

Protein C von *Eubacterium acidaminophilum*:

Sequenzanalyse und Funktion der Thiole von GrdD für die Freisetzung von  
Acetylphosphat



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Ulf-Martin Kohlstock

geb. 23. September 1969

in Eberswalde-Finow

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen

2. Prof. Dr. W. Buckel

3. Prof. Dr. P. Dürre

verteidigt am 9. April 2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Organismen und Vektoren</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i></b>	<b>7</b>
2.2.1. Vollmedium für die Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen	7
2.2.2. Zellanzucht	7
2.2.3. Messung des Bakterienwachstums	8
<b>2.3. Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>8</b>
2.3.1. Isolierung von Nukleinsäuren	8
<b>2.4. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>9</b>
2.4.1. Auftrennung und Dokumentation von Nukleinsäuren	9
2.4.2. Größenbestimmung von Nukleinsäuren	9
2.4.3. Konzentrationsbestimmung von DNA	9
2.4.4. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	9
2.4.5. Reinigung von PCR-Produkten	10
2.4.6. Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	10
2.4.7. Phenolextraktion und Fällung von Nukleinsäuren	10
2.4.8. Übertragung von DNA in <i>Escherichia coli</i>	10
<b>2.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren</b>	<b>11</b>
2.5.1. Herstellung von Digoxigenin markierten DNA-Sonden	11
2.5.2. Southern-Blot (Southern, 1975)	12
2.5.3. Dot-Blot	13
2.5.4. Koloniehybridisierung	13
2.5.5. Detektion von Hybridisierungssignalen	13
2.5.6. Wiederverwendung von Nylonmembranen	14
<b>2.6. DNA-Sequenzierung</b>	<b>14</b>
2.6.1. DNA-Sequenzierung am A.L.F. <sup>TM</sup> -Sequencer	14
2.6.2. DNA-Sequenzierung am ABI-Sequencer 377	15
<b>2.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</b>	<b>15</b>
2.7.1. Standardmäßig eingesetzte PCR	15
2.7.2. Overlap extension-PCR	15
<b>2.8. Proteinchemische Methoden</b>	<b>17</b>
2.8.1. Proteinbestimmung (Bradford, 1976)	17
2.8.2. Bestimmung der Enzymaktivität	17
2.8.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE )	19
2.8.4. Anfärben von Proteinen	19
2.8.5. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen	20
2.8.6. Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen	20
2.8.7. Chemische Modifikation von GrdD	20
2.8.8. Massenspektrometrie	21
<b>2.9. Spektroskopische Methoden</b>	<b>22</b>

<b>2.10. Zink-Analytik</b>	<b>22</b>
<b>2.11. Heterologe Protein-Expression</b>	<b>22</b>
2.11.1. Zellanzucht, Induktion der Genexpression und Zellernte	22
2.11.2. Native Reinigung von <i>Strep</i> -tag-Fusionsprotein	22
<b>2.12. Geräte und Chemikalien sowie Firmen</b>	<b>22</b>
<b>3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Klonierung von <i>grdD1</i> aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i></b>	<b>25</b>
<b>3.2. Auswertung der Sequenzdaten</b>	<b>27</b>
3.2.1. Genanordnung	27
3.2.2. Transkriptions- und Translationssignale	28
<b>3.3. Versuche zur Klonierung von <i>grdD2</i></b>	<b>29</b>
<b>3.4. Vergleich der Sequenzen von GrdC und GrdD aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i></b>	<b>33</b>
3.4.1. Sequenzen von GrdC und GrdD anderer Organismen	33
3.4.2. Vergleich der Sequenzen von GrdC	34
3.4.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen von GrdD	37
3.4.4. Vergleich der Aminosäuresequenz der großen Untereinheit GrdC von Protein C mit Sequenzen der Datenbanken	38
3.4.5. Vergleich der Sequenz von GrdD mit Datenbanken	41
3.4.6. Sequenzvergleich von OrfU	41
<b>3.5. Heterologe Hybridisierung von chromosomaler DNA aus <i>Clostridium litorale</i></b>	<b>45</b>
<b>3.6. Klonierung von <i>grdC</i> und <i>grdD</i> in Vektoren zur heterologen Proteinexpression</b>	<b>46</b>
3.6.1. Klonierung von <i>grdD</i> in pQE30 in <i>Escherichia coli</i> M15 (pRep4)	47
3.6.2. Klonierung von <i>grdD</i> und <i>grdC</i> zur Expression als <i>Strep</i> -tag-Fusionsproteine	47
<b>3.7. In vitro-Mutagenese von <i>grdD1</i></b>	<b>48</b>
<b>3.8. Heterologe Expression der rekombinanten Untereinheiten von Protein C in <i>Escherichia coli</i></b>	<b>50</b>
3.8.1. Reinigung von GrdD als N-terminales 6xHis-tag -Fusionsprotein	50
3.8.2. Heterologe Expression von GrdD als <i>Strep</i> -tag-Fusionsprotein	53
3.8.3. Reinigung von GrdC als <i>Strep</i> -tag-Fusionsprotein	56
3.8.4. Enzymaktivität der Untereinheiten GrdD in Gegenwart von GrdC	58
3.8.5. Enzymaktivität von GrdD-Mutanten	58
<b>3.9. Analyse des Zink-Gehalts in GrdC</b>	<b>60</b>
<b>3.10. Untersuchungen zur Markierung des katalytisch aktiven Cysteins in GrdD</b>	<b>61</b>
3.10.1. Untersuchungen zum Substratschutz durch Acetylphosphat und zur Inaktivierung von GrdD durch Jodacetat	61
3.10.2. Weiterführung der Ansätze durch Markierung von GrdD mit 4-Vinylpyridin und Analyse der proteolytischen Spaltungsprodukte	63
3.10.3. Untersuchung der modifizierten Proteine und der Mutante GrdD C359→A durch CD-Spektroskopie	66
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>4.1. Protein C der Glycin-Reduktase</b>	<b>69</b>
<b>4.2. Klonierung von <i>grdD</i> aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i></b>	<b>69</b>
<b>4.3. Vergleich der funktionellen Genorganisation der Glycin-Reduktase und Proteine aus verschiedenen Organismen</b>	<b>71</b>

4.4. Der Sequenzvergleich der Untereinheit GrdD	74
4.5. Sequenzvergleich der Untereinheit GrdC	77
4.6. Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Untereinheiten von Protein C nach heterologer Expression in <i>Escherichia coli</i>	81
4.7. Die Rolle von Zink im Katalysemechanismus von Protein C	84
4.8. Nachweis der katalytisch aktiven Thiol-Gruppe an GrdD	88
4.9. Hypothetischer Mechanismus für die Katalyse von Protein C	91
4.10. orfU aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i> und <i>Clostridium difficile</i>	93
5. ZUSAMMENFASSUNG	96
6. LITERATURVERZEICHNIS	97

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcP	Acetylphosphat
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
Ähnl.	Ähnlichkeit
AP-	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Bet	Betain (N,N,N-Trimethylglycin)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Ct.</i>	<i>Carboxydotherrnus</i>
ca.	circa
CD	Cirkulardichronismus
CoA	Coenzym A
d	Schichtdicke
Da	Dalton
deg x cm <sup>2</sup> x dnmol	Einheit der molaren Eliptizität
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DIG	Digoxigenin
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
ε	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E.</i>	<i>Eubacterium, Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EB	Elutionspuffer
Endkonz.	Endkonzentration
Fa.	Firma
F	Farad
FAD	Flavinadenindinucleotid
g	Gramm
h	Stunden
HABA	4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HPLC	“High-performance liquid chromatography”
Ident.	Identität
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
J	Joule
k-	kilo- (10 <sup>3</sup> )
kb	kilobasen
K <sub>M</sub>	Michelis-Konstante
l	Liter
λ	Lambda (Wellenlänge)
M	Molar
M-	mega- (10 <sup>6</sup> )

-m	-meter
m-	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$ -	micro- ( $10^{-6}$ )
min	Minute(n)
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
m/z	Massenzahl
N	normal
n-	nano- ( $10^{-9}$ )
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat) reduziert
OD	Optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
s.	siehe
Sar	Sarkosin (N-Methyl-Glycin)
SDS	Natriumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
theoret.	theoretisch
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>T.</i>	<i>Tissierella, Treponema</i>
u. a.	unter anderem
U	Units (Einheit für die Enzymaktivität)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indoyl- $\beta$ -D-galactosid
z. B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

Acetylphosphat ist ein wichtiges energiereiches Stoffwechselintermediat, das jedoch selten durch Substratphosphorylierung entsteht und als Cosubstrat für die Synthese von ATP zur Energiekonservierung dient. Zu den Enzymen, die die Bildung von Acetylphosphat katalysieren, gehören die Phosphotransacetylase (Stadtman, 1955), die Phosphoketolase (Merkler und Retey, 1981) und die Pyruvat-Oxidase (Müller und Schulz, 1993).

Acetylphosphat ist jedoch auch das Produkt der Reduktion der proteinogenen Aminosäure Glycin in einer Stickland-Reaktion, in der die Synthese von Acetylphosphat als letzter Energie konservierender Schritt durch das Protein C der Glycin-Reduktase katalysiert wird (Arkowitz und Abeles, 1989; Schräder und Andreesen, 1992; Stadtman, 1989). Analog zur Coenzym A abhängigen Katalyse der Phosphotransacetylase erfolgt hier die Bildung von Acetylphosphat aus einem an Protein C gebundenen Acetylthioester und freiem Phosphat (Arkowitz und Abeles, 1991).

Zu den Organismen, die diesen Weg der Bildung von Acetylphosphat einschlagen, zählen u. a. *Eubacterium acidaminophilum*, *Clostridium purinolyticum*, *C. litorale*, *C. sticklandii*, *T. creatinophila*, *Peptostreptococcus micros* und *P. magnus* (Andreesen, 1994; Andreesen, 1994; Andreesen *et al.*, 1989; Arkowitz und Abeles, 1989; Dürre und Andreesen, 1982; Dürre und Andreesen, 1983; Harms *et al.*, 1998; Schräder und Andreesen, 1992; Stadtman, 1989).

*E. acidaminophilum*, ein grampositives, obligat anaerobes Bakterium (Zindel *et al.*, 1988), gehört zu den am besten untersuchten Organismen mit einer Stickland-Reaktion, die sowohl Glycin als auch die beiden Glycin-Derivate Betain und Sarkosin reduzieren kann (Andreesen, 1994). In einer Stickland-Reaktion werden zwei Aminosäuren fermentiert, eine wird als Elektronendonator oxidiert und die andere als Elektronenakzeptor reduziert.

*E. acidaminophilum* ist in der Lage, Glycin als alleinige Kohlenstoffquelle sowohl zu reduzieren als auch zu oxidieren. Die Oxidation von Glycin verläuft über die Glycin-Decarboxylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase, N<sup>5</sup>,10-Methenyl-tetrahydrofolat-Cyclohydrolase, N<sup>10</sup>-Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase und die Formiat-Dehydrogenase (Freudenberg und Andreesen, 1989; Freudenberg *et al.*, 1989) zu Kohlendioxid und NAD(P)H+H<sup>+</sup>, dessen Redoxäquivalente anschließend über Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin der Reduktion von Glycin zugeführt werden (Dietrichs *et al.*, 1991). Die beiden methylierten Glycin-Derivate Sarkosin und Betain werden von *E. acidaminophilum* nur als Elektronenakzeptoren genutzt und zu Methylamin bzw. Trimethylamin und Acetylphosphat reduziert (Hormann und Andreesen, 1989). Dafür nötige Redoxäquivalente werden z. B. durch NADPH+H<sup>+</sup> aus der Oxidation von Formiat durch die Formiat-Dehydrogenase über das Thioredoxin-System bereitgestellt (Glanderath, 1993; Zindel *et al.*, 1988).

Die Glycin-, Betain- und Sarkosin-Reduktase bestehen aus drei Proteinkomplexen A, B und C. Protein A und jeweils eine Untereinheit des Substrat-spezifischen Proteins B, PB<sub>Glycin</sub>, PB<sub>Betain</sub> und PB<sub>Sarkosin</sub>, enthalten Selen in Form von Selenocystein (Cone *et al.*, 1976; Wagner *et al.*, 1999). Das Glycin-spezifische Selenoprotein PB<sub>Glycin</sub> und das Sarkosin-spezifische Selenoprotein PB<sub>Sarkosin</sub> bestehen jeweils aus drei Untereinheiten mit Molekülmassen von 47 kDa, 25 kDa und 22 kDa, während das Betain-spezifische PB<sub>Betain</sub> nur aus zwei Untereinheiten der Größen 48 kDa und 45 kDa besteht. Erstaunlicherweise liegen diesen Untereinheiten in allen Fällen zwei Genprodukte zugrunde (Abb. 1). Die 47 kDa-Untereinheiten der Glycin- und Sarkosin-spezifischen und die 45 kDa-Untereinheit des Betain-spezifischen Selenoproteins B, die GrdB, GrdF und GrdH genannt werden (Abb. 1), enthalten das Selenocystein (U) in der mutmaßlich redoxaktiven Sequenz UXXCXXC (Sonntag, 1998; Wagner *et al.*, 1999). Für die 25 kDa-Untereinheiten und 22 kDa-Untereinheiten des Protein B der Glycin- und Sarkosin-Reduktase wurde nach Vergleich von

Peptid-Sequenzen der 25 kDa- und 22 kDa-Untereinheiten mit den Aminosäuresequenzen der Genprodukte von *grdE* und *grdG* eine Entstehung durch autoproteolytische Cysteinolyse der Proproteine GrdE (PB<sub>Glycin</sub>) und GrdG (PB<sub>Sarkosin</sub>) (Wagner *et al.*, 1999) postuliert. *In vitro* wurde diese Spaltung am rekombinanten Proprotein GrdE der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* nach heterologer Expression in *Escherichia coli* nachgewiesen (Bednarski, 1999). PB<sub>Betain</sub> besteht lediglich aus der selenocysteinhaltigen 45 kDa-Untereinheit GrdH und einer 48 kDa-Untereinheit GrdI (Meyer *et al.*, 1995), die nicht Produkte einer Spaltung sind. Dies könnte mit der möglichen unterschiedlichen Art der Substratbindung im Fall von Betain als quartäre Ammoniumverbindung zusammenhängen, die über ionische Wechselwirkung erfolgen könnte (Meyer *et al.*, 1995).

Das universelle Selenoprotein A der Reduktasen aus *E. acidaminophilum* besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa (Lübbers und Andreesen, 1993) und enthält wie die Selenoproteine B Selen in Form von Selenocystein (Cone *et al.*, 1976) in der redoxaktiven Konsensus-Sequenz CXXU (Lübbers und Andreesen, 1993).

Protein C (Abb. 1) der Glycin-, Betain- und Sarkosin-Reduktasen besteht aus zwei Untereinheiten GrdC mit einer apparenten Molekülmasse von 57 kDa und GrdD mit der von 48 kDa (Schräder und Andreesen, 1992).

Die Gene aller Untereinheiten der Substrat-spezifischen Selenoproteine B der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktasen und des Selenoproteins A aus *E. acidaminophilum* wurden kloniert und liegen in mehreren Gensätzen angeordnet chromosomal lokalisiert vor (Lübbers, 1993; Lübbers und Andreesen, 1993; Wagner *et al.*, 1999).

Im folgenden wird der postulierte Mechanismus der Reduktion von Glycin, Betain und Sarkosin dargestellt:

Die Substrate werden durch die spezifischen Selenoproteine B gebunden, wobei die Bindung von Glycin und Sarkosin als Schiffsbasis kovalent an einer Carbonylfunktion der 47 kDa-Untereinheiten erfolgt, während Betain als quartäre Ammoniumverbindung über ionische Wechselwirkungen an die 45 kDa-Untereinheit gebunden sein sollte. Die Rolle der anderen Untereinheiten ist unklar. In Betain verursacht das quartäre Ammoniumion bereits die Polarisierung der C-N-Bindung. In allen drei Substraten (Glycin, Sarkosin und Betain) sollte die C-N-Bindung nach Aktivierung so polarisiert vorliegen, daß ein nucleophiler Angriff des Selenol-Anions zum Carboxymethylselenoether führt.

Im nächsten Schritt erfolgt ein Angriff der Selenol-Gruppe des Selenocysteins an das  $\alpha$ -C-Atom der polarisierten C-N-Bindung, so daß ein Protein B gebundener Carboxymethylselenoether (Abb. 1) unter späterer z. T. hydrolytischen Freisetzung von Ammoniak, Methylamin bzw. Trimethylamin gebildet wird. Ursprünglich wurde dieser Schritt der ersten Selenoether-Bildung erst für die Übertragung auf Selenoprotein A postuliert (Andreesen, 1994; Arkowitz und Abeles, 1990; Garcia und Stadtman, 1991), jedoch ist nach dem Nachweis von Selenocystein in den 47 kDa-Untereinheiten und der 45 kDa-Untereinheit (Sonntag, 1998; Wagner *et al.*, 1999) die Carboxymethylselenoether-Bildung an den Selenoproteinen B sehr wahrscheinlich, zumal eine kovalente Bindung der radioaktiv markierten Substrate Glycin bzw. Sarkosin nach Borhydrid-Behandlung an die entsprechenden Proteine B gezeigt werden konnte (Harms *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1995).

Im nächsten Schritt erfolgt eine Umetherung des Carboxymethyl-Rests von Selenoprotein B auf Selenoprotein A (Arkowitz und Abeles, 1990; Garcia und Stadtman, 1991), das als Überträger des Carboxymethyl-Rests nach Protein C fungiert. Das nach dieser Redoxreaktion an Selenoprotein A vorliegende Selenid-Sulfid wird in der internen Stickland-Reaktion über die Redoxäquivalente von NADPH+H<sup>+</sup> der Oxidation über das Thioredoxin-System (Dietrichs *et al.*, 1990) zur Selenol/Thiol-Gruppe reduziert, so daß es wieder für eine erneute Carboxymethylselenoether-Bindung zur Verfügung steht (Abb. 1).

Der Carboxymethylselenoether an Selenoprotein A ist das Substrat der Katalyse von Protein C, bei der über einen Protein C gebundenen Acetylthioester und freiem Phosphat Acetylphosphat entsteht (Abb. 1).

Das Protein C der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Acetylphosphat wurde als Endprodukt der Reaktion von carboxymethylierten Selenoprotein A, Protein C und freiem Phosphat nachgewiesen (Arkowitz und Abeles, 1989; Schröder und Andreesen, 1992; Stadtman, 1989).

