAA GCA TCT GAA GCC
Seqgcvf13	→	TGA GGC AAT AGC AGG AGT AGC
Seqgcvr13	←	CGT GCT GTG CGT AGT CTG TAG
Seqgcvf14	→	GAC CTA ACG CTG AGA AAA TAC
Seqgcvr14	←	AAC CTT AAC CCA GTC ATG GTG
Seqgcvf15	→	GAC CTA ACG CTG AGA C
Seqgcvr15	←	CCT ACA TAT GCC TTG TTT CCG
Seqgcvr16	←	GTA GCA CCT ACA TAT GCC TTG
Seqgcvr17	←	ACA TCT GCT GCA GCT ACA TCG
Seqgcvr18	←	GAA GTC CGT TTT TAG CCT CAG
Seqgcvr19	←	GAA GTC CGT TTT TTA GAC CTC AG
Seqgcvr20	←	ATG CCT TTT TCC CTT CTT TAG
Seqgcvr21	←	AAT GCC TGG AAG AAT AGT TGG
Seqgcv48r	←	TAT TCC GCC GCC CTC GTA TTG

Fortsetzung Tabelle 14

SequsGcvP4f1	→	GAT TTG ACT GCT TGG GAT TTG
SequsGcvP4r1	←	GCT GGT TTT ATC CTC ATT GGC
SequsGcvP4f2	→	CCG CAC AGT TCA AAG TCT CAG
Seq228f	→	TCA CAG ACT ACG CAC AGC ACG
Seqgcv246r	←	AAG CAG GTC GTC TAC AGT TCC
Seq337f	→	AGG CGG CTT CAG ATG CTT ACG
Seq360r	←	GAG CGT AAG CAT CTG AAG CCG
Seq414r	←	TAT TTT CTC AGC GTT AGG TCC
SeqGcv540r	←	AAA AAA GGC GAG AGA ATG GGC
SeqGcv593r	←	CCC ATT CAT TAC GAT TCA AAC
Seq614f	→	CCT CTT CAG CGA CAT ACC AGC
Seq884r	←	AGC CCA CTT TCT TGT CTC CTG
Seq892f	→	TTT GCG ATT TGA CTG GTA TGG
Seq918f	←	TCA GGA GAC AAG AAA GTG GGC
Seq1183f	→	GAG TGT TTG AAG ATG TTG AGG
Seq1203r	←	CTC AAC ATC TTC AAA CAC TCC
Seq1400f	→	AAT GCC TGG AAG AAT AGT TGG
SeqGcvF1460f	→	GAC TGC TGT TCT GGG AGG AGG
Seq1501r	←	GCC TTT TCT CTT CTT ATG TGC
Seq1819r	←	GTC ACG CAG AAA AGA AGT CCG
Seq1937f	→	ACA GCC TTC CAA AAT GCG ACG
Seq2140r	←	TCT TTG GGT TGT ATT TCA TCG
Seq2444r	←	ACT ATT TCA AGA CCA GCA ACG
SeqGcvF2554f	→	TTC TCT CGC CTT TTT TTC AGC
Seq2664r	←	GTC TCC AGG TCT TGT CTT GCC

für Sonden Southern *gcvP4* und *gcvP2*

gcvP2f	→	TNG GIA THA CIG AYT AYG C
gcvP2r	←	CRT AIG GRT CYT CRT TNA
gcvP4f1	→	TTY GAY GTI TCN CAY ATG GG
gcvP4r	←	AAI CCR TYY TCJ CCH GTR TA

Sequenzierung Gencluster

SeqGrdA3r1	←	AAC TGC GTG GAA TAC TCT TAG
SeqGrdA3r2	←	CGA GTC AAC ATC AAG AAC CAT
SeqdsGrdA4/1	→	CAA TGT GTG CTG GGA AAG GGG
SeqdsGrdA4/2	←	ATT GTC CGC TTT CAC TTT TTC
SeqGrdG2/1	→	AAT GGC AGG ACT CAA AAT AGG
SeqGrdG2/2	→	ATT TGT AGG AGA AGC GGG AAG

Fortsetzung Tabelle 14

SeqGrdG2/3	→	ATT ACG GAG TGG ACG CAA AGC
Klonierung in pASK-IBA3 und pASK-IBA5		
P1alphaIBA3f	→	ATG GTA GGT CTC AGC GCC CAT AAG TAT ATC CCA AAT ACA GAG G
P1alphaIBA3r	←	ATG GTA GGT CTC ATA TCA GCA ATT CAC CTC CAT AAC CTG AG
P1alphaIBA5f	→	ATG GTA GGT CTC AGC GCC CAT AAG TAT ATC CCA AAT ACA GAG G
P1alphaIBA5r	←	ATG GTA GGT CTC ATA TCA GCA ATT CAC CTC CAT AAC CTG AG
P1αKE+BsaI	→	CGC ATG CAT TTT TTG AGA CCT TAG CAA TTC ACC TCC ATA AC
P1betaIBA3f		ATG GTA GGT CTC AAA TGA AGA ACT ACA ATA AGC TTG TAT TTG AG
P1betaIBA3r	←	ATG GTA GGT CTC AGC GCT GCC TTG ATA TTT TAG TAT AAG GTC TT
P1betaIBA5f	→	ATG GTA GGT CTC AGC GCC AAG AAC TAC AAT AAG CTT GTA TTT GAG
P1betaIBA5r	←	ATG GTA GGT CTC ATA TCA GCC TTG ATA TTT TAG TAT AAG GTC TT
P1βKE+BsaI	←	GCG TAC GTA AAA AAG AGA CCG AGG GCA AAA AAT GAA GAA CTC CAA TAA GCT T
P2IBA3f	→	ATG GTA GGT CTC AAA TGA GCA AAA TAG TAC AAG GAC TTT ATT AC
P2IBA3r	←	ATG GTA AGC CTC CTT GTT GCA GAA GTC TT
P2IBA5f	→	ATG GTA GGT CTC AGC GCC AGC AAA ATA GTA CAA GGA CTT TAT TAC
P2IBA5r	←	ATG GTA GGT CTC ATA TCA AGC CTC CTT GTT GCA GAA GTC TT
P4IBA3f	→	ATG GTA GGT CTC AAA TGG AAA ATG TTA AAA AGA CAG CCC TTT A
P4IBA3r	←	ATG GTA TTT TTT GTA GCT TTT GTT GTA GAA TTT C
P4IBA5f	→	ATG GTA GGT CTC AGC GCC GAA AAT GTT AAA AAG ACA GCC CTT TA
P4IBA5r	←	ATG GTA GGT CTC ATA TCA TTT TTT GTA GCT TTT GTT GTA GAA TTC
prpUIBA3f	→	AGG AGG GGT CTC TAA TGG CAT TTA AAA TTG AAG G
prpUP2I3	←	CTT AAA GGT CTC AGC GCT AGG CTT CTC AGT TAT TTG
GrdAIBA3f	→	ATG GTA GAA GAC AAA ATG AGT TTG TTT GAC GGC AAA AAA GTC A
GrdAIBA3r	←	ATG GTA GAA GAC AAG CGC TGT CGT TGA ACT TAC CAA ACT GCT C
TRXB-F	→	GAA CAA GGT CTC TAA TGC AAA ATG TAT ACG ATT T
TRXB-R	←	GAC TAA GGT CTC AGC GCT CTC TTC GAA GTT
TRXA-F	→	GAA CTC GGT CTC AAA TGA GCG CAT TAC TAG TTG A
TRXA-R	←	CTC CAC GGT CTC AGC GCT GCC AAC GTG CTT AGC TAT CA
Klonierung in Vektoren der <i>two-hybrid</i> -Systeme		
EaP1αBssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCC ATA AGT ATA TCC CAA ATA CA
EaP1αBgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAG CAA TTC ACC TCC ATA AC
EaP1βBssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCA AGA ACT ACA ATA AGC TTG TA
EaP1βBgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAG CCT TGA TAT TTT AGT AT
EaP2BssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCA GCA AAA TAG TAC AAG GAC TT
EaP2BgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAA GCC TCC TTG TTG CAG AA
EaP4BssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCG AAA ATG TTA AAA AGA CAG CC
EaP4BamH1r	←	GCA TGC ATG GAT CCT TAC TAT TTT TTG TAG CTT TTG TT

Fortsetzung Tabelle 14

EaPrpUBssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCG CAT TTA AAA TTG AAG GCG GA
EaPrpUBgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAA GGC TTC TCA GTT ATT TGA
EaGrdABssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCA GTT TGT TTG ACG GCA AAA AA
EaGrdABgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAG TCG TTG AAC TTA CCA AA
EaTRBssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCG AAA ATG TAT ACG ATT TGG CC
EaTRBgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAC TCT TCG AAG TTA GCC TC
EaTrxBssHIIf	→	ATG CAT GCG CGC GCA GCG CAT TAC TAG TTG AAA TA
EaTrxBgIIr	←	GCA TGC ATA GAT CTT TAT TAG CCA ACG TGC TTA GCT AT
EaP1 α AgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG CAT AAG TAT ATC CCA AAT A
EaP1 α Sallr	←	GCA TGC ATG TCG ACT TAT TAG CAA TTC ACC TCC ATA AC
EaP1 β AgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG AAG AAC TAC AAT AAG CTT G
EaP1 β XhoIr	←	GCA TGC ATC TCG AGT TAT TAG CCT TGA TAT TTT AGT AT
EaP2AgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG AGC AAA ATA GTA CAA GGA C
EaP2XhoIr	←	GCA TGC ATC TCG AGT TAT TAA GCC TCC TTG TTG CAG AA
EaP4AgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG GAA AAT GTT AAA AAG ACA G
EaP4XhoIr	←	GCA TGC ATC TCG AGT TAC TAT TTT TTG TAG CTT TTG TT
EaPrpUAgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG GCA TTT AAA ATT GAA GGC G
EaPrpUXhoIr	←	GCA TGC ATC TCG AGT TAT TAA GGC TTC TCA GTT ATT TGA
EaGrdAAgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG AGT TTG TTT GAC GGC AAA A
EaGrdAXhoIr	←	GCA TGC ATC TCG AGT TAT TAG TCG TTG AAC TTA CCA AA
EaTRAgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG GAA AAT GTA TAC GAT TTG G
EaTRXhoIr	←	GCA TGC ATC TCG AGT TAT TAC TCT TCG AAG TTA GCC TC
EaTrxAgeIf	→	ATG CAT GCA CCG GTG AGC GCA TTA CTA GTT GAA A
EaP1aNotIf		ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGC ATA AGT ATA TCC CAA AT
EaP1aBamHIr	←	GCA TGC ATG GAT CCT TAT TAG CAA TTC ACC TCC ATA AC
EaP1aSpeIr	←	GCA TGC ATA CTA GTT TAT TAG CAA TTC ACC TCC ATA AC
EaP1 β NotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGA AGA ACT ACA ATA AGC TT
EaP2NotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGA GCA AAA TAG TAC AAG GA
EaP4NotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGG AAA ATG TTA AAA AGA CA
EaPrpUNotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGG CAT TTA AAA TTG AAG GC
EaPGrdANotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGA GTT TGT TTG ACG GCA AA
EaTRNotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTG TGG AAA ATG TAT ACG ATT TG
EaPTrxNotIf	→	ATG CAT GCG CGG CCG CTA TGA GCG CAT TAC TAG TTG AA

Fortsetzung Tabelle 14

RT-PCRs <i>upstream</i> von <i>gcvP4</i>		
RTusP4f1	→	AAG AGA TAG AGT GAA ACG GTG
RTusP4r1	←	ACT TTC TCC TTC GGT GTC GCA
RTusP4f2	→	AAT CAG AAT ACG GAC CAA ATG
RTusP4r2	←	ATA ACA GGG GCA TCT AAA GGG
RTusP4f3	→	TGC GAC ACC GAA GGA GAA AGT
RTusP4r3	←	CGC ATA TGC CTC GTA TAT GTC
RTusP4f4	→	GTT TGA ATC GTA ATG AAT GGG
RTusP4r4	←	CAG TGT GGG ACT GCT AGC AAA
RTusP4f5	→	AAA GCG AAA CTA AGA CAG GAC
RTusP4f6	→	GCC TCC TCC TAT GAC GGT AAG
RTusP4f7	→	CTT TTT TTA TTT TTG CTA TGG
RTusP4f8	→	ATG CTG ACG AGT ATA TGA ATC
RTusP4f9	→	ATA TGG CAT ACT AAG GCA AGC
RTusP4f10	→	GCC AAT GAG GAT AAA ACC AGC
RTusP4f11	→	TTC GGC TTC GGT AAT GTC AGT
RTusP4f12	→	GCC CGC ACT ATC TCT ATT TCC
RTusP4f13	→	TAT CAT CAG GGT TTG CGC AAG
RTusP4f14	→	TTA CAT CAA ACA ATC GCA AAG
RTusP4f15	→	AAT CGA AAT TTG ACA TAT ACG
<i>primer-extensions</i>		
Pr-Ext-P4	←	CAT TTG GTC CGT ATT CTG ATT
Pr-Ext-P4/2	←	GCT TAT ATG GTG TTT TTT CCA TAG C
Pr-Ext-P2	←	CGT GCT GTG CGT AGT CTG TAG
Pr-Ext-P1a	←	GCT GGT ATG TCG CTG AAG AGG
Pr-Ext-P1b	←	CTC TTC ACT GCT TAG GTA TCC
Klonierung <i>upstream</i> -Bereich von <i>gcvP4</i>		
VPusP4r1	←	CAA ATC CCA AGC AGT CAA ATC
VPusP4r2	←	CTG AGA CTT TGA ACT GTG CGG
Klonierung Gencluster		
UsGrdA3/1	→	TAC TCT GCT CCA ACA CCG CTC
UsGrdA3/2	→	TTG GCA GGT TTG GAT ACT TGG
UsGrdA3/3	→	GAT GCT CCG TCT CTT CCT GCG
usGrdA3r1	←	TCA TTG AAC TTG CAG AAC TGC
usGrdA3r2	←	AAT TTT GCT CAT GTG TTT ACC
DsGrdC/1	→	AAT AAT AGC AGC GGG TGG AGC
DsGrdC/2	→	AAC CAA AGA GGA GGC GGA AAC

Fortsetzung Tabelle 14

dsGrdC2/3	→	ATG ATA GTA GGA AAG GGA AGC
dsGrdC2/4	→	GGC AAA GTG GAG TCA GGA AGC
DsOrf1/1	→	AGG CTC AAC AAG AAG AAT GGC
DsOrf1/2	→	TAA AGA GCG TGA GCA AGA ACC
GrdEEaf	→	ATG CGT TTA GAA ATT GGA AAT
usGrdE2/1	→	TAT TCT CAC ACT CTC TCC TGG
usGrdE2/2	→	TACT CT GCT CCA ACA CCG CTC
TrxB1Ear	←	CTT CAT CTT GGC TCT GGC TCC
GrdT1Eaf	→	GTT ACG CTA TTG CTT CTA TGC
GrdT2Ear	←	CCG CCC ATT TGA GGA TTA GTG
GrdD1Ear	←	TTA AGC TAC TAT GCC TGC ATC
dsGrdD2EA1	→	ATA GTA ATG GTA AAC GAA GCC
dsGrdD2EA2	→	TAA CAG GAA CAA TCT CAG GCG
GrdG1Eaf	→	ATG CGT CTT GAA CTT GGA AAG
usGrdG2Ea1	→	TAC ATA AAG CGT TCC ATT CTC
usGrdG2Ea2	→	CCG ACC CAT CCA CCT TGA CTC
dsGrdF1/1f	→	TCA CAC CAA GGA GGG AGA GGA
dsGrdF1/2f	→	ACG GTA TTT GAA GGC TAA CGC
dsGrdF1/r	←	GGA AAA TAT ACG GAG CCC AGC
usGrdF2/1	→	GGA CAA CCG AGG ATA ACA TTC
usGrdF2/2	→	CCC TAT TTC CTC ACC CTT TGC
OrfREar	←	CAA CTC CAC ACC GTC CAT TCC
LdcEar1	→	CTC CGC TTA CCT CCC CTT CCG
LdcEar2	←	TTC AAG TGC CGC TAC AAG TGC
DnmtEaf1	→	AGA GAT ATG GAT ACT GCC GGG
DnmtEaf2	→	CAG AAA AAG TGA AAG CGG ACA
GrrZEaf1	→	GAA AGC CTC CTG ATT GAA AAG
GrrZEaf2	→	GGA TGA GGG AAT ACA CAG GGC
GrrYEar1	←	TGT CTC TTG CGG TAT GTC TGC
GrrYEar2	←	TAC CTC TTC ACT GCC TAC CGC

Amplifikation Kontrollgene für Transkriptionsanalysen

EFTUf1	→	GTI GAY TGY CCD GGH CAY GC
EFTUf1	←	CTG AGI TTC GAG CAT CCT CA
RPOAf	→	GAA CCD YTI GAR AGR GGH TA
RPOAr	←	GTR TTD ATD CCI GCY CTY TT
RPOBf	→	ATH AAY GGH GCI GAR AGR GT
RPOBr	←	CGT GRA YTG IGA GAG RGT RA

Fortsetzung Tabelle 14

		Transkriptionsanalysen	
RTRPOAEaf	→	GGC TAA GAT TGA CGG TGA CGG	
RTRPOAEar	←	CAT AGC CTC TTC CCT TGT CCA	
RTRPOBEaf1	→	GCG GAG AGG GTA ATA GTC AGC	
RTRPOBEaf2	→	ACA AGG TGG TGG AGT TTC AGC	
RTRPOBEar1	←	GGT TGC TTT GTG GTT CTG TCA	
RTRPOBEar2	←	CGG AGC AAA CGA GAA GGA CAT	
RTEFTUAEaf	→	TGA CAC TCC AAT AAT AAA AGG	
RTEFTUEar	←	TCC TCT TTC AAC TCT TCC TGT	
RTSelBEaf	→	GGT TCT GCT TGT GGT GTC TGC	
RTSelBEar	←	CCT GTG CCG CTT ATT GAG TCC	
RTPRpUEaf	→	GGA GTG AAA GAA GAA ATA AGC	
RTPRpUEar	←	TCA TCT TTT ACC TTA CAT CCG	
		Vektorette-PCR	
ABPFW		GAA GGA GAG GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC GGA CGA GAG AAG GGA GAG	
ABPRV		GAC TCT CCC TTC TCG AAT CGT AAC CGT TCG TAC GAG AAT CGC TGT CCT CTC CTT	
UV		CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT	
		Vektor-spezifische Sequenzierprimer	
UPRN	→	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG	
RPRN	←	CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT G	
Sp6		ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT CAA GC	
T7		GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GG	
pMS604f	→	AAT TGT TTC CGG CGC ATC ACG	
pMS604r	←	TTT ATC CGC CTC CAT CCA GTC	
pDP804f	→	AAG AAG GGT TGC CGC TGG TAG GTC	
pDP804r	←	ATC ACC TTC CTC CAC CTT CATC C	
Strep-up	←	AGT AGC GGT AAA CGG CAG ACA	
Strep-down	→	CAG TGA TAG AGA AAA GTG AAA	

A.II. Sequenz des Glycin-Decarboxylase-Operons und der angrenzenden Bereiche

```

      G R R G F V S D W E A E T I D T F L N S
1  CAGGAGAGGA AGGCTTCTGC GACAGGGTAA GCCGAAGCCA TTACAGTCAT TTTTCTAAAC

      V S I G A N N V L V D V S G F E R I C L
61 TTTGCCTATA CGGCCGTAAT AAATGTTCGT GTAGCTGACA TGGTTTGAGG GACTATGTTT

      D V M A D V E S R V S V D A K F A L G S
121 CTAGGTGGTA ACGTAGTTGG AGCCTAGACT GCGAGTGCAG TCGGAACTTA CGCTCAGGTC

      L G Q A N L L A E F E L A E R S S S N Y
181 TCTCCGGGAC TCGCAATTCC TCTCGAAGTT TAAGCTCTCG AAGGGACCTT CTCGACAACA

      N I I V N Y G K C A F N E A I S R G I G
241 TCAAATAATA ATGTAACATA GGAAACGTCC GTTTCAAAAG CCGATACCTC GCCGGATAGG

      K S A G T I I A T K K M fabG
301 GAAATCTACG GGGACAATAT TAACGTCAGA AAAAGTAAAAT ATGGTGGACC TAAGGTTTTAA
      TTA TACCACCTGG ATTCCAAATT

      AGTTTTGTCT TATTCGTCTT GTATTCAAGT AAAATGTAGT TTGTTAGCGT TTCTATTTCA
361 TCAAAACAGA ATAAGCAGAA CATAAGTTCA TTTTACATCA AACAATCGCA AAGATAAAGT

      AAGTTATAAT AACAAATTCC CATAATTATT TAAACGATCG TCAGGGTGTG ACGGGCGTGA
421 TTCAATATTA TTGTTAAAGG GTATTAATAA ATTTGCTAGC AGTCCCACAC TGCCCGCACT

      TAGAGATAAA GGTATAATTG ACGTTTCCGT CCGCGTTCAG CAACGGAAAC GCGCAATTAT
481 ATCTCTATTT CCATATTAAC TGCAAAGGCA GGCGCAAGTC GTTGCCTTTG CGCGTTAATA

      ACGTGTAAG TGTCGTTATT TTTAACGCTA AAGTCTTTAG CTTTAAACTG TATATGCTCC
541 TGCACATTTT ACAGCAATAA AAATTGCGAT TTCAGAAATC GAAATTTGAC ATATACGAGG

      GTATACGCAT ATTACAATTA TTTATTTACA AATATTTTTT ATGAACATGT TCACTCCGAC
601 CATATGCGTA TAATGTTAAT AAATAAATGT TTATAAAAAA TACTTGTACA AGTGAGGCTG

      ATAGGCACCT TTCTATTGTT CTGTTTTTGT AATGTACCTC CCATA nlpP
661 TATCCGTGAA AAGATAACAA GACAAAAACA TTACATGGAG GGTATATGAT TAAAAAAATC
      M I K K I

      T TACTGAGCG CATCGCTCAT ACTGATGCTC CTTAATATGG GAATATCATC AGGGTTTGCG
721 L L S A S L I L M L L N M G I S S G F A

      CAAGAGGTCC CAAATGCATA TGTCAAAGTC AGCAGCTTAA ATGTAAGAAA TGGCGCAGAT
781 Q E V P N A Y V K V S S L N V R N G A D

      ATTAATTCGC AGGTTATAGG AAAAGTAGTA TCAGGTCAGA AGCTTGAAAT TATCGAGCAG
841 I N S Q V I G K V V S G Q K L E I I E Q

      TCTGGCAAAT GGTCAAAAGC AAGGCTTGAA AACGGAAGTA TAGGCTGGGT TTATTCTGAA
901 S G K W S K A R L E N G S I G W V Y S E

      TACATAAGTT CAAACGGCAG TACATACTTG CAAAACAGCG GTTCGCAGGT TGTTAGCAGA
961 Y I S S N G S T Y L Q N S G S Q V V S R

      GGTGGTTCAA GATCATCAAG CCTAATGGTT GTTGCAAATG CAAAGCTTGG AGCAAAGTAT
1021 G G S R S S S L M V V A N A K L G A K Y

      TCAAGAGGCG CTGAAGGTCC TGACAGATTT GACTGCTTGG GATTTGTAAA GTATGTTTAT
1081 S R G A E G P D R F D C L G F V K Y V Y