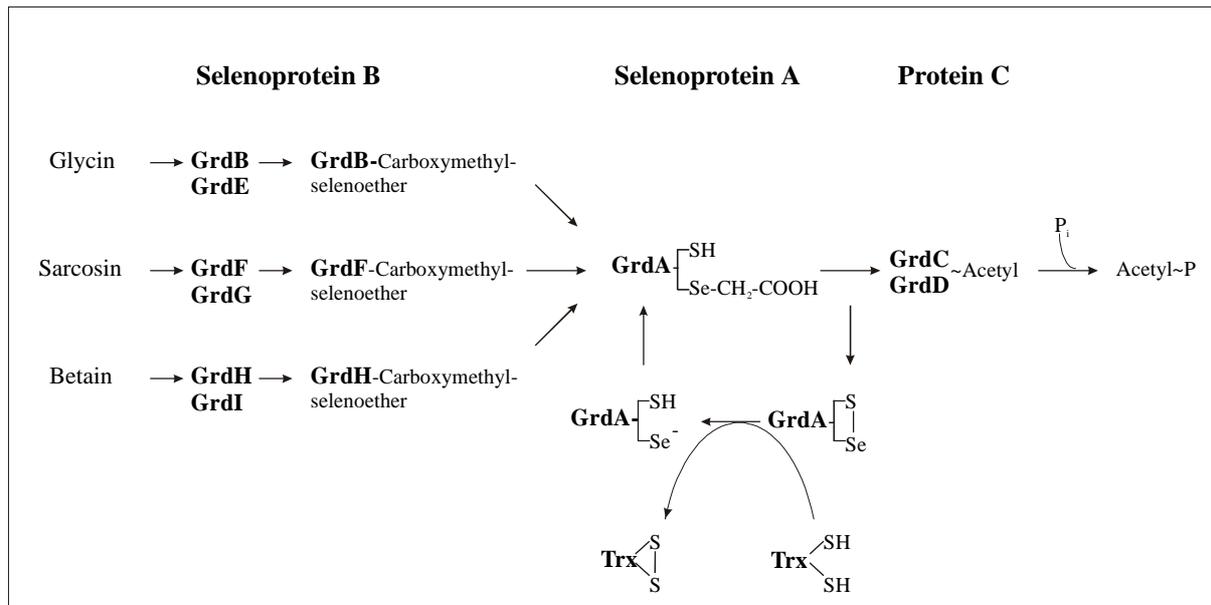
Die Hypothese, nach der vor Bildung von Acetylphosphat die Umwandlung des Carboxymethylselenoether gebunden an Selenoprotein A in einen Acetylthioester an Protein C erfolgt, wurde nach der Isolierung und Charakterisierung eines Acetyl-Protein C-Intermediats (Arkowitz und Abeles, 1991) aufgestellt.

Neben der Bildung von Acetylphosphat katalysiert Protein C aber auch in der rückläufigen Reaktion, die arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat, unter eventueller Bildung eines Acetylthioesters an Protein C zu Acetat, Phosphat und Arsenat. Aus dieser unphysiologischen Rückreaktion wurde ein Enzymtest etabliert, über den die Enzymaktivität von Protein C aus den Organismen *C. sticklandii* (Stadtman, 1989), *E. acidaminophilum* (Schröder und Andreesen, 1992) und *T. creatinophila* (Harms *et al.*, 1998) bestimmt und die Proteine gereinigt wurden. Durch Inkubation mit dem thiole spezifischen Reagenz Jodacetat wird Protein C irreversibel inaktiviert (Stadtman, 1989; Stadtman und Davis, 1991). Die Inaktivierung blieb aus, wenn vor der Inkubation mit Jodacetat das unphysiologische Substrat Acetylphosphat zugegeben wurde. Möglicherweise schützte die Acetylthioesterbildung an einer katalytisch essentiellen Thiol-Gruppe Protein C vor einer irreversiblen Inaktivierung durch Carboxymethylierung (Stadtman und Davis, 1991). Diese Enzymaktivität von Protein C ist  $Mg^{2+}$ -abhängig und wird durch Zugabe reduzierender Agenzien stimuliert (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992; Stadtman, 1989). Acetylphosphat wirkt als Substratinhibitor auf die Enzymaktivität (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992). Das Protein C aller drei Organismen besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Bei der Bestimmung der nativen Molekülmasse im Bereich von 45 bis 400 kDa zeigte sich ein ausgeprägtes Assoziations-Dissoziationsverhalten dieses Proteinkomplexes (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992; Stadtman, 1989).

An welchem Cystein-Rest der beiden Untereinheiten von Protein C die Bildung des Acetylthioesters stattfindet, wurde nicht geklärt.

Nach der Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* wurde postuliert, daß an der 48 kDa-Untereinheit die Bildung des Acetylthioesters und die Freisetzung von Acetylphosphat erfolgt, denn die Untereinheit wurde von der 57 kDa-Untereinheit partiell getrennt gereinigt und war in der Lage, die arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat zu katalysieren (Schröder und Andreesen, 1992). Welche Thiol-Gruppe in der 48 kDa-Untereinheit für die Acetylthioesterbildung in Frage kam, war noch ungeklärt, da beide Kopien des Gens der 48 kDa-Untereinheit *grdD1* und *grdD2* in *E. acidaminophilum* noch unvollständig kloniert stromabwärts der beiden Gene *grdC1* und *grdC2* vorlagen (Lübbers, 1993) und daher die Zahl der Cystein-Reste von GrdD noch unklar war.

Der Transfer des Carboxymethyl-Rests von Selenoprotein A nach GrdD war noch völlig unverstanden. Da es durch die Charakterisierung des Acetyl-Enzym-Intermediats Hinweise auf eine Acetylthioesterbildung an Protein C gab (Arkowitz und Abeles, 1991), mußte es zu einer reductiven Spaltung des an Selenoprotein A gebundenen Carboxymethylselenoethers unter Freisetzung von  $H_2O$  kommen. Dies wäre bei einem möglichen nucleophilen Angriff einer reaktiven Thiol-Gruppe an den Carbonyl-Kohlenstoff und einer primären Acetylthioesterbildung an GrdC unter Freisetzung von  $H_2O$  der Fall. Der Acetyl-Rest könnte durch eine anschließende Transacetylierung auf GrdD übertragen werden, an dem dann die Bildung und Freisetzung von Acetylphosphat erfolgt. Die 57 kDa-Untereinheit konnte in



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Reduktion von Glycin, Sarkosin und Betain, katalysiert durch die Proteine der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase in *E. acidaminophilum*. Dargestellt ist der Carboxymethylselenoether an den Untereinheiten GrdB, GrdF und GrdH der Substrat-spezifischen Proteine B der Reduktase-Komplexe. Anschließend erfolgt die Umetherung auf Selenoprotein A. Der Carboxymethyl-Rest wird nach Protein C transferiert, wo ein energiereiches Acetyl-Protein C-Intermediat an den Untereinheiten sowie oxidiertes Selenoprotein A gebildet wird. Der an Protein C gebundene Acetylthioester wird als Acetylphosphat freigesetzt. Das Selenid-Sulfid an Selenoprotein A wird zu einem Selenol-Thiol durch Redoxäquivalente aus dem Thioredoxin-System überführt. GrdB: selenocysteinhaltige 47 kDa-Untereinheit von Selenoprotein B<sub>Glycin</sub>, GrdE: Proprotein der 25- und 22 kDa-Untereinheiten von Selenoprotein B<sub>Glycin</sub>, GrdF: selenocysteinhaltige 47 kDa-Untereinheit von Selenoprotein B<sub>Sarkosin</sub>, GrdG: Proprotein der 25- und 22 kDa-Untereinheiten von Selenoprotein B<sub>Sarkosin</sub>, GrdH: selenocysteinhaltige 45 kDa-Untereinheit von Selenoprotein B<sub>Betain</sub>, GrdI: 48 kDa-Untereinheit von Selenoprotein B<sub>Betain</sub>, GrdA: Selenoprotein A, GrdC: 57 kDa-Untereinheit von Protein C, GrdD: 48 kDa-Untereinheit von Protein C, Trx: Thioredoxin

bisher durchgeführten Untersuchungen nur unter denaturierenden Bedingungen von der 48 kDa-Untereinheit abgetrennt werden (Harms, 1995), daher ist ihre Rolle noch völlig unklar. Bei der Überführung des Carboxymethyl-Rests von Selenoprotein A in einen Acetylthioester an Protein C wurde die Entstehung eines reaktiven Keten-Intermediats postuliert, welches durch eine von Protein C gebildete hydrophobe Tasche vor einem Angriff durch H<sub>2</sub>O geschützt und anschließend als Acetylthioester an Protein C gebunden wird (Buckel, 1990).

Die Aminosäuresequenz der 57 kDa-Untereinheit GrdC enthält sechs Cystein-Reste, an deren Thiol-Gruppen eine solche Acetylthioesterbildung erfolgen könnte (Lübbers, 1993). Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Kopien des Gens der 57 kDa-Untereinheit *grdC1* und *grdC2* abgeleitet und sind zu 99 % identisch (Lübbers, 1993). *grdC1* wurde mit dem Gensatz I der Glycin-Reduktase kloniert und befand sich stromabwärts von *grdA1*, einer Kopie des Gens von Selenoprotein A. Im Gensatz II der Glycin-Reduktase stromabwärts von *trxA2*, einer Kopie des Gens des Thioredoxins, lag eine zweite Kopie *grdC2* (Lübbers, 1993; Lübbers und Andreesen, 1993).

Am Transfer des Carboxymethyl-Rests nach Protein C, könnte Zn<sup>2+</sup> als Cofaktor beteiligt sein. Eine Beteiligung von Zn<sup>2+</sup>, das bei der Aktivierung des Substrats für einen nucleophilen Angriff eine wesentliche Rolle spielt, ist in Enzymen, die den Transfer von Methyl-Resten aus Methanol und Isoprenoid-Gruppen auf Thiol-Gruppen katalysieren, gezeigt worden (Matthews und Goulding, 1997).

Eine Zielstellung dieser Arbeit war die Identifikation der katalytischen Thiol-Gruppe der Untereinheit GrdD, an der die Freisetzung von Acetylphosphat stattfinden sollte, durch gerichtete Mutagenese bzw. Markierung der Cystein-Reste. Dazu mußte die vollständige Sequenz von *grdD* bekannt sein. Dies war die Voraussetzung für eine getrennte Charakterisierung der beiden Untereinheiten GrdC und GrdD nach heterologer Expression in *E. coli*.

Eine Trennung beider Untereinheiten war ebenso Vorbedingung, um erste Untersuchungen zum  $Zn^{2+}$ -Gehalt in GrdC durchzuführen, als Hinweis auf die Beteiligung von  $Zn^{2+}$  an der Katalyse von Protein C. Die erste vollständig vorliegende Aminosäuresequenz beider Untereinheiten von Protein C ermöglichte weiterhin einen Vergleich mit homologen Proteinen aus anderen Organismen und mit anderen Proteinklassen, um Hinweise auf konservierte Aminosäurereste und Domänen zu erhalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Organismen und Vektoren

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt, die benutzten Vektoren und hergestellten Hybridplasmide wurden in Tab. 2 zusammengefaßt.

**Tab. 1 : Übersicht über verwendete Bakterienstämme**

Bakterienstamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
<i>Eubacterium acidaminophilum</i> DSM 3953	Wildtyp	(Zindel <i>et al.</i> , 1988)
<i>Clostridium litorale</i> DSM 5388	Wildtyp	(Fendrich <i>et al.</i> , 1990)
<i>Escherichia coli</i> XL 2-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB lac<sup>q</sup>ZM15</i> , Tn10 (Tet <sup>r</sup> ), Amy, Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL 1-blue MRF <sup>-</sup>	( <i>mcrA</i> )183, )(mrcCB- <i>hsdSMR-mrr</i> ) 173, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB</i> , <i>lac<sup>q</sup>Z...M15</i> , Tn10(Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4]	<i>nal<sup>S</sup></i> , <i>str<sup>S</sup></i> , <i>rif<sup>S</sup></i> , <i>lac<sup>-</sup></i> , <i>ara<sup>-</sup></i> , <i>gal<sup>-</sup></i> , <i>mtl<sup>-</sup></i> , F <sup>-</sup> , <i>recA<sup>+</sup></i> , <i>uvr<sup>+</sup></i> ,	QIAGEN, Hilden
<i>Escherichia coli</i> Bl21DE3	F <sup>-</sup> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup></i> ) <i>gal</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg

**Tab. 2 Übersicht über Vektoren und Hybridplasmide**

Vektor bzw. Hybridplasmid	Ausgangsplasmid, Fragment, Gen (Mutation)	Referenz
PUC18	Amp <sup>r</sup> , lacPoz <sup>-</sup> *	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
PASK-IBA3	Amp <sup>r</sup> ,	IBA, Göttingen
PASK-IBA5	Amp <sup>r</sup> ,	IBA, Göttingen
PQE-30	Amp <sup>r</sup>	QIAGEN, Hilden
PML10	PUC18::2,8 kb <i>PstI</i> -Fragment	(Lübbers, 1993)
PML11	PUC18::3 kb <i>PstI</i> -Fragment	(Lübbers, 1993)
PMK374	PUC18::4,1 kb <i>MboI</i> -Fragment	diese Arbeit
PMK4641	PUC18::3,2 kb <i>MboI</i> -Fragment	diese Arbeit
PMKD30	PQE30::1,1 kb <i>BamHI/KpnI</i> -Fragment <i>grdD</i>	diese Arbeit
PMKD5	PASK-IBA5::1,1 kb <i>BsaI</i> -Fragment <i>grdD</i>	diese Arbeit
PMKC5	PASK-IBA5::1,5 kb <i>BsaI</i> -Fragment <i>grdC</i> (CCA <sub>9</sub> →CGA <sub>9</sub> )	diese Arbeit
PMK98S	PASK-IBA5::1,1 kb <i>BsaI</i> -Fragment <i>grdD</i> (TGC <sub>294</sub> →AGC <sub>294</sub> )	diese Arbeit

PMK359A	PASK-IBA5::1,1 kb <i>Bsa</i> I-Fragment <i>grdD</i> (TGC <sub>1077</sub> →GCA <sub>1077</sub> )	diese Arbeit
PMKC3	PASK-IBA3::1,5 kb <i>Bsa</i> I-Fragment <i>grdC</i>	diese Arbeit

## 2.2. Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Alle wäßrigen Lösungen und Geräte zur Kultivierung von *Escherichia coli* und zum Arbeiten an der Steril-Box wurden 25 min bei 121 °C autoklaviert bzw. mit Rotisol gespült und anschließend abgeflammt.

Antibiotika und andere Medienzusätze, die laut (Sambrook *et al.*, 1989) nicht autoklavierbar waren, wurden steril filtriert und wurden den Medien nach Abkühlen unter 50 °C hinzugefügt.

### 2.2.1. Vollmedium für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

Peptone von Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	1 l

LB-Agar	LB-Medium	
	Agar	15 g/l

Nährbouillon I (Immumpräparate Berlin):

25 g/l

Nähragar I (Immumpräparate Berlin)

36,5 g/l

**Tab. 3 Medienzusätze**

Medienzusatz	Stammlösung <sup>1</sup>	Konzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O	125 µg/ml
Tetrazyklin	25 mg/ml in 70 % Ethanol	12,5 µg/ml
X-Gal	2 % (w/v) in DMF	48 µg/ml
IPTG	0,1 M IPTG	40 µg/ml

<sup>1</sup> Die Stammlösungen der Medienzusätze wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.2. Zellanzucht

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 30 °C bzw. 37 °C unter Schütteln mit 100 bis 125 Upm auf einem Rundschtüttler (Typ KS 500, Fa. Janke & Kunkel) bzw. auf einem Rundschtüttler (Typ HS 500, Fa. Janke & Kunkel) in LB-Medium mit den entsprechenden Zusätzen. *E. coli*-Klone wurden in LB-Medium unter Zusatz von 20 % Glycerol bei -80 °C eingefroren und gelagert. Nähragarplatten mit Kolonien wurden bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.3. Messung des Bakterienwachstums

Die optische Dichte einer Bakterienkultur wurde in Glasküvetten am Spektralphotometer (Spekoll 11, Fa. Zeiss, Jena) gemessen. Beim Überschreiten einer  $OD_{600/550}$  von 0,5 wurden die Proben mit entsprechendem Nährmedium verdünnt.

## 2.3. Arbeiten mit Nukleinsäuren

Alle Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden mit sterilen Lösungen und Gefäßen durchgeführt.

### 2.3.1. Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.3.1.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus *E. acidaminophilum* bzw. *C. litorale*

Für die Isolierung von Gesamt-DNA (Saito und Miura, 1963) aus *E. acidaminophilum* und *C. litorale* wurden bei -20 °C gelagerte Zellen (3 g) verwendet. Die Zellen wurden in 4 ml Saline-EDTA-Lösung (0,15 M NaCl, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0) suspendiert, mit 6 mg Lysozym versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde bei -20 °C eingefroren und mit 25 ml Tris-SDS-Puffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 1 % SDS, pH 9,0) versetzt. Es erfolgte ein mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Suspension (bis zu 6 x) bis zur vollständigen Zell-Lyse. Je 15 ml der Suspension wurden mit 1 Vol. Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0, Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis (unter gelegentlichem Schütteln) erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 4000 Upm, 4°C) zur groben Phasentrennung. Die Oberphase wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (10 min, 15 000 Upm, 4°C), der resultierende Überstand mit 2,5 Vol. 96 % Ethanol (4 °C) versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Das durch Zentrifugation (15 min, 15 000 Upm, 4 °C) entstandene Nukleinsäure-Pellet wurde in 25 ml 0,1 x SSC gelöst, anschließend mit 2,5 ml 1 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0) sowie 50 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die RNaseA wurde durch Phenolextraktion (Zusatz von 1 Vol. Phenol) entfernt, dabei der Überstand nach Zentrifugation (10 min, 15 000 Upm, 4 °C) mit 2,5 Vol. 96 % Ethanol versetzt und bei -20 °C inkubiert. Das durch Zentrifugation (10 min, 15 000 Upm, 4 °C) entstandene Pellet wurde nacheinander mit eiskalter 70, 80 und 90%iger wäßriger Ethanol-Lösung gewaschen und nach dem Trocknen in 20 ml 0,1 x SSC aufgenommen. Zur weiteren Abtrennung von RNA erfolgte unter Zusatz von 2,2 ml Acetat-EDTA-Lösung eine Fällung mit 0,7 Vol. Isopropanol mit anschließender Zentrifugation (30 min, 15 000 Upm, 20 °C). Das DNA-Pellet wurde erneut mit 70, 80 und 90 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und in 10 ml 0,1 x SSC gelöst. Die Qualität der DNA-Präparation wurde durch Spalten mit Restriktionsendonukleasen überprüft.

#### 2.3.1.2. Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

##### 2.3.1.2.1. Mini- und Midipräparations-Methoden von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

###### **Phenol/Chloroform-Methode**

Zur Isolierung rekombinanter Plasmiden aus *E. coli*-Kulturen von 3 bis 5 ml wurde die Methode nach (Birnboim und Doly, 1979) angewendet.

###### **Plasmidisolierung unter Verwendung des QIAprep Spin Plasmid Kits (QIAGEN, Hilden)**

Zur Gewinnung von qualitativ hochwertiger *E. coli*-DNA für Sequenzierungen wurden 5 ml einer Übernachtskultur entsprechend den Anweisungen des Herstellers präpariert.

### 2.3.1.2.2. Präparative Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurde einmal der QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN, Hilden) bzw. der Plasmid Mini Prep-Kit angewendet und die DNA laut Anleitung des Herstellers präpariert.

## 2.4. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.4.1. Auftrennung und Dokumentation von Nukleinsäuren

#### Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA erfolgte nach (Sambrook *et al.*, 1989) in 1 %igen Agarosegelen.

#### Dokumentation

Zur Dokumentation von Gelen standen einmal ein Videosystem (Image-Master<sup>®</sup>, Fa. Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) sowie ein Video-System (ImageMaster<sup>®</sup>, Pharmacia, Freiburg) zur Verfügung.

### 2.4.2. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die annähernde Länge von DNA konnte durch direktem Vergleich mit elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Markern definierter Fragmentlänge (Marker) bestimmt werden.

#### Eingesetzte DNA-Marker :

$\lambda$ /PstI: 14,055/11,497/5,077/4,749/4,503/2,838/2,459/2,443/2,140/1,986/1,7/1,159/0,805/  
0,514 kb

DNA-Längenstandards VII, Digoxigenin-markiert (Boehringer Mannheim):

8,0/7,1/6,0/4,8/3,5/2,7/1,9/1,85/1,5/1,4/1,15/1,0/0,68/  
0,49/0,37 kb

### 2.4.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Das Abschätzen von DNA-Konzentrationen erfolgte im Vergleich zu DNA definierter Konzentration ( $\lambda$ -DNA, pUC18, M15) im Agarosegel.