```

```

1141 AAAGAAGTGT TTGGCAAAGT GCTGCCGCAC AGTTCAAAGT CTCAGAGTCA GTTGGGCAGT
      K E V F G K V L P H S S K S Q S Q L G S

1201 GCTGTTTCGA GAGAAGCTGT TCAAAC TGGG GACATTGTAG TATTTGCCAC GGCAGGCAGC
      A V S R E A V Q T G D I V V F A T A G S

1261 AGCAGTGTAA ATCACTCGGG AATATATATG AATGATGGCA AGTTTATAACA TGCCTCCTCC
      S S V N H S G I Y M N D G K F I H A S S
      ↓
1321 TATGACGGTA AGGTTGTGAT TTCGGACATG AGCTCCGGGC ATTATTACAG GGCCTTTAGG
      Y D G K V V I S D M S S G H Y Y R A F R

1381 GGAGCCAGAC GGCTTAATTA AATAATGAGT ATAGTGACAG AGCATAGAGT ACCATGTGCT
      G A R R L N - ATTACTCA TACTACTGTC TCGTATCTCA TGGTACACGA
      >>>>>>>>>>-----<<<<<<<

1441 CTGTCTTTTT TTATTTTTGC TATGGAAAAA ACACCATATA AGCTACACAA TATAATATAA
      GACAGAAAAA AATAAAAACG ATACCTTTTT TGTGGTATAT TCGATGTGTT ATATTATATT
      <<<<<<

1501 GTGAGACAAA TAAACTGATT TGCATAAAAT AATGATGCAA CATAAGCTGT AAAAGCAATA
      CACTCTGTTT ATTTGACTAA ACGTATTTTT TACTACTGTT GTATTCGACA TTTTCGTTAT

1561 ATGCTGACGA GTATATGAAT CAATTATTA AATTAATGACA TCCCATTATA AATATATGGC
      TACGACTGCT CATATACTTA GTTAATAAAT TAATTACTGT AGGTAATAT TTATATACCG

1621 ATACTAAGGC AAGCTTGGAT TGAAATGATA TTAACAAAAA TCCTGTTTGA AAAGTAAATA
      TATGATTCGG TTCGAACCTA ACTTTACTAT AATTGTTTTT AGGACAAACT TTTTCATTTAT

1681 TTTCAAGTCC AATGAGGATA AAACCAGCAC AAACAAGCTC AATTTCCAAT CAGCTGAAAT
      AAAGTCACGG TTAATCCTAT TTTGGTTCGTC TTTGTTTCGAG TTAAAGGTTA GTCGACTTTA

1741 CAAAGAGATA GAGTGAACG GTGTATTATT AAGATACAAA GAGTAAAAGC CGGGTTGGGC
      GTTTCTCTAT CTCACTTTGC CACATAATAA TTCTATGTTT CTCATTTTCG GCCCAACCCG

1801 ATGAGCTTCG CTTGCCTTTTT GAAATGCAAT GCAAGGTTCA GAAAATTTAG TTAAATTAAT
      TACTCGAAGC GAACGGAAAA CTTTACGTTA CGTTCCAAGT CTTTTAAATC AATTTAATTA

1861 ATCTTTGGTT GAAATGAAGT TTAATGTATT ATATTATAAC CTTAAATCAG AATACGGACA
      TAGAAACCAA CTTTACTTCA AATTACATAA TATAATATTC GAATTTAGTC TTATGCCTGG

1921 AATGAAGGCA CGGGAGAGAT ATTCATGCTT ATTCAAATA ACATGGATGG CCGACGGGGC
      TTACTTCCGT GCCCTCTCTA TAAGTACGAA TAAGTTTATT TGTACCTACC GGCTGCCCCG

1981 AATATAAGAG AATTGCCAAT TCCTTATAGA ATCTTTCAGG CGAAAATATC GTTGCTCGAT
      TTATATTCTC TTAACGGTTA AGGAATATCT TAGAAAGTCC GCTTTTATAG CAACGAGCTA

2041 GGAGCTCTGA AGAGATCGCA CATTAACGTG CGACACCGAA GGAGAAAGTG CAAAGTGTAA
      CCTCGAGACT TCTCTAGCGT GTAATTGCAG GCTGTGGCTT CCTCTTTCAC GTTTCACATT

2101 AGATTTGCAT GTAAAAC TCT CAGGTAAAGA GACAGAGAAT ATAGTGGCGT ATGTATTTTC
      TCTAAACGTA CATTTTGAGA GTCCATTTCT CTGTCTCTTA TATCACCGCA TACATAAAAG

2161 ATGCGAATTT GTCATTGTAT TCTTTTTTTTA TACCCATAAT ACGATAATTT TGTAATTTAT
      TACGCTTAAA CAGTAACATA AGAAAAAAT ATGGGTATTA TGCTATTAAA ACATTAAATA

2221 GGGAGCGATT GCAAGTGTTT GAATCGTAAT GAATGGGTAT AGAGGTAATG AAAAGGTAAT
      CCCTCGCTAA CGTTCACAAA CTTAGCATT AATTACCCATA TCTCCATTAC TTTTCCATGA

2281 AGTGAAGAGA AACCAGTTGT AATTTTAAGA GAGAGCGGCT ATGCACCACT GATGAATTGC
      TCACTTCTCT TTGGTCAACA TTAATAATTCT CTCTCGCCGA TACGTGGTGA CTACTTAAACG

```

2341 TTGCTTTATA ATCAACAGAT TAGTTATACA TAAAGCGAAA CTAAGACAGG ACTGCTGTTC
AACGAAATAT TAGTTGTCTA AGCAATATGT ATTTTCGCTTT GATTCTGTCC TGACGTCAAG

gcvP4

2401 TGGGAGGAGG ATTTTAAATG GAAAATGTTA AAAAGACAGC CCTTTACGAT CTTCATGTGA
ACCCTCCTCC TAAAAAT M E N V K K T A L Y D L H V

2461 AATACGGGGG CAAAATAATT GAATTCTGTG GTTGGGCTCT GCCTACTCAA TACGAGGGCG
K Y G G K I I E F C G W A L P T Q Y E G

2521 GCGGAATAAA CGCTGAGCAC GAGGCTGTTA GAACTGCAGC TGGTATGTTC GACGTATCTC
G G I N A E H E A V R T A A G M F D V S

2581 ACATGGGTGA GGTGAAGTT AAGGGTAAGG AAGCTGAAAA ATTCATAAAT TATCTTGTGC
H M G E V E V K G K E A E K F I N Y L V

2641 CTAATGATAT AACTGTATTG GAGCCAAACC AGGTTCTATA CACTCAGTTC TGCTATCCTC
P N D I T V L E P N Q V L Y T Q F C Y P

2701 ACGGAGGAAC TGTAGACGAC CTGCTTGTTT ACAAATACAC TAATGAAGAC TATCTGCTTG
H G G T V D D L L V Y K Y T N E D Y L L

2761 TTATAAACGC TGCTAACGTA GACAAGGACT ATGCATGGAT AGTTGAGAAT TCTAAAGGCT
V I N A A N V D K D Y A W I V E N S K G

2821 TTGATGTAAG TCTTAAGAAT ATATCTCCTG AGGTTTCCGA AATAGCTCTT CAAGGACCTA
F D V S L K N I S P E V S E I A L Q G P

2881 ACGCTGAGAA AATACTCAG AAGCTTACAG ATACTGATCT TGCACAGGTT AAATTCTTCT
N A E K I L Q K L T D T D L A Q V K F F

2941 ACTGCAAGAA GGACGTTAAC ATAGGCGGAG CAAGCTGCCT TATATCTAGA ACAGGCTACA
Y C K K D V N I G G A S C L I S R T G Y

3001 CTGGTGAAGA CGGCTTCGAG ATATATACTT CAAACGAAGA TGTTTCAGCT GTATGGGAAA
T G E D G F E I Y T S N E D V S A V W E

3061 AGCTTATGGA AGCAGGAAAA GATCTTGGA TCAAGCCAGC AGGACTTGGA TGTAGAGATA
K L M E A G K D L G I K P A G L G C R D

3121 CTCTAAGATT CGAAGTTGCA CTTCCACTAT ACGGAAACGA GCTAGGAGAA GACATATCTC
T L R F E V A L P L Y G N E L G E D I S

3181 CACTTGAAGC TGGACTAGGA TACTTCGTTA AGCTAGACAA AGAGGCTGAC TTCATAGGCA
P L E A G L G Y F V K L D K E A D F I G

3241 AGGAAGCTCT TAAGAAGCAA AAGGCTGAAG GTCTTAAGAG AAAGCTTGTT GGAAGCTGAGC
K E A L K K Q K A E G L K R K L V G L E

3301 TAAAAGGCAA AGGTATAGCA AGACATGAGT GCGAAGTTTA CTCAGGAGAC AAGAAAGTGG
L K G K G I A R H E C E V Y S G D K K V

3361 GCTTTGTAAC TACTGGATAC CAATCTCCAA GCACTGGCAA AGTAGTGGCT CTTGCTATAG
G F V T T G Y Q S P S T G K V V A L A I

3421 TAGATACAGA ATACACTGAA ATGGGAACAC AGCTTGAAAT TCAAATAAGA AAGAACAGAG
V D T E Y T E M G T Q L E I Q I R K N R

3481 TGCCTGCAGA AGTGGTTGCT AAGAAATTCT ACAACAAAAG CTACAAAAAA TAGTTTTTTG
V P A E V V A K K F Y N K S Y K K -AAAAAAC

3541 TTCGTCGGAT AGTGGATATT TAAGCGCCCG TATAGTATCA TATTAGTGTG CTAAAGTAAC
 AAGCAGCCTA TCACCTATAA ATTCGCGGGC TATACATAGT ATAATCACAC GATTTTCATTG

3601 GGGTGTTACA AATAAAAAAT GAAATGCCAA TAAAAAATAC ATTTATATTT CTGAGGAGGA
 CCCACAATGT TTATTTTTTA CTTTACGGTT ATTTTTTATG TAAATATAAA GACTCCTCCT