### 2.4.4. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurden sie im Agarosegel aufgetrennt und herausgeschnitten. Die Fragmente wurden anschließend unter Verwendung des QIAEX II Gelextraktion Kit bzw. (QIAGEN, Hilden) nach Herstelleranleitung aus dem Gel gereinigt.

### 2.4.5. Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Template und Primer mittels QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) nach Herstellervorschrift gereinigt. Am Ende der Säulenreinigung wurde das PCR-Produkt mittels 50 µl dest. H<sub>2</sub>O bzw. EB-Puffer eluiert.

### 2.4.6. Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

#### DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Die Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen (Fa. MBI Fermentas, ST. Leon-Rot, Biolabs) in 20 bis 300 µl Reaktionsansätzen (Sambrook *et al.*, 1989) und wurden den jeweiligen Versuchsbedingungen angepaßt. Die Spaltungen erfolgten in einem Zeitraum von 2 h bis zu 16 h über Nacht. Die Reaktionsansätze wurden mittels Phenol/Chloroform-Fällung bzw. durch Zugabe von 5x Stopplösung inaktiviert.

#### Dephosphorylierung

Zur Vermeidung von Selbstligation wurde gespaltene Plasmid-DNA mittels 1 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, Fa. MBI Fermentas, ST. Leon-Rot) in einem Reaktionsvolumen von 70 µl 1x CIAP-Puffer dephosphoryliert.

#### Ligation

Die Ligation zwischen DNA-Fragmenten und gespaltener Vektor-DNA erfolgte mittels 1U Ligase (Fa. Boehringer Mannheim) im Standardansatz (Sambrook *et al.*, 1989). Der Ligationsansatz wurde mindestens 12 h bei 15 °C inkubiert.

Zur Vorbereitung der Transformation durch Elektroporation (2.4.8.2.) wurde der Ansatz mittels 30 minütiger Mikrodialyse (0,025 µm-Filter, Millipore, Eschborn) gegen 10 %iges Glycerol bzw. dest. H<sub>2</sub>O gereinigt.

### 2.4.7. Phenolextraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Um DNA in wäßriger Lösung von Proteinen zu reinigen wurde die Lösung 1:1 mit Tris gesättigtem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und anschließend bei 2 min. 12000 bis 15000 Upm zentrifugiert.

Zur weiteren Reinigung wurde die Lösung mit 0,1 Vol. Na Acetat und 2,5 Vol. absolutem Ethanol (-20°C, 60 min, -80°C 20 min) bzw. mit 0,7 bis 1 Vol. Isopropanol (bei Raumtemperatur) gefällt, bei 4°C 15 min. zentrifugiert und das Pellet 5 min mit 70% igem Ethanol (-20°C) durch Zentrifugation (12000 bis 15000 Upm, 4°C) gewaschen.

Fällung und Reinigung von DNA bei Raumtemperatur sind in den jeweiligen Methoden angegeben.

### 2.4.8. Übertragung von DNA in *Escherichia coli*

#### 2.4.8.1. Transformation mittels CaCl<sub>2</sub>-Methode

Die Transformation in *E. coli* M15 (pREP4) für die Expression von His-tag-Proteinen erfolgte nach einer Vorschrift der Fa. QIAGEN (Qiagen, 1992).

Die Transformation Plasmid-DNA in die Klonierungsstämme *E. coli* XL2Blue, *E. coli* XL1Blue MRF<sup>+</sup> oder in *E. coli* B121DE3 zur Expression von *Strep*-tag-Proteinen erfolgte mittels Elektroporation nach (Dower *et al.*, 1988).

### Herstellung kompetenter Zellen

200 ml LB-Kultur (12,5 µg/ml Tetrazyklin) wurden 1 %ig mit einer Übernacht-Vorkultur beimpft und anschließend bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,8 kultiviert. Nach Abkühlen auf Eis (15 min) wurden die Zellen geerntet (5000 Upm, Fa. Sorvall, 4°C). Nach zweimaligem Waschen und Resuspendieren der Zellen mit 200 ml eiskaltem dest. H<sub>2</sub>O, folgte einmal Waschen und Resuspendieren der Zellen in 30 ml 10 %igem Glycerol (Zentrifugation, 15000 Upm, Fa. Sorvall, 4°C). Die Zellen wurden anschließend in 0,4 ml 10%igem Glycerol resuspendiert und in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße zur Lagerung bei -80 °C als 40 µl-Aliquots überführt.

### Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser der Fa. Biorad (München).

Ein Aliquot elektrokompenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand, Fa.) mit 2-10 µl DNA vermischt. Nach Entfernung der Feuchtigkeit von der Küvetten-Außenseite erfolgte der Impuls bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten von 3,5-4,5 ms erreicht wurden. Nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium auf den Elektroporationsansatz gegeben und dieser 45 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren von 200 µl Ansatz auf eine Nähragarplatte (2.2.1).

#### 2.4.8.2. Selektion rekombinanter Klone

Transformanten wurden auf LB-Selektionsagar (s. 2.2.2.) mit IPTG und X-gal unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml, *E. coli* XL 1-Blue, XL 2-Blue) oder Kanamycin (50 µg/ml, *E. coli* M15[pREP4]) selektiert und rekombinante Klone durch Test auf α-Komplementation identifiziert. [Blau-weiß-Selektion, (Sambrook *et al.*, 1989)].

## 2.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren

### 2.5.1. Herstellung von DIG-markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung von DNA-Sonden wurden unter Verwendung des DIG DNA Labeling and Detection Kits (Boehringer Mannheim) PCR-Fragmente (s. 2.6.) nach der Random Priming-Methode mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Zur Markierung wurden ca. 1 µg PCR-Produkt eingesetzt. Das Experiment wurde nach der Anweisung des DIG DNA Labeling and Detection Kits (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

**Tab. 4 Charakterisierung verwendeter PCR-Sonden (DIG-markiert)**

Sonde	PCR-Primerpaar <sup>1</sup>	Gen (Restriktions-schnittstellen)	Länge [bp]	Hybridisierungstemperatur
s_grdD	48-1 – 48-2	1 x <i>Hind</i> III	990	68 °C
s_grdC	57Bam-57Kpn	1 x <i>Hind</i> III	1610	60 °C <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Heterologe Hybridisierung

## 2.5.2. Southern-Blot (Southern, 1975)

### 2.5.2.1. Gelelektrophorese und Transfer der DNA

Chromosomale DNA von *E. acidaminophilum* und *C. litorale* wurden nach Spaltung mit Restriktionsenzymen in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V über mindestens 2 h in TAE-Puffer. Das Agarosegel wurde für den Transfer der DNA wie folgt vorbereitet (Inkubationen erfolgten jeweils auf einer Laborwippe mit leichter Bewegung der Flüssigkeit):

Depurinieren: 5-10 min in 0,25 N HCl (Farbumschlag des Bromphenolblaus nach Grün)

Denaturierung: 20 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Neutralisierung: 20 min in 1 M Tris, pH 7,5, 1,5 M NaCl

Transferpuffer:	10 x SSC	NaCl	87,65 g	1,5 M
		NaCitrat	44,1 g	0,15 M
		H <sub>2</sub> O	1 l	

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit dest. H<sub>2</sub>O gespült. Der Transfer der DNA auf Nylonmembranen (QIABRANE Nylon Plus, positiv geladen oder ungeladen, QIAGEN, Hilden) erfolgte über Nacht mittels Kapillar-Blot mit 10 x SSC als Transferpuffer. Der Kapillar-Blot wurde wie folgt aufgebaut:

Der Transferpuffer befand sich in zwei Gefäßen, auf die eine Platte gelegt war. Zwei mit Transferpuffer durchfeuchtete Lagen Whatman-Papier wurden mit den Enden in der Lösung auf die Platte aufgelegt und dienten als Brücke zwischen den beiden Gefäßen. Darauf wurden in folgender Reihenfolge Agarosegel, Nylon-Membran und zwei Lagen Whatman-Papier (in Transferlösung equilibriert) luftblasenfrei zu einem feuchten Paket aufeinandergelegt. Über diesem folgten mehrere Lagen saugfähiger Zellstoff und ein 0,5 kg schweres Gewicht. Durch die über 18 bis 22 Stunden wirkenden Kapillarkräfte wurde die DNA auf die Nylon-Membran transferiert.

Im Anschluß daran wurde die Position des Gels auf der Membran markiert und die DNA durch 2 minütige UV-Bestrahlung (Transilluminator) vernetzt. Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

### 2.5.2.2. Hybridisierung

Die der Blockierung unbesetzter Bindestellen dienende Prähybridisierung erfolgte für mindestens 1 h bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur, welche sich an der Schmelztemperatur der DNA orientierte. Homologe Hybridisierungen wurden stets über Nacht bei 65 - 68 °C, heterologe Hybridisierungen bei ca. 60 °C (Hybridisierungsofen OV4, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Für die Prähybridisierung wurden jeweils 20 ml Standard-Puffer (5 x SSC 1 % Blocking-Reagenz (Boehringer Mannheim), 0,1 % N-Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS), für Hybridisierungen 5 ml dieses Puffers unter Zusatz der DNA-Sonde (DNA-Fragmente: ca. 0,5 µg, 10 min bei 98 °C denaturiert) eingesetzt. Die Auswahl der Bedingungen für die anschließenden Waschschrte richtete sich nach der angestrebten Stringenz. Das Waschen erfolgte für 2 x 5 min in 2 x SSC / 0,1 % SDS (RT) und 2 x 15 min in 1 - 0,1 x SSC / 0,1 % SDS (68 °C).

### 2.5.3. Dot-Blot

Mittels Dot-Blot wurden die Plasmid-Poole der partiellen *MboI*-Genbank (Gursinsky, 1996) auf eine Nylonmembran zur Hybridisierung transferiert. Dazu wurden 20 µl Lösung (1:30 mit 0,2 N NaOH) der 48 Poole nach 15 min bei 65 °C denaturiert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 130 µl wurden die Lösungen mittels einer Dot-Blot-Apparatur (Biorad, München) unter Anlegen eines leichten Vakuums auf eine equilibrierte Nylonmembran (ungeladen, QIAGEN, Hilden) transferiert. Die Membran wurde danach für 2 min auf Puffer getränktes Filterpapier (2 x SSC) gelegt, und die DNA 2 min mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Membran konnte für mehrere Hybridisierungen (2.5.2) verwendet werden und wurde zwischenzeitlich zwischen Filterpapier gelagert.

### 2.5.4. Koloniehybridisierung

Zum weiteren Screening der partiellen *MboI*-Genbank über Koloniehybridisierung wurden Klone auf einen Nylonmembran-Rundfilter, der auf einer Nähragarplatte aufgelegt war, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die auf der Membran angewachsenen Bakterien wurden lysiert (Sambrook *et al.*, 1989) und deren DNA 2 min durch UV-Licht fixiert. Nach einem 30 minütigen Waschschrift bei 50 °C in 5 x SSC, 0,5 % SDS, 1mM EDTA, pH 8,0 wurden die Zellreste vorsichtig mit Zellstoff entfernt, und die Membran zur Hybridisierung eingesetzt.

### 2.5.5. Detektion von Hybridisierungssignalen

Puffer 1:	Maleinsäure/NaOH	100 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,5	

Alle Schritte dieses Nachweises wurden nacheinander bei Raumtemperatur in sauberen Schalen bzw. verschweißten Plastikbeuteln auf einer Laborwippe durchgeführt.

Der Ablauf des Chemoluminiszenz-Nachweises lief wie folgt ab:

1. Equilibrieren der Membran mit Puffer 1	2 bis 5 min
2. Blockieren der Membran mit Puffer 2 (100 ml)	30 min
3. Antikörper-Bindung (0,5 µl Anti-DIG AP-Konjugat 10 ml Puffer 2)	30 min
4. Waschen der Membran mit Puffer 1+ 0,3 % (v/v) Tween 20	2 x 15 min
5. Waschen der Membran in Puffer 3 (100 ml)	
6. Inkubation mit Substratlösung (2 bis 10 ml Puffer 3 mit 1% CPD Star)	5 min

Um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, wurde die Membran auf sauberem Filterpapier getrocknet, und in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Danach erfolgte die Exposition für zunächst 30-45 min auf Röntgenfilm (X-ray Retina, Berlin). Waren die Signale nach dieser Expositionszeit noch zu schwach, wurde nochmals ein Film für längere Zeit aufgelegt.

## 2.5.6. Wiederverwendung von Nylonmembranen

Sollten Nylonmembranen mehrmals (bis zu 2 mal) für Hybridisierungen eingesetzt werden, wurde die Sonde durch "strippen" von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran kurz in dest. H<sub>2</sub>O gespült und 2 x 10 min bei 37 °C in frisch angesetzter 0,2 N NaOH/ 0,1 % SDS - Lösung gewaschen (Hybridisierungssofen). In einer stringenteren Methode wurde 0,1%ige SDS-Lösung in einer Mikrowelle auf 90 °C erhitzt und über die Nylonmembran gegossen. Die Lösung kühlte auf der Membran bei ständiger Bewegung auf einer Laborwippe allmählich ab. Die Membranen wurden jeweils mit 2 x SSC gespült und getrocknet aufbewahrt.

## 2.6. DNA-Sequenzierung

### 2.6.1. DNA-Sequenzierung am A.L.F.<sup>TM</sup>-Sequencer

Die DNA-Sequenzierung erfolgte enzymatisch über das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden überwiegend am automatisierten Sequenzier-gerät (A.L.F.<sup>TM</sup>-Sequencer, Pharmacia, Freiburg) unter Verwendung des AutoRead<sup>TM</sup> Sequencing Kits (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Als fluoreszenzmarkierte Primer wurden zum Kit gehörende M13 Universal bzw. Reverse Primer oder synthetisierte Oligonucleotide eingesetzt.

### 2.6.2. DNA-Sequenzierung am ABI-Sequencer 377

Sequenzierungen mit dem DNA Sequencing Kit (dRhodamine Termination Cycle Sequencing Ready Reaction) der Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems (Foster City, USA) wurden im TRIO-Thermocycler (Biometra, Göttingen) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und im ABI-Sequenzgerät 377 aufgetrennt.

#### 2.6.2.1. Auswertung von Sequenzdaten

Die Sequenzdaten wurden unter Anwendung der Analyseprogramme DNASIS und CLONE ausgewertet. Mit Hilfe der Programme FASTA und BLITZ (Pearson und Lipman, 1988) sowie BLASTP 2.0.1 (Altschul *et al.*, 1997) wurden die in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT gespeicherten DNA- bzw. Proteinsequenzen mit den Nukleinsäure- bzw. Aminosäure-Sequenzen klonierter DNA-Fragmente verglichen. Vollständige Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLUSTAL W (1.74, Matrix "blosum", (Thompson *et al.*, 1994)) bzw. mit dem Programm LALIGN durchgeführt. Die theoretische Sekundärstruktur von Aminosäuresequenzen wurde mit SOPMA (Geourjon und Deleage, 1995) analysiert, ein Hydropathie-Blot wurde mit dem Programm PROTSCALE (Kyte und Doolittle, 1982) erstellt. Mit HAIRPIN (Uhlenbeck *et al.*, 1973) der PCGENE-Software (6.85, IntelliGenetics) wurden mRNA-Sekundärstrukturen identifiziert.

## 2.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 2.7.1. Standardmäßig eingesetzte PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zum Amplifizieren von DNA-Fragmenten aus chromosomaler DNA oder Plasmiden eingesetzt. In Tab. 5 wurden alle Komponenten, deren Konzentrationen und Volumina in einem 50 µl-Ansatz aufgeführt. Der Reaktionsansatz wurde mit 60 µl Mineralöl überschichtet. Bei bestimmten Versuchen wurden die Primer 15 min gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

**Tab. 5 PCR-Ansatz im 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.**

Komponenten	Volumen	Konzentration
DANN	2 µl	ca. 100 ng
Fw-Primer	x µl	30 pmol/Ansatz
Rv-Primer	y µl	30 pmol//Ansatz
20 x <i>Tfl</i> -PCR-Puffer (Biozym, Hess, Oldendorf) oder 10 x <i>Taq</i> -PCR-Puffer (Boehringer Mannheim) oder 10 x <i>Pwo</i> -PCR-Puffer (Boehringer Mannheim) oder 10 x <i>Pfu</i> -PCR-Puffer (Stratagene, Heidelberg)	2,5 µl  (5 µl)  (5 µl)  (5 µl)	1 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM, Boehringer Mannheim)	4-9 µl	2-4,5 mM
DNTP-Mix (20 mM pro Nukleotid Pharmacia)	1 µl	0,4 mM
<i>Tfl</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl) (Biozym, Hess, Oldendorf) oder <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl) (Boehringer Mannheim) oder <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase <sup>1</sup> (2,5 U/µl) (Boehringer Mannheim) oder <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase <sup>1</sup> (2,5 U/µl) (Stratagene, Heidelberg)	0,5 µl  (0,5 µl)	0,5 U  (1,25 U)
dest. H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

<sup>1</sup> DNA-Polymerasen mit *proof-reading*-Funktion

### Reaktionsbedingungen:

<b>Hot start</b>	5 min bei 98 °C
Enzymzugabe	Pause bei 95 °C
Denaturierung	1 min bei 95 °C
<i>Annealing</i>	30 s bei 40 °C - 55 °C (in Abhängigkeit von der <i>annealing</i> -Temperatur der Primer)
Extension	20 s - 2 min 30 s (ca. 1 kb/min) bei 72 °C
	30 Zyklen
Abschließender Schritt	2 min bei 72 °C

### 2.7.2. Overlap extension-PCR

Gerichtete Basenaustausche in DNA-Fragmenten wurden mittels *overlap extension*-PCR generiert (Ho *et al.*, 1989). Dazu wurden zwei Primer entgegengesetzter Orientierung abgeleitet, die die Mutation enthielten. Mit Hilfe dieser Primer und zweier weiterer Flankenprimer wurden in der 1. Reaktion (wie unter 2.7.1.) zwei überlappende DNA-

Fragmente amplifiziert, die die Mutation enthielten. Diese wurden zusammen mit den zwei Flankenprimern einer zweiten PCR-Reaktion (wie unter 2.6.1.) eingesetzt, und das gewünschte, vollständige und mutierte DNA-Fragment amplifiziert (Abb.).

Nach dieser Methode wurden mittels der Primer BSA-f-48 und BSA-48r2 als Flankenprimer und der mutierten Primer Pr5(Ser98) und Pr6(Ser98) das PCR-Produkt mit der Mutation *grdD* C98→S amplifiziert und der mutierten Primer Pr7 (Ala359) und Pr8 (Ala359) (Tab. 6) das PCR-Produkt mit der Mutation *grdD* C359→A amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor pASK5-IBA in *E. coli* XL1Blue MRF' kloniert.

**Tab. 6 Primer, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen**

Name	Orientierung	Sequenz	Position [bp], Gen (Mutation)
GA660	→	5'-GTGGACTACATCATAGAGTGC-3'	1217, <i>grdC1</i>
GA528	←	5'-GTCGTTTCCTCTCATTACGCTTCCG-3'	2718, <i>grdD1</i>
U3777	←	5'-TTGTCAGCGGTATTCTTTCAC-3'	3777, <i>orfU'</i>
U3542	→	5'-GTAGAGACATAAAGCAAAAGG-3'	3542, <i>grdD1</i> - - <i>orfU'</i> <sup>1</sup>
37R645	→	5'-GAACCTAAACTCTCATAACAAT-3'	1114 <i>grdC1</i>
37U251	←	5'-AGACAGACTTGACTCTTAT-3'	3464 <i>grdD1</i> - - <i>orfU'</i>
37/U2-377	→	5'-TTCACCCTTTTCATCCATTCT-3'	3781 <i>grdD1</i> - - <i>orfU'</i>
MU1	→	5'-GTAGAGGTAGCAACAGAAGAA-3'	2339 <i>grdD1</i>
MU2	→	5'-AAGAAGTGAAGATGCCTCCTA-3'	3070 <i>grdD1</i>
Pml11-2913	→	5'-GAGCAAGAGCAGTAGA-3'	2626 <i>grdD1</i>
48-302	→	5'-CACGCTAATGTAAGTCTGTCT-3'	3444 <i>grdD1</i> - - <i>orfU'</i>
48-6	→	5'-TGAAGAAGCGGCAAAGATAC-3'	3233 <i>grdD1</i>
GA892	→	5'-CGTGAAGGCGATAGCAGCGGC-3'	2966 <i>grdD1</i>
48-Bam	→	5'-CATCACGGATCCGATGACGATGACAAATCAGATATAAAACAAATG-3'	<i>grdD</i> , 5'-Ende mit <i>Bam</i> HI
48-Kpn	←	5'-AATTTTGGTACCAGCTACTATGCCTGCATCCTTAAG	<i>grdD1</i> , 3'-Ende mit <i>Kpn</i> I
BSA-f-48	→	5'-GAAAAAGGCGCCGAGACCTCAGATATAA AACAAATGATA-3'	<i>grdD1</i> , 5'-Ende mit <i>Bsa</i> I
BSA-48r2	←	5'-TTAGATATCAGAGACCTTAAGCTACTATGCCTGCATC-3'	<i>grdD1</i> , 3'-Ende mit <i>Bsa</i> I
BSA-f-57	→	5'-GAAAAAGGCGCCGAGACCAATTTTCGAGTTCTTAAAGGT-3'	<i>grdC1</i> , 5'-Ende mit <i>Bsa</i> I (P3R)
BSA57r	←	5'-TTAGATATCAGAGACCCTTATTCAGCTAATAGATGTGCTGCGAA-3'	<i>grdC1</i> , 3'-Ende mit <i>Bsa</i> I,
57F3	→	5'-GGGGGGTCTCTAATGAATTTTCCAGTTCTT-3'	<i>grdC1</i> 5'-Ende mit <i>Bsa</i> I
57R3	←	5'-CCAAGCGCTGAGACCTTCAGCTAATAGATGTGC-3'	<i>grdC1</i> 3'-Ende mit <i>Bsa</i> I
Pr5(Ser98)	→	5'-TATATCCACTCTAGCGTAACAGTGCAC-3'	282 in <i>grdD</i> (C98S)
Pr6(Ser98)	←	5'-GTGCACTGTTACGCTAGAGTGGATATA-3'	306 in <i>grdD</i> (C98S)
Pr7 (Ala359)	→	5'-CGGAATGGGCGCAACAAGGACCTATAGT-3	1065 in <i>grdD</i> (C359A)
Pr8 (Ala359)		5'-ACTATAGGTCCTGTGCTGCCCATCCG-3'	1091 in <i>grdD</i> (C359A)

<sup>1</sup> -|- intergene Region



Nachweislösung  
 675 mM FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
 10 % H<sub>2</sub>O  
 10,7 % Perchlorsäure (70 % v/v)  
 in Ethanol (99,6 %)

**Herstellung:** 182,5 g FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O wurde zuerst in 100 ml destillierten H<sub>2</sub>O gelöst, mit 107,1 ml Perchlorsäure versetzt und anschließend mit 99,6 %igen Ethanol auf 1 l aufgefüllt.

**Reaktionsansatz für einen Meßpunkt :**

	25 µl	60 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> pH7,5
	20 µl	6 mM Acetylphosphat
	20 µl	7,5 mM DTT
	165 µl	Proteinlösung
5 min Inkubation bei 37 °C		
	20 µl	15 mM Arsenat-Lösung pH 7,5
Reaktionsvolumen	250 µl	
	60 µl	Stopplösung
	500 µl	Nachweislösung

Um den Volumenfehler zu minimieren, wurden zur Messung der dreifache Meßansatz Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer mit Acetylphosphat, DTT und Proteinlösung für 2 Meßpunkte in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengemischt und bei 37 °C für 5 min vorinkubiert. Durch Zugabe von Arsenat-Lösung wurde die Reaktion gestartet und nach 1 bis 2 min bzw. 2 bis 10 min jeweils 250 µl pro Meßpunkt entnommen und in eine Küvette mit vorgelegter Stopplösung gegeben. Nach 1 min Inkubation in der Küvette wurden 500 µl Nachweislösung dazugegeben, mit einem Rührstab durchmischt und die Extinktion bei 550 nm gegen einen Leerwert ohne Acetylphosphat vermessen. Die Extinktionsdifferenz aus beiden Meßpunkte pro Minute wurde in die Formel zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt. Der nichtenzymatische Abbau von Acetylphosphat wurde vor jeder Meßreihe durch eine Messung ohne Arsenat-Zugabe getestet und mit den gemessenen Extinktionsänderungen verrechnet. Die Messungen wurden in 1 ml-Plastikküvetten mit einem Uvikon 710 Photometer (Kontron Instruments, Eching) durchgeführt. Die Enzymaktivität [U] wurde nach der folgenden Formel berechnet:

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

ΔE/min :	Extinktionsänderung pro Minute
V :	Reaktionsvolumen [µl]
ε :	Extinktionskoeffizient [mM <sup>-1</sup> x cm <sup>-1</sup> ]
d :	Küvetten-Lichtweg [cm]
v :	Probenvolumen [µl]

**2.8.2.2. Eichkurve für Acetylphosphat**

Die Eichkurve wurde aus vier Meßansätzen (s. 2.8.2.1. ohne Protein) mit Konzentrationen von 1 mM bis 6 mM Acetylphosphat gegen einen Leerwert ohne Acetylphosphat im linearen Extinktionsbereich erstellt. Der Extinktionskoeffizient wurde aus dem Quotienten der Extinktion, Acetylphosphatkonzentration und dem Küvetten-Lichtweg berechnet und betrug 0,3 ± 0,1 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>.

### 2.8.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE )

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) in einer Proteingel-Apparatur der Firma Biometra (Göttingen). Die Gele wurden nach Vorschrift des Herstellers vorbereitet und die Proben nach Denaturierung (5 min 95 °C in SDS-Proben-Puffer) bei 25 mA und maximaler Spannung in 1x-SDS-Probenpuffer (s. Vorschrift Biometra) aufgetrennt (1h).

Markerproteine des MW-SDS-70L-Kits (SIGMA Chemie, Deisenhofen):

67 kDa-Albumin (Rind), 45 kDa-Albumin (Ei), 36 kDa-Glyzeraldehyd-3-phosphat-DH (Kaninchen), 29 kDa-Carbonanhydrase (Rind), 24 kDa-Trypsinogen (Rinderpankreas), 20,1 kDa-Trypsininhibitor (Sojabohne), 14,4 kDa- $\alpha$ -Lactalbumin (Rind)

### 2.8.4. Anfärben von Proteinen

#### 2.8.4.1. Coomassie-Färbung

In Gelelektrophoresen aufgetrennte Proteine wurden für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung (0,6 g Serva Blau R-250, 454 ml Methanol, 92 ml Eisessig, ad 1000 ml) mit dest. H<sub>2</sub>O) inkubiert und anschließend durch schnellen Entfärber (45 % Methanol, 10 % Essigsäure) entfärbt und danach in 7 %iger Essigsäure in Folien eingeschweißt aufbewahrt bzw. getrocknet.

#### 2.8.4.2. Silberfärbung (Blum et al., 1989)

Zur Silberfärbung wurde das Gel 1 h in Fixierlösung inkubiert und anschließend 3x 20 min in 50 %iger Ethanol-Lösung gewaschen. Nach 1 minütigem Schwenken in eisgekühlter Thiosulfat-Lösung und Waschen in dest. H<sub>2</sub>O (3 x 20 s) wurde das Gel für 20 min bei RT in Imprägnier-Lösung inkubiert. Nach Waschen (2 x 20 s) wurde Entwickler-Lösung auf das Gel gegeben und solange inkubiert bis die Proteinbanden deutlich gegenüber dem Hintergrund sichtbar wurden. Dann wurde die Entwickler-Lösung sofort abgegossen, das Gel in dest. H<sub>2</sub>O kurz gespült und sofort Stopplösung zugegeben. Das Gel konnte in Stopplösung aufbewahrt werden oder wurde getrocknet (s2.7.5.).

Fixier-Lösung                    50 % Methanol  
                                      12 % Essigsäure  
                                      50  $\mu$ l Formaldehyd (37 %ig v/v)  
                                      ad. 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Thiosulfat-Lösung            0,02 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
                                      ad. 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Imprägnier-Lösung            0,2 g AgNO<sub>3</sub>  
                                      75  $\mu$ l Formaldehyd (37 %ig v/v)  
                                      ad. 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Entwickler-Lösung            6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
                                      50  $\mu$ l Formaldehyd (37 %ig v/v)  
                                      ad. 100 ml dest. H<sub>2</sub>O

Alle Lösungen, die Formaldehyd enthielten, wurden frisch angesetzt.

## 2.8.5. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden nach 15 minütiger Vorbehandlung mit Trockenlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 3% Glycerol) zwischen zwei ebenfalls mit dieser Lösung getränkte Folien luftblasenfrei gespannt und bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Tagen getrocknet.

## 2.8.6. Umpuffern und Einengen von Proteinlösungen

Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte sowohl über Gelfiltration an PD-10-Säulen (Fa. Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) nach der Vorschrift des Herstellers als auch über Dialyse. Die verwendeten Dialyseschläuche (Fa. Pearce, Rockford) wurden nach Herstellervorschrift einmal eingesetzt und danach verworfen. Das Einengen von Proteinlösungen erfolgte mittels Microconcentrators Nanosep<sup>TM</sup> durch Zentrifugation bei 5000 Upm (HERMLE-Zentrifuge, 4 °C)

## 2.8.7. Chemische Modifikation von GrdD

### 2.8.7.1. Reduktion von GrdD mit NaBH<sub>4</sub>

Zu 0,5 ml Proteinlösung GrdD (in 100 mM Tris/HCl pH8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT, 2,5 mM Desthiobiotin) wurden 50 µl NaBH<sub>4</sub> zugegeben und das Protein in der Anarobier-Box unter N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>-Atmosphäre 2 h bei Raumtemperatur reduziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 % (v/v) Aceton gestoppt.

### 2.8.7.2. Inkubation mit Jodacetat

#### Stammlösungen:

Tris/HCl	600 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	pH 7,5
Jodacetat	10 mM
DTT	75 mM
NaBH <sub>4</sub>	500 mM in 40 mM KOH gelöst

Das reduzierte Protein wurde im folgenden Ansatz (Endkonzentrationen angegeben) mit Jodacetat inkubiert:

	150 µl	60 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> pH7,5
	600 µl	2 mM Jodacetat
	200 µl	GrdD (2 nmol eingesetzt)
Gesamtvolumen :	1,5 ml	

Das Protein wurde 45 min bei Raumtemperatur mit Jodacetat inkubiert und durch Zugabe von 5 mM DTT (Endkonz.) abgestoppt. Danach wurden die Proben wie unter 2.7.7.2. entsalzt und die Enzymaktivität bestimmt.

### **2.8.7.3. Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat**

Das reduzierte Protein wurde nach folgendem Ansatz (Endkonzentrationen angegeben) mit Acetylphosphat und Jodacetat inkubiert:

150 µl	60 mM Tris/HCl pH7,5	10 mM MgCl <sub>2</sub>
200 µl	10 mM Acetylphosphat	
600 µl	2 mM Jodacetat	
200 µl	2 nmol GrdD	
Gesamtvolumen	1,5 ml	

Das Protein wurde zuerst 45 min mit Acetylphosphat inkubiert und anschließend 45 min mit Jodacetat. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 mM DTT abgestoppt.

Nach den Inkubationen mit Acetylphosphat und Jodacetat (2.7.5.2.) sowie nur Jodacetat (2.7.5.3.) wurden beide Ansätze mit 60 mM Tris/HCl pH7,5 10 mM MgCl<sub>2</sub> auf 2,5 ml aufgefüllt, auf eine equilibrierte PD-10-Säule (Fa. Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, nach Herstellervorschrift) geladen und das Protein mit 3,5 ml 100mM Tris/HCl pH 8,0 eluiert, wobei Fraktionen von 0,5 ml beim Eluieren gesammelt wurden. Nach dem Entsalzen wurden Proteinkonzentration und Enzymaktivität gemessen.

Zur anschließenden Markierung mit 4-Vinylpyridin wurden die Proteinproben wie unter 2.7.6. beschrieben eingengt.

### **2.8.7.4. Markierung mit 4-Vinylpyridin**

Die Arbeiten zur chemischen Modifizierung von Proteinen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Rücknagel (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle). 1 nmol Protein wurden in 50-80 µl Tris/Guanidin-Lösung (1 M Tris/HCl pH 8,5, 4 mM EDTA und 8 M Guanidiniumhydrochlorid im Verhältnis 1:3) unter Zusatz von 0,5 % DTT für 2 h denaturiert und reduziert. Anschließend wurden 2 µl 4-Vinylpyridin zugegeben und weitere 2 h inkubiert.

### **2.8.7.5. Proteolytische Spaltung von Proteinen und HPLC-Chromatographie**

Die Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Rücknagel. Das Reaktionsgemisch aus 2.7.7.4. wurde zum Entsalzen auf eine 50 x 3 mm C4-Säule (Macherey & Nagel), die mit Lösung A (0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O) äquilibriert wurde, aufgetragen. Danach wurde 5 min gespült. Das Protein wurde anschließend mit einem Gradienten 0-70 % Lösung B (0,08 % TFA in Acetonitril) eluiert. Die Detektion erfolgte bei 215 nm. Die gesammelten Proben wurden im Stickstoffstrom eingengt. Anschließend wurde die Proteinprobe mit einer LysC-Protease 2,5 h bei 37 °C gespalten, das Peptidgemisch auf einer C18-Säule (Macherey & Nagel) getrennt und gereinigt. Die Säule wurde mit Lösung A äquilibriert. Die Hälfte des Spaltansatzes wurde injiziert und nach 2 min mit einem Gradienten 0-60 % Lösung B in 60 min eluiert. Die Detektion erfolgte bei 215nm und 254 nm. Die Peptid-Fractionen wurden gesammelt und zur Massenspektrometrie eingesetzt.

### **2.8.8. Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie von Proteinproben wurden durch Frau Dr. Angelika Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

## 2.9. Spektroskopische Methoden

Zur Messung von Fern-UV-CD-Spektren wurden ein Jasco-J710A Spektrometer und 0,1-cm-Küvetten verwendet (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle). Zur Messung wurden 300 µl Proteinlösung (in 100 mM Na-Phosphat pH 7,5) eingesetzt. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 20 °C im Bereich von 190 bis 300 nm gemessen (Step-Resolution 1 nm, 100 nm/s Aufnahmegeschwindigkeit, 0,5 s Response, Akkumulation 8, Sensitivität 20 mdeg). Die resultierenden Spektren wurden mit Hilfe der bekannten Proteinkonzentration auf molare Elliptizitäten normiert und mit der Jasco-Software geglättet. Spektren und Meßwerte wurden gegen die Pufferwerte korrigiert.

### Bestimmung der Proteinkonzentration

UV/VIS-Messungen wurden am Uvikon 710 Photometer (Kontron Instruments, Eching) durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Proteinlösung wurde über das Lambert-Beersche Gesetz spektroskopisch bei 280 nm bestimmt.

Der molare Extinktionskoeffizient von GrdD betrug  $277,39 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) als *Strep*-tag-Fusionsprotein und wurde nach der Methode von (Pace *et al.*, 1995) auf der Grundlage der bekannten Aminosäuresequenz bestimmt.

## 2.10. Zink-Analytik

Die Zink-Analytik an GrdC wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Marion Martienssen (Institut für Biochemie/Biotechnologie) mittels Atomabsorptionsspektroskopie an einen Atom-Absorptionsspektrometer Unicam 929 (Fa. ATI Unicam) durchgeführt. Der Zink-Gehalt der Proteinlösung wurde anhand einer Eichkurve gemessen, die im Bereich von 0,1 mg/l bis 0,5 mg/l mit granulierten Zink als Standard erstellt wurde. Als Referenz wurde eine Proteinlösung aus Hefe-Alkohol-Dehydrogenase eingesetzt.

## 2.11. Heterologe Protein-Expression

### 2.11.1. Zellanzucht, Induktion der Genexpression und Zellernte

LB-Kulturen von 20 ml, 100 ml, 1 l Volumen (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) mit *E. coli* M15 (pREP4), die pQE30-Derivate enthielten, wurden 1:50 mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur angeimpft und in jeweils 50 ml-, 500 ml- bzw. 2 l- Schikane-Kolben bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 wurde der Induktor 1 mM IPTG zugegeben und weitere 5 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Die Anzucht von *E. coli* BL21DE3-Klonen mit pASK-IBA3/5-Derivaten erfolgte in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) unter denselben vorher genannten Bedingungen bei 30°C. Die Induktion erfolgte nach Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,5 bis 0,7 mit Anhydrotetrazyklin (2 µg/ml). Nach der Induktion inkubierten die Zellen weitere 3 h unter Schütteln bei 30 °C.

Zellaufschluß und Gewinnung von Rohextrakt aus *E. coli* M15(pREP4)

### 2.11.2. Überprüfung der Genexpression

*E. coli* M15 (pREP4) wurde 20 ml Kulturvolumen angezogen und induziert. Die Genexpression wurde nach dem 'rapid screening'-Protokoll der Firma QIAGEN (Qiagen, 1992) überprüft.

Zur Überprüfung der Genexpression bei *E. coli* BL21DE3-Klonen wurden vor Induktion und nach Induktion pro Stunde eine Probe von 1 ml Kultur entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Zellpellet der Probe in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer bzw. der induzierten Proben in 200 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und anschließend für 10 min gekocht. 15 µl uninduzierte Probe und 10 µl induzierte Probe wurden in der SDS-PAGE zum Vergleich nebeneinander aufgetragen.

### 2.11.3. Zellaufschluß und Gewinnung von Rohextrakt

Zum Zellaufschluß wurden die geernteten Zellen *E. coli* M15 (pREP4) in 100 mM NaPhosphat, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol suspendiert und 1 mg/ml Lysozym, 10 µg/ml DNase, 10 µg/ml RNase und 100 µmol PMSF (Stammlösung 100 mM in Isopropanol) wurden zur Suspension zugegeben und 30 min 4 °C inkubiert.

*E. coli* BL21DE3-Zellen wurden in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 2 mM EDTA, 3 mM DTT resuspendiert und ebenfalls 1 mg/ml Lysozym, 10 µg/ml DNase, 10 µg/ml RNase und 100 µmol PMSF (Stammlösung 100 mM in Isopropanol) zur Suspension hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Der Zellaufschluß erfolgte mittels zweier Passagen über die French-Press (SLM Instruments, Inc., II/USA). Mittels Zentrifugation (30 min 15000 Upm, 4 °C Fa Sorvall, Hanau) wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen abgetrennt. Für eine StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde zur Abtrennung des *E. coli*-eigenen Biotin-Proteins Avidin (1 mg/ml entspricht 1 U/ml, Fa. Gerbu) zum Rohextrakt zugesetzt und der Rohextrakt auf Eis zur Bindung des Biotins 30 min inkubiert. Danach erfolgte zur Abtrennung von Membranresten und Proteinaggregaten eine Ultrazentrifugation (Fa. Beckmann 29000 Upm, 4 °C, SW55-Rotor bei bis zu 5 ml oder 23000 Upm, SW40-Rotor bis 12 ml Rohextrakt). Anschließend wurde der Rohextrakt auf Eis gelagert bzw. sofort zur Reinigung eingesetzt.