gcvP2

3661 ATTTATCATG AGCAAAATAG TACAAGGACT TTATTACACA ACTCACCATG ACTGGGTAA
 TAAATAG M S K I V Q G L Y Y T T H H D W V

3721 GGTTGACGGA AACAAGGCAT ATGTAGGTGC TACAGACTAC GCACAGCACG CTCTAGGAGA
 K V D G N K A Y V G A T D Y A Q H A L G

3781 TATAGTATAC GTTGAGCTTC CAGAAGTGGG AGAAGAATTT GCGTGAAG ATGCATACGG
 D I V Y V E L P E V G E E F G V E D A Y

3841 CGTTATAGAA TCAGTTAAGG CGGCTTCAGA TGCTTACGCT CCACTAAGCG GAAAAATAGT
 G V I E S V K A A S D A Y A P L S G K I

3901 TGAAGTTAAC AGCGAGCTTG AAGATGCTCC TGAGAGCATA AACGAAGCTC CATAAGAAAA
 V E V N S E L E D A P E S I N E A P Y E

3961 ATGGCTTGTA GCTATAGAAA TGAGCGACGC ATCAGAATA GAAAACTAA TGGACGCTAG
 K W L V A I E M S D A S E L E K L M D A

gcvP1α

4021 CGCTTACGAA GACTTCTGCA ACAAGGAGGC TTAAGATGCA TAAGTATATC CCAAATACAG
 S A Y E D F C N K E A - M H K Y I P N T

4081 AGGCGGATAA GAAGTCTATG CTCGAGAGCA TAGGAGTCTC GTCTATAGAA GACCTCTTCA
 E A D K K S M L E S I G V S S I E D L F

4141 GCGACATACC AGCTGAGCTT AAGCTGGGAA GAGAGCTTAA CTTGGCGGAG CCTATGTCGG
 S D I P A E L K L G R E L N L G E P M S

4201 AGCTTGAGCT AGTGAAGCAT ATGAACGAGC TTGCTGATAA AAACAAATCA GACTTTGTTT
 E L E L V K H M N E L A D K N K S D F V

4261 GCTTCAGAGG AGCAGGTGCA TATGATCACT ACATTCCGTC GCTTATAAAT CACATGTTGC
 C F R G A G A Y D H Y I P S L I N H M L

4321 TCCGTCAGGA ATTCTTCACT GCATACACTC CTTATCAGCC AGAGATAAGC CAGGGTACGC
 L R Q E F F T A Y T P Y Q P E I S Q G T

4381 TTCAGATGAT ATTCGAATTC CAGACAATGC TTTGCGATTT GACTGGTATG GACGTTGCCA
 L Q M I F E F Q T M L C D L T G M D V A

4441 ACGCATCTAT GTATGATGTT GGAAGTCTA CTGTAGAAGC AGCGGTTATG GCTGTTCAAA
 N A S M Y D V G T A T V E A A V M A V Q

4501 ACAAGAAAAA GTGCAAGAAT GTAGTTGTGT CAAAGGCCGT TGCACCAGAG ACAAGACTTA
 N K K K C K N V V V S K A V A P E T R L

4561 TACTTCACAC ATATCTTAAG CAAAATGATA TAGAAGTAAT TGAAGTTGAC ACTGCAGATG
 I L H T Y L K Q N D I E V I E V D T A D

4621 GCGTAACCGA TATGGACAAG CTGACTGCGG CTGTTGGAGA TGAAACTGCT GGCGTAATAG
 G V T D M D K L T A A V G D E T A G V I

4681 TTCAAAATCC AAACCTCTTT GGAGTGTTTG AAGATGTTGA GGCAATAGCA GGAGTAGCTC
 V Q N P N F F G V F E D V E A I A G V A

4741 ATGACAAGAA AGCTCTTCTT ATTGACGTTG TTGATCCGAT ATCTCTTGGA ATCGTAAAAA
 H D K K A L L I D V V D P I S L G I V K

4801 GACCGGGAGA CATAGGAGCA GATATAGTAG TAGGAGATGC TCAATGTTTT GGTAGCGCAC
 R P G D I G A D I V V G D A Q C F G S A

4861 TGAAC TTTGG CGGACCATAT ATAGGCTTCC TTACA ACTAA ATCTAAAATG GCAAGAAAAA
 L N F G G P Y I G F L T T K S K M A R K

4921 TGCCTGGAAG AATAGTTGGA CAGACAGAAG ATACTGATGG CAAGAGAGGA TTTGTTCTTA
 M P G R I V G Q T E D T D G K R G F V L

4981 CTCTTCAAGC TAGAGAGCAG CACATAAGAA GAGAAAAGGC AACATCCAAC ATATGCTCGA
 T L Q A R E Q H I R R E K A T S N I C S

5041 ACCAAGGTCT GTGCACTCTT ACAGTTGCAA TATACCTTTC AACAAATGGGC AAAAGCGGAC
 N Q G L C T L T V A I Y L S T M G K S G

5101 TTAAAGAAGT TGCCTTCAG TGCATGAACA AGGCTCAGTA TGCTTACAAG AAGCTTACTG
 L K E V A L Q C M N K A Q Y A Y K K L T

5161 AATCAGGCAA ATTCAAACCT CTATAACAATA AGCCTTTCTT CAAGGAGTTT GCTCTTACAA
 E S G K F K P L Y N K P F F K E F A L T

5221 GCGATGTAGC TGCAGCAGAT GTAAATGCAA AGCTTGCTGA AAGTAACATA CTTGGAGGAT
 S D V A A A D V N A K L A E S N I L G G

5281 ACGAGCTTGA GTGTGACTAT CCTGAGGCTA AAAACGGACT TCTTTTCTGC GTGACAGAGA
 Y E L E C D Y P E A K N G L L F C V T E

5341 AGAGAACAAA AGAAGAGATA GACTGCCTTG CTCAGGTTAT GGAGGTGAAT TGCTAAC**ATG**
 K R T K E E I D C L A Q V M E V N C - M

5401 AAGAACTACA ATAAGCTTGT ATTTGAGGTT TCTAAAGAAG GGAAAAAGGC ATACAGCCTT
 K N Y N K L V F E V S K E G K K A Y S L

5461 CCAAAATGCG ACGTGCCAGA GCTTGATGCT GCAAGCGTGA TCCCTGCGGG ATACCTAAGC
 P K C D V P E L D A A S V I P A G Y L S

5521 AGTGAAGAGC CAAAGCTTCC TGAGCTTAGC GAAGTGGATG TAATAAGACA CTTTACAAAC
 S E E P K L P E L S E V D V I R H F T N

5581 CTTTCTCAAA AGAACTTTGG TCTTGACGGT GGATTCTATC CGCTTGGATC ATGTACTATG
 L S Q K N F G L D G G F Y P L G S C T M

5641 AAATACAATC CAAAGATAAA CGAAGACATG TGCAGAATTC CAGGACTTGT GAATGTACAC
 K Y N P K I N E D M C R I P G L V N V H

5701 CCTTACCAGC CTGAAGAGAC TGTACAAGGA TCCCTTGAAG TAATGTACAA CCTGGCTCAG
 P Y Q P E E T V Q G S L E V M Y N L A Q

5761 AGCCTTGCGA AAATTTCCGG TATGGACGAG GTTACTCTTC AGCCGGCAGC GGGAGCTCAC
 S L A E I S G M D E V T L Q P A A G A H

5821 GGTGAGTATG CTGGTCTTCT TTCAATAAAG GAATACCACA AAAAAAGAGG CGACCTAAAG
 G E Y A G L L S I K E Y H K K R G D L K

5881 AGAACTAAGA TAATAGTTCC TGA CTGACC CACGGA ACTA ACCCTGCAAG TGCATACGTT
 R T K I I V P D S A H G T N P A S A Y V

5941 GCTGGTCTTG AAATAGTAGA GATCGAGTCT AACTCTCAAG GCGGAGTAGA CATCGAAAAC
A G L E I V E I E S N S Q G G V D I E N

6001 CTTAAGTCCG TTCTAAATGA CGAGGTTGCA GGCTTCATGC TTACAAACCC AAGTACTCTT
L K S V L N D E V A G F M L T N P S T L

6061 GGA

7141 ACCCAACTCC AGCAGGAGAA GGAAAGACTA CTACAAACGT AGGTCTTAGC ATGGGTCTTA
N P T P A G E G K T T T N V G L S M G L

7201 ACAAGATAGG TAAAAAGACT ATAACAGCTC TTAACGAGCC ATCACTTGGA CCATGCTTTG
N K I G K K T I T A L N E P S L G P C F

7261 GTGTTAAGGG AGGAGCAGCT GGAGGCGGAT ACGCTCAGGT AGTTCCTATG GATGACATAA
G V K G G A A G G G Y A Q V V P M D D I

7321 ACCTTCACTT CACTGGAGAC ATCCACGCTA TAACTACAGC TCACAACCTG CTTGCAGCTC
N L H F T G D I H A I T T A H N L L A A

7381 TTATGGACAA CCACATAAAG CAGGGCAACG CTCTTGGAAT AGACATAAAC AAGATAACTT
L M D N H I K Q G N A L G I D I N K I T

7441 GGAAAAGGGT TCTTGACATG AATGACAGAG CTCTTAGAGA CATAGTTATA GGCCTTGGCG
W K R V L D M N D R A L R D I V I G L G

7501 GCACAGCCAA CGGAATCCCA AGACAAGACG GATTCGATAT AACTGTTGCA TCTGAGATAA
G T A N G I P R Q D G F D I T V A S E I

7561 TGGCTATAAT GTGTCTTGCT ACAAGCCTTT CAGACCTTAA AGACAGACTT TCAAGAATGA
M A I M C L A T S L S D L K D R L S R M

7621 TAGTAGGCTA TACAAGCCGA CGATTAGCCG TTACTGCTGA CAGCTTAACG CTCAGGGGAG
I V G Y T S R R L A V T A D S L T L R G

7681 CTCTTGCACT TCTTCTTAAG GATGCTCTTA AGCCAAACCT TGTACAGACT CTAGAAAACA
A L A L L L K D A L K P N L V Q T L E N

7741 CTCCAGCTAT AATACACGGC GGACCATTG CAAACATAGC TCACGGCTGT AACTCTGTAA
T P A I I H G G P F A N I A H G C N S V

7801 CGACTACTAA GACAGCTCTT AAGATAGCTG ACTACGTAGT TACAGAAGCC GGTTTTGGTG
T T T K T A L K I A D Y V V T E A G F G

7861 CTGACCTTGG AGCTGAGAAG TTCTTCGACA TCAAGTGCCG TTTTGCAGAT CTTAAGCCTG
A D L G A E K F F D I K C R F A D L K P

7921 ACGTAGCTGT AATAGTTGCT ACAGTTAGAG CTCTTAAGAA CCACGGCGGA GTAGCTAAAG
D V A V I V A T V R A L K N H G G V A K

7981 CAAACCTTGG GGCTGAAAAC ATGAAGGCTC TTGAGGACGG CTTTGGAAAC TTGGAAAGAC
A N L G A E N M K A L E D G F G N L E R

8041 ATATTGAAAA CGTGCACAAG TTCGGAGTGC CTGCAGTAGT TGCTATAAAC GCATTCCCTA
H I E N V H K F G V P A V V A I N A F P

8101 CAGACACTGA AAAAGAGCTT AAGTTCGTTG AAGATGCCTG CAGAAAATA GGCGCAGACG
T D T E K E L K F V E D A C R K L G A D

8161 TAGTGCTTTC AGAAGTATGG GCAAAAGGCG GAGAAGGCGG AGTTGAGCTT GCTAAGAAGG
V V L S E V W A K G G E G G V E L A K K

8221 TAGTTGAAGT AACTGAAAAA GGCGCAGCAA AATTCAAGCC GCTATATCCA GCAGAAATGC
V V E V T E K G A A K F K P L Y P A E M

8281 CTCTAAAGCA AAAGATAGAG ACAATAGCAA AAGAAATATA CAGAGCGGAC GGAGTAGAGT
P L K Q K I E T I A K E I Y R A D G V E

```

8341 TCTCGGCTAA GGCTTCAAAA GAGCTTGATA AATTCGAGAA GCTTGGATTT GGAAATCTTC
    F S A K A S K E L D K F E K L G F G N L

8401 CAATATGCGT AGCTAAGACT CAGTATTCAT TCTCTGACAA TCCAAACCTT AAAGGAGCTC
    P I C V A K T Q Y S F S D N P N L K G A

8461 CAAAGGGCTT CACTGTATCA GTAAGCAATG CAAGAATATC AGCTGGTGCA GGCTTCATAG
    P K G F T V S V S N A R I S A G A G F I

8521 TTGTGCTTAC TGGAGACATA ATGACTATGC CTGGACTTCC AAAGGTTCCA GCTGCAAACC
    V V L T G D I M T M P G L P K V P A A N
                                     ↓
8581 ACATGGATGT ACTTGAAAGC GGAGAAATAG TAGGTCTGTT CTAATATGGA TATCAAGTTT
    H M D V L E S G E I V G L F -ATACCT ATAGTTCAAA

8641 AATAAGTAAT AGAACCATCC TCTTAATCTA TTTGGGGAAA ACCTAGGTTT TCCCCTCTTT
    TTATTCATTA TCTTGGTAGG AGAATTAGAT AAACCCCTTT TGGATCCAAA AGGGGAGAAA
                                     >>>>>>-----<<<<<<<<
                                     prpU
8701 TATACACACA GCTATAGAAA AATTCTATCA TCAAGGAGGG CATTATAATG GCATTTAAAA
    ATATGTGTGT CGATATCTTT TTAAGATAGT AGTTCCTCCC GTAATAT M A F K

8761 TTGAAGGCGG AGACGTTAAG AAAGCTCTGG AAGTGAGCAT AGATGAGTCA ATAAAAGACA
    I E G G D V K K A L E V S I D E S I K D

8821 GGATAGCTAA CGCCTGCGCA ACCTGAGATA TCAACGCAGT CCTGGCAGTT GCTTGGGGAG
    R I A N A C A T U D I N A V L A V A W G

8881 TGAAAGAAGA AATAAGCGCT AGTGAAGCTG AAGCAGTAGA CAAGACTCTT GCAGAACTTG
    V K E E I S A S E A E A V D K T L A E L

8941 CAGTTTCAAG CATAGCACTT GAGTCTGGAT ACAAGGTTGA TTTTATGAAG GGCGGATGTA
    A G S S I A L E S G Y K V D F M K G G C

9001 AGGTAAAAGA TGACAAGGCC GTGCTTATAT ACAGATATCA AATAACTGAG AAGCCTTAAG
    K V K D D K A V L I Y R Y Q I T E K P -

9061 TTTTCATATTT TAAGAATCAA AATAATATTT ATAATGCAAA GTCAAAACAG TATAAAACAA
    AAAGTATAAA ATTCTTAGTT TTATTATAAA TATTACGTTT CAGTTTTGTG ATATTTTGTT

9121 ATCTATGGGA CAGGCCGTTT ATAAACGGCC TGTTTTGGTG ATAATCTTAA GTATATGGTC
    TAGATACCCT GTCCGGCAAA TATTTGCCGG ACAAACCAG TATTAGAATT CATATACCAG
    >>>>>>>>-----<<<<<<<<

```

Abb. 45: Nukleotidsequenz des Glycin-Decarboxylase-Operons aus *E. acidaminophilum* und der angrenzenden Genregionen. Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen, mögliche Promotorelemente (-10, und -35-Regionen) sind einfach unterstrichen. Durch primer extension identifizierte Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Potentielle Terminationsstrukturen sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Das Selenocystein-Codon ist genau wie die Aminosäure fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Die angegebene Sequenz ist unter der *accession number* AY722711.1 in der EMBL-Datenbank eingetragen. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *fabG*_3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase, *nlpP*_Zellwand assoziierte Reduktase mit SH3-Domäne, *gcvP4*_P4-Protein, *gcvP2*_P2-Protein, *gcvP1 α* _ α -Untereinheit des P1-Proteins, *gcvP1 β* _ β -Untereinheit des P1-Proteins, *thf*_Formyl-THF-Synthetase, *prpU*_PrpU.

A.III. Sequenz eines neuen Ausschnittes des Glycin-Reduktase-spezifischen Gencluster I

1 AGCCTTGCTA AAAGGCCGCC GAAGGGACAA GTCTTGATTT ACCCAAAGG ATCAAGGTGA
 TCGGAACGAT TTTCCGGCGG CTTCCCTGTT CAGAACTAAA TGGGTTTTTC TAGTTCCACT

61 AATTCTCAGG CAAAAGGACC ATATTCGGAC AGACTCTGGA TAAAAACAGA GAAACATGAC
 TTAAGAGTCC GTTTTTCCTGG TATAAGCCTG TCTGAGACCT ATTTTTGTCT CTTTGTACTG

121 TTGGGATGGT TTTGTTTTTT CTGTTTTTTT TTATACTCAA AATCCGCTTT GGAGTTTGTA
 AACCTACCA AAACAAAAA GACAAAAAA AATATGAGTT TTAGGCGAAA CCTCAAACAT

181 TTGCGGCACA GGAAATAATA GCGGGTTTAG AGTTTTGAAA ATTCGGAAAA CATTTCAGA
 AACGCCGTGT CCTTTATTAT CGCCCAAATC TCAAACTTT TAAGCCTTTT GTAAAAGTCT

grdX

241 GGAGGTAATA AAC**ATGG**GAGA TTATACTAA TAATCCTCTT GTGAAGGAAA AGCTTCTCCA
 CCTCCATTAT TTG M E I I T N N P L V K E K L L

301 AAAGGCAGAG AGACCTGACA GGGTAAAAAA CATAACGTTT TTATCGGACT GCGATTATAT
 Q K A E R P D R V K N I T F L S D C D Y

361 CGGAGTACTC CACAATGTCA GAAATCTTGT GCATTCTGGT TACAAGATAC TCACCCATCC
 I G V L H N V R N L V H S G Y K I L T H

421 TTTGTATGGA AGCGTAAAGC CAAATGAAAC ACCATACAGA ACGATATTTG TGAACCGGG
 P L Y G S V K P N E T P Y R T I F V E P

481 AACAGGTCTT GATATGGACT CCCTGAAGCT TATTGAAAGC GCAATTCAAA CAGTTGAGAC
 G T G L D M D S L K L I E S A I Q T V E

541 ATTCCAGAAG AACTACAAGA CACCTGTATG GGACGAAAAA GTAACAGACG ACTTTCAGGT
 T F Q K N Y K T P V W D E K V T D D F Q

601 TGTAGACTTG GATCTTATTG CACACACACT TAACGGGATC AAATTCTAGA GAGTGGCAGC
 V V D L D L I A H T L N G I K F -T CTCACCGTGC

661 CTTGAGATTC GCTGACAATA TTTATTATCT GCAAAGGTAA ACGCTTGCAA GGGCCAAAGC
 GAACTCTAAG CGACTGTTAT AAATAATAGA CGTTTCCATT TGCGAACGTT CCCGGTTTTGC

721 TGGAGCAGAG TAATATATTA TTTTTTCAAT TTTTCAATAT ATTGAAGGAG GTACTTTTAT
 ACCTCGTCTC ATTATATAAT AAAAAAGTTA AAAAGTTATA TAACCTCCTG CATGAAAATA

grdE₂

781 **ATGCGTTTGG** AAC**TTGG**AAA TATCTTCATC AAAGACATTC AGTTCGCTGC AGAGACAAAA
 M R L E L G N I F I K D I Q F A A E T K

841 GTAGAAAATG GGGTTCTTTA TGTAATAAAA GACGAAATGA TTAAAAAATT AAGCACAATT
 V E N G V L Y V N K D E M I K K L S T I

901 GAACACATCA AATCAGTAGA TCTTGACATC GCACGTCCAG GAGAGAGTGT GAGAATAACT
 E H I K S V D L D I A R P G E S V R I T

961 CCTGTTAAGG ATGTTATAGA GCCAAGGGTT AAGGTTGAAG GACCTGGCGG AATATTCCCG
 P V K D V I E P R V K V E G P G G I F P

1021 GGAGTAATAA GCAAGGTTGA GACTGATGGT TCAGGAAGAA CTCACGTGCT TCAGGGCGCT
 G V I S K V E T D G S G R T H V L Q G A

1081 GCGGTAGTAA CAACTGGAAA GGTAGTTGGA TTCCAGGAAG GTATAGTAAA CATGAGCGGT
 A V V T T G K V V G F Q E G I V N M S G

1141 GTTGGAGCAG AGTATACTCC TTTCTCGAAG ACTTTAAACC TTGTAGTGAT AGCTGAGCCA
 V G A E Y T P F S K T L N L V V I A E P

1201 GAAGATGGAA TAGAGCAGCA CAGACACGAA GAGGTTCTGA GAATGGTTGG ACTAAACGCC
 E D G I E Q H R H E E V L R M V G L N A

1261 GGCCTATATC TTGGAGAAGC TGGAAGAAAC GTAACTCCAG ACGAAGTAAA AGTATATGAA
 G V Y L G E A G R N V T P D E V K V Y E

1321 ACTGATACAA TATTCGAAGG AGCAGCAAAG TATCCAAACC TGCCAAAGGT AGGATATGTA
 T D T I F E G A A K Y P N L P K V G Y V

1381 TACATGCTTC AAACCTCAGG TCTTCTACAC GACACATATG TATACGGCGT AGATGCGAAG
 Y M L Q T Q G L L H D T Y V Y G V D A K

1441 AAAATAGTTC CAACAATACT ATACCCAACA GAAGTAATGG ATGGAGCCAT ACTAAGCGGA
 K I V P T I L Y P T E V M D G A I L S G

1501 AACTGCGTTT CGTCATGCGA CAAGAACCCA ACATACGTAC ACTGCAACAA CCCGATGGTT
 N C V S S C D K N P T Y V H C N N P M V

1561 GAAGAGCTTT ACGCAGTGCA CGGAAAAGAG ATCAACTTTG TTGGTGTTAT AATAACAAAC
 E E L Y A V H G K E I N F V G V I I T N

1621 GAAAACGTAT ACCTTGCTGA CAAGGAAAGA TCTTCAGACT GGACAGCAAA GCTTTGCAAG
 E N V Y L A D K E R S S D W T A K L C K

1681 TTCCTGGGAC TTGACGGTGC AATAGTATCA CAGGAAGGCT TTGGAAACCC AGATACAGAC
 F L G L D G A I V S Q E G F G N P D T D

1741 CTTATAATGA ACTGCAAGAA GATAGAAATG GAAGGCGTTA AGACTGTAAT ATCTACAGAC
 L I M N C K K I E M E G V K T V I S T D

1801 GAGTACGCAG GAAGAGACGG AGCATCTCAG TCACTTGCTG ATGCTGATGT AAGAGCTAAC
 E Y A G R D G A S Q S L A D A D V R A N

1861 GCTGTTGCAA GCAACGGTAA CGCCAACATG GTAATAGTAC TTCCTCCAAT GGATAAGACT
 A V A S N G N A N M V I V L P P M D K T

1921 ATAGGCCACA TCCAGTACAT CGACACTATA GCAGGCGGAT TCGACGGAGC TCTAAGAGCT
 I G H I Q Y I D T I A G G F D G A L R A

1981 GACGGAAGCG TAGAAGTTGA AATCCAGGCT ATAACAGGAG CTACAATCGA GCTTGGCTTC
 D G S V E V E I Q A I T G A T I E L G F

2041 GGATACCTAT CTGCTAAAGG ATACTAATCC AAACCGAAAA CGTAAATAAG CAAAAGAAGC
 G Y L S A K G Y -AGG TTTGGCTTTT GCATTTATTC GTTTTCTTCG

2101 TTCATTATAA TATAAAAATT ATTACGCAA GGAGAGACTT TGGT**ATG**TCA ATATTTGACG
 AAGTAATATT ATATTTTTAA TAATGCGTTT CCTCTCTGAA ACCA M S I F D

2161 GCAAAAAAGT CATCATAATC GGTGACAGAG ACGGAATACC AGGTCCTGCT ATGGCAGAAT
 G K K V I I I G D R D G I P G P A M A E

2221 GTCTAAAAGG CACTGGAGCA GAAGTAGTAT ACTCTGCAAC AGAATGCTTT GTCT**G**AACAG
 C L K G T G A E V V Y S A T E C F V U T

2281 CTGCTGGTGC AATGGACCTA GAGAATCAGA ATAGGGTTAA GAGCTTTACT GAGCAGTACG
 A A G A M D L E N Q N R V K S F T E Q Y

2341 GTGCAGAGAA CATGATAGTT CTTGTTGGTG CAGCAGAAGC TGAATCAGCA GGACTAGCTG
 G A E N M I V L V G A A E A E S A G L A

2401 CAGAGACTGT TACAGCAGGA GACCCCTACAT TCGCAGGACC ACTTGCAGGA GTCCAGTTGG
 A E T V T A G D P T F A G P L A G V Q L

2461 GACTAAGAGT ATTCCACGCA GTTGAACCAG AATTCAAAGA TTCGGTAGAC TCAGCAGTAT
 G L R V F H A V E P E F K D S V D S A V

2521 ACGATGAGCA AATAGGCATG ATGGAAATGG TTCTTGATGT TGAATCGATA ATAGCTGAAA
 Y D E Q I G M M E M V L D V D S I I A E

2581 TGAAGTCAAT AAGAGAGCAG TTCTGCAAGT TCAATGACTA ATTGAGGAGG TAAACACATG
 M K S I R E Q F C K F N D -AACTCCTCC ATTTGAG M *grdB₁*

2641 AGCAAAATTA AAGTAGTTCA TTATATAAAC CAATTCTTCG CAGGTGTTGG TGGAGAAGAA
 S K I K V V H Y I N Q F F A G V G G E E

2701 AAAGCTGACA TCGAGCCTTT CATAGCTGAG TCACTTCCAC CAGTAAGCCA GAGCCTTGCA
 K A D I E P F I A E S L P P V S Q S L A

2761 ACCCTTGTAAGGATGATGC AGAAGTTGTT GGAACAGTAG TTTGCGGAGA CTCATACTTC
 T L V K D D A E V V G T V V C G D S Y F

2821 GGAGAAAACC TTGTAGAAGC TAAAAACAGA ATACTTGAAA TGATCAAGTC TTTCAATCCA
 G E N L V E A K N R I L E M I K S F N P

2881 GACATAGTAG TAGCTGGACC AGCTTTCAAC GCAGGAAGAT ACGGAGTTGC TGCTGCAACT
 D I V V A G P A F N A G R Y G V A A A T

2941 GTAAC TAAGG CTGTTCAAGA CGAGCTTGG AATACCAGCAG TAACTGGTAT GTACATCGAA
 V T K A V Q D E L G I P A V T G M Y I E

3001 AACCCAGGCG CTGACATGTT CAAGAAATAC GCATACATCA TATCTACTGG AAACCTAGCT
 N P G A D M F K K Y A Y I I S T G N S A

3061 GCAGCAATGA GAACAGCTCT TCCAGCAATG GCTAAGTTTCG CTATGAAGCT TGCTAAAGGC
 A A M R T A L P A M A K F A M K L A K G

3121 GAAGAAATAG GCGGACCAGC AGCAGAAGGA TACATCGAAA GAGGTATCAG GGTTAACATG
 E E I G G P A A E G Y I E R G I R V N M

3181 TTCAAAGAAG ACAGAGGAGC TAAGAGAGCT GTCGCTATGC TTGTTAAGAA GCTTAAAGGC
 F K E D R G A K R A V A M L V K K L K G

3241 GAAGAGTATG AAACCTGAGTA TCCAATGCCT TCATTTGACA AGGTTGAGCC AGGAAAAGCT
 E E Y E T E Y P M P S F D K V E P G K A

3301 ATAAAAGACA TGTCTAAAGC TAAAATAGCT ATAGTAACTT CTGGTGGTAT AGTTCCAAAA
 I K D M S K A K I A I V T S G G I V P K

3361 GGAAACCCAG ACAGAATAGA GTCTTCATCA GCTTCTAAGT ATGGCAAGTA TGACATACAA
 G N P D R I E S S S A S K Y G K Y D I Q

3421 GGAATAGATG ATCTTACTTC AGAAGGCTGG GAGACAGCTC ACGGCGGACA CGACCCAATC
 G I D D L T S E G W E T A H G G H D P I

3481 TACGCTAACG AAGATGCAGA CAGGGTTATA CCAGTAGACG TGCTTAGAGA CATGGAGAAA
 Y A N E D A D R V I P V D V L R D M E K

```

3541 GAAGGCGTAA TAGGCGAGCT TCACAGATAC TTCTACTCAA CAACTGGTAA CGGTACTGCT
      E G V I G E L H R Y F Y S T T G N G T A
3601 GTTGCAAGCT CTAAGAAATT CGCTGAAGAA TTCACTAAGG AACTAGTAGC AGACGGCGTT
      V A S S K K F A E E F T K E L V A D G V
3661 GATGCTGTTA TACTAACTTC TACATGAAGC ACTTGTTACTA GATGCGGTGC ATCTATGGTT
      D A V I L T S T G T C T R C G A S M V
3721 AAAGAAATAG AAAGATCTGG AATACCAGTA GTTCACATAG CTACAGTTAC TCCAATATCT
      K E I E R S G I P V V H I A T V T P I S
3781 CTAACAGTTG GAGCCAACAG AATAGTTCCA GCTATAGCAA TACCTCACCC ACTTGGA AAC
      L T V G A N R I V P A I A I P H P L G N
3841 CCAGCTCTTT CTCATGAAGA GGAAAAAGCT CTTAGAAGAA AGATAGTTGA GAAGGCTCTT
      P A L S H E E E K A L R R K I V E K A L
3901 GAAGCCCTTC AAAGTGAAGT TGAAGAGCAA ACGGTATTTCG AAAGAAACTA TTAATATCAA
      E A L Q T E V E E Q T V F E R N Y -ATAGTT
3961 TAAATGCAGG CAAGGGCTTT TGCCCCTGCC TGCAATATAT AAGTATTTTC AAGGTATCTT
      ATTTACGTCC GTTCCCAGAA ACGGGGACGG ACGTTATATA TTCATAAAAG TTCCATAGAA
      >>>>>>> >>>>>>>>>
4021 TTATTGGATT AAAAGATATT TTGAAAATGT CTTTGAATAG TCACATTAGA GATGAAAACG
      AATAACCTAA TTTTCTATAA TTCTTTTACA GAAACTTATC AGAGTAATCT CTACTTTTGC
      >>>-----< <<<<<<<<<< <<<<<<<<<<
4081 TCAAAGGCTG GTAAGATACA TAAATTCATA ACGATTTTTTT AAAAAATTTA ATAATGCTAA
      AGTTTCCGAC CATTCTATGA ATTTAAGTAT TGCTAAAAAA TTTTTTAAAT TATTACGATT
      trxB1
4141 GTATCTTAAG GAGGAAGTCA CAGGTGGAAAA TGTATACGAT TTGGCCATAA TAGGTTTCAGG
      CATAGAATTC CTCCTTCAGT GT V E N V Y D L A I I G S
4201 TCCTGCAGGG CTGGCAGCAG CTCTATACGG AGCCAGAGCC AAGATGAAG
      G P A G L A A A L Y G A R A K M K

```

Abb. 46: Nukleotidsequenz eines neuen Ausschnittes des Glycin-Reduktase-spezifischen Genclusters I aus *E. acidaminophilum*; Erweiterung zu KOHLSTOCK *et al.* (2001), LÜBBERS und ANDREESSEN (1993) und WAGNER *et al.* (1999). Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen. Potentielle Terminationsstrukturen sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Das Selenocystein-Codon ist genau wie die Aminosäure fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Das Selenocystein-Codon ist genau wie die Aminosäure fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdX*_GrdX (hypothetisch), *grdE*₂_Protein der 25- und 22 kDa-Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *grdA*₃_ Selenoprotein A, *grdB*₁_47 kDa -Untereinheit des Protein B der Glycin-Reduktase, *trxB*₁_Thioredoxin-Reduktase. Die vollständige Sequenz dieses Genclusters ist unter der *accession number* L04500 in der EMBL-Datenbank eingetragen.

A.IV. Sequenz eines erweiterten Ausschnittes des Glycin-Reduktase-spezifischen Genclusters III

grrW

1 GCGGACTTTT GCGTTCAC TA CAATTCGGAA AACCCATATT TTTATGCACT CTGGGTGTGC
 A D F C V H Y N S E N P Y F Y A L W V C

61 AGGAAATGCG GTTATGTTGA GTTTGAAAAC AGGTTTGAAA GCATAAGCAA AGCAGGGGCA
 R K C G Y V E F E N R F E S I S K A G A

121 GACAAAATAA AAAAAGAGGT TACGCCCAA TGGACTCCAA GAGATTATGG AGGCAAAAGA
 D K I K K E V T P K W T P R D Y G G K R

181 GATATAGCAC AAGCCATGCA AATATAAAG CTGGCGCTGT ATCAGGCGGA GCTTCTTCAA
 D I A Q A M Q I Y K L A L Y Q A E L L Q

241 AAGGAATATT CTAACAAGGC CGTACTGTGC CTTATGATAG CATGGCTTTA CAGGTATGAA
 K E Y S N K A V L C L M I A W L Y R Y E

301 AACGACACTG CGAGCGAAAC GAGATTCATG AAATCTGCGC TTGAGCTTTA TGCTAAAGCA
 N D T A S E T R F M K S A L E L Y A K A

361 TATTCGGCTG AAGATTTCCC AATAGGCGGT ATGGATTCAG CAAAGCTTTC ATACCTCATA
 Y S A E D F P I G G M D S A K L S Y L I

421 GGGGAGTTAA ACAGAAGATG CGGAAATTTT CGGGAGTCGA TTAAATGGTT TGACAAAGCG
 G E L N R R C G N F R E S I K W F D K A

481 ATTAACGACC CAAATGTAAA AAAATCAATT CATATAAAAA AGAAAGCCAG AGAGCAGTGG
 I N D P N V K K S I H I K K K A R E Q W

541 CATAAAGCTG CAGAGTATTA CAAGGCGGCA AAGCCTGCCG AATAACAAAG TTGGGAGTTG
 H K A A E Y Y K A A K P A E -GTTTC AACCTCAAC

grrX

601 ATTTGCTAGT ATGCCTTTAA ATATAGTGCT TGTGGAGCCT GAAATTCCTC AAAACACAGG
 TAAACGATCA M P L N I V L V E P E I P Q N T

661 AAACATAATA AGAACATGCG CCGTAACAGG TGCAAAGCTG CATCTTGTGA GACCTCTTGG
 G N I I R T C A V T G A K L H L V R P L

721 TTTTGTAATG AACGACAAGT ACCTCAAAAG GGCCGGGCTT GATTATTGGG ACATGGTGGA
 G F V M N D K Y L K R A G L D Y W D M V

781 TATAAATTAC TATGACAGCT TTGAAGAGCT TAAGGTCAGA TTTCTGGTT CGTCATATCA
 D I N Y Y D S F E E L K V R F P G S S Y

841 CTTTGCCACC ACTAAATGCC AAAACAGGCA TAGCGATGTC AAATACAAGG ACGAGTGCTT
 H F A T T K C Q N R H S D V K Y K D E C

901 TATTGTTTTT GGAAGGAGA CGAAAGGTCT TCCTAAGGAA CTTTTGGAAC AAAACGCAGA
 F I V F G K E T K G L P K E L L E Q N A

961 TGAATGCATA AGGGTTCCCA TGCTTAAAGA TTCAAAGGCT AGATCACTGA ATCTTTCAAA
 D E C I R V P M L K D S K A R S L N L S

1021 CAGCGTGGCC ATAGTCGTGT ATGAAGCGCT AAGACAGCTG GGTTATCCTG GATTGGAATA
 N S V A I V V Y E A L R Q L G Y P G L E

grrY

1081 ATTGAGAAAG TCGGGGAGAA GATTGATAAT GGATATTAAG ATTATTTTCAG ACAGCCTAGC
 -AACTCTTTC AGCCCTCTT CTAAC TAT M D I K I I S D S L

```

1141  AGACATACCG CAAGAGACAG CCAGGGCGCT TGACATTGAA GTAATGCCAC TGACCATAAT
      A D I P Q E T A R A L D I E V M P L T I

1201  ATTTGATGAT GCTCAGTATG AGGATGGAGT TGAAATCACT CCGGCAGAAA TGTACAAAAA
      I F D D A Q Y E D G V E I T P A E M Y K

1261  AATCGGAAGC ATCAGGCAAG CTGCCCACTT CATTCTCAAG TTAACACCAC AGAAATTTGA
      K I G S I R Q A A H F I L K L T P Q K F

1321  AGAAGCCTTC AGGAAATATG TGAATGAAGG CTACACCGTA ATATATATAG GTTCCTCATC
      E E A F R K Y V N E G Y T V I Y I G S S

1381  AAGGGCTTCG GGCACTTTCC AGTCTGCACT GGTTGCAAAA AATGCGGTAG GCAGTGAAGA
      S R A S G T F Q S A L V A K N A V G S E

1441  GGTACACGTT TTTGACACAT ACCTTTTAAG CTATGCCAGC GGAATGATTG CAGTCGAGGC
      E V H V F D T Y L L S Y A S G M I A V E

1501  TGCCAGAATG GCCAAGGAAG GCAAGAATCC AGAGCAGATA CTGAAAAGGT CGCAGAGCAT
      A A R M A K E G K N P E Q I L K R S Q S

1561  GAAGGAACGC ATGGGGTGCT TATTTACAGT AGACACGCTT GACTATCTAA AGCGAGGAGG
      M K E R M G C L F T V D T L D Y L K R G

1621  CAGGCTTTCT GCAACAAAAG CCGCAATAGG CACAATACTA AATGTAAAGC CCTTGTTGAC
      G R L S A T K A A I G T I L N V K P L L

1681  ACTCGAAGAT GGAATAGTAA AGCACCTTAA GAATGTAAGG GGGACAAAAA AGGCTCTTGA
      T L E D G I V K H L K N V R G T K K A L

1741  AGAGATGTTG GATATCATCA TATCGGAAGC GGGAGAATCT CCCGAGCAGA TAACGATTTTC
      E E M L D I I I S E A G E S P E Q I T I

1801  TCATGGACTT GATATGGAAC TGTTCTCGAA TTTGCAGGAT ATGGCGGCCG AGCGCATGGA
      S H G L D M E L F S N L Q D M A A E R M

1861  CATGGATAGA ATTCAGACAT CACAGATAGG GGCTGTAATA GGGATACATA CAGGACCAAG
      D M D R I Q T S Q I G A V I G I H T G P

1921  CGTAGCAGCA GCTTTTTATC TTAAAAAATA A
      S V A A A F Y L K K -

```

Abb. 47: Nukleotidsequenz eines erweiterten Ausschnittes des Glycin-spezifischen Genclusters III aus *E. acidaminophilum*; Erweiterung zu WAGNER *et al.* (1999). Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt und unterstrichen, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grrW*_hypothetisches Protein, *grrX*_RNA-Methylase (hypothetisch), *grrY*_hypothetisches Protein. Die vollständige Sequenz dieses Genclusters ist unter der *accession number* Y14275 in der EMBL-Datenbank eingetragen.

A.V. Sequenz eines Ausschnittes des Sarcosin-Reduktase-spezifischen Gencluster IV

orfs'

```

1  GCAGAATGGG TTGGAGTGTG GACACCTTTT ATTAAGGATA CATCCTCGGA AAAGGCATA
   A E W   V G V   S T P F   I K D   T S S   E K V I

61  CTTATAACAT CGTTTCTTAT AAGCCTCCTT TTCATTTGCA TATACCTGGT GTATTCTTGG
   L I T   S F L   I S L L   F I C   I Y L   V Y S W

121 AACAGGCTTC TAAAGAGCGA GGTTCTGAAA AAAACGAGCG AGCTGAGTCT GAGCCGCCAG
   N R L   L K S   E V L K   K T S   E L S   L S R Q

181 AGACTCCAGA CAACCTTCGA CAGCATTACT GATTGTATGG TTGTTCTTGA TAGCAGTCTT
   R L Q   T T F   D S I T   D C M   V V L   D S S L

241 AAGGTGGAAA CTGTCAACAG GGCTTTCACG GAATTTACAG GACTGCAGGA GCATGAGCTA
   K V E   T V N   R A F T   E F T   G L Q   E H E L

301 ATTGGCAGAA GCTTCCTGGA CTTCGAAGAC TTATCTGCTA AGGAATGCCT GCCGCTTATA
   I G R   S F L   D F E D   L S A   K E C   L P L I

361 AAAGACACGC TAAAGACCAG TTCAAAGCAT AGCTTAGAAT TTCAGCATGA AGACATAATA
   K D T   L K T   S S K H   S L E   F Q H   E D I I

421 TACAGCATGA GCACTTTTCC TCTTAACTGG GATGATCCGG ATATGGAAAAG CGCGCTAGTT
   Y S M   S T F   P L N W   D D P   D M E   S A L V

481 ATGGTTAAGG ATATAACACA TATGAAGCTG AGCGAGCAAA AACTTCTGCA GGACAACAAG
   M V K   D I T   H M K L   S E Q   K L L   Q D N K

541 ATGCTCGCCA TAGGTCAGCT GGCTTCGGGA GTGGCGCATG AAATAAGAAA TCCACTCGGA
   M L A   I G Q   L A S G   V A H   E I R   N P L G

601 ATAATAAGGA GCCATTGCTA TGTCCTTAGA CATTACAGAG ATGTCAATGA AGCTGAAATC
   I I R   S H C   Y V L R   H S Q   N V N   E A E I

661 CAGGGTTCTG TTGCTGCTAT TGAAAATTCT GTGACAAGGG CCAGCGGAAT AATCGAAAAC
   Q G S   V A A   I E N S   V T R   A S G   I I E N

721 CTGCTGAATT TTGTAAGGAT ATCCAGCGAC AAGTGCCAGC TTACAAATGT AAGGATTTTT
   L L N   F V R   I S S D   K C Q   L T N   V R I F

781 CTGGAAAGCA TAATAGCCCT TGAAAGGAAA ACTCTGGAGA AGAATTCAAT AGACGTAAGC
   L E S   I I A   L E R K   T L E   K N S   I D V S

841 GTGGAGTGCC CAGATGATAT CTCCTGCTGC CTGCATCAGG ATTCGCTTAA GCATGTGTTC
   V E C   P D D   I S C C   L H Q   D S L   K H V F

901 ATCAACCTGA TTTCAAACCTC AATGGATGCT ATTGAGTCAG GCGGCAGAAT ATCCATAAAA
   I N L   I S N   S M D A   I E S   G G R   I S I K

961 TCATATACGA AAGAAGATTC GGTTGTATTTC GAGTTCAGCG ACAACGGTGA TGGCATAAAA
   S Y T   K E D   S V V F   E F S   D N G   D G I K

1021 GAAAAAGACA TAAAGAATAT TTTCAACCCG TTCTTCACTA CAAAGCCGGC AGGAAAGGGC
   E K D   I K N   I F N P   F F T   T K P   A G K G

1081 ACAGGCCTGG GACTCTATAT AACATACAAT GAAGTCAAAA AATGCGGAGG CTCTATAACA
   T G L   G L Y   I T Y N   E V K   K C G   G S I T

```

1141 GCAAGCAGCA AACCCGGAGA GGGCACTACA TTCCGGATAG AAATACCGTT AAGGGAGGAA
 A S S K P G E G T T F R I E I P L R E E
orfR

1201 AAAGATGAAA TCGGACTCAA GCTTCAGAAT ACTAATAGTT GATGATGAAG ATGAATACAG
 K D E I G L K L Q N T N S -
 M K S D S S F R I L I V D D E D E Y

1261 AGACATACTA AAAAGAATAC TGGAAATCAA TGCATACGAT GCTGACACCG CGGTCAGTGG
 R D I L K R I L E I N A Y D A D T A V S

1321 CCAGGATGCA CTTGTAAAGA TAAAAAAGA TGAGTACGAT CTTGTGCTTA GCGATCTAAT
 G Q D A L V K I K K D E Y D L V L S D L

1381 AATGCCGGGA ATGGACGGTG TGGAGTTGCT AGGCGAAATA AAAAAAATAA AAAAGGACAT
 I M P G M D G V E L L G E I K K I K K D

1441 CGAGGTGATA CTTGTACACGG GCTATGGCAG CATCGAGAAT GCAGTCGAAG CCATGAGGAA
 I E V I L V T G Y G S I E N A V E A M R

1501 GGGAGCCTTT TCATACTTTG TAAAAGGGAA TGCTCCTGAG GAGCTGCTCG GCGAAATCGA
 K G A F S Y F V K G N A P E E L L G E I

1561 AAAGTTTCGT GAAAGCGCGG CGCTGCAAAA CAAGATGAAG CAGCATATCA GCGATAGCCT
 E K V R E S A A L Q N K M K Q H I S D S

1621 GGGCGGAGAG TTCCTACTTG GCACAAGGAG CGAGAAGTTC AAAAAGGCAC TTCAGACCGC
 L G G E F L L G T R S E K F K K A L Q T

1681 AGAAAAGGCC GCAAAGAGTA ATATTACAAT ACTGCTTCTG GGAGAGTCTG GTGTTGGTAA
 A E K A A K S N I T I L L L G E S G V G

1741 GGAGGTATTT GCAAAATATA TTCATAGCTG CAGCGAAAGA AAGGATAAGC CTTTTATAGC
 K E V F A K Y I H S C S E R K D K P F I

1801 TGTAAACTGC TGTGCATTTT CGGAAAGCCT TCTGGAATCA GAGCTCTTTG GACATGAGAA
 A V N C C A F S E S L L E S E L F G H E

1861 AGGTGCCTTT ACCGGGGCCT CGGACTCCAG AAAGGGAAGA TTCGAGGCGG CAGACAAGGG
 K G A F T G A S D S R K G R F E A A D K

1921 CACGCTTTTT CTGGATGAAA TAGGTGATGT GTCGCTCGAC ATACAGGTAA AGCTTCTTAG
 G T L F L D E I G D V S L D I Q V K L L

1981 AGTTCTCGAG ACCAGAAGGA TAGAAAAGAT TGGCAGCAAC GTTCCTGCGC CTGTGGATTT
 R V L E T R R I E K I G S N V P A P V D

2041 CAGGCTCATA TGCGCAACTA ACAAGGACCT GCAGCAGGAG ATGGTCGAAG GAAGAATTAG
 F R L I C A T N K D L Q Q E M V E G R I

2101 AGAAGATTTT TTCTACAGAA TCAGTTCAAT AGTAATTACT ATTCCACCGC TTCGGGAGAG
 R E D F F Y R I S S I V I T I P P L R E

2161 GCGGGAGGAC CTGCCGGATT TAATAGAATT TTTTCTTGGC AAGGCGCAGC TTGAAATGGG
 R R E D L P D L I E F F L G K A Q L E M

2221 AAAAGAGATA ACGTCGGTAC AAAAAGAAGT AATGAGCTTC CTGCTTTCAT ACGATTATCC
 G K E I T S V Q K E V M S F L L S Y D Y

2281 GGGAAATATA CGCGAGCTGA GAAACATATT AAACAGGCTT GTAGTGCTTT CTGAAAATGG
 P G N I R E L R N I L N R L V V L S E N


```

2341  GGTTCCTCAGG  GCGAGCGACC  TTCCAAATGT  TGAAAATCAG  GCGGATGTGC  TCTGCGAATA
      G V L R   A S D   L P N   V E N Q   A D V   L C E

2401  CGACGTCAGG  CCGCTTAGGG  ATATACGGCG  CGATTTTCGAA  TCGGAATATA  TCGAAAGAGT
      Y D V R   P L R   D I R   R D F E   S E Y   I E R

2461  GCTCGAGGTC  TGC GGCAACA  ATGTGTCAAA  GGCGGCAAAG  CTGCTCGACA  TAAGCAGGAG
      V L E V   C G N   N V S   K A A K   L L D   I S R

2521  GCAACTGACC  AAAAAAATAG  CTGAATTCGG  CTTGAGGGAA  GCTTCACAGC  CTTCCGAAAT
      R Q L T   K K I   A E F   G L R E   A S Q   P S E

2581  GGTTGACTAG
      M V D   -

```

Abb. 48: Nukleotidsequenz eines Ausschnittes des Sarcosin-spezifischen Gencluster VI aus *E. acidaminophilum*; Erweiterung zu WAGNER *et al.* (1999). Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt und unterstrichen, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *orfS*_Zwei-Komponenten-Sensor-Histidin-Kinase, *orfR*_NtrC-ähnlicher Responsregulator. Die vollständige Sequenz dieses Genclusters ist unter der *accession number* Y17872 in der EMBL-Datenbank eingetragen.

A.VI. Sequenz eines erweiterten und verbundenen Ausschnittes des Betain-spezifischen Gencluster II/V

```

      grdT1
1    GTTACGCTAT  TGCTTCTATG  CACCTTCTTT  ATAACATCTG  CAAACTCGGC  TACATTTGTA
      V T L   L L L   C T F F   I T S   A N S   A T F V

61   CTCGGAATGT  TTACATCTGA  AGGAGATCTC  AATCCCTCGA  ATCAAAAGAA  AATAATATGG
      L G M   F T S   E G D L   N P S   N Q K   K I I W

121  GGACTCTTCC  AATCGCTTCT  TGCAACGGCA  CTTCTTCTTC  TAGCTGGAGG  ACTTCAGTCG
      G L F   Q S L   L A T A   L L L   L A G   G L Q S

181  CTTCAGACAA  TATCTGTAGC  AGCGGCTTTT  CCATTCATAG  GAGTCATGCT  TCTTGCGTGC
      L Q T   I S V   A A A F   P F I   G V M   L L A C

241  GTATCACTTA  TAAAGGTGTT  ATTGGAGGAT  TCCAAGTCGA  CGAAATAAAT  TAAGGGCAGC
      V S L   I K V   L L E D   S K S   T K   -TA  ATTCCCCTCG

301  TATATAACAA  GCCAGGAGCT  GATGGTGCAG  TATATGTTGT  CTGTCACTGT  TTCTGGCTTG
      ATATATTGTT  CGGACCTCGA  CTACCAGGTC  ATATACAACA  GACAGTGACA  AAGACCGAAC

361  TATATTGACA  ACAATTGTTA  AAATATAAAT  AATGTTTCAA  ACTTGTGTGT  TCGAGTATAA
      ATATAACTGT  TGTTAACAAT  TTTATATTTA  TTACAAAGTT  TGAACACACA  AGCTCATATT

421  ATATAGAGTG  GATTATATGA  TAAATTTATG  CGAAGAAGCG  TGTTCAATTAA  AAAAGATAAT
      TATATCTCAC  CTAATATACT  ATTTAAATAC  GCTTCTTCGC  ACAAGTAATT  TTTTCTATTA

481  TGTGACGTTT  TTTTCAATTG  AAAAGTATTC  AACTATAAGC  AATATTTTTG  ATATATTTTA
      ACACTGCAAA  AAAAGTTAAC  TTTTCATAAG  TTGATATTTCG  TTATAAAAAC  TATATAAAAT

541  ATATGATGAT  ATTTATTTGA  CATTGTGTTA  TAAAATCACA  CCATGCATGA  ATAAAAATGC
      TATACTACTA  TAAATAAACT  GTAACACAAT  ATTTTAGTGT  GGTACGTACT  TATTTTTTACG