### 2.11.4. Native Reinigung von His-tag-Fusionsprotein

#### Anreicherung 1

Der gewonnene Rohextrakt nach Induktion von *E. coli* M15 (REP4) wurde anschließend mit equilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose für 1 h inkubiert. Die Suspension wurde in eine PD10-Leersäule (Pharmacia) gegossen. Nach Absetzen des Säulenmaterials am Boden der Säule wurde es mit einer zweiten Fritte luftblasenfrei verschlossen und der Durchlauf gesammelt. Anschließend wurde zuerst die Säule gewaschen und mittels eines Gradientenmischers und einer Pumpe (1 ml/min Geschwindigkeit, Pharmacia) wurden 2 Gradienten (20 mM Imidazol bis 50 mM Imidazol) und (50 bis 500 mM Imidazol) angelegt und die Fraktionen mittels eines Fraktionssammlers (Pharmacia) gesammelt (s. 3.10.1.).

#### Anreicherung 2

1 l *E. coli* M15 (pREP4) wurden mittels Zentrifugation (5000 Upm, 4°C, Sorvall Hanau) geerntet und bei -20°C eingefroren. Nach Resuspension der Zellen im Lysispuffer wurden die

Zellen aufgeschlossen. Der so gewonnene Rohextrakt wurde in eine PD10-Leersäule (Pharmacia) überführt und anschließend nach Absetzen des Säulenmaterials in der Säule mittels einer zweiten Fritte verschlossen. Mittels einer Pumpe (1 ml/min, Geschwindigkeit, Pharmacia) wurde zuerst mit Lysispuffer gewaschen und anschließend ein pH-Gradient von pH 8,0 bis pH 5,3 (s. 3.10.1.) angelegt.

### **2.11.5. Native Reinigung von *Strep*-tag-Fusionsprotein**

#### **Reinigung über StrepTactin-Affinitätschromatographie**

*Strep*-tag-Fusionsproteine, sowohl N-terminal als auch C-terminal, wurden über StrepTactin-Affinitätssäulen gereinigt. Die Säulen wurde unter Schwerkraft betrieben. Dazu wurden bis zu 1 ml StrepTactin (Fa. Bioanalytiks in eine Leersäule (Ø10 mm) überführt und anschließend nach Absetzen des Säulenmaterials mit einer zweiten Fritte verschlossen. Die Säule wurde mit 2x 2,5 ml Waschpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2mM EDTA, 3mM DTT) equilibriert. Anschließend wurde die Säule mit vorbehandeltem Rohextrakt in 1 ml-Schritten beladen, dann mit Waschpuffer gewaschen bis kein Protein in den gesammelten Fraktionen zu messen war. Das *Strep*-tag-Protein wurde mit 6x 0,5 ml Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3mM DTT, 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert.

#### **Regeneration des Säulenmaterials**

Zur Regenerierung des StrepTactins und Entfernung des DTT wurde die Säule zuerst mit 3x 5 ml Puffer R (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2mM EDTA, 1mM HABA) und anschließend mit 2x 4 ml Puffer W (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2mM EDTA) gewaschen. Die Säule wurde verschlossen und das Material mit Puffer W überschichtet bei 4 °C gelagert.

## **2.12. Geräte und Chemikalien sowie Firmen**

Folgende Geräte fanden neben den bereits in den vorausgehenden Kapiteln erwähnten Geräten Verwendung:

pH-Meter (MV 88, Präcitronic bzw. 761 Calimatic, Fa. Knick)  
 Waagen (AND ER-182A Electronic Balance bzw. Gibertini Europe 1700)  
 UV-Leuchtkasten (Appligene-Oncor, Heidelberg)  
 Vortex (Genie 2, Bender & Hobein AG)  
 Magnetrührer, heizbar (IKAMAG RCT)

Soweit nicht extra aufgeführt wurden alle Chemikalien von den Firmen Serva (Heidelberg), Merk (Darmstadt), Fluka Chemie AG (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Sigma Aldrich (Deisenhofen) im handelsüblichen Reinheitsgrad bezogen. Weitere Enzyme und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

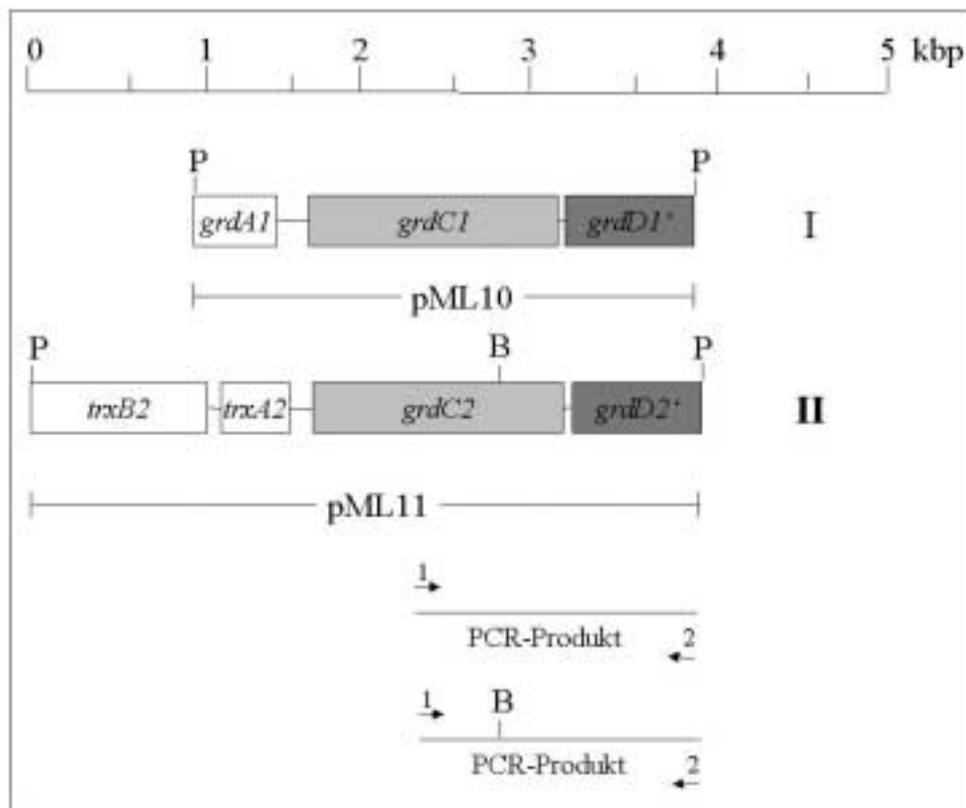
Restriktionsenzyme	Appligene-Oncor (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Pharmacia-Biotech Europe (Freiburg), MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Gibco (Eggenstein), Biozym (Hess, Oldendorf)
Lysozym, Ampicillin	Appligene-Oncor (Heidelberg)
DTT	Gerbo (Gaiberg)

### 3. Experimente und Ergebnisse

#### 3.1. Klonierung von *grdD1* aus *Eubacterium acidaminophilum*

Das Ziel der folgenden Experimente war es, die vollständige Sequenz der Gene *grdD1* und *grdD2* der 48 kDa-Untereinheit des Proteins C der Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* zu klonieren.

Von (Lübbers, 1993) wurden zwei Bereiche der chromosomalen DNA von *E. acidaminophilum* mit einer Länge von 5332 bp und 2421 bp auf den Inserts der Plasmide pML23, pML10 und pML11 kloniert, auf denen sich die Gensätze I und II der Glycin-Reduktase befanden. Jeweils eine Kopie der Gene der Thioredoxin-Reduktase *trxB* und des Thioredoxins *trxA* lagen in diesen Gensätzen vor. Stromabwärts der Gene *trxB1* und *trxA1* befand sich im Gensatz I *grdA1*, eine Kopie des Gens von Selenoprotein A der Glycin-Reduktase auf dem *PstI*-Fragment von pML10 (Abb. 2).



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Inserts der Plasmide pML10 und pML11 (Lübbers, 1993). Das *PstI*-Fragment des Plasmides pML10 enthält die Gene des Selenoproteins A *grdA1*, der 57 kDa-Untereinheit *grdC1* und die ersten 632 bp des Gens *grdD1'* der 48 kDa-Untereinheit von Protein C, die zum Gensatz I der Glycin-Reduktase-Gene gehören. Das Insert von pML11 enthielt den Gensatz II der Glycin-Reduktase-Gene und bestand aus den Genen *trxB2*, *trxA2*, *grdC2* und *grdD2'*. Die Restriktionsschnittstellen *PstI* (P) beider Plasmide und die Restriktionsschnittstelle *BglII* (B), die in pML11 an Position 1862 auftrat, wurden eingezeichnet. Mittels der Primer GA660 (1) und GA528 (2) wurden das 3'-Ende der *grdC*-Gene und das 5'-Ende beider *grdD*-Gene als PCR-Produkte amplifiziert und nach Markierung als DNA-Sonde zum Screening der partiellen *MboI*-Genbank (Gursinsky, 1996) eingesetzt.

Auf *grdA1* folgten die Gene *grdC1* der 57 kDa-Untereinheit und *grdD1'* der 48 kDa-Untereinheit von Protein C der Glycin-Reduktase. Während die Sequenz von *grdC1* vollständig mit 1542 bp vorlag, endete das Insert von pML10 an der *PstI*-Restriktionsschnittstelle in *grdD1'* nach 632 bp, so daß das 3'-Ende des Gens fehlte. Der

Gensatz II der Glycin-Reduktase befand sich auf dem Insert von pML11, das ebenfalls als *Pst*I-Fragment kloniert wurde, und bestand aus einer zweiten Kopie der Gene von Thioredoxin-Reduktase *trxB2*, Thioredoxin *trxA2* und den Genen der Untereinheiten von Protein C *grdC2* und *grdD2'*, das ebenfalls unvollständig vorlag (Abb. 2). Die Sequenzen von *grdD1'* und *grdD2'* waren bis zur selben *Pst*I-Restriktionsschnittstelle bekannt und zu 100 % identisch.

In Gensatz II befand sich keine Kopie von *grdA* zwischen *trxB2* und *grdC2*. Die Sequenzen von *grdC1* und *grdC2* differierten an insgesamt 20 Positionen, aber nur an fünf Stellen führten diese Unterschiede zu Änderungen von *grdC1* zu *grdC2* in der Aminosäuresequenz an den Positionen 457 (Austausch G/A), an Position 474 G/C, an 985 T/A, an 1087 C/T und an 1244 T/C (s. 3.4.1.). Durch den Austausch T/C an Position 561 in *grdC* (an Position 1668 in pML10 und an 1862 in pML11) befand sich in Gensatz II eine zusätzliche *Bg*III-Restriktionsschnittstelle (Abb. 2).

Um die Gene *grdD1'* und *grdD2'* zu vervollständigen, wurde eine DNA-Sonde zur Hybridisierung einer Genbank benötigt, die das 3'-Ende von *grdC* und das 5'-Ende von *grdD* enthielt. Dieser Bereich wurde mittels PCR aus chromosomaler DNA aus *E. acidaminophilum* mit den Primern GA660 und GA554 amplifiziert (Abb. 2), deren Sequenzen in beiden Gensätzen vorkamen und bereits von Sonntag (1998) zur Überprüfung der Transkription beider Gensätze mittels RT-PCR eingesetzt wurden. Das PCR-Produkt bestand aus 1518 bp. Der Gensatz II enthielt im amplifizierten Bereich eine zusätzliche *Bg*III-Restriktionsschnittstelle (s. o.). Nach der Spaltung des PCR-Produkts mit *Bg*III lagen daher drei DNA-Fragmente vor, zum einen das ungespaltene 1518 bp-DNA-Fragment des Gensatzes I und die anderen beiden Fragmente (1168 bp und 350 bp) aus dem PCR-Produkt des Gensatzes II. Diese Daten stimmten mit denen von (Sonntag, 1998) überein. Das Amplifikat, das zur Spaltung eingesetzt wurde, enthielt demzufolge den 3'-Bereich von *grdC1* und *grdC2*, die intergene Region und die beiden unvollständigen Kopien *grdD1'* und *grdD2'* einschließlich der oben genannten *Bg*III-Restriktionsschnittstelle und wurde nach Markierung mit Digoxigenin als DNA-Sonde zum Screening einer Genbank aus chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* verwendet. Zur Verfügung stand eine partielle *Mbo*I-Genbank aus 5000 *E. coli* XL2Blue-Klonen nach Ligation von chromosomalen 3- bis 5 kb-DNA-Fragmenten von *E. acidaminophilum* mit *Bam*HI gespaltenen pUC18-Vektor (Gursinsky, 1996). In dieser Genbank waren die Plasmide von jeweils 96 dieser 5000 Klone als Plasmid-Pool zusammengefaßt. Weiterhin wurden die Kolonien derselben 96 Klone auf einer Nylonmembran zur Kolonie-Hybridisierung übertragen. Als drittes wurden die entsprechenden 96 Klone Glycerin-Kultur auf einer Mikrotiter-Platte bei -80°C gelagert (Gursinsky, 1996). Die Plasmid-Pools wurden mittels Dot-Blot auf eine Membran übertragen und anschließend mit der oben beschriebenen DNA-Sonde bei 65 °C hybridisiert. Die Plasmid-Pools 37 und 46 gaben positive Signale. Um die positiven Klone zu selektieren, wurde mit den Membranen, auf denen sich die Klone der Plasmid-Pools 37 und 46 befanden, eine Koloniehybridisierung durchgeführt. An der Position vier der Membran 37 und an Position des Klones 41 der Membran 46 waren je ein einzelnes Signal zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Die Plasmide zu den genannten Klonen wurden als pMK374 und pMK4641 bezeichnet. Nach einem Restriktionsverdau der Plasmide enthielten pMK374 ein Insert von ca. 4,3 kb und pMK4641 eines von 3,1 kb. Die Kontroll-PCR an beiden Plasmiden mit den Primern GA660 und GA554 ergab 1,5 kb große Produkte wie mit chromosomaler DNA, die sich aber nicht mit *Bg*III verdauen ließen. Dies deutete auf Gensatz I hin.

Nach Sequenzierung der Plasmide pMK374 und pMK4641 (s. folgendes Kapitel) mit dem "reversed" Primer zeigte die Sequenz 100 % Identität zu *grdA1* aus *E. acidaminophilum*, einer von drei Kopien des Gens des Selenoproteins A (Lübbers und Andreesen, 1993; Sonntag, 1998; Wagner *et al.*, 1999). Die Inserts beider Plasmide begannen demzufolge in *grdA1* und sollten die stromabwärts folgenden Gene *grdC1* und *grdD1'* (Abb. 2) enthalten.

Die Sequenz der Inserts der Plasmide pMK374 und pMK4641 begann an der *MboI*-Restriktionsschnittstelle an Position 99 von pML10 (Lübbers, 1993). Aus der bekannten Sequenz von pML10 wurden Primer abgeleitet und die Inserts von pMK374 und pMK4641 schrittweise sequenziert.

## 3.2. Auswertung der Sequenzdaten

### 3.2.1. Genanordnung

Das Insert des Plasmides pMK374 umfaßte 4158 bp und enthielt 287 bp von *grdA1*, *grdC1* mit 1513 bp und den 632 bp umfassenden 5'-Bereich von *grdD1*, der bereits aus pML10 (Lübbers, 1993) bekannt war. Die Sequenz von pMK4641 umfaßte nur 3293 bp (Abb. ). Beide Inserts begannen an der *MboI*-Restriktionsschnittstelle 188 bp nach Beginn von *grdA1* an Position 1713 der publizierten Sequenz (Lübbers und Andreesen, 1993).

In Tab. 7 wurden die Eigenschaften der auf dem Insert von pMK374 befindlichen Leserahmen und der intergenen Regionen zusammengefaßt. In pMK374 wurde nach Leserahmen mit wenigstens 100 bp gesucht. Die Sequenz von *grdD1* umfaßte überraschender Weise nur 1158 bp. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von 385 Aminosäuren ergab ein Molekülmasse von 40 kDa, die von der über SDS-PAGE ermittelten apparenten Molekülmasse von 48 kDa stark abwich (Schräder und Andreesen, 1992). Das 3'-Ende von *grdD1* wurde durch die Sequenzierung von pMK4641 bestätigt, in dessen Insert das TAA-Codon ebenfalls vorlag.

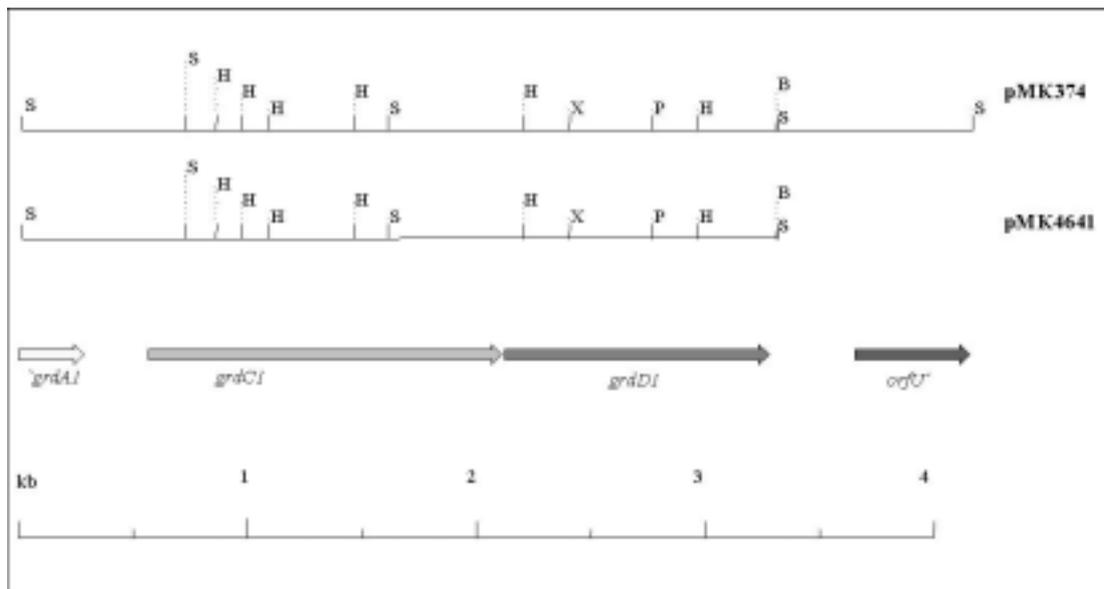
Tab. 7 Eigenschaften der Gene und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen

Gensatz I pMK374 Gene/offene Leserahmen	<i>grdA1</i> <sup>1</sup>	<i>grdC1</i> <sup>1</sup>	<i>grdD1</i>	<i>OrfU</i> <sup>2</sup>
Anzahl der Basen	278	1542	1158	506 <sup>2</sup>
GC-Gehalt [mol%]	44,4	46,5	48,4	41,5
Startcodon	-	ATG	ATG	ATG
Stopcodon	TAA	TAA	TAA	-
Genprodukte	GrdA	GrdC	GrdD	OrfU
Anzahl der Aminosäuren	96	513	385	64 <sup>2</sup>
Molekulare Masse [kDa]		54,4	40,0	-
Intergene Region	<i>grdA1</i> / <i>grdC1</i>	<i>grdC1</i> / <i>grdD1</i>	<i>grdD1</i> / <i>orfU</i> '	-
Anzahl der Basen	281	10	373	-
G/C-Gehalt [mol%]	27,4	(66)	28,9	-

<sup>1</sup> das 5'-Ende von *grdA1* ist nicht auf dem Klon vorhanden, Daten entsprechen denen von Lübbers, (1993)

<sup>2</sup> das 3'-Ende ist nicht auf dem Insert von pMK374

An Position 3652 von pMK374 begann ein offener Leserahmen *orfU*' mit einer Länge von 506 bp, dessen 3'-Ende jedoch nicht mehr auf dem Insert lag. Die intergene Region zwischen dem Start von *orfU*' und *grdD1* betrug 373 bp. In Abb. 3 sind die "open reading frames", deren Orientierung und die wichtigsten Restriktionsschnittstellen der Inserts von pMK374 und pMK4641 zusammengefaßt.



**Abb. 3 Schematische Darstellung der klonierten Inserts von pMK374 und pMK4641.** Gezeigt ist die Lage der Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bgl*II (B), *Hind*III (H), *Pst*I (P) und *Mbo*I (S) auf den Inserts. Die Insertgröße von pMK374 betrug 4153 bp und von pMK4641 3229 bp. Die Orientierung der Leserahmen ist durch Pfeilspitzen angegeben.

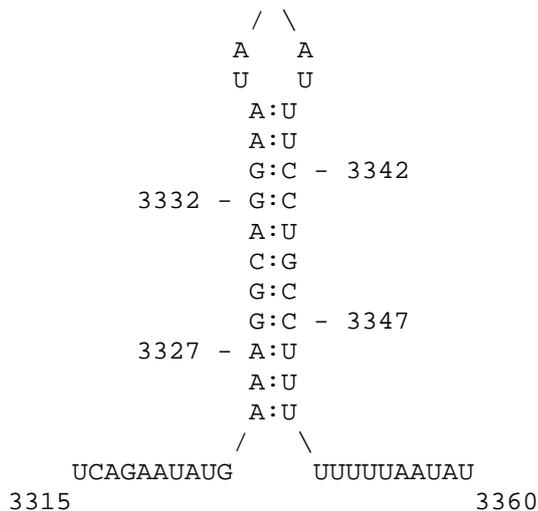
### 3.2.2. Transkriptions- und Translationssignale

Die intergene Region zwischen *grdD1* und *orfU'* umfaßte 373 bp und wurde auf mögliche Transkriptions- und Translationssignale untersucht. Der Vergleich mit Untersuchungen der Transkription der Glycin-Reduktase-Gene (Lübbers, 1993; Sonntag, 1998) sollte Hinweise liefern, ob *orfU'* unabhängig von den Genen der Glycin-Reduktase transkribiert wird.

Im Abstand von 45 bp nach dem Stoppcodon von *grdD1* wurde mit dem Computerprogramm DNA-Fold (PCGENE) eine Haarnadel-Struktur abgeleitet, deren freie Energie -77,8 kJ/mol betrug. Der Stamm dieser Haarnadelstruktur bestand aus 22 Basen, die fünf G-C-Paare und sechs A-U-Paare bildeten. Die ungepaarte Schleife bestand aus vier Basen (Abb. 4). Dieser Struktur folgte eine U-reiche Sequenz, so daß es sich um einen rho-unabhängigen Terminator (Platt, 1986) handeln könnte.

Im Abstand von 11 bp zum Startcodon von *orfU'* befand sich eine Sequenz 5'-GGAGGC-3' (s. Abb. 5), die als mögliche Ribosomenbindestelle (Shine und Dalgarno, 1974) eingeordnet wurde.

Auf Grund von Homologien zur Konsensus-Sequenz in gram-positiven Organismen wurde die Sequenz 5'-TTGATA-N<sub>17</sub>-TATAAT-3' (Moran *et al.*, 1982) im Abstand von 212 bp vom Startcodon von *orfU'* als möglicher  $\sigma^{70}$ -Promotor vorgeschlagen. Dies deutete an, daß *orfU'* unabhängig von den Glycin-Reduktase-Genen transkribiert wird, muß jedoch durch experimentelle Untersuchungen bewiesen werden. Experimentelle Untersuchungen zur Transkription von *orfU'* wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.



**Abb. 4 mRNA-Sekundärstruktur, die aus der DNA-Sequenz von pMK374 abgeleitet wurde.** Rho-unabhängiger Terminator, der sich hinter *grdD1* befindet, mit einer freien Energie  $\Delta G_0' = -77,8$  kJ/mol nach (Freier *et al.*, 1986) berechnet. Die mRNA-Sekundärstruktur wurde mit dem Programm DNA-Fold (PCGENE) ausgewertet.

### 3.3. Versuche zur Klonierung von *grdD2*

Aus der vervollständigten Sequenz von *grdD1* wurden spezifische Primer PC48-1 und PC48-2 (s. 2.7.) abgeleitet, um ein *grdD*-spezifisches 990 bp PCR-Produkt zu amplifizieren, welches den bisher unbekanntem 3'-Bereich von *grdD* umfaßte. Dieses PCR-Produkt wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde eingesetzt, um in der partiellen *MboI*-Genbank nach Klonen mit der zweiten Kopie von *grdD* zu suchen. Dabei wurden die Klone pMK1255 und pMK926 als positive Klone identifiziert. Die Sequenzierungen ergaben wie bei den Plasmiden pMK374 und pMK4641 die Reihenfolge *grdA*, *grdC*, *grdD* auf dem Insert, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß sich auf dem Insert Sequenzen des Gensatzes I befanden. pMK926 enthielt nach Restriktionsverdau das gleiche Insert wie pMK4641, während in pMK1255 das gleiche Insert wie in pMK 374 gefunden wurde.

Die Primer GA660 und GA554 (s. 3.1.) wurden mittels PCR zum Screening einer weiteren chromosomalen Genbank von *E. acidaminophilum* eingesetzt (im Forschungsgruppenpraktikum durch A. Lechel). Diese Genbank bestand aus 7-10 kb *EcoRI*-DNA-Fragmenten (Dr. B. Söhling, persönliche Mitteilung), die aus einem partiellen Restriktionsverdau der chromosomalen DNA hervorgegangen waren und durch das Lambda ZAP<sup>®</sup> II-System in das pBluescriptSK(-)-phagemid des  $\lambda$ -Phagen ligiert wurden. Die Phagen-Überstände der Genbank wurden als Template für die PCR eingesetzt und das 1,5 kb-PCR-Produkt (s. 3.1.) amplifiziert. Nach *BglIII*-Restriktionsverdau war das PCR-Produkt ungespalten. Damit konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem *EcoRI*-Fragment in der Genbank um den bereits klonierten Gensatz I handeln mußte, während der Gensatz II offensichtlich nicht in der Genbank vorkam.

*grdA1*

1 AGTTTGGAGC AGAGAATCTT GTAGTTCTTG TTGGTGCAGC AGAAGCTGAA TCAGCAGGAC TAGCTGCTGA AACTGTTACA GCAGGAGACC CTACATTTCG AGGACCACTT GCAGGAGTCC  
 F G A E N L V V L V G A A E A E S A G L A A E T V T A G D P T F A G P L A G V

121 AGTTGGGACT AAGAGTATTC CACGCAGTTG AGCCAGAATT CAAAGATGCC GTAGACTCAG CAGTTTACGA TGAGCAAATA GGTATGATGG AAATGGTTCT TGACGTTGAC TCGATAATAG  
 Q L G L R V F H A V E P E F K D A V D S A V Y D E Q I G M M E M V L D V D S I I

241 CTGAAATGAA GTCAATAAGA GAGCAGTTTG GTAAGTTCAA CGACTAATAG CAGTATATAC CAAAAAATAA AAGCATGTGC CGGATAGTTT TATCCGGCAC AGCTTAGCAA AAGTATAAAT  
 A E M K S I R E Q F G K F N D -

361 GGGTGATTTT CCAAAATCACC CATTATTAA AATGCAGGAA TTTTAACAAA AAAATTATAA TCAAGAAAAC TACGATAAGA TTATTTTATA GATTTAGATA TAAGAGAGAT ATATGGTGG A

481 AGGCTGTCTG ATGACAAATT TCTACATTAT ATATAATATG CTTAATAATA AGCAAATATG ATTTCAAAAA TTTTGGAGGT GTCAATATAT *grdC1*  
 GAATTTTCCA GTTCTTAAAG GTGCGGGATA  
 M N F P V L K G A G

601 CGTTCTCGTG CACACACCAG ACATGATAAT GCACAACGGA ACAACTCAGA CAACAGAAAA GATTGTAAAC CCAGAATCAG AATACCTAAA AAAGCTGCCT GAGCATTTAA GATCATTTGA  
 Y V L V H T P D M I M H N G T T Q T T E K I V N P E S E Y L K K L P E H L R S F

721 AGACGTAGTA GCATACGCTC CAAACCAGAC ATACATTGGA AGCATGACTC CAGAGGCACT TGGAGAAAATA GCAATGCCAT GGTGGACAGA AGACAAGAAA GTGGCGGGAG CCGACAGATA  
 E D V V A Y A P N Q T Y I G S M T P E A L G E I A M P W W T E D K K V A G A D R

841 CGGAAAGCTT GGAGAGATAA TGCCTCAGGA CGAGTTCCTT GCGCTTATGT CTGCATCAGA CGTATTCGAC CTTGTGCTTT TCGAAAAAGA GTTCATAGAG GGAGCAAAGG CTAAGCTTGC  
 Y G K L G E I M P Q D E F L A L M S A S D V F D L V L F E K E F I E G A K A K L

961 AGCTCACCTT GTAGTAGGCA ACCTTGACAGA GAGCGTAAAC GCAGGAGTAG AGCTAGCTGA GATAGAAAAG CAGCTAAGCG AGTTCCACGC AGAAGGACTA TACAATAACG GCAAGCTTGT  
 A A H P V V G N L A E S V N A G V E L A E I E K Q L S E F H A E G L Y N N G K L

1081 AGGCTGCGTA AAAAGAGCCC ACGACGTAGA CGTGAACCTA AACTCTCATA CAATGCTTGA GAACCTTGCG GTTAAGGCAT CAGGAGTGCT TGCTCTTGCA AACCTTATAG CTAAAAACAA  
 V G C V K R A H D V D V N L N S H T M L E N L A V K A S G V L A L A N L I A K N

1201 CGTAAACCCA GCTGAAGTGG ACTACATCAT AGAGTGCTCT GAAGAGGCTT GCGGAGACAT GAACCAAAGA GGAGGCGGAA ACTTCGCCAA GGCTCTTGCA GAAATGACTG GCTGCGTTAA  
 N V N P A E V D Y I I E C S E E A C G D M N Q R G G G N F A K A L A E M T G C V

1321 CGCGACAGGC TCAGACATGA GAGGCTTCTG CGCAGGACCA ACGCACGCAC TTATAGCGGC AGCGGCGCTA GTTAAATCAG GCGTATACAA GAACGTAATA ATAGCAGCGG GTGGAGCGAC  
 N A T G S D M R G F C A G P T H A L I A A A A L V K S G V Y K N V I I A A G G A

1441 AGCAAAGCTT GGAATGAACG GAAAAGACCA CGTTAAGAAA GAAATGCCAA TACTTGAGGA CTGCCTTGGC GGCTTCGCGG TTCTAGTTAG CGAAAACGAC GGAGTAAACC CAATTCTAAG  
 T A K L G M N G K D H V K K E M P I L E D C L G G F A V L V S E N D G V N P I L

1561 AACAGACCTA GTGGGAAGAC ACACAGTTGC AACTGGATCA GCTCCACAGG CTGTAATAGG CTCTCTAGTT CTAAGCCCAC TAAAAGCAGG CGGACTTAAA ATAACAGACG TAGACAAGTA  
 R T D L V G R H T V A T G S A P Q A V I G S L V L S P L K A G G L K I T D V D K

1681 CTCGGTAGAA ATGCAAACCC CAGACATAAC TAAGCCGGCA GGAGCAGGAG ACGTTCCAGA GGCCAACTAC AAGATGATAG CCGCACTTGC TGTCATGGGA AAAGAAATAG AAAGAGCAGA  
 Y S V E M Q N P D I T K P A G A G D V P E A N Y K M I A A L A V M G K E I E R A

Fortsetzung nächste Seite



*orfU*<sup>-</sup>

```

3601 TAGCACGGTA AATGTTGTGA ATATTCAAAA AATTAAACCA TGGAGGCGTG AAATGTTCAA AATAGTTGAA AAGAAAGTAC TTGCGCCATC TATATTCCTT ATGAAAATAG ATGCGCCAAG
      M F K I V E K K V L A P S I F L M K I D A P
3721 GGTAGCAAAA TCAGCTAAGC CAGGACAGTT TGTAATAATC AGAATGGATG AAAAGGGTGA AAGAATACCG CTGACAATAT GCGACTATGA CAAAGAGGCG GGAACGGTTA CAATAGTAGT
      R V A K S A K P G Q F V I I R M D E K G E R I P L T I C D Y D K E A G T V T I V
3841 TCAGTCTATG GGATGCTCAA CAAGAAGAAT GGCAGAGTTC AACGAAGGCG ACTACTTCTC GGACTTCGTA GGACCTCTTG GAAGAGAGTC TGAGTTTGTT CATGAGAGCA TTGATGCACT
      V Q S M G C S T R R M A E F N E G D Y F S D F V G P L G R E S E F V H E S I D A
3961 AAAAAACAAG AAGATACTAT TTGTTGCAGG CGGAGTTGGA ACAGCTCCTG TTTACCCGCA GGTAAAGTGG CTTTCATGAAA ATGGAATAGA TGCAGATGTA ATAATAGGTG CAAAGAACAA
      L K N K K I L F V A G G V G T A P V Y P Q V K W L H E N G I D A D V I I G A K N
4081 AGAAATGATG ATAATGGAAG AAGAGCTAAA GAGCGTGAGC AAGAACCCTT ATCCTGCAAC TGACGACGGA TCCTCTAG-3'
      K E M M I M E E E L K S V S K N L Y P A T D D G S S

```

**Abb. 5 Sequenz des Inserts von pMK374 und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen.** Der nicht-codierende Strang vom 5'-Ende bis zum 3'-Ende wurde dargestellt. Bei Stop-Codons wurde ein Strich (-) in die Aminosäuresequenz gesetzt. Die Sequenz des vorgeschlagenen rho-unabhängigen Terminators wurde mit Pfeilen (>>) untersetzt, die vorgeschlagene Promotor-Sequenz mit Sternen (\*) markiert. Eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz wurde unterstrichen.

### 3.4. Vergleich der Sequenzen von GrdC und GrdD aus *Eubacterium acidaminophilum*

#### 3.4.1. Sequenzen von GrdC und GrdD anderer Organismen

Durch die Klonierung von *grdD1* aus *E. acidaminophilum* im Rahmen dieser Arbeit lagen die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten von Protein C der Glycin-Reduktase zum ersten Mal vollständig vor. Die ersten 210 Aminosäuren der Genprodukte von *grdD1* und *grdD2* waren völlig identisch (Lübbers, 1993). Die Aminosäuresequenzen von GrdC und GrdD aus *E. acidaminophilum* wurden mit den Sequenzen von Protein C aus *C. sticklandii* verglichen, die durch die Klonierung der Gene der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* bekannt waren (Gräntzdörffer *et al.*, 2000).

Um noch mehr Sequenzen zum Vergleich der Glycin-Reduktase-Gene zu erhalten, wurden die Sequenzen der Untereinheiten von Protein C aus *E. acidaminophilum* mit den Leserahmen aus vollendeten und unvollendeten Genomsequenzierungsprojekten verglichen, die unter <http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?> und unter <http://www.sanger.ac.uk/> zur Verfügung standen. Unter <http://www.sanger.ac.uk/> wurden die Gene der Glycin-Reduktase in *C. difficile* identifiziert. *C. difficile* gehört wie *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* zum Cluster XI der Clostridien (Collins *et al.*, 1994) und ist ein humanpathogener Organismus (Sears und Kaper, 1996). Unter <http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?> wurden zwei weitere Organismen gefunden, in denen die Gene der Glycin-Reduktase identifiziert wurden. *Treponema denticola* gehört zu den *Spirochaetaceae* und ist ebenfalls ein humanpathogener Organismus. *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* ist ein obligat anaerobes extrem thermophiles Bakterium (Svetlichny *et al.*, 1991). *E. acidaminophilum* ist der einzige bisher bekannte Organismus, in dem mehr als eine Kopie der Gene der Untereinheiten von Protein C vorkommt. Neben den Sequenzen der Untereinheiten von Protein C wurden über Sequenzvergleich auch die Sequenzen der Gene und Genprodukte der übrigen Glycin-Reduktase-Proteine und der Proteine des Thioredoxin-System in den aufgeführten Organismen gefunden (s. 4.2.).

**Tab. 8 Vergleich der Sequenzen von GrdC und GrdD.** GrdC1 und GrdD1 aus *E. acidaminophilum* wurden mit den Sequenzen aus *C. difficile*, *C. sticklandii*, *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola* verglichen. Die Identitäten wurden mit dem Programm LALIGN (Huang und Miller, 1991) bestimmt.

Organismus	Homologes Protein (AS, molekulare Masse [kDa])	Identität [%]
<i>E. acidaminophilum</i>	GrdC1(513, 54,5)	100
<i>C. difficile</i>	GrdC (510; 55,2)	64
<i>C. sticklandii</i>	GrdC (511; 55,3)	61,2
<i>Ct. hydrogenoformans</i>	GrdC (509; 54,8)	60,8
<i>T. denticola</i>	GrdC (512, 54,8)	56,1
<i>E. acidaminophilum</i>	GrdD1(385/40,0)	100
<i>C. difficile</i>	GrdD (381; 40,9)	65,5
<i>C. sticklandii</i>	GrdD (388; 41,0)	60,6
<i>Ct. hydrogenoformans</i>	GrdD (381; 40,5)	58,5
<i>T. denticola</i>	GrdD (384; 40,2)	53,6

Durch Vergleich der Sequenzen war es möglich, konservierte Regionen in GrdC und GrdD zu bestimmen. Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Prozente an Identität und Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen von GrdC und GrdD der genannten Organismen. Demnach

bestanden die höchsten Identitäten zwischen Protein C von *E. acidaminophilum* und *C. difficile* mit 63,3 % für GrdC und mit 64 % für GrdD.

### 3.4.2. Vergleich der Sequenzen von GrdC

Die Genprodukte von *grdC1* und *grdC2* von *E. acidaminophilum* unterschieden sich lediglich an fünf Positionen der Aminosäuresequenz (Austausch Glu/Lys an 153, Glu/Asp an 158, Ile/Val 329, Leu/Phe an 362 und Phe/Ser an 414) von *grdC1* zu *grdC2* (Lübbers, 1993), s. unter 3.1.). Aus beiden Sequenzen von GrdC aus *E. acidaminophilum* und GrdC der anderen Organismen (s. Tab. 8) wurde ein Alignment (Abb. 6) erstellt, um konservierte Sequenzbereiche und Domänen zu ermitteln. Solche konservierte Bereiche bestanden aus einer Abfolge von über alle fünf bekannten Sequenzen identischen Aminosäuren bzw. aus über alle fünf bekannten Sequenzen ähnlichen Aminosäuren (mit ähnlichen Eigenschaften). In Abb. 6 wurde neben dem Alignment eine Sekundärstrukturvorhersage dargestellt, die mit dem Programm SOPMA ([http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) mit GrdC1 aus *E. acidaminophilum* bestimmt wurde.

Die Hydrophobie der Sequenz von GrdC aus *E. acidaminophilum* wurde mittels Hydrophatie-Blot (Kyte und Doolittle, 1982) nach der Klonierung von *grdC1* und *grdC2* untersucht (Lübbers, 1993). Die daraus hervorgegangenen hydrophoben Sequenzbereiche mit positiven Werten (Kyte und Doolittle, 1982) der Sequenzen von *E. acidaminophilum* wurden ebenfalls in Abb. 6 als Balken über den Sequenzbereichen dargestellt, um zu ermitteln, ob sie in den anderen Proteinen ebenfalls auftraten.