```

trxB₂

601 ATAAATGAAC AGGAGGGGTT TAAATGGAAA ATGTATACGA TTTGGCCATA ATAGGTTTCAG
TATTTACTTG TCCTCCCCAA ATT M E N V Y D L A I I G S

661 GTCCTGCAGG GCTGGCAGCA GCTCTATACG GAGCCAGAGC CAAGATGAAG ACAATCATGA
G P A G L A A A L Y G A R A K M K T I M

721 TTGAAGGTCA GAAAGTCGGA GGACAAATAG TAATAACTCA CGAGGTTGCA AACTACCCAG
I E G Q K V G G Q I V I T H E V A N Y P

781 GCTCAGTAAG AGAAGCTACG GGTCCATCAC TTATAGAGAG AATGGAAGAG CAGGCTAACG
G S V R E A T G P S L I E R M E E Q A N

841 AGTTCGGTGC CGAGAAGGTA ATGGACAAGA TAGTAGACGT TGACCTTGAC GGCAAGATAA
E F G A E K V M D K I V D V D L D G K I

901 AAGTAATAAA AGGCGAAAAA GCCGAGTACA AGGCAAAATC AGTAATACTT GCAACAGGAG
K V I K G E K A E Y K A K S V I L A T G

961 CGGCTCCAAG ACTTGCAGGC TGCCCTGGAG AGCAGGAGCT TACAGGCAAG GGAGTATCAT
A A P R L A G C P G E Q E L T G K G V S

1021 ACTGCGCAAC TTGCGACGCT GACTTCTTCG AGGACATGGA AGTTTTTCGTA GTAGGCGGAG
Y C A T C D A D F F E D M E V F V V G G

1081 GAGACACTGC TGTTGAAGAG GCTATGTACC TTGCGAAGTT TGCAAGAAAG GTTACAATAG
G D T A V E E A M Y L A K F A R K V T I

1141 TTCACAGAAG AGACGAGCTA AGAGCTGCCA AGTCTATACA GGAGAAGGCA TTCAAGAATC
V H R R D E L R A A K S I Q E K A F K N

1201 CTAAGCTAGA CTTTCATGTGG AACTCTGCAA TAGAAGAAAT AAAGGGAGAC GGCATAGTTG
P K L D F M W N S A I E E I K G D G I V

1261 AATCTGCAGT ATTCAAGAAC CTTGTTACTG GAGAGACTAC AGAGTACTTT GCAAACGAAG
E S A V F K N L V T G E T T E Y F A N E

1321 AAGACGGCAC ATTCGGAATA TTCGTATTCA TAGGCTACAT ACCTAAGAGC GACGTATTCA
E D G T F G I F V F I G Y I P K S D V F

1381 AGGGCAAGAT AACGCTTGAC GATGCAGGAT ATATAATAAC AGACGACAAC ATGAAGACAA
K G K I T L D D A G Y I I T D D N M K T

1441 ATGTTGAAGG CGTATTTGCA GCAGGAGACA TAAGAGTCAA GTCCCTAAGA CAAGTAGTTA
N V E G V F A A G D I R V K S L R Q V V

1501 CTGCATGCGC AGACGGAGCT ATAGCTGCAA CTCAGGCTGA AAAATATGTT GAGGCTAACT
T A C A D G A I A A T Q A E K Y V E A N

1561 TCGAAGAGTA GAAAGCACAA AAAATATTGT TTGACGATCC AAAATAAGGC TATAAATTCA
F E E -TTTCGTGTT TTTTATAACA AACTGCTAGG TTTTATTCCG ATATTTAAGT

1621 AACGATGACT GTAAAATCAA TGTACTGAAA TATATTGATA ATAATAGAAT TTTAAAGGAG
TTGCTACTGA CATTTTAGTT ACATGACTTT ATATAACTAT TATTATCTTA AATTTTCCTC

trxA₂

1681 ATGACTTTTA ATGAGCGCAT TACTAGTTGA AATAGACAAG GATCAATTCC AAGCAGAGGT
TACTGAAAAT M S A L L V E I D K D Q F Q A E

1741 GCTAGAGGCA GAAGGCTATG TGCTAGTTGA CTAATTTCAGT GACGGCTGCG TGCCATGCAA
V L E A E G Y V L V D Y F S D G C V P C

1801 GGCTCTTATG CCTGACGTGG AAGAGCTGGC TGCTAAATAC GAAGGCAAGG TTGCATTCCG
 K A L M P D V E E L A A K Y E G K V A F

1861 TAAATTCAAC ACAAGCTCAG CGAGAAGACT TGCAATAAGC CAAAAAATAC TTGGACTTCC
 R K F N T S S A R R L A I S Q K I L G L

1921 AACATAACA CTTTACAAGG GTGGACAAAA GGTAGAGGAA GTTACTAAGG ACGACGCTAC
 P T I T L Y K G G Q K V E E V T K D D A

1981 AAGAGAAAAC ATAGATGCAA TGATAGCCAA GCACGTTGGC TAAATTGTCA TTCAATGATA
 T R E N I D A M I A K H V G -TAACAGT AAGTTACTAT

2041 ACCTAATGGG CGGTGACTTC ACTGCCCAT T AGGTTTATTC AAAAGGTTTA TTCAAAAAAG

2101 TACTTCAAAA ATTTCCGGAGG TGTCAATATA TGAATTTTCC AGTTCTTAAA GGTGCGGGAT
 ATGAAGTTTT TAAAGCCTCC ACAGTTATA M N F P V L K G A G

grdC₂

2161 ACGTTCCTCGT GCACACACCA GACATGATAA TGCACAACGG AACAACTCAG ACAACAGAAA
 Y V L V H T P D M I M H N G T T Q T T E

2221 AGATTGTAAA CCCAGAATCA GAATACCTAA AAAAGCTGCC TGAGCATTTA AGATCATTTG
 K I V N P E S E Y L K K L P E H L R S F

2281 AAGACGTAGT AGCATACGCT CCAAACCAGA CATACTTGG AAGCATGACT CCAGAGGCAC
 E D V V A Y A P N Q T Y I G S M T P E A

2341 TTGGAGAAAT AGCAATGCCA TGGTGGACAG AAGACAAGAA AGTGGCGGGA GCCGACAGAT
 L G E I A M P W W T E D K K V A G A D R

2401 ACGGAAAGCT TGGAGAGATA ATGCCCTCAGG ACGAGTTCCT TGCGCTTATG TCTGCATCAG
 Y G K L G E I M P Q D E F L A L M S A S

2461 ACGTATTGCA CTTTGTGCTT TTCGAAAAAG AGTTCATAGA GGGAGCAAAG GCTAAGCTTG
 D V F D L V L F E K E F I E G A K A K L

2521 CAGCTCACCC TGTAGTAGGC AACCTTGCAG AGAGCGTAAA CGCAGGAGTA GAGCTAGCTG
 A A H P V V G N L A E S V N A G V E L A

2581 AGATAGAAAA GCAGCTAAGC GAGTTCCACG CAGAAGGACT ATACAATAAC GGCAAGCTTG
 E I E K Q L S E F H A E G L Y N N G K L

2641 TAGGCTGCGT AAAAAGAGCC CACGACGTAG ACGTGAACCT AAACCTTCAT ACAATGCTTG
 V G C V K R A H D V D V N L N S H T M L

2701 AGAACCTTGC GGTTAAGGCA TCAGGAGTGC TTGCTCTTGC AAACCTTATA GCTAAAAACA
 E N L A V K A S G V L A L A N L I A K N

2761 ACGTAAACCC AGCTGAAGTG GACTACATCA TAGAGTGCTC TGAAGAGGCT TGCGGAGACA
 N V N P A E V D Y I I E C S E E A C G D

2821 TGAACCAAAG AGGAGGCGGA AACTTCGCCA AGGCTCTTGC AGAAATGACT GGCTGCGTTA
 M N Q R G G G N F A K A L A E M T G C V

2881 ACGCGACAGG CTCAGACATG AGAGGCTTCT GCGCAGGACC AACGCACGCA CTTATAGCGG
 N A T G S D M R G F C A G P T H A L I A

2941 CAGCGGCGCT AGTTAAATCA GGCGTATACA AGAACGTAAT AATAGCAGCG GGTGGAGCGA
 A A A L V K S G V Y K N V I I A A G G A

3001 CAGCAAAGCT TGGAATGAAC GGAAAAGACC ACGTTAAGAA AGAAATGCCA ATACTTGAGG
 T A K L G M N G K D H V K K E M P I L E

3061 ACTGCCTTGG CGGCTTCGCG GTTCTAGTTA GCGAAAACGA CGGAGTAAAC CCAATTCTAA
 D C L G G F A V L V S E N D G V N P I L

3121 GAACAGACCT AGTGGGAAGA CACACAGTTG CAACTGGATC AGCTCCACAG GCTGTAATAG
 R T D L V G R H T V A T G S A P Q A V I

3181 GCTCTCTAGT TCTAAGCCCA CTAAAAGCAG GCGGACTTAA AATAACAGAC GTAGACAAGT
 G S L V L S P L K A G G L K I T D V D K

3241 ACTCGGTAGA AATGCAAAAC CCAGACATAA CTAAGCCGGC AGGAGCAGGA GACGTTCCAG
 Y S V E M Q N P D I T K P A G A G D V P

3301 AGGCCAACTA CAAGATGATA GCCGCACTTG CTGTCTATGGG AAAAGAAATA GAAAGAGCAG
 E A N Y K M I A A L A V M G K E I E R A

3361 ACATAGCAGC TTTCGTTGAA AAGCACGGAA TGTTTGGTTG GGCTCCAACA CAAGGCCACA
 D I A A F V E K H G M V G W A P T Q G H

3421 TACCATCAGG AGTACCATAC ATCGGCTTTG CAATAAGCGA CCTTACAGAA GGCTCAGTAA
 I P S G V P Y I G F A I S D L T E G S V

3481 ACAGAACTAT GATAGTAGGA AAGGGAAGCC TCTTCCTTGG AAGAATGACA AACCTTTTCG
 N R T M I V G K G S L F L G R M T N L F

3541 ATGGTGT TTC AATAGTAGCA GAGAGAAACA CAGGCAAAGT GGAGTCAGGA AGCTCAGTAT
 D G V S I V A E R N T G K V E S G S S V

3601 CAACAGAAGA GATAAGAAAA ATGATAGCAG AATCTATGAA GGATTTTCGCA GCACATCTAT
 S T E E I R K M I A E S M K D F A A H L

3661 TAGCTGAATA GGGGTGAAAA ***grdD₂*** AATGTCAGAT ATAAAACAAA TGATAGGCAA GACTTTTCATG
 L A E -CCCACTTTT T M S D I K Q M I G K T F M

3721 GAGATAGCAG ACGCTATCGA AACAGGAAGC TTCGCTGGAA AAGTAAAAGT AGGAATAACA
 E I A D A I E T G S F A G K V K V G I T

3781 ACCCTGGGCA GCGAGCACGG AGTAGAGAAC CTGGTAAAGG GAGCAGAGCT TGCAGCTAAA
 T L G S E H G V E N L V K G A E L A A K

3841 GACGCAGCCG GCTTTGACAT AGTGCTTATA GGACCAAAGG TTGAAACAAG CCTTGAAGTA
 D A A G F D I V L I G P K V E T S L E V

3901 GTAGAGGTAG CAACAGAAGA AGAAGCGCAC AAGAAAATGG AAGAGCTTCT AGACAGCGGC
 V E V A T E E E A H K K M E E L L D S G

3961 TATATCCA CTGCGTAAC AGTGCATAT AACTTCCCAA TAGGCGTATC GACAGTAGGA
 Y I H S C V T V H Y N F P I G V S T V G

4021 AGGGTAGTAA CACCTGGAAT GGGCAAGGAG ATGTTTCATAG CAACAACAAC AGGAACATCT
 R V V T P G M G K E M F I A T T T G T S

4081 GCGGCTCAAA GAGTCGAGGC CATGGTAAGA AACGCGCTTT ACGGAATAAT AACAGCAAAG
 A A Q R V E A M V R N A L Y G I I T A K

4141 TCAATGGGAA TAGAAAACCC GACAGTTGGA ATACTAAACC TTGACGGAGC AAGAGCAGTA
 S M G I E N P T V G I L N L D G A R A V

4201 GAAAGAGCGC TTAAGGAGCT TGCAGGAAAC GGCTACCCTA TAACATTCGC AGAGTCGCTA
 E R A L K E L A G N G Y P I T F A E S L

```

4261  AGAGCTGACG GCGGAAGCGT AATGAGAGGA AACGACCTTC TTGGCGGAGC TGCAGACGTA
      R A D G G S V M R G N D L L G G A A D V
4321  ATGGTAACAG ACTCGCTAAC AGGCAACATA ATGATGAAGG TGTTCTCGTC ATACACAACA
      M V T D S L T G N I M M K V F S S Y T T
4381  GGCGGAAGCT ACGAGGGACT AGGCTACGGC TACGGCCCTG GAATAGGCGA CGGCTACAAC
      G G S Y E G L G Y G Y G P G I G D G Y N
4441  AGGACAATAC TGATACTCTC AAGAGCGTCA GGAGTTCCAG TAGCTGCAAA CGCAATAAAA
      R T I L I L S R A S G V P V A A N A I K
4501  TACGCAGCCA AGCTTGCGCA AAACAACGTG AAGGCGATAG CAGCGGCAGA GTTCAAGGCG
      Y A A K L A Q N N V K A I A A A E F K A
4561  GCCAAGGCGG CAGGCCTCGA GAGCATACTT GCGGGACTAA GCAAGGACAC TAAGAAAGCC
      A K A A G L E S I L A G L S K D T K K A
4621  TCTACAGAGG AAGAAGTGAA GATGCCTCCT AAGGAAGTAG TAACAGGAAC AATCTCAGGC
      S T E E E V K M P P K E V V T G T I S G
4681  GTAGACGTAA TGGACCTTGA AGACGCACAG AAAGTGCTTT GGAAAGCCGG AATATACGCA
      V D V M D L E D A Q K V L W K A G I Y A
4741  GAGAGCGGAA TGGGCTGCAC AGGACCTATA GTAATGGTAA ACGAAGCCAA GGTTGAAGAA
      E S G M G C T G P I V M V N E A K V E E
4801  GCGGCAAAGA TACTTAAGGA TGCAGGCATA GTAGCTTAA
      A A K I L K D A G I V A -

```

Abb. 49: Nukleotidsequenz eines Ausschnittes des Betain-Reduktase-spezifischen Gencluster V/II aus *E. acidaminophilum*; Erweiterung zu LÜBBERS und ANDREESEN (1993), STEINER (2004) und WAGNER *et al.* (1999). Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt und unterstrichen, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen. Potentielle Terminationsstrukturen sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdT₁*_Glycin-Betain-Transporter, *trxB₂*_Thioredoxin-Reduktase, *trxA₂*_Thioredoxin *grdC₂*_57 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *grdD₂*_48 kDa-Untereinheit des Protein C der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase. Durch die Arbeiten von Steiner (2004) wurde das von LÜBBERS und ANDREESEN (1993) beschriebene Gencluster II und das von WAGNER *et al.* (1999) beschriebene Gencluster V verknüpft. Die vollständige Sequenz dieses Genclusters ist unter der *accession number* Y17145 in der EMBL-Datenbank eingetragen.

A.VII. Sequenz eines neuen Ausschnittes des Creatin-Reduktase-spezifischen Gencluster VI-5'-Bereich

1 CATTTCGGAT GTGGAAAAGG AAAAAGAGGA TAGGGCGGGC TCGAAATCCT GCAAAATCAA
 GTAAAGGCTA CACCTTTTCC TTTTCTCTCT ATCCCGCCCG AGCTTTAGGA CGTTTTAGTT

61 CAAATATAAT TTTTTTGAAT GAAAACGATT TCTTGGCATA AGAATTGCTT ATATACATGT
 GTTTATATTA AAAAACTTA CTTTTGCTAA AGAACCGTAT TCTTAACGAA TATATGTACA

121 TAAACAGATA ACAAATGTT GGCAAGGGCG AGGAGGTGAA TCTATAGCAG AAATGCAATT
 ATTTGTCTAT TGTTTTACAA CCGTTCCCGC TCCTCCACTT AGATATCGTC TTTACGTTAA

181 AAATCAATTT CAGGGGAAAA TATTTGGAAC ATACAAGAAA GGCTTTAAAA TACGAGGAGG
 TTTAGTTAAA GTCCCTTTT ATAAACCTTG TATGTTCTTT CCGAAATTTT ATGCTCCTCC
grdG₂

241 TGTGCGTTAT GCGTCTTGAA CTTGGAAAAA TAAAAATAAC TGATGTTTCCAG TTTGGCGAAA
 ACACGCAA M R L E L G K I K I T D V Q F G E

301 AAACAAAGGT TGAGAATGGA ACGCTTTATG TAAATAAGAA AGAGCTAGTC GACATTGCAA
 K T K V E N G T L Y V N K K E L V D I A

361 TGAAAGATGA CCGCATACTG AGTGTGAATA TAGAACTCGC AAGGCCGGGA GAATCTGTAA
 M K D D R I L S V N I E L A R P G E S V

421 GGATAGCTCC TGTAAGGAT GTAATCGAGC CCAGAGTCAA GGTGGATGGG TCGGGAGGCA
 R I A P V K D V I E P R V K V D G S G G

481 TGTTCCCGGG GATGATAAGC AAGGTGAAAA CAGTTGGTTC GGAAGGACT CATGCTCTTG
 M F P G M I S K V K T V G S G R T H A L

541 TTGGGGCAGC GGTGCTGACT TGTGGAAGCA TAGTGGGATT CCAGGAAGGA ATAATAGATA
 V G A A V L T C G S I V G F Q E G I I D

601 TGTCAGGCC GGCAGCCAAG TACACGCCTT TTTCCGAAAC ATTCAACGTG TCGTAGTAA
 M S G P A A K Y T P F S E T F N V C V V

661 TCGAGCCTAA GGAAGGTCTT GAGACACATG CGTATGAAGA GGCGGCTAGA ATGGCAGGAC
 I E P K E G L E T H A Y E E A A R M A G

721 TCAAAATAGG AACATTTGTA GGAGAAGCGG GAAGACATGT TGAGCCTGAT GAGGTTGTCC
 L K I G T F V G E A G R H V E P D E V V

781 TATATGAAAC TAAGCCGCTT CTGGAGCAAG TGGCACAATA TCCAGATCTT CCAAAGGTGG
 V Y E T K P L L E Q V A Q Y P D L P K V

841 GTTACATCCA TATGCTCCAG TCGCAGGGAT TGCTTCATGA TACTTACTAT TACGGAGTGG
 G Y I H M L Q S Q G L L H D T Y Y Y G V

901 ACGCAAAGCA AATGGTTCCT ACATTCATGT ACCCAACCGA AATAATGGAC GGGGCAATTA
 D A K Q M V P T F M Y P T E I M D G A I

961 CAAGCGGAAA CTGCGTTGCT CCATGCGACA AGGTTACGAC ATTCCACCAT TTGAACAATC
 T S G N C V A P C D K V T T F H H L N N

1021 CGGTCATAGA GGACCTCTAT AAGAGACATG GAAAGGACAT CAACTTCATA GGCGTTATCT
 P V I E D L Y K R H G K D I N F I G V I

1081 TGACTAATGA GAATGTATTC TTGGCAGACA AGGAAAGATC TTCGACATG GTTGGGAAAT
 L T N E N V F L A D K E R S S D M V G K

1141 TCGTAGAATT CCTGGGCCTT GATGGTGTCC TGATCACTGA AGAAGGCTAT GGAAACCCTG
 F V E F L G L D G V L I T E E G Y G N P

1201 ATACTGACCT TATGATGAAC TGCAAAAAAG CTACGGATGC AGGAGCTAGT GTTGTACTTA
 D T D L M M N C K K A T D A G A S V V L

1261 TAACTGACGA ATTCCCAGGC AGAGATGGAA AGTCCCAGTC GCTTGCAGAT GCTGTACTG
 I T D E F P G R D G K S Q S L A D A V T

1321 AGGCGGATGC GCTTGTATCA TGCGGTCAGG GTAATTTGAT AATAGAATTT CCTCCTATGG
 E A D A L V S C G Q G N L I I E F P P M

1381 ACAAGATAAT AGGAACTTTA GACTACATTG AACTATGAT AGGCGGATAC GAGGGAAGCT
 D K I I G T L D Y I E T M I G G Y E G S

1441 TGAGGCCTGA CGGAAGCATT GAGGCGGAGC TTCAAATAGT GATAGCCTCG ACAATTGCAA
 L R P D G S I E A E L Q I V I A S T I A

1501 ATGGATACAA CAACTGGCA GCCAGAACTT ATTAAGAGGG GTGAGAAATC ***grdF₂*** **ATGAGAAAAC**
 N G Y N K L A A R T Y - M R K

1561 TAAAGGTAGT TCATTATATA AACAACTTTT TCGCTGGAGT AGGGGGAGAA GAAAAGGCGG
 L K V V H Y I N N F F A G V G G E E K A

1621 ACATACCTCC AGATGTGAGA GAAGAGGCTG TGGGACCAGG AATGGCCCTT AATGCTGCAT
 D I P P D V R E E A V G P G M A L N A A

1681 TCAATGGAGA GGCTGAGGTT GTGGCCACAG TGGTCTGCGG CGACACATAC TACGGTGAGA
 F N G E A E V V A T V V C G D T Y Y G E

1741 ACATGGAAGA TGCAAAGGCA AAAATACTTG AAATGATAAA AAAATATAAT CCCGATCTAT
 N M E D A K A K I L E M I K K Y N P D L

1801 TTGTTGCAGG GCCGGCATT C AATGCCGGAA GATACGGAGT TGCTTGTGGA TCTATTGCAA
 F V A G P A F N A G R Y G V A C G S I A

1861 AGGCCGTGGA GGATGAGCTG GGAATTCCTG TAGTAAGCGC CATGTACAAG GAGAACCCGG
 K A V E D E L G I P V V S A M Y K E N P

1921 GCACAGACAT GTATAAAAAG GACATACACA TAATTGAAAC TGAAATTTCA GCGGCTGACA
 G T D M Y K K D I H I I E T E I S A A D

1981 TGAGAAATGC TGTTCCAAAG CTTGCACGGC TCGGGCTTAA GCTTGCAAAG GGTGAGGAAA
 M R N A V P K L A R L G L K L A K G E E

2041 TAGGGTCTCC GCAAGAAGAA GGTATCATG TCAGGGGAAT AAGAGTCAAC TATTTCAATG
 I G S P Q E E G Y H V R G I R V N Y F N

2101 AAAAGAGAGC TTCAGAAAGA GGCATTGATA TGCTTGTAAG AAAGATGAAG GGCGAGGAGT
 E K R A S E R G I D M L V K K M K G E E

2161 TCATCACAGA ATACCCAATG CCGGTGTTTG ACCGCGTACC TCCGAATCCG GCAGTAAAGG
 F I T E Y P M P V F D R V P P N P A V K

2221 ATATATCAAA GGTCAAGATA GCCATTGACA CTTCAGGCGG AATTGTTCCG CAAGGAAATC
 D I S K V K I A I D T S G G I V P Q G N

2281 CTGACAGGAT TGAATCGTCA AGTGCCACAA AGTACGGCAT ATATTATATT TCAGCCATGG
 P D R I E S S S A T K Y G I Y Y I S A M

2341 ATTCGCTGGG AGCGGGCAGA TTCATGACTA TACACGGCGG GTATCAACGA CGTTTGTAC
 D S L G A G R F M T I H G G Y D R R L S

```

2401 AGAGAACCCC CAATCTTGTA GTGCCTCTTG ATGTAATGAG GGAAATGGAA AAAGAGGGAA
      Q R T P N L V V P L D V M R E M E K E G
2461 CAATAGGAGA GCTCGCAGAT TATTTTCATAA GCACCACGGG AACAGGCACT TCCGTAGGAA
      T I G E L A D Y F I S T T G T G T S V G
2521 ATGCCAAAGC TTTTCGGAAAA GATTTTTTCAA AGAAATTGCT GGAGGATGGA GTAGGAGCAG
      N A K A F G K D F S K K L L E D G V G A
2581 TTATCCTGAC ATCCACCTGA GGCACATGCA CACGTTGCGG CGCAACGATG GTAAAAGAAA
      V I L T S T U G T C T R C G A T M V K E
2641 TTGAAAGAGT TGGAAATCCG GTGGTTTCATG TTGCTACCGT GGTACCAATA TCCCTTACAA
      I E R V G I P V V H V A T V V P I S L T
2701 TAGGAGCCAA CAGGATTGTC CCTGCTGTGCG GAATCCCATATA TCCGCTTGGC AATCCAAATC
      I G A N R I V P A V G I P Y P L G N P N
2761 TAGGGCCTGA TGGAGATAAA AAGATACGAA GAGCGCTTGT TGAAAAAGCC TTAAGAGCGC
      L G P D G D K K I R R A L V E K A L R A
2821 TTCAAACAGA AGTGAAGAG CAAACTGTAT TTGAGGATTA AAATCACAAT ATAAGCGTAT
      L Q T E V E E Q T V F E D -TTAGTGTTA TATTCGCATA
                                     grdT2
2881 ATAGCAATAG TTTATGAACT GTTTCCTGCA AGAAAATAAT TCTCAGGAGG ATTGCTATGG
      TATCGTTAGC AAATACTTGA CAAAGGACGT TCTTTTATTA AGAGTCCTCC TAACGA M
2941 GCAACTTTTT TGGCAAGATA GATAAACCGG TATTCTGGGT CTCCACAATA CTATCATTGG
      G N F F G K I D K P V F W V S T I L S L