Die Sequenzen von GrdC von *E. acidaminophilum* enthielten sechs Cysteine, deren Thiol-Gruppen für eine mögliche Acetylthioesterbildung im Katalysemechanismus von Protein C in Frage kamen. Von diesen Cysteinen waren Cystein 223 und 261 über alle fünf bekannten Sequenzen hochkonserviert. Zwei der Cysteine von GrdC aus *E. acidaminophilum* waren über vier von fünf bekannten Sequenzen konserviert, in der Sequenz von *T. denticola* statt Cystein 228 der Sequenz von *E. acidaminophilum* ein Alanin und Cystein 172 von *E. acidaminophilum* war in *C. difficile* durch ein Tyrosin ersetzt (Abb. 6). Ob diese Unterschiede in der Gensequenz auf mögliche Sequenzfehler zurückzuführen sind, weil die Genomsequenzierungen noch unvollendet sind, wurde diskutiert (s. 4.2.). Cystein 261 befand sich laut der Sekundärstrukturvorhersage im Bereich einer 'random coiled' Sekundärstruktur, dagegen lag Cystein 223 in einem Sequenzbereich von  $\alpha$ -Helices (Abb. 6).

Cystein 223 lag in der Konsensus-Sequenz IECSEEA am Beginn eines nach Hydrophatie-Blot hydrophilen Bereichs und im längsten der konservierten Bereiche (von Aminosäure 215 bis 242 der Sequenz von *E. acidaminophilum*). Cystein 261 befand sich in dem oben erwähnten hydrophoben Sequenzbereich von 238 bis 294 (Abb. 6). Für Cystein 261 in einem Sequenz-Motiv RGFCAG/AP konnte nach Vergleich mit Sequenzen in den Datenbanken aufgrund der Homologie zur FabH (Tsay *et al.*, 1992) eine katalytische Funktion postuliert werden (s. 3.4.1.).

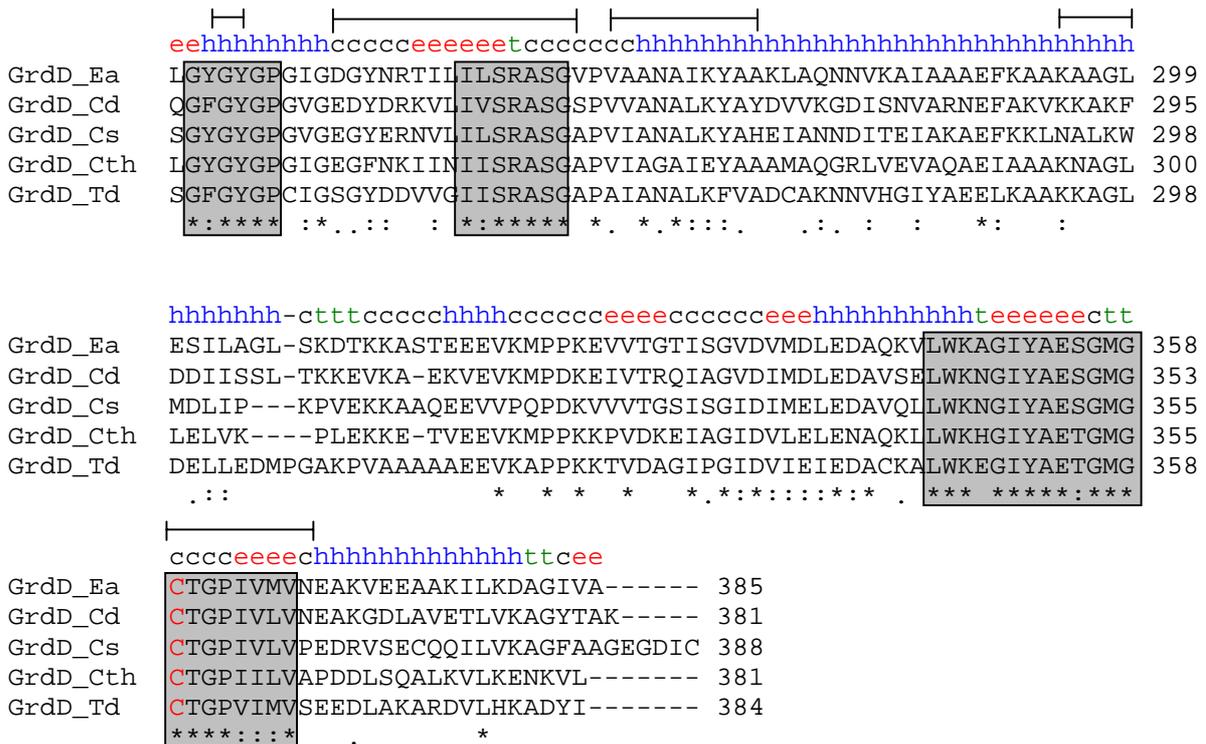
Im N-Terminus gab es weitere zwei Sequenzbereiche von wenigstens vier identischen Aminosäuren hintereinander, von Aminosäure 95 bis 98 und 160 bis 164 (Abb. 6). Weitere Bereiche gab es im mittleren Teil und im C-Terminus von GrdC von Aminosäure 258 bis 265, von 294 bis 298, von 384 bis 401, von 423 bis 437, von 455 bis 469 und von 471 bis 479. In diesen genannten Bereichen wurde jedoch kein Sequenz-Motiv identifiziert, welches bereits aus anderen Proteinen bekannt war.

Keine der Sequenzen von GrdC enthielt laut Hydrophatie-Blot eine transmembrane Domäne, für die wenigstens 20 hydrophobe Reste hintereinander nötig sind (Argos und Rao, 1986).









**Abb. 7 Sequenzvergleich der kleinen Untereinheit GrdD des Protein C.** GrdD\_Ea: 40 kDa-Untereinheit aus *E. acidaminophilum* (Genprodukt von *grdD1* des Gensatzes I), GrdD\_Cd: Genprodukt eines *orf* aus *C. difficile* (<http://www.sanger.ac.uk>), GrdD\_Cs: 39 kDa-Untereinheit aus *C. sticklandii* (Gräntzdörffer *et al.*, 2000), GrdD\_Cth: Genprodukt aus *Ct. hydrogenoformans* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?>), GrdD\_Td: Genprodukt eines Leserahmens aus *T. denticola* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?>). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*), konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:), semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt (.), eingefügte Lücken durch einem Strich (-) dargestellt. Konservierte Sequenzbereiche mit mehr als fünf identischen Aminosäuren hintereinander wurden grau unterlegt. Die konservierten Cystein-Reste (C) wurden hervorgehoben. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL W (1.74) (Matrix "blosum", THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt. Die Sekundärstrukturvorhersage wurde nur anhand von GrdD\_Ea mit dem Programm SOPMA ([http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) vorgenommen, die Art der berechneten Sekundärstruktur,  $\alpha$ -Helices (h),  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (e); turn (t) und coiled (c) wurden über der Aminosäure angegeben. Über den Sequenzen wurden mit Klammern die hydrophoben Bereiche von GrdD1 aus *E. acidaminophilum* markiert (Kyte und Doolittle, 1982).

### 3.4.4. Vergleich der Aminosäuresequenz der großen Untereinheit GrdC von Protein C mit Sequenzen der Datenbanken

Die Proteinsequenzen von GrdC und GrdD von *E. acidaminophilum* wurden in die Datenbank eingegeben, um aus Homologien zu Sequenzen anderer Proteine mögliche Funktionen von Domänen ableiten zu können.

Die Sequenz von GrdC zeigte Homologien zur Sequenz der  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein Synthase III (FabH) prokaryotischer und eukaryotischer Organismen (Tab. 9). Die  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier-Protein-Synthase III (FabH) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Fettsäure-Biosynthese, das die initiale Kondensationsreaktion zwischen Acetyl-CoA und Malonyl-ACP zu Acetoacetyl-CoA katalysiert (Tsay *et al.*, 1992). Während der Katalyse wird der Acetyl-Rest unter Bildung eines Acetylthioesters von Acetyl-CoA auf ein im katalytischen Zentrum liegenden Cystein-Rest an Position 112 der Sequenz von *E. coli* (Tsay *et al.*, 1992) übertragen. Anschließend kommt es unter Bildung von Acetoacetyl-ACP zu einer Claisen-Kondensation zwischen dem Acetyl-Rest und dem Malonyl-Rest, der an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebunden vorliegt. Das katalytisch wirksame Cystein befand sich in dem Sequenz-Motiv GA/SCAG von ungeladenen Aminosäuren umgeben. Das Cystein 261

von GrdC lag mit GFCAG in einem ähnlichen Sequenz-Motiv in allen fünf bekannten Sequenzen (Abb. 6). In einem Alignment zwischen den Sequenzen der FabH verschiedener Organismen und den fünf bekannten Sequenzen GrdC waren das beschriebene katalytisch aktive Cystein der FabH immer identisch zum konservierten Cystein 261 von GrdC1 aus *E. acidaminophilum* (Abb. 8). Die höchste Identität zwischen GrdC und der  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III bestand zur FabH von *Spinacia oleracea* mit 29 %. Die Homologien zu *Streptomyces roseofulvus* betrug nur 25 %, jedoch erstreckte sich die Homologie über 251 Aminosäuren der FabH (s. Tab. 9). Durch die Auswertung der Kristallstruktur der FabH von *E. coli* (Qiu *et al.*, 1999) sind neben dem Cystein 112 weitere für die Katalyse der FabH essentielle Aminosäure-Reste bekannt. Histidin 244 wirkt bei der Aktivierung der Thiol-Gruppe von Cystein 112 als Base. Zwischen Histidin 244 und der Sequenz von GrdC gab es jedoch keine Identitäten und Ähnlichkeiten. Zu den Leucin-Resten 142 und 205, sowie zu den Phenylalanin-Resten 157 und 87, die eine hydrophobe Tasche um den Acetyl-Rest im katalytischen Zentrum bilden (Qiu *et al.*, 1999), gab es keine Identität, jedoch befanden Leucin- bzw. Phenylalanin-Reste in der näheren Umgebung (Abb. 8).

FabH_Cj	SPDY <b>F</b> TMPSTACKIASNLGLVNIS----AFDISAA <b>C</b> SGFIYLLLEQAKALVESGLKKNVLI	138
FabH_ec	S-ATHA <b>F</b> PSAACQIQSMLGIKGCPCP----AFDVAAA <b>C</b> AGFTYALSVADQYVKS GAVKYALV	136
FabH_bs	T-PDQS <b>F</b> PTVSCMIQEQLGAKKAC----AMDISAA <b>C</b> AGFMYGVVTGKQFIESGTYKHVLV	136
FabH_so	T--PEDL <b>F</b> GSAPQVQRALGCSRTPPL---SYDITAA <b>C</b> SGFMLGLVSAACHVRGGGFKNVLV	205
FabH_Sr	S-RLEQT <b>P</b> PLAVLLAEDLGARAAA----GLDVSGA <b>C</b> AGFCHALALASDAVRAGSARHVLV	149
GrdC1_Ea	EACGDMNQ <b>R</b> GGGNFAKALAEMTGCVNATGSDMRGF <b>C</b> AGPTHALIAAAAALVKSGVYKNVII	285
GrdC2_Ea	EACGDMNQ <b>R</b> GGGNFAKALAEMTGCVNATGSDMRGF <b>C</b> AGPTHALIAAAAALVKSGVYKNVII	285
GrdC_Cs	EACGDMNQ <b>R</b> GGGNFAKSIAEACSF <sup>T</sup> NATGSDTRGF <b>C</b> AGPTHALINAAAALVKSGVYKHVVV	283
GrdC_Cd	EACGDINQ <b>R</b> GGGNFAKSIAE IAGLQ <b>N</b> ATGSDTRGF <b>C</b> AAPTHALIQAAAALVKAGIHKNVMV	282
GrDC_Td	EAAGDINQ <b>R</b> GGGNIAKAVGEKSGCVNATGSDVRGF <b>C</b> AAPVHAI IHGAALVAAGIFKNVMV	282
GrdCt_Ch	EACGDMNQ <b>R</b> GGGNFAKAIGE IAGLVNANGSDVRGF <b>C</b> AGPAHALLHAASLVKSGTFKNVVV	282
	. . . : . * . * . : . : * : . : :	
FabH_Cj	IGA <b>E</b> KTSSI----MDYNDRSICIL <b>F</b> GDGAGAGVVS <b>L</b> D-NEN-HILDVHTASNGN-----	186
FabH_ec	VGSD <b>V</b> LART----CDPTDRGTII <b>I</b> FGDGAGAAVLAAS-EEP-GII <b>S</b> THLHADGS-----	184
FabH_bs	VGVEKL <b>S</b> SI----TDWEDRNTAVL <b>F</b> GDGAGAAVVG <b>P</b> V-SDDRGILSFELGADG-----	184
FabH_so	IGADAL <b>S</b> RF----VDWTD <b>R</b> GT <b>C</b> IL <b>F</b> GDAAAGAVV <b>V</b> QACDSEEDGMFAFDLHSDGGGG <b>R</b> ---	258
FabH_Sr	VGTERMT <b>D</b> L----VERAD <b>R</b> TVSVL <b>F</b> ADGAGAAV <b>V</b> GPS--AR <b>P</b> GISPPARGA <b>A</b> GR-----	197
GrdC1_Ea	AAGGATA <b>K</b> LGMNGKDHVKKEM <b>P</b> ILEDCLGGFAVLVSE <b>N</b> DGVNPIL <b>R</b> TDLVGR <b>H</b> T-----	339
GrdC2_Ea	AAGGATA <b>K</b> LGMNGKDHVKKEM <b>P</b> ILEDCLGGFAVLVSE <b>N</b> DGVNPV <b>L</b> R <b>T</b> DLVGR <b>H</b> T-----	339
GrdC_Cs	VGGGATA <b>K</b> LGMNAKDH <b>I</b> KK <b>N</b> IPVLEDV <b>L</b> GGFAVLVSE <b>D</b> DGISPVF <b>N</b> TDLVGR <b>H</b> T-----	337
GrdC_Cd	VAGGAS <b>A</b> KLGMNAKDHV <b>K</b> GLPVLEDV <b>V</b> GGFAVLVSE <b>N</b> DGVNPV <b>I</b> R <b>T</b> DL <b>T</b> KG <b>H</b> T-----	336
GrDC_Td	VSGGS <b>V</b> PKLGMNGKDHV <b>K</b> DL <b>P</b> L <b>F</b> EDMIGGF <b>A</b> V <b>M</b> LSADDGVNPV <b>I</b> N <b>T</b> EV <b>V</b> GG <b>H</b> V-----	336
GrdCt_Ch	VGGG <b>A</b> VAKLGMNGKDHV <b>N</b> K <b>M</b> PVLED <b>M</b> L <b>G</b> AF <b>A</b> ILVSE <b>N</b> DGLNP <b>I</b> IR <b>L</b> DVIG <b>K</b> HN-----	336
	. . . : . : : . . : :	
FabH_Cj	-YGD <b>L</b> LMTQ <b>R</b> SQK <b>S</b> SL <b>C</b> Q <b>T</b> LS <b>M</b> Q-----MKGNE <b>V</b> FK <b>I</b> AV <b>N</b> TL <b>S</b> ND <b>V</b> VE <b>I</b> LAK	232
FabH_ec	-YGE <b>L</b> LTL <b>P</b> N <b>A</b> DRV <b>N</b> P <b>E</b> NS <b>I</b> HL <b>T</b> -----MAGNE <b>V</b> FK <b>V</b> AV <b>T</b> EL <b>A</b> H <b>I</b> VD <b>E</b> TL <b>A</b> A	230
FabH_bs	--TGG <b>Q</b> H <b>L</b> Y <b>L</b> NE <b>K</b> -----R <b>H</b> T <b>I</b> -----M <b>N</b> GRE <b>V</b> FK <b>F</b> AV <b>R</b> Q <b>M</b> GE <b>S</b> C <b>V</b> N <b>V</b> IE <b>K</b>	223
FabH_so	-HL <b>N</b> AS <b>L</b> L <b>N</b> DE <b>T</b> DA <b>A</b> I <b>G</b> NN <b>G</b> AV <b>T</b> GF <b>P</b> PK <b>R</b> PS <b>Y</b> SC <b>I</b> N <b>M</b> NG <b>K</b> EV <b>F</b> R <b>F</b> AV <b>R</b> CV <b>P</b> Q <b>S</b> IE <b>A</b> AL <b>Q</b> K	317
FabH_Sr	-YAG <b>A</b> L <b>R</b> MD <b>R</b> GW <b>D</b> TF <b>A</b> AD <b>P</b> SL <b>G</b> R-----P <b>W</b> MR <b>M</b> D <b>G</b> RR <b>V</b> FR <b>W</b> AM <b>D</b> EV <b>T</b> PR <b>A</b> AE <b>L</b> LR <b>E</b>	247
GrdC1_Ea	-VATGSAPQ <b>A</b> VIG <b>S</b> LVLS <b>P</b> L <b>K</b> AG-----GL <b>K</b> IT <b>D</b> VD <b>K</b> YS <b>V</b> EM <b>Q</b> NP <b>D</b> IT <b>K</b> P <b>A</b> GA	386
GrdC2_Ea	-VATGSAPQ <b>A</b> VIG <b>S</b> LVLS <b>P</b> L <b>K</b> AG-----G <b>F</b> K <b>I</b> T <b>D</b> VD <b>K</b> YS <b>V</b> EM <b>Q</b> NP <b>D</b> IT <b>K</b> P <b>A</b> GA	386
GrdC_Cs	-VGTGSS <b>P</b> Q <b>A</b> VIT <b>S</b> LIT <b>M</b> PL <b>D</b> KG-----GL <b>K</b> IT <b>D</b> IS <b>K</b> YS <b>V</b> EM <b>Q</b> NP <b>D</b> IT <b>K</b> P <b>A</b> GA	384
GrdC_Cd	-VGTGSS <b>P</b> Q <b>A</b> V <b>M</b> TALIT <b>S</b> GL <b>D</b> RA-----NL <b>K</b> IT <b>D</b> VD <b>V</b> YS <b>V</b> EM <b>Q</b> NP <b>D</b> IT <b>K</b> P <b>A</b> GA	383
GrDC_Td	-ISSGSAPQ <b>A</b> V <b>M</b> SVLVY <b>D</b> PL <b>N</b> AA-----GL <b>K</b> M <b>T</b> DI <b>E</b> K <b>Y</b> SA <b>E</b> L <b>Q</b> N <b>H</b> EIT <b>A</b> P <b>A</b> GA	383
GrdCt_Ch	-IGSGAS <b>P</b> Q <b>Q</b> V <b>M</b> KAL <b>V</b> AE <b>P</b> L <b>A</b> KL-----GR <b>K</b> IT <b>E</b> ID <b>Y</b> YS <b>V</b> EM <b>Q</b> NP <b>E</b> L <b>T</b> E <b>P</b> A <b>G</b> A	383
	: :	

Fortsetzung nächste Seite

FabH_Cj	NNILAQEIDLFIPH <sup>*</sup> QANLRIIKAV-----QEKLNLSD-EKCVITVQKYGNTSAASIPMAM	286
FabH_ec	NNLDRSQLDWLVEH <sup>*</sup> QANLRIISAT-----AKKLGMSM-DNVVVTLDRHGNTSAASVPCAL	284
FabH_bs	AGLSKEDVDFLIH <sup>*</sup> QANIRIMEAA-----RERLELPV-EKMSKTVHKYGNTSAASIPISL	277
FabH_so	AGLTSSNIDWLLIH <sup>*</sup> QANQRIIDAV-----ATRLEVPS-ERVLNLANYGNTSAASIPLAL	371
FabH_Sr	SGIEPEALDAFVH <sup>*</sup> QANLRMIELM-----AERLGLPERTAVARDVVRAGNTSAASVPLAL	302
GrdC1_Ea	GDVPEANYKMIAALAVMGKEIERADIAAFVEKHGMVGVWAPTQGHIPSGVPYIGFAISDLT	446
GrdC2_Ea	GDVPEANYKMIAALAVMGKEIERADIAASVEKHGMVGVWAPTQGHIPSGVPYIGFAISDLT	446
GrdC_Cs	GDVPEANYKMIAALGVKRGDLEKSSLPFTFGKEHGMVGFAPPTQGHIPSGVPPFIGFAIDEMK	444
GrdC_Cd	GDVPEANYKMIGALAVKRGDLEKELKDFVSNKGLPGWAPTQGHIPSGAPYIGFLIDDLT	443
GrDC_Td	GNVPEANVKMIAALSVMKGQLEKTQIAEFVKKHGVVGFAPPTQGHIPSGVPPFIGHARRDMM	443
GrdC_Ch	GNVPEANYKMIGALAVMAGEIGRADIHKFVEKHGLPGFAPPTQGHIPSGVPALGFFRDALL	443
	. : . : . : . : . : . :	

**Abb. 8 Ausschnitt eines Alignments zwischen Sequenzen der  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III und der großen Untereinheit von Protein C.** GrdC1\_Ea 54 kDa-Untereinheit aus *E. acidaminophilum* (Genprodukt von grdC1 des Gensatzes I (Lübbbers, 1993), GrdC2\_Ea 54 kDa-Untereinheit aus *E. acidaminophilum* (Genprodukt von grdC2 des Gensatzes II, (Lübbbers, 1993), GrdC\_Cd Genprodukt eines orf aus *C. difficile* (<http://www.sanger.ac.uk>), GrdC\_Cs Untereinheit aus *C. sticklandii* (Gräntzdörffer, 1997), GrdCt\_Ch Genprodukt eines Leserahmens aus dem Genom von *Ct. hydrogeniformans* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?>); GrdC\_Td Genprodukt eines orf aus *T. denticola* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?>), FabH\_Sr  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III aus *Streptomyces roseofulvus* (Bibb *et al.*, 1994); FabH\_Ec  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III aus *E. coli* (Tsay *et al.*, 1992); FabH\_Cj putative  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III aus *Camphylobacter jejuni*; FabH\_bs putative  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III aus *B. subtilis* (Morbidoni *et al.*, 1996); putative  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III aus *Spinacia oleracea* (Tai und Jaworski, 1993). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*), konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:), semi-konservierte Aminosäuren (.), eingefügte Lücken durch einem Strich (-) dargestellt. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL W (1.74) (Matrix "blosum", THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt. Der identische Cystein-Rest zwischen den Sequenzen der FabH und GrdC wurde rot hervorgehoben. Der katalytische Histidin-Rest in der FabH wurde eingerahmt (Qiu *et al.*, 1999). Drei Leucin-Reste und ein Phenylalanin, die eine hydrophobe Tasche bilden (Qiu *et al.*, 1999), wurden fett hervorgehoben.