```

Abb. 50: Nukleotidsequenz eines erweiterten Ausschnittes des Creatin-Reduktase-spezifischen Genclusters VI (5'-Bereich) aus *E. acidaminophilum*; Erweiterung zu STEINER (2004) und RUDOLF (2003). Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt und unterstrichen, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Das Selenocystein-Codon ist genau wie die Aminosäure fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdG₂*-Proprotein der 22- und 25 kDa-Untereinheit des Protein B der Sarcosin-Reduktase, *grdF₂*-47 kDa-Untereinheit der Sarcosin-Reduktase, *grdT₂*-Glycin-Betain-Transporter.

A.VIII. Sequenz des neuen Ausschnittes des Creatin-Reduktase-spezifischen Genclusters VI-3'-Bereich

```

grdA4
1 ATGAGTTTGT TTGACGGCAA AAAAGTCATC ATCATCGGTG ACAGAGACGG TATACCAGGT
  M S L F D G K K V I I I G D R D G I P G
61 CCGGCCATGG CAGAATGTCT GAAAGGCACA GGAGCAGAAG TAGTATACTC TGCTACAGAA
  P A M A E C L K G T G A E V V Y S A T E
121 TGCTTTGTCT GAACGGCTGC TGGTGCAATG GACCTAGAGA ATCAGAACAG GGTAAAGAGC
  C F V U T A A G A M D L E N Q N R V K S
181 TTTACTGAGC AGTACGGTGC AGAGAACATG ATAGTTCTTG TTGGTGCAGC AGAAGCTGAA
  F T E Q Y G A E N M I V L V G A A E A E
241 TCAGCAGGAC TAGCTGCAGA GACTGTTACA GCAGGAGACC CTACATTCGC AGGACCACTA
  I S R T S C R D C Y S R R P Y I R R T T

```



```

301 GCAGGAGTCC AGTTGGGACT AAGAGTATTT CACGCGGTTG AGCCAGAATT CAAGGATTCT
    S R S P V G T K S I S R G U A R I Q G F

361 GTAGATGCAG CAGTATACGA TGAGCAAATC GGAATGATGG AGATGGTTCT TGATGTTGAC
    C R C S S I R - A N R N D G D G S - C -

421 TCGATAATAG CTGAAATGAA GTCGATAAGA GAGCAGTTCT GCCAGTTCAA CGACTAGTAA
    S I I A E M K S I R E Q F C Q F N D -ATT

481 ATTTCAAAAA CATGCAAAGG CATGTGCAAA CAAATAGGTG GTTCTTGGAC CACCTATTTG
    TAAAGTTTTT GTACGTTTCC GTACACGTTT GTTTATCCAC CAAGAACCTG GTGGATAAAC

541 TTTTAAGCGC AGCAAAGGGA GACCAAACCTG CATTAGCGCC ACAGAAATAC GTGCAATGTG
    AAAATTGCGC TCGTTTCCCT CTGGTTTGAC GTAATCGCGG TGTCTTTATG CACGTTACAC

601 TGCTGGGAAG GGGGATAACT ATGAAGTTTT GCACTTGAAC TAGAGCATGA AAACCTTAAT
    ACGACCCTTC CCCCTATTGA TACTTCAAAA CGTGAACCTG ATCTCGTACT TTTGGAATTA
                                dadM

661 TTAGAAGATT AAAATTAGCA CTATGAGAGA AAACAAAATA AATTTTTTCAC CAATATTCAA
    AATCTTCTAA TTTTAATCGT GA M R E N K I N F S P I F

721 ATGGATAAGA TATGAAAAGC ATATAATTGA AGAAATAAAA AAGCATGTTC CCAAAAGCTT
    K W I R Y E K H I I E E I K K H V P K S

781 TTCAAGCTAT TGGGAACCAT ATACGGGAGG AGGAGCGCTT CTTTTCGATA TACAGCATAA
    F S S Y W E P Y T G G G A L L F D I Q H

841 GAGATCGGTG ATAAATGTTT GCGATGAAGA GCTCTACAAC ATATACAGGG TAATAAGAGA
    K R S V I N V C D E E L Y N I Y R V I R

901 TGATGTCAAT GCTCTTATAG AAGAGCTCAA AAAACATAAA AATGAAAAAG AATACTACTA
    D D V N A L I E E L K K H K N E K E Y Y

961 TGAGCTCAGA GATATGGATA CTGCCGGAAT GAGCTCTGTT GAAAATGCGG CAAGGAACAT
    Y E L R D M D T A G M S S V E N A A R N

1021 ATACCTTAAC AAGACCTGCT TTAACGGTTT TTTCAGAAAA AGTGAAAGCG GACAATTTGA
    I Y L N K T C F N G F F R K S E S G Q F

1081 TGTTCCTTTT GGATC
    D V P F G

```

Abb. 51: Nukleotidsequenz eines erweiterten Ausschnittes des Creatin-Reduktase-spezifischen Gencluster VI (3'-Bereich) aus *E. acidaminophilum*; Erweiterung zu STEINER (2004) und RUDOLF (2003). Der nicht-codierende Strang ist in 5'-3'-Richtung, die resultierenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-code jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons dargestellt. Die einzelnen Startcodons sind fett gedruckt und unterstrichen, putative Ribosomen-Bindestellen doppelt unterstreichen. Die intergenen Bereiche sind doppelsträngig dargestellt. Das Selenocystein-Codon ist genau wie die Aminosäure fett gedruckt und doppelt unterstrichen. Die dargestellten Gene codieren für folgende Proteine: *grdA_* Selenoprotein A der Glycin, Sarcosin und Betain-Reduktase, *dadM_* Adenin spezifische DNA-Methylase.

A.IX. β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli*-SU202 und *E. coli*-SU101 Stämme

A.IX.1. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP1 α -Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten

Tab. 15: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme

pMSP1 α + ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	75	(\pm 11)	144	(\pm 30)	113	(\pm 21)
pDPP1 β	251	(\pm 41)	248	(\pm 17)	332	(\pm 26)
pDPP2	147	(\pm 28)	122	(\pm 18)	155	(\pm 9)
pDPP4	262	(\pm 30)	329	(\pm 38)	296	(\pm 35)
pDPPrpU	268	(\pm 16)	246	(\pm 19)	241	(\pm 18)
pDPGrdA	197	(\pm 36)	192	(\pm 53)	170	(\pm 22)
pDPTR	316	(\pm 66)	301	(\pm 22)	329	(\pm 20)
pDPTrx	153	(\pm 24)	185	(\pm 55)	207	(\pm 41)
pDPP1 α β	215	(\pm 47)	274	(\pm 41)	264	(\pm 29)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSP1 α und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

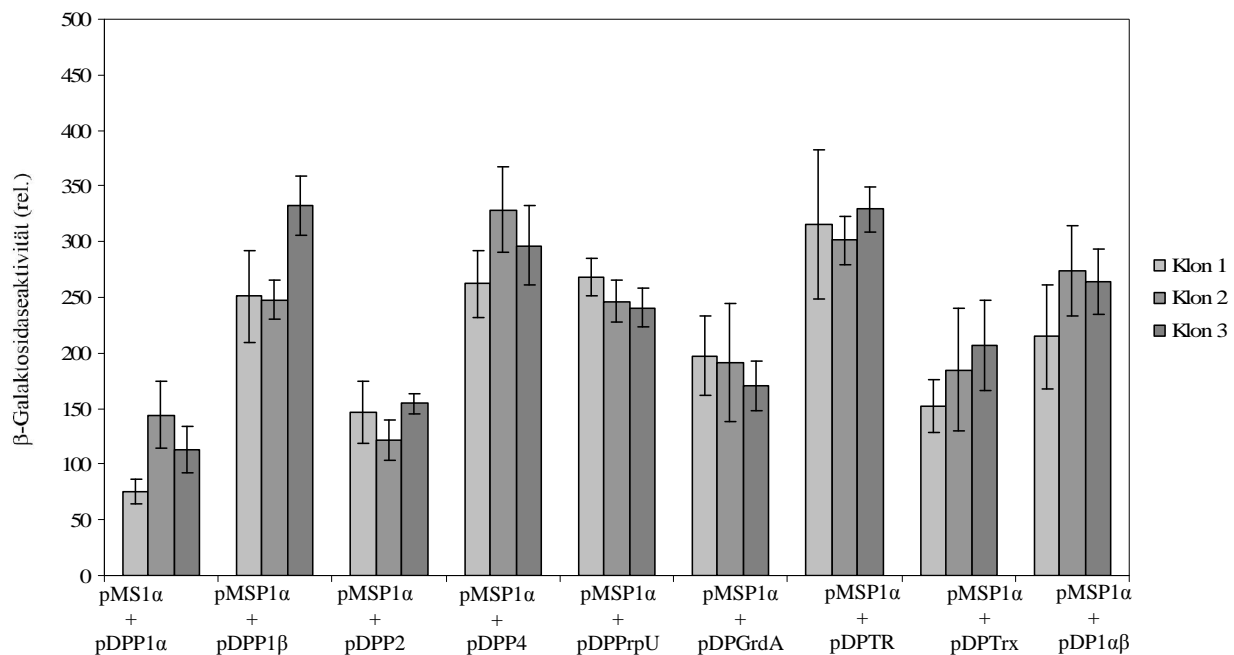


Abb. 52: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSP1 α kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.2. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP1 β -Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 16: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSP1 β + ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	19	(\pm 11)	15	(\pm 7)	9	(\pm 5)
pDPP1 β	116	(\pm 38)	149	(\pm 1)	133	(\pm 30)
pDPP2	166	(\pm 7)	264	(\pm 34)	231	(\pm 20)
pDPP4	250	(\pm 38)	294	(\pm 52)	373	(\pm 52)
pDPPrpU	413	(\pm 34)	373	(\pm 45)	325	(\pm 55)
pDPGrdA	252	(\pm 39)	151	(\pm 16)	284	(\pm 52)
pDPTR	149	(\pm 1)	308	(\pm 55)	290	(\pm 31)
pDPTrx	252	(\pm 45)	254	(\pm 48)	326	(\pm 11)
pDPP1 $\alpha\beta$	55	(\pm 33)	65	(\pm 26)	51	(\pm 12)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSP1 β und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

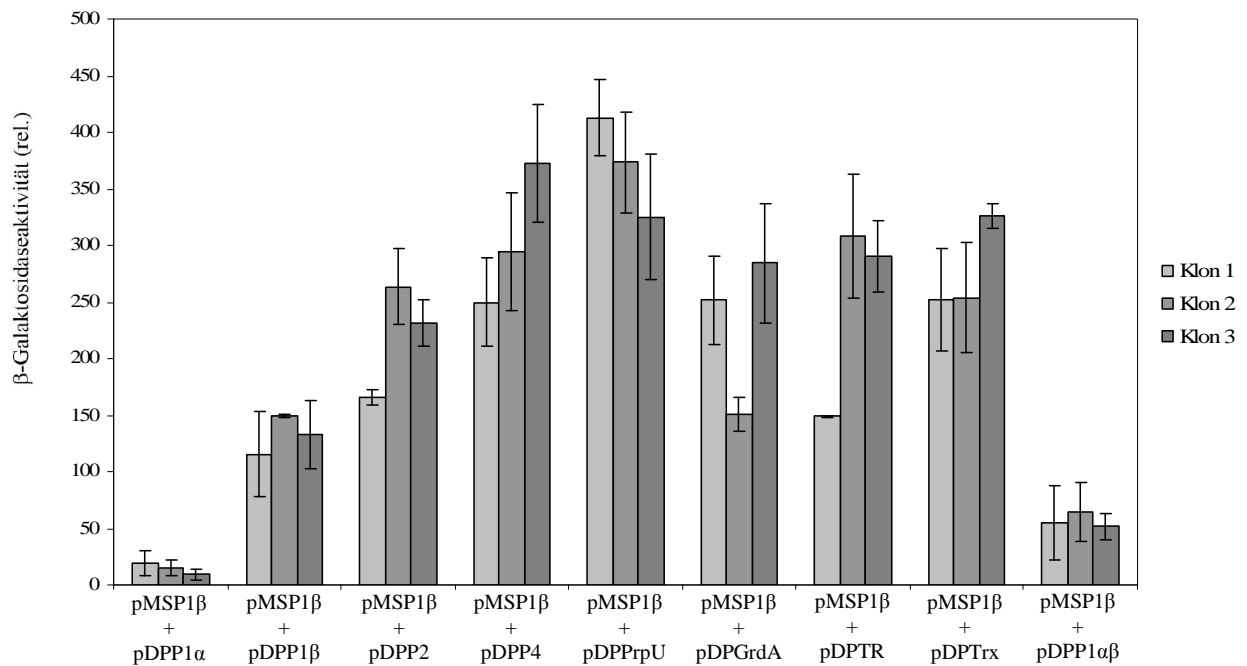


Abb. 53: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSP1 β kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.3. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP2-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 17: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSP2+ ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	136	(\pm 46)	148	(\pm 29)	120	(\pm 32)
pDPP1 β	149	(\pm 11)	138	(\pm 7)	182	(\pm 30)
pDPP2	83	(\pm 9)	56	(\pm 20)	57	(\pm 15)
pDPP4	217	(\pm 23)	243	(\pm 26)	142	(\pm 10)
pDPPrpU	81	(\pm 39)	43	(\pm 10)	85	(\pm 12)
pDPGrdA	100	(\pm 59)	64	(\pm 15)	96	(\pm 29)
pDPTR	242	(\pm 21)	275	(\pm 15)	200	(\pm 5)
pDPTrx	101	(\pm 39)	120	(\pm 40)	91	(\pm 19)
pDPP1 $\alpha\beta$	305	(\pm 17)	223	(\pm 43)	139	(\pm 21)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSP2 und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

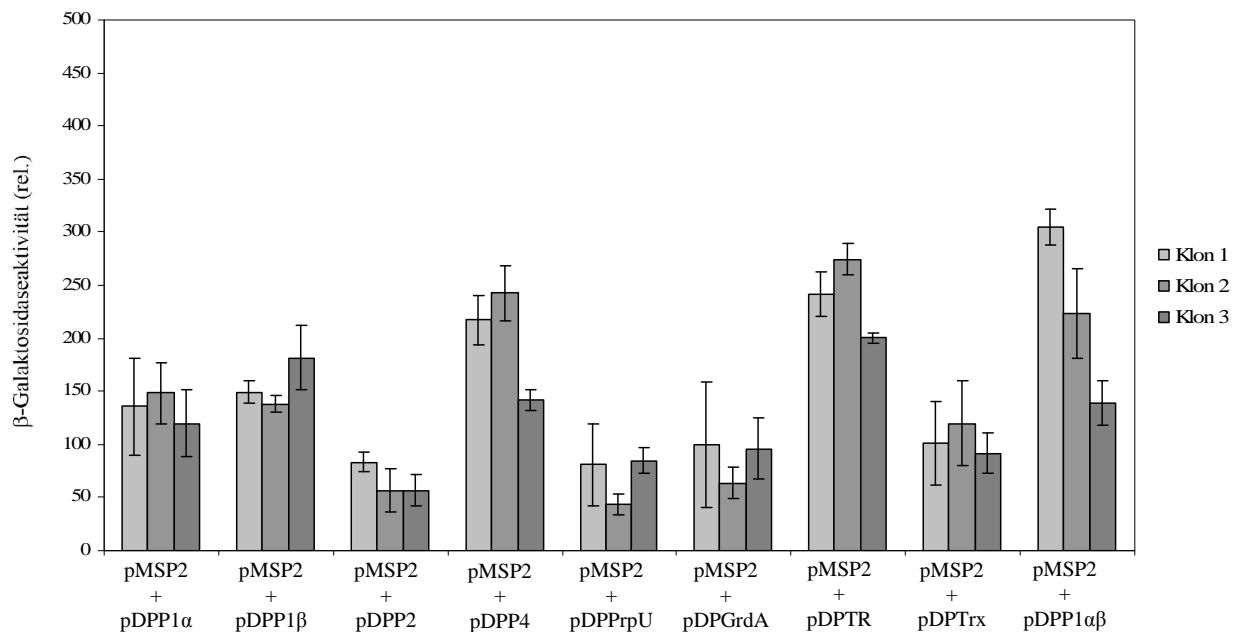


Abb. 54: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSP2 kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.4. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP4-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 18: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSP4 ⁺ ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	136	(\pm 46)	148	(\pm 29)	120	(\pm 32)
pDPP1 β	149	(\pm 11)	138	(\pm 7)	182	(\pm 30)
pDPP2	83	(\pm 9)	56	(\pm 20)	57	(\pm 15)
pDPP4	217	(\pm 23)	243	(\pm 26)	142	(\pm 10)
pDPPrpU	81	(\pm 39)	43	(\pm 10)	85	(\pm 12)
pDPGrdA	100	(\pm 59)	64	(\pm 15)	96	(\pm 29)
pDPTR	242	(\pm 21)	275	(\pm 15)	200	(\pm 5)
pDPTrx	101	(\pm 39)	120	(\pm 40)	91	(\pm 19)
pDPP1 $\alpha\beta$	305	(\pm 17)	223	(\pm 43)	139	(\pm 21)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSP4 und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

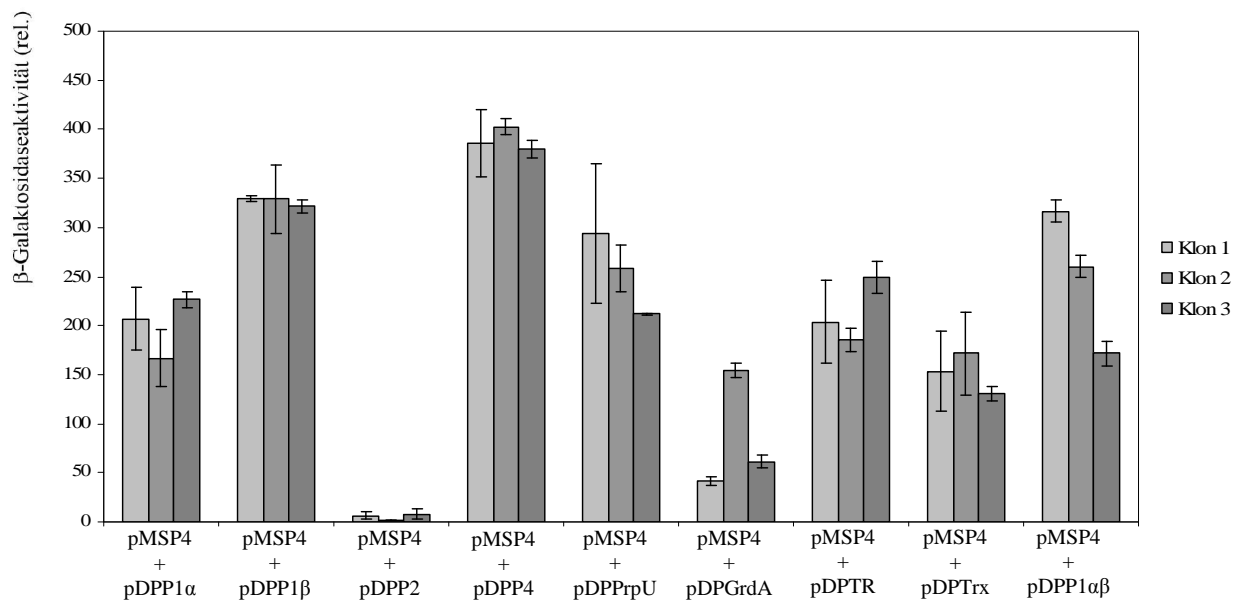


Abb. 55: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSP4 kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.5. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSGrdA-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 19: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSGrdA ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	244	(\pm 55)	179	(\pm 14)	178	(\pm 24)
pDPP1 β	335	(\pm 15)	324	(\pm 9)	396	(\pm 17)
pDPP2	300	(\pm 32)	174	(\pm 13)	139	(\pm 9)
pDPP4	197	(\pm 22)	312	(\pm 29)	197	(\pm 5)
pDPPrpU	147	(\pm 31)	245	(\pm 18)	257	(\pm 21)
pDPGrdA	119	(\pm 34)	155	(\pm 4)	199	(\pm 489)
pDPTR	298	(\pm 6)	274	(\pm 34)	303	(\pm 46)
pDPTrx	152	(\pm 29)	139	(\pm 36)	93	(\pm 15)
pDPP1 $\alpha\beta$	310	(\pm 22)	368	(\pm 10)	305	(\pm 37)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSGrdA und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

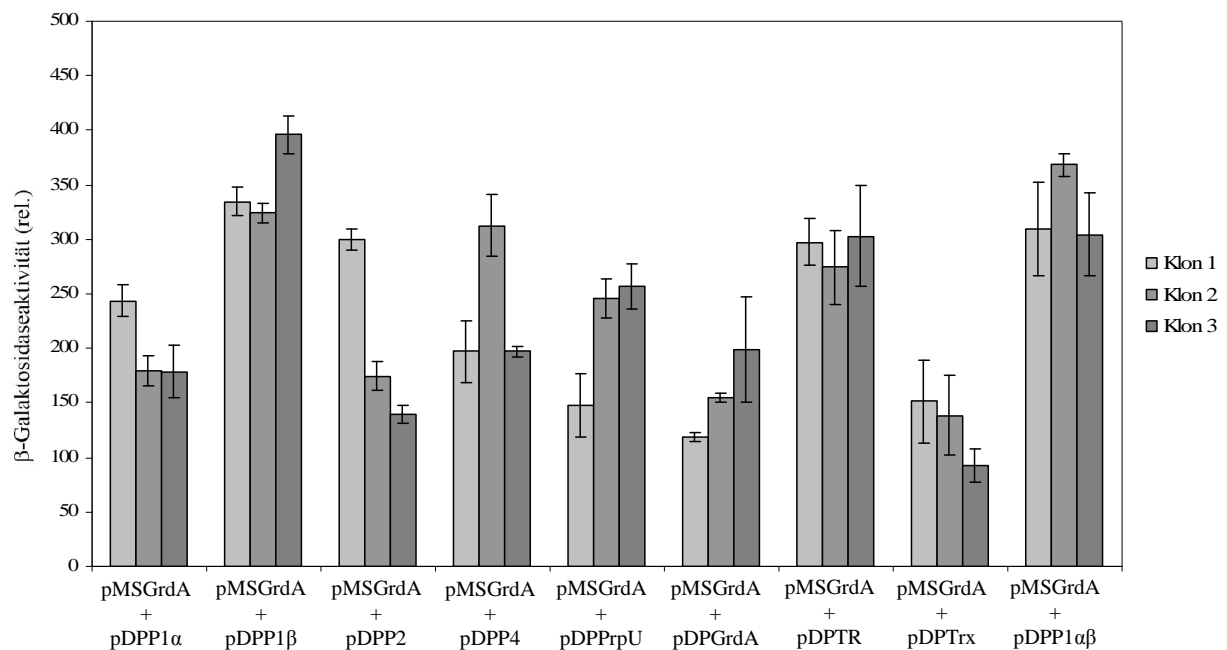


Abb. 56: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSGrdA kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.6. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSTR-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 20: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSTR+ ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	272	(\pm 7)	293	(\pm 19)	274	(\pm 369)
pDPP1 β	351	(\pm 65)	363	(\pm 26)	441	(\pm 35)
pDPP2	231	(\pm 20)	163	(\pm 15)	268	(\pm 33)
pDPP4	188	(\pm 19)	326	(\pm 59)	370	(\pm 60)
pDPPrpU	294	(\pm 20)	335	(\pm 18)	286	(\pm 539)
pDPGrdA	235	(\pm 21)	262	(\pm 12)	105	(\pm 22)
pDPTR	400	(\pm 43)	327	(\pm 43)	299	(\pm 38)
pDPTrx	180	(\pm 29)	150	(\pm 42)	145	(\pm 38)
pDPP1 $\alpha\beta$	367	(\pm 12)	329	(\pm 27)	326	(\pm 37)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSTR und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

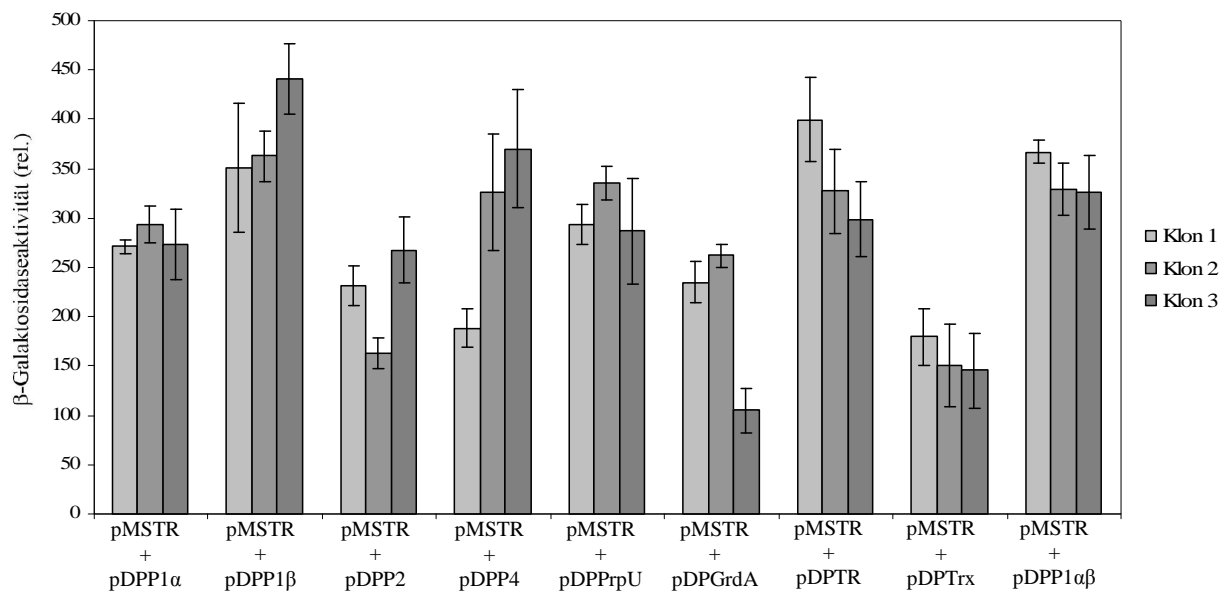


Abb. 57: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSTR kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.7. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSTrx-Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 21: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSTrx+ ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	191	(\pm 12)	86	(\pm 32)	187	(\pm 29)
pDPP1 β	313	(\pm 21)	340	(\pm 43)	369	(\pm 34)
pDPP2	86	(\pm 4)	67	(\pm 1)	129	(\pm 24)
pDPP4	326	(\pm 24)	228	(\pm 27)	345	(\pm 25)
pDPPrpU	173	(\pm 33)	80	(\pm 17)	124	(\pm 4)
pDPGrdA	84	(\pm 22)	82	(\pm 26)	146	(\pm 11)
pDPTR	288	(\pm 5)	321	(\pm 25)	334	(\pm 18)
pDPTrx	109	(\pm 14)	131	(\pm 14)	114	(\pm 8)
pDPP1 $\alpha\beta$	319	(\pm 37)	263	(\pm 24)	344	(\pm 36)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSTrx und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

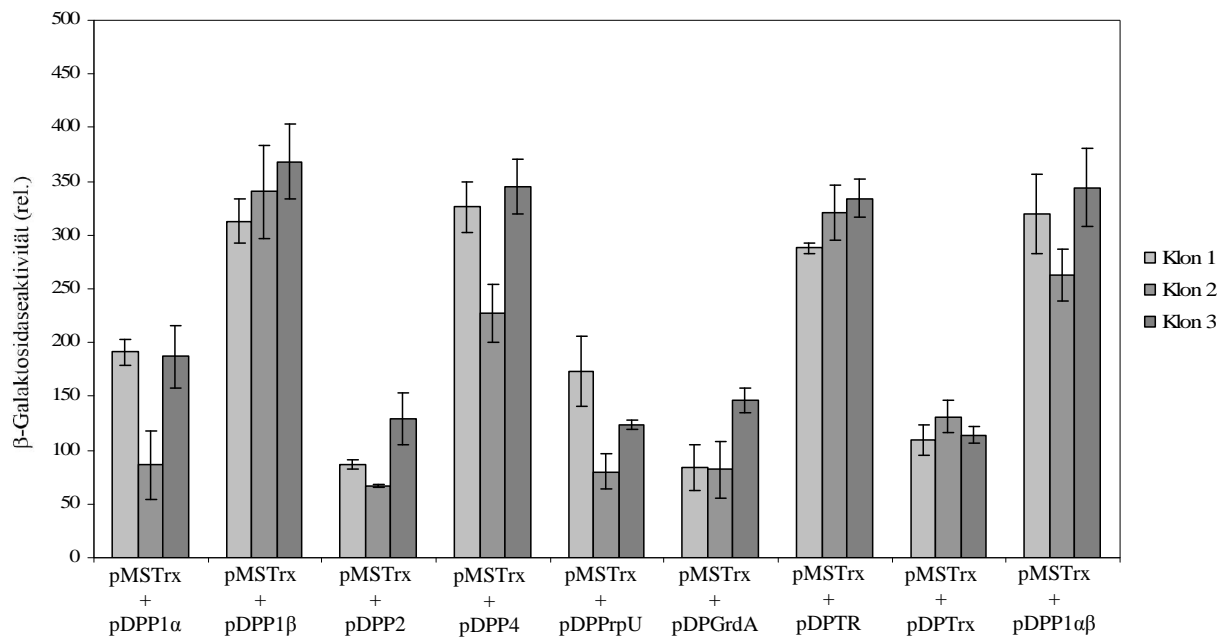


Abb. 58: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSTrx kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.8. β -Galactosidase-Aktivitäten des pMSP1 $\alpha\beta$ -Derivates in Kombination mit allen pDP804-Derivaten**Tab. 22: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

pMSP1 $\alpha\beta$ + ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	353	(\pm 30)	172	(\pm 6)	395	(\pm 27)
pDPP1 β	375	(\pm 45)	381	(\pm 56)	436	(\pm 11)
pDPP2	233	(\pm 13)	274	(\pm 43)	241	(\pm 23)
pDPP4	378	(\pm 45)	330	(\pm 9)	353	(\pm 18)
pDPPrpU	296	(\pm 30)	357	(\pm 2)	343	(\pm 18)
pDPGrdA	297	(\pm 27)	283	(\pm 15)	304	(\pm 16)
pDPTR	426	(\pm 31)	341	(\pm 26)	358	(\pm 23)
pDPTrx	368	(\pm 12)	335	(\pm 4)	327	(\pm 45)
pDPP1 $\alpha\beta$	372	(\pm 23)	321	(\pm 5)	329	(\pm 49)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils das Plasmid pMSP1 $\alpha\beta$ und eins der neun aufgeführten pDP804-Derivate

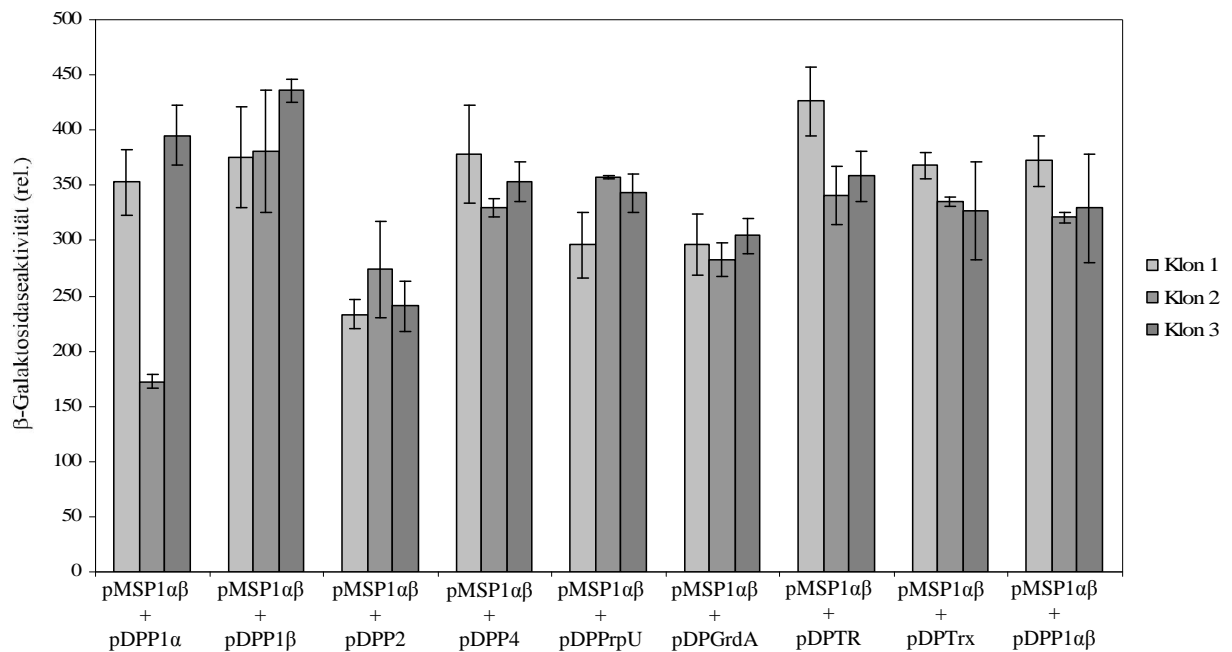


Abb. 59: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die das Plasmid pMSP1 $\alpha\beta$ kombiniert mit allen pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.9. β -Galactosidase-Aktivitäten der pMSP604-Derivate im Stamm *E. coli*-SU202**Tab. 23: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

Stamm <i>E. coli</i> -SU202 ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
MSP1 α	382	(\pm 91)	410	(\pm 26)	395	(\pm 39)
MSP1 β	483	(\pm 16)	461	(\pm 77)	410	(\pm 48)
MSP2	219	(\pm 47)	406	(\pm 33)	392	(\pm 72)
MSP4	254	(\pm 39)	363	(\pm 23)	290	(\pm 3)
MSPPrpU	401	(\pm 55)	395	(\pm 16)	493	(\pm 29)
MSPGrdA	384	(\pm 7)	209	(\pm 8)	398	(\pm 51)
MSPTR	196	(\pm 13)	278	(\pm 16)	389	(\pm 52)
MSPTrx	334	(\pm 42)	237	(\pm 43)	219	(\pm 24)
MSP1 $\alpha\beta$	388	(\pm 15)	367	(\pm 22)	373	(\pm 40)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils ein Plasmid der neun aufgeführten pMS604-Derivate

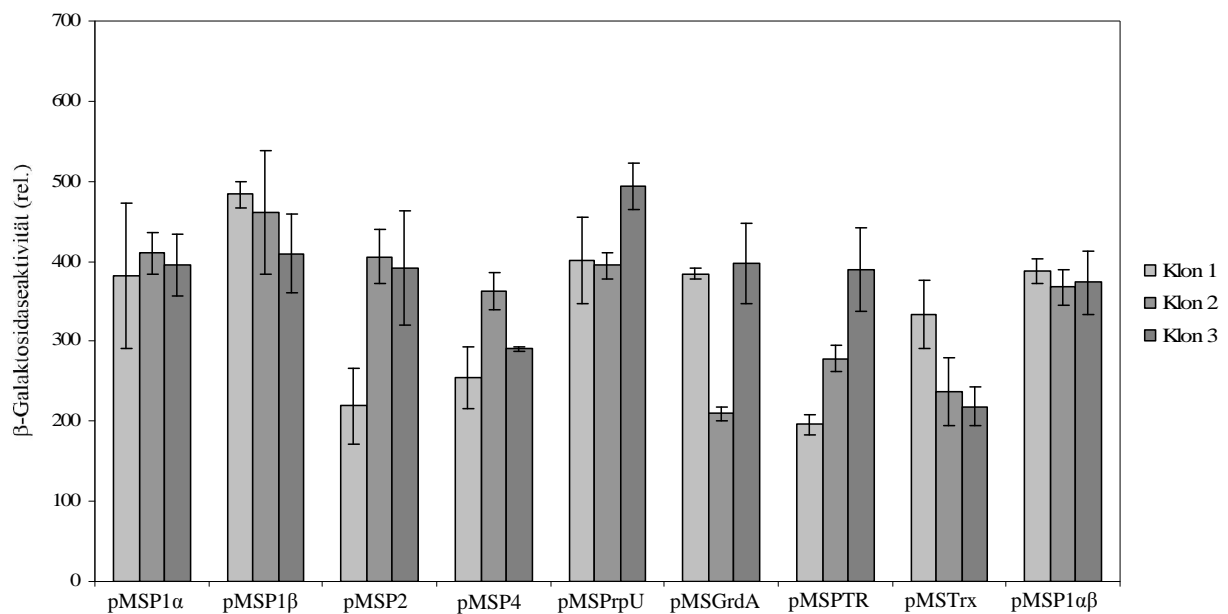


Abb. 60: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU101-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU101-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die jeweils eins der neun pMS604-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.10. β -Galactosidase-Aktivitäten der pDP804-Derivate im Stamm *E. coli*-SU101**Tab. 24: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* –SU101-Stämme**

Stamm <i>E. coli</i> -SU101 ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	551	(\pm 72)	442	(\pm 50)	386	(\pm 70)
pDPP1 β	323	(\pm 28)	446	(\pm 27)	385	(\pm 66)
pDPP2	312	(\pm 32)	436	(\pm 45)	435	(\pm 7)
pDPP4	436	(\pm 47)	418	(\pm 32)	325	(\pm 33)
pDPPrpU	447	(\pm 33)	434	(\pm 17)	427	(\pm 43)
pDPGrdA	450	(\pm 12)	384	(\pm 45)	450	(\pm 12)
pDPTR	333	(\pm 27)	383	(\pm 22)	398	(\pm 31)
pDPTrx	338	(\pm 14)	390	(\pm 52)	480	(\pm 51)
pDPP1 $\alpha\beta$	500	(\pm 28)	447	(\pm 59)	465	(\pm 10)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils ein Plasmid der neun aufgeführten pDP804-Derivate

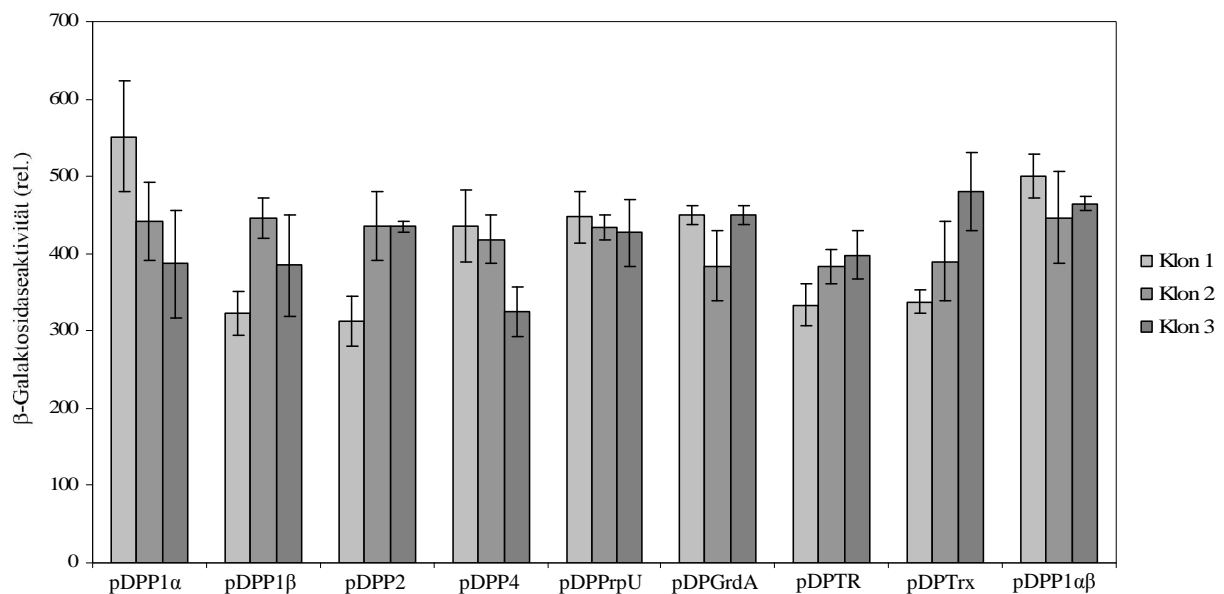


Abb. 61: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU101-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU101-Reporterstämmen (Klon 1, 2 und 3), die jeweils eins der neun pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.11. β -Galactosidase-Aktivitäten der pDP804-Derivate im Stamm *E. coli*-SU202**Tab. 25: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* -SU202-Stämme**

Stamm <i>E. coli</i> -SU202 ²	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
pDPP1 α	415	(\pm 24)	372	(\pm 21)	373	(\pm 29)
pDPP1 β	513	(\pm 1)	441	(\pm 32)	486	(\pm 39)
pDPP2	439	(\pm 58)	272	(\pm 36)	459	(\pm 23)
pDPP4	234	(\pm 16)	280	(\pm 10)	444	(\pm 28)
pDPPrpU	419	(\pm 24)	462	(\pm 37)	480	(\pm 56)
pDPGrdA	437	(\pm 40)	471	(\pm 48)	449	(\pm 12)
pDPTR	481	(\pm 56)	238	(\pm 44)	409	(\pm 62)
pDPTrx	400	(\pm 29)	445	(\pm 78)	367	(\pm 63)
pDPP1 $\alpha\beta$	397	(\pm 44)	373	(\pm 104)	357	(\pm 59)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

² die untersuchten Stämme enthielten jeweils ein Plasmid der neun aufgeführten pDP804-Derivate

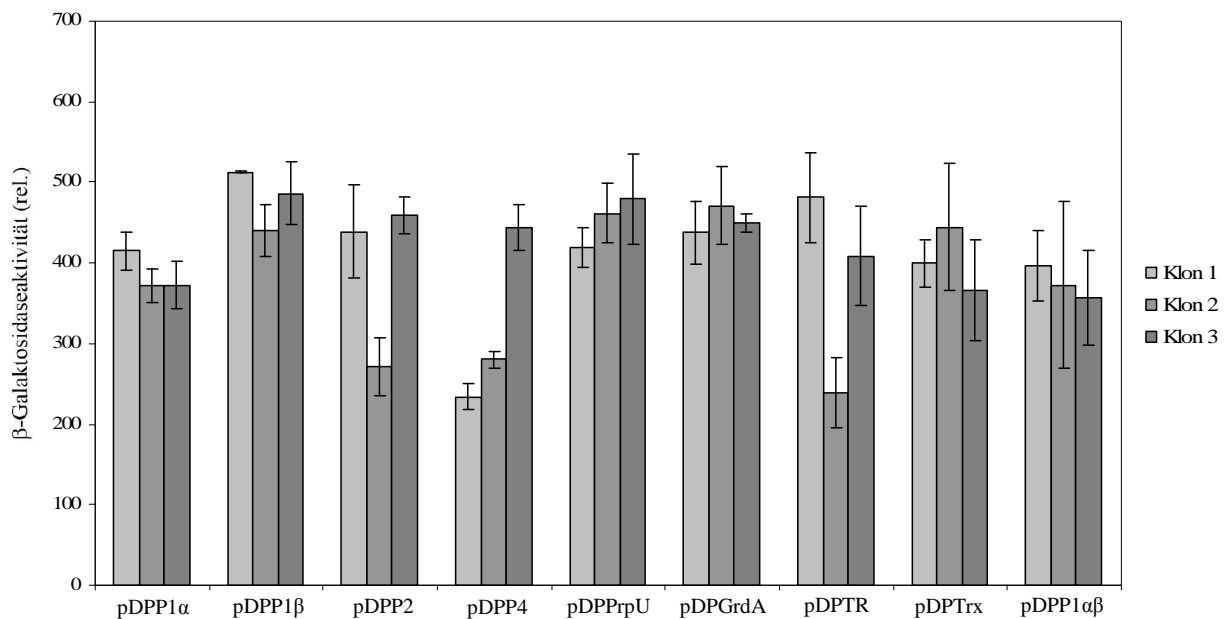


Abb. 62: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), die jeweils eins der neun pDP804-Derivaten tragen. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

A.IX.12. β -Galactosidase-Aktivitäten der Kontrollen**Tab. 26: β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten *E. coli* –SU101 und *E. coli*-SU202-Stämme**

Kontrollen	ermittelte β -Galactosidase-Aktivität (rel.) ¹					
	Klon 1		Klon 2		Klon 3	
<i>E. coli</i> SU101	459	(\pm 13)	461	(\pm 21)	447	(\pm 35)
<i>E. coli</i> SU202	522	(\pm 34)	495	(\pm 24)	519	(\pm 5)
pMS604 + pDP804 in <i>E. coli</i> SU101	3	(\pm 1)	2	(\pm 1)	2	(\pm 1)
pMS604 + pDP804 in <i>E. coli</i> SU202	1	(\pm 0)	1	(\pm 0)	3	(\pm 2)
pMS604 in <i>E. coli</i> SU101	27	(\pm 3)	35	(\pm 8)	21	(\pm 14)
pMS604 in <i>E. coli</i> SU202	495	3(\pm 4)	402	(\pm 85)	522	(\pm 35)
pDP804 in <i>E. coli</i> SU101	342	1(\pm 0)	374	(\pm 44)	333	(\pm 67)
pDP804 in <i>E. coli</i> SU202	337	3(\pm 4)	263	(\pm 17)	168	(\pm 23)

¹ dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Ansätzen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die errechneten Standardabweichungen sind in Klammern dargestellt

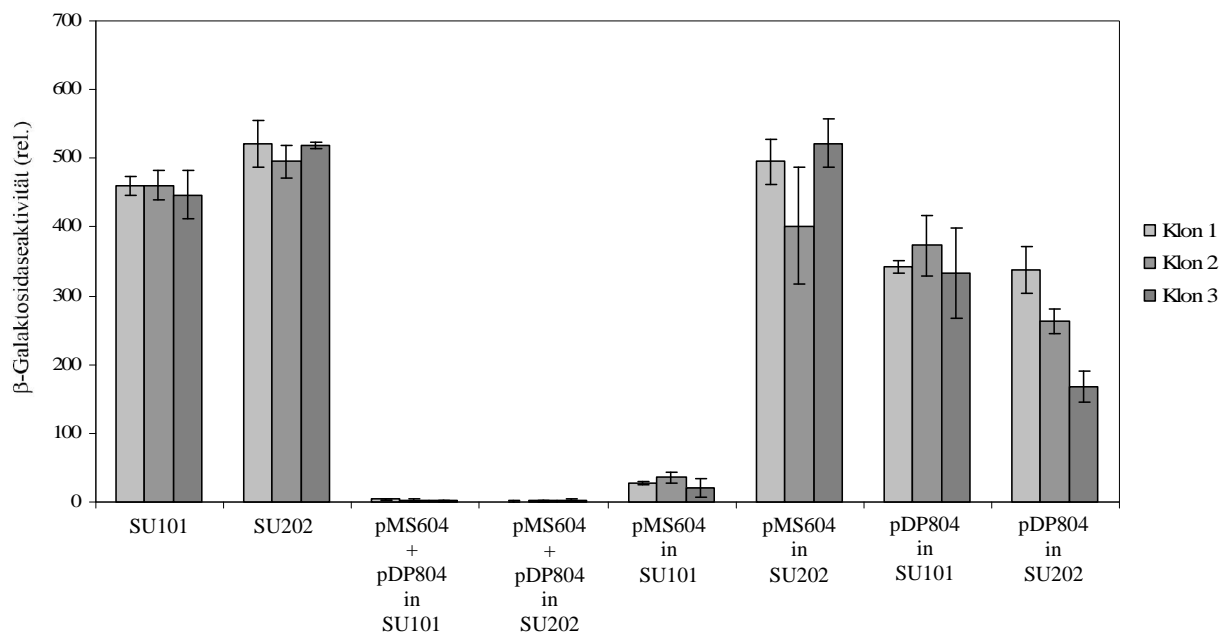


Abb. 63: Relative β -Galactosidase-Aktivitäten der *E. coli*-SU101 und *E. coli*-SU202-Reporterstämme. Dargestellt sind die rel. β -Galactosidase-Aktivitäten von jeweils drei *E. coli*-SU101-Reporterstämme bzw. *E. coli*-SU202-Reporterstämme (Klon 1, 2 und 3), ohne Plasmid, mit jeweils einem der beiden Kontroll-Plasmide (pMS604 bzw. pDP804) oder mit beiden Kontroll-Plasmiden. Die ermittelten Werte ergeben sich jeweils aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt.

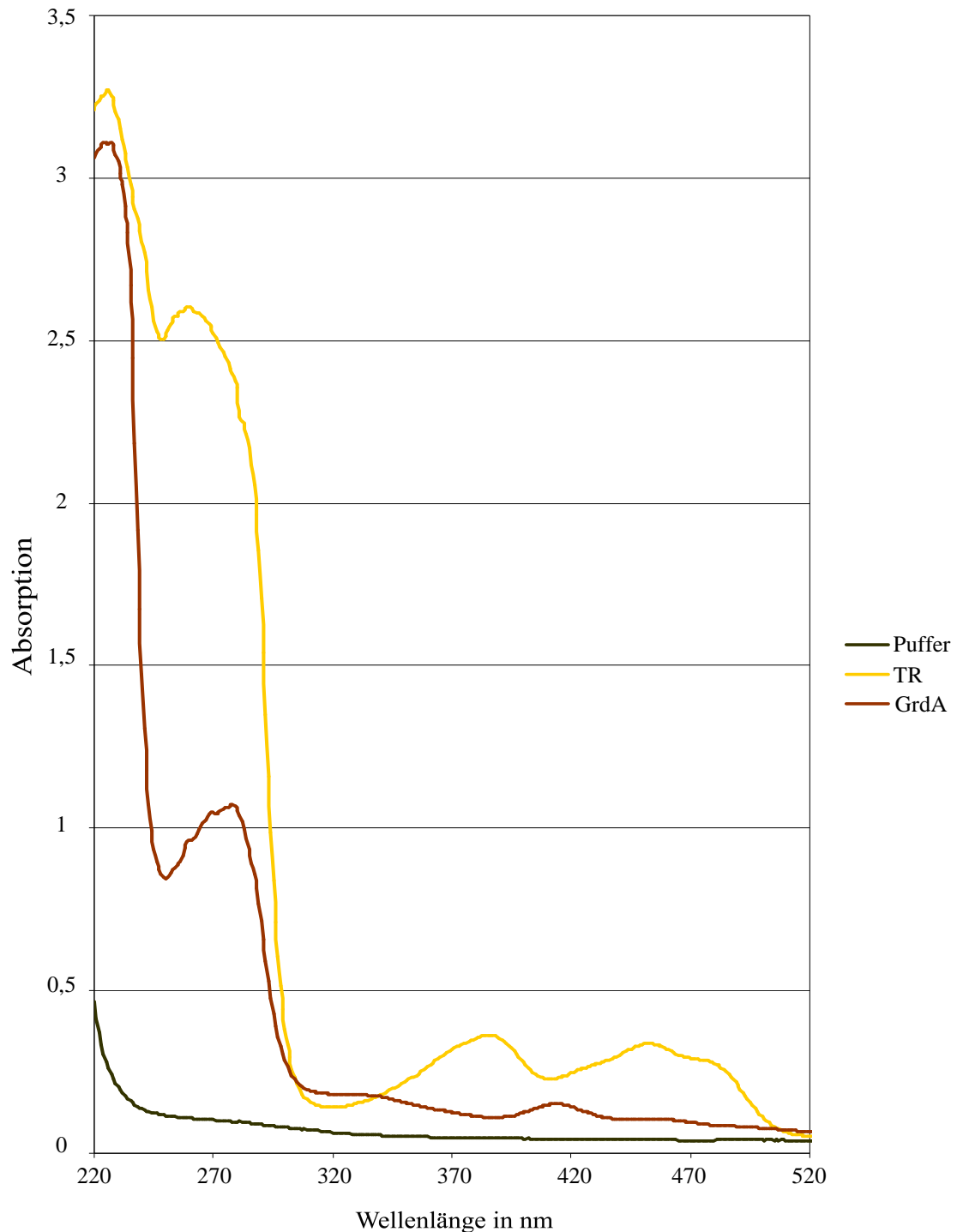
A.X. Absorptionsspektren von heterolog synthetisierter Thioredoxin-Reduktase und von GrdA

Abb. 64: Absorptionsspektren der Thioredoxin-Reduktase und von GrdA. Dargestellt sind die Absorptionsspektren von heterolog synthetisierter und mit *Strep*-tag[®] II-fusionierter Thioredoxin-Reduktase (gelbes Spektrum) und von der Cystein-Variante des heterolog synthetisierten und mit *Strep*-tag[®] II-fusionierten Selenoprotein A (rotes Spektrum). TR_Thioredoxin-Reduktase, GrdA_Selenoprotein A.

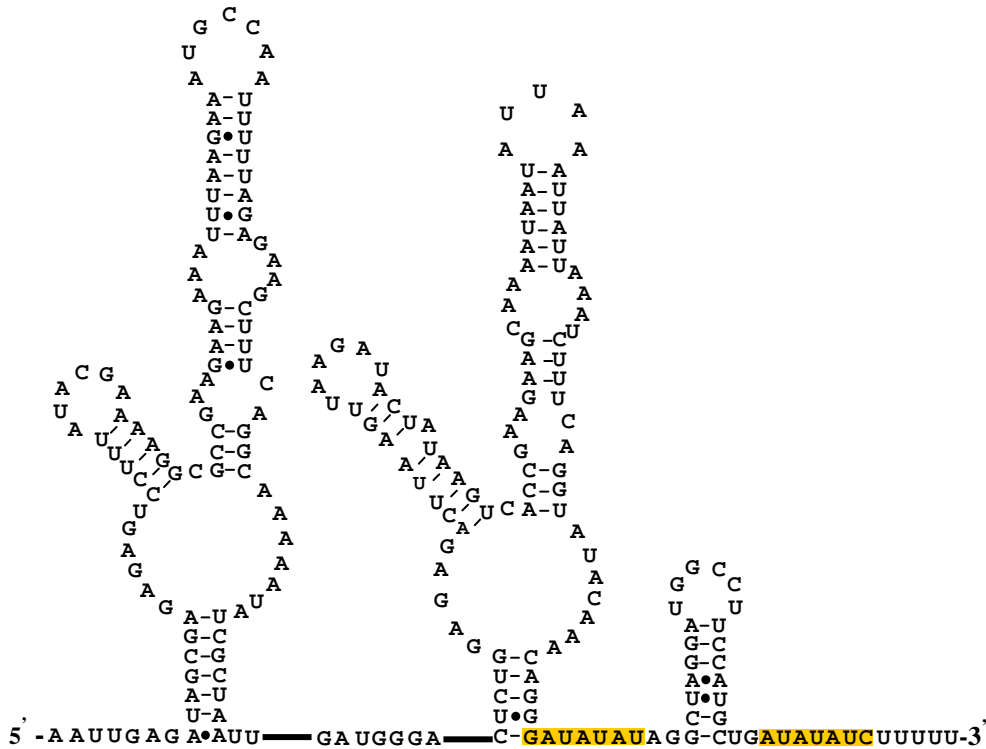
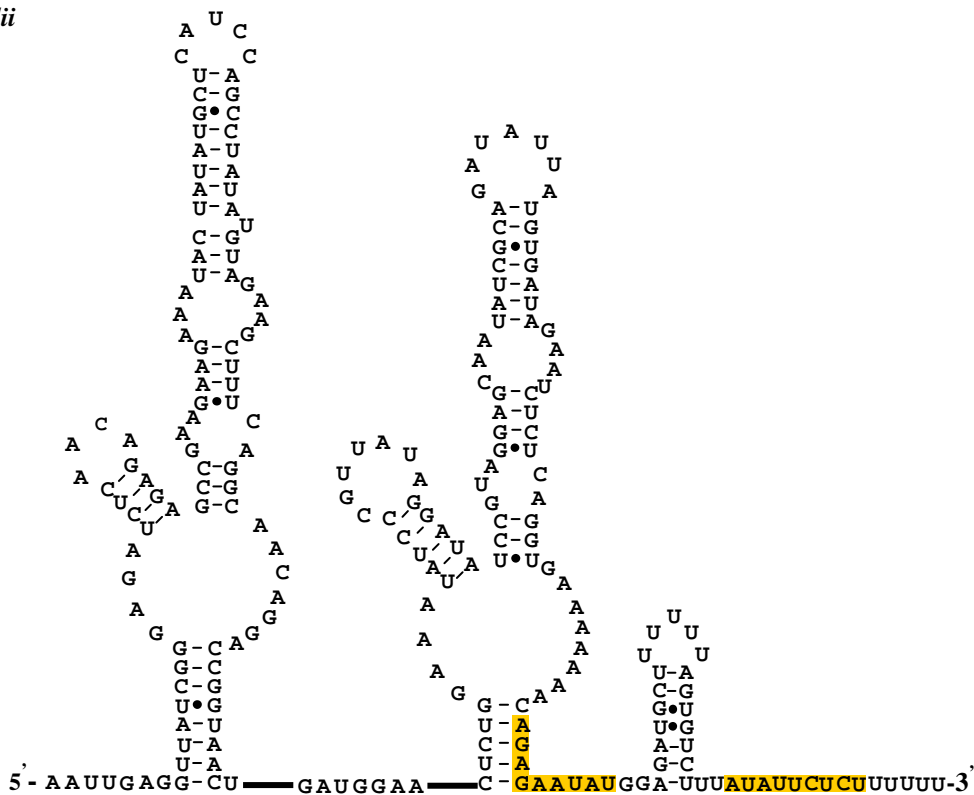
A.XI. mRNA-Sekundärstrukturen des potentiellen Glycin-Riboswitch aus *C. difficile* und *C. sticklandii**C. difficile**C. sticklandii*

Abb. 65: Sekundärstrukturen des Glycin-abhängigen Riboswitches aus *C. difficile* (A) und *C. sticklandii* (B): Die mRNA-Sekundärstruktur potentieller Glycin-Riboswitches aus *C. difficile* (A) und *C. sticklandii* (B) wurden dargestellt. Die orange unterlegten Nukleotide repräsentieren die intrinsische Terminatorstruktur, die sich bei Formation des Aptamer II durch Bindung von Glycin nicht ausbilden kann.

Danksagung

Als erstes geht mein Dank an Prof. Dr. J. R. Andreesen für die Überlassung des interessanten Themas, seine Betreuung, sein stetiges Interesse, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen auch in sehr schwierigen Situationen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Prof. Dr. G. R. Sawers für seine Unterstützung, seine Hilfe und vor allem für die Finanzierung der letzten Versuche, die ich sonst nur sehr schwer hätte verwirklichen können.

Ein besonders großer Dank geht an Anke, die für mich die ganze Zeit eine sehr sehr große Stütze war und sehr oft mehr als ein offenes Ohr für mich hatte

Bei Kathrin möchte ich mich ebenfalls sehr bedanken, sie hatte immer eine Antwort auf meine vielen Fragen und sie stand mir immer mit sehr hilfreichen Tipps und Vorschlägen zur Seite.

Seit ich 1999 das erste Praktikum im Labor 211 absolvierte, erwartete mich dort immer eine sehr angenehme und nette, wenn auch z. T. feucht-fröhliche Arbeitsatmosphäre die die vielen kleinen und großen Rückschläge erträglicher machten. Dafür danke ich allen Mitgliedern dieses Labors: Martin Kohlstock, Jana Jäger, Tina und Daniel Gröbe, Juliane Viezens, Olli Döring, Diana Steiner, Kristin Wahl, Claudi Doberenz (chronologische Reihenfolge). Ein besonderer Dank geht hierbei an Torsten für manch hilfreichen Tipp und vor allem für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an Frau Claudia Hammerschmidt für die Übernahme von kleinen und großen Aufgaben und ihr ständig offenes Ohr für laborinterne und -externe Probleme.

Barbara möchte ich für die Zusammenarbeit danken.

Frau Ute Lindenstrauß danke ich für die zahlreichen Sequenzierungen.

Dank auch an Herrn Dr. Thomas Brüser für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Dank an alle bisher nicht erwähnten Mitglieder des Institutes.

Vielen Dank auch an Jana und Wenke.

Des Weiteren möchte ich Jana Rudolf für ihre Freundschaft danken.

Danke auch an alle bisher nicht erwähnten Freunde, wie z. B. Sandra, Eva und Katja.

Der größte Dank aber geht an meine Familie, hier vor allem an meine Eltern, die mich die ganzen 11 Jahre hier in Halle immer unterstützt haben und mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben.

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 17. 06. 2008

Anja Poehlein

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anja Poehlein
Geburtsdatum	26.09.1978
Geburtsort	Halle / Saale
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsweg

Dezember 2007	Anfertigung der vorliegenden Promotionsschrift
März 2003 Dezember 2007	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jan R. Andreesen) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; praktische Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
Jan. 2003	Abschluss der Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie zum Thema „Klonierung und Analyse der Gene der Glycin-Decarboxylase aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i> “ (Prädikat Sehr Gut) unter Betreuung von Prof. Dr. Jan R. Andreesen
Dez. 2001-Feb. 2002	Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Immunologie (Gesamtprädikat: Gut)
Juli- Aug. 2000	Praktikum bei der Invitek GmbH Berlin mit dem Thema Expression und Reinigung rekombinater Proteine
1997-2003	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1991-1997	Gymnasium Egeln (Abschluss: Abitur)
1985-1991	Grund- und Sekundarschule Westeregeln

Halle, den 17.06.2008