Ein weiteres Enzym, zu dem GrdC Homologien hatte und dessen Katalyse über ein als Thioester gebundenes Acetyl-Enzym-Intermediat abläuft, war die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Thiolase aus *Acinetobacter calcoaceticus*. Das Enzym besteht aus 401 Aminosäuren und katalysiert die Spaltung von  $\beta$ -Ketoacyl-CoA zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA. Der  $\beta$ -Ketoacyl-Rest wird an die Thiolat-Gruppe des Cystein 90 gebunden. Der Bereich dieses Cysteins wurde mit der Region um Cystein 261 von GrdC in Verbindung gebracht.

200	210	220	230	240	250
GrdC1_Ea	GVLALANLI	AKN-NVNPAEVDYII	ECSEEEACGDMNQ	RGGGNFAKALAEMT	GCVNATGSDM
	*:: :*	** :*	** :*	*:*	*:*
CATF_ACICA	GAIP	IAALIERNPSVNWAQ	VDDVIYGCANQAGEDN	-RNVGRMSALLAGLP	--VEVPATTV
	30	40	50	60	70
					80
	260	270	280		
GrdC1_Ea	RGF	CAGP	THALIAAAAALVKSGVYKNV	IIAAG	
	:::	*:	** :	*:* :	
CATF_ACICA	NRL	CSSLD	AIAMAARA	IKAG-EAHLIIAGG	
	90	100	110		

**Abb. 9 Sequenzvergleich von GrdC von *E. acidaminophilum* mit der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Thiolase von *Acinetobacter calcoaceticus* CATF\_ACICA (Shanley *et al.*, 1994).** Sequenzvergleich wurde mit dem Programm LALIGN (Huang und Miller, 1991) erstellt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*), konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:), semi-konservierte Aminosäuren (.), eingefügte Lücken durch einem Strich (-) dargestellt. Die Identität zwischen dem katalytischen Cystein der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Thiolase und Cystein 261 in GrdC wurde rot hervorgehoben.

Ein zweites Cystein dient der Deprotonierung von Acetyl-CoA als Voraussetzung für eine Kondensation mit einem weiteren Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA (Davis *et al.*, 1987;

Palmer *et al.*, 1991). Zu diesem katalytisch aktiven Cystein der Thiolase an Position 387 wies GrdC keine Homologien auf, da es offensichtlich keine analoge Reaktion katalysiert. In Tab. 9 wurden die höchsten Homologien zwischen GrdC von *E. acidaminophilum* zur  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III-Sequenzen verschiedener Organismen zusammengefaßt.

**Tab. 1 Gemeinsame Sequenzbereiche von GrdC mit anderen Proteinen.** GrdC1 von *E. acidaminophilum* zeigte Homologien zu Sequenzbereichen von Proteinen anderer Funktion, die mittels NCBI-Blast (TblastN) ermittelt wurden. In der nachfolgenden Tabelle wurden die Proteine, die Größe des gemeinsamen Sequenzbereichs und die Höhe der Identität in diesem Bereich angegeben.

Protein/Enzym-Komplex	Organismus	Bereich der Homologie in den Proteinen	Bereich der Homologie bei GrdC	Homologie Ident. [%]	Ähnl. [%]	Accession No.
$\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein Synthase III	<i>Streptomyces roseofulvus</i>	13-270	199-460	25	37	AF058302.1
$\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein Synthase III	<i>Spinacia oleracea</i>	45-213	142-293	30	47	JQ2386
$\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein Synthase III	<i>Porphyra purpurea</i>	47-174	186-330	30	48	P51196
$\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein Synthase III	<i>Escherichia coli</i>	43-144	187-243	23	34	P2449
$\beta$ -Ketoacyl-CoA Thiolase	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	30-118	200-290	31	50	Q43935

### 3.4.5. Vergleich der Sequenz von GrdD mit Datenbanken

Bei Sequenzvergleich mit Datenbanken zeigte GrdD Homologien zu den Phospholipid-Synthese-Proteinen PlsX verschiedener Organismen, die ubiquitär vorkommen und deren Gene *plsX* sich immer im Bereich von Genen des Fettsäure- bzw. Phospholipid-Stoffwechsel befanden. PlsX wurde in *E. coli* entdeckt bei Untersuchungen einer *sn*-Glycerol-3-phosphat-Auxotrophie. Diese Auxotrophie zeigt sich in einem erhöhten  $K_M$ -Wert der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase für *sn*-Glycerol-3-phosphat. Ursache dafür ist einmal eine Mutation *plsB26* in der Sequenz der *sn*-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase PlsB, die die Acylierung von Glycerol-3-Phosphat als ersten Schritt der Phospholipid-Synthese katalysiert. Neben *plsB26* fand man jedoch eine weitere Mutation auf dem Chromosom von *E. coli*, die für die Auxotrophie verantwortlich war. Diese wurde als *plsX* bezeichnet (Larson *et al.*, 1984).

Es gab keine Identitäten zwischen GrdD und den PlsX im Bereich der Cystein-Reste von GrdD. An Positionen 217 und 222 in PlsX (auf die Sequenz von *E. coli* bezogen) und an den Positionen 212 und 217 von GrdD aus *E. acidaminophilum* existierten jeweils 2 konservierte Aspartat-Reste, einem Asparagin und einem Lysin-Rest, die immer zwischen 2 ungeladenen Aminosäuren lagen und in beiden Proteinen konserviert waren (Abb. 10).

```

PlsX_Ec  RDASAVLKTIPSIN---YIGYLEANELLTGTIDVLVCDGFTGNVTLKTMEGVVVM 238
PlsX_St  REASLMLKTVPPTIN---YIGYLEANELLTGTIDVLVCDGFTGNVTLKTMEGVVVM 238
PlsX_Cd  KRSYEEIKK-LDLN---FIGNVEAREVINAYTDIIICDGFTGNILLKSAEGVALS 242
PlsX_Tm  KRAYQLLKEFLGDT---FFGNVEGHDINLGTVDVVVADGFGSNGVALKTMEGTAKL 224
PlsX_Bs  KQTFQILKETANIN---FIGNVEARDLLDDVADVVTVDGFTGNVTLKTLLEGSALS 176
PlsX_Rc  KIAAEMIGAMETAGGYEFVGFVEGNDLPGSRVDVIIVTDGFTGNVALKTEGTTAKF 293
PlsX_Cp  RQTFRMLRETFGEA---FLGNIESGAVFDGAAIDIVVTDGFTGNIFLKTAEGVFEEF 250
: : : : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
GrdD_Ea  AGNGYPITFAESLRADGGSVMRGNDLLGGAADVMVTDLSLTGNIMMKVFFSSYTTG 234
GrdD_Cd  KDNQYDMEFADSIKADGGCVMRGNLDLLVGAEDVMVTDLSLTGNIFMKVFFSSYTTG 230
GrdD_Cs  QAKGYDIAFGESQSRSDGGRVLRGNLDLLGTVDVVVTDLTGNILMKMFFSFTSG 233
GrdD_Cth QSRGYPIDFSESKRSDGGVVMRGNLDLLAGTVDVMICDSLTLGNLLIKIFSAITTTG 235
GrdD_Td  KEKGYKVNYTESNRADGGVVMRGNLDLLQGTVDVMVCDTLTLGNLLIKLFFSFTVTG 233
* * : : * * : * * : * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

```

**Abb. 10 Darstellung des Sequenzabschnitts mit Homologien zwischen GrdD und Phospholipid-Synthese-Protein PlsX.** PlsX\_Ec: Phospholipid-Synthese-Protein aus *E. coli* (Oh und Larson, 1992), PlsX\_St: Phospholipid-Synthese-Protein aus *S. typhimurium* (Zhang und Cronan, 1998), PlsX\_Cd: Genprodukt eines offenen Leserahmens aus *C. difficile* (<http://www.sanger.ac.uk>), PlsX\_Tm: putatives Phospholipid-Synthese-Protein aus *T. maritima* (Nelson *et al.*, 1999), PlsX\_Bs Phospholipid-Synthese-Protein aus *B. subtilis* (Morbidoni *et al.*, 1996), PlsX\_Rc: Phospholipid-Synthese-Protein aus *R. capsulatus* (Carty *et al.*, 1994), PlsX\_Cj: Phospholipid-Synthese-Protein aus *Chlamydia pneumoniae* (Kalman *et al.*, 1999), GrdD\_Ea: 40 kDa-Untereinheit aus *E. acidaminophilum* (Genprodukt von grdD1 des Gensatzes I), GrdD\_Cd: Genprodukt eines orf aus *C. difficile* (<http://www.sanger.ac.uk>), GrdD\_Cs: 39 kDa-Untereinheit aus *C. sticklandii* (Grätzdörffer *et al.*, 2000), GrdD\_Cth: Genprodukt aus *Ct. hydrogenoformans* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?>), GrdD\_Td: Genprodukt eines Leserahmens aus *T. denticola* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?>). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*), konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:), semi-konservierte Aminosäuren mit einem Punkt (.) eingefügte Lücken durch einem Strich (-) markiert. Der konservierte Bereich beider Proteinklassen wurde grau unterlegt und wurde durch Abgleich von GrdD von *E. acidaminophilum* mit der Datenbank ermittelt Der Sequenzvergleich für beide Proteinklassen wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL W (1.74) (Matrix "blosom", THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

**Tab. 10 Sequenzhomologien von GrdD zu anderen Proteinen.** Dabei wurde die Protein-Sequenz von GrdD von *E. acidaminophilum* in die Datenbank NCBI-blast (tBlastN) eingegeben.

Protein/Enzym-Komplex	Organismus	Sequenzbereich der PlsX	Sequenzbereich von GrdD	Homologie		Accession No.
				Ident. [%]	Ähnl. [%]	
Phospholipid-Synthese-Protein	<i>Thermotoga maritima</i>	1-223	28 bis 223	31	51	AE001700
Phospholipid-Synthese-Protein	<i>Bacillus subtilis</i>	128 bis 233	128 bis 233	27	49	P71018
Phospholipid-Synthese-Protein	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	190-285	131 bis 226	30	47	P30789
Phospholipid-Synthese-Protein	<i>Salmonella typhimurium</i>	133-240	116 bis 223	31	46	AF044668
Phospholipid-Synthese-Protein	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	150-242	131 bis 226	32	50	AE001676
Phospholipid-Synthese-Protein	<i>Escherichia coli</i>	133-240	116 bis 226	30	44	P27247

Neben diesen wurden beim Alignment mit den PlsX vorwiegend hydrophobe und saure Reste, die aber nicht in beiden Proteinarten konserviert an diesen Stellen auftraten, miteinander in Verbindung gebracht. Die Funktion dieser Proteine ist unbekannt, aber aufgrund ihrer Stellung im Genom wurde eine mögliche Funktion bei der Fettsäure- oder Phospholipid-Biosynthese postuliert (s. 4.4.). Das Gen der PlsX liegt in fast allen Organismen stromaufwärts von *fabH*, dem Gen der  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein Synthase III, zu der

GrdC Homologien aufwies. Über ein Zusammenwirken im Stoffwechsel von PlsX und FabH ist bisher nichts bekannt. Es wurde postuliert, daß PlsX ein wichtiges Bindeglied in der Regulation von Ribosomen und Phospholipid-Synthese ist (Podkovyrov und Larson, 1995).

### 3.4.6. Sequenzvergleich von OrfU

Stromabwärts des 3'-Endes von *grdD1* folgte die Sequenz eines unbekanntes Leserahmens, der als *orfU'* bezeichnet wurde. Von *orfU'* lagen nur die ersten 492 bp auf dem Insert von pMK374. Um mehr Informationen über den Leserahmen zu erhalten, wurde die resultierenden 164 Aminosäuren mit den Leserahmen des Genoms von *C. difficile* verglichen. Hier wurde ein Leserahmen aus 843 bp und 280 resultierenden Aminosäuren mit 66 % Identität gefunden (Abb. 11). In Tab. 11 wurden die Identitäten und Ähnlichkeiten der 164 Aminosäuren des OrfU' aus *E. acidaminophilum* zu anderen Proteinen aufgeführt.

Die höchste Identität mit 70 % bestand zum Produkt eines Leserahmens, von dem die ersten 123 bp bei Arbeiten zur Klonierung einer ADH aus *C. beijerinckii* (Chen, 1995; Rifaat und Chen, 1993) identifiziert wurden (siehe Tab. 11) und OrfU' aus *E. acidaminophilum*. Die gesamte Sequenz dieses *orf* aus *C. beijerinckii* wurde ebenso wie in *E. acidaminophilum* noch nicht kloniert.

OrfU`_Ea	MKIDAPRVAKSAKPGQFVIIRMDEKGERIPLTICDYDKEAGTVTIVVQSMGCSTRRMAEF	60
OrfU_Cd	MEIEAPRVAKSSQPGQFIIKNDEKGERIPLTIADYDREKGTVTIVFQTVGASTKKLAMF	60
	*:.*:*****:.*:****:*:*****.****:* *****.***:.*.***:.* **	
OrfU`_Ea	NEGDYFSDVFGPLGRESEFVHESIDALKNKKILFVAGGVGTAPVYPQVKWLHENGIDADV	120
OrfU_Cd	EENDFVMDVFGPLGQASEFIHEDIEELRNKKILFVAGGVGSAPVYPQVKWFKEHGLDQDV	120
	:*.*:.* *****:****:*.*:.*:*****:*****:*****:.*:.*.*.***	
OrfU`_Ea	IIGAKNKEMMIMEEELKSVSKNLYPATDDGSS-----	152
OrfU_Cd	IIGARTKELIILEDDMKKVAKNVYVSTDDGTYGFNGRVTDLLKDLVDNQGKKYDQAIIVIG	180
	****:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:.*:****:	
OrfU`_Ea	-----	
OrfU_Cd	PMIMMKFMCQLTKELNIPTIVSLNTIMIDGTGMCGGCRVSVGNETKFACVDGPEFDGHLV	240
OrfU`_Ea	-----	
OrfU_Cd	DFDQAMRRQSMYKTQEGRAMLKLLEEGDSSHHSNCGCGGNK	280

**Abb. 11 Sequenzvergleich der Genprodukte von orfU.** OrfU`\_Ea: *E. acidaminophilum*; dargestellt sind die 164 Aminosäuren, Produkt der 492 bp von *orfU'*, die durch die Klonierung von pMK374 bekannt sind. OrfU\_Cd: Genprodukt eines *orf* aus *C. difficile*, der durch die vollständige Sequenzierung des Genoms bekannt war. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (\*), konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:), semi-konservierte Aminosäuren durch einen Punkt (.), eingefügte Lücken durch einem Strich (-) markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm CLUSTAL W (1.74) (Matrix "blosum", THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

OrfU aus *C. difficile* hatte 28 % Identität zur Untereinheit ArsB der anaeroben Sulfid-Reduktase aus *S. typhimurium*. Zu diesem Protein gab es zwei konservierte Regionen, deren Funktionen bekannt waren. Zum einen bestanden Homologien in der glycinreichen Region I<sub>93</sub>LFVAGGVGTAP<sub>104</sub>, die aus Nitrat-Reduktasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Aspergillus nidulans* als Flavin-Bindedomäne, die die Oxidation von NADH katalysiert, bekannt war. Zum anderen befanden sich im C-Terminus drei Cysteine und ein Aspartat eines DX<sub>4</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>11</sub>C-Motivs, deren Abstand und Stellung in der Aminosäuresequenz auf eine Funktion als Liganden eines Eisen-Schwefel-Clusters hindeuten (s. 4.8. Abb. 11). Aufgrund dieser gemeinsamen Sequenz-Motive bestanden Homologien von OrfU aus *C. difficile* zur Untereinheit HydG einer aus vier Untereinheiten bestehenden Ni-Fe-Hydrogenase aus

*Pyrococcus furiosus* (Pedroni *et al.*, 1995). Das besondere dieses Enzymes ist neben den Sequenzhomologien der Untereinheiten HydD und HydA zu Untereinheiten einer Ni-Fe-Hydrogenase die Homologien der Untereinheiten HydB and HydG Sulfid-Reduktase aus *S. typhimurium*. Dies deutete auf eine Doppelfunktion des Enzyms als Hydrogenase und Sulfid-Reduktase hin (Pedroni *et al.*, 1995). Weiterhin bestanden Homologien zu hypothetischen Proteinen der Organismen *Pyrococcus abyssi* (AJ248286.1) und *Treponema pallidum* (Fraser *et al.*, 1998), die aufgrund ihrer Homologien als  $\gamma$ - Untereinheit von Hydrogenasen identifiziert wurden (Tab. 11).

Daneben gab es die Homologie zur PyrDII, einer Untereinheit Dihydroorotat-Dehydrogenase (Quinn *et al.*, 1991) aus *B. subtilis*, das Redoxequivalente von einem Flavoprotein auf das Elektronentransportsystem der Zellmembran überträgt, als vierten Schritt der Pyrimidin-Biosynthese.

*orfU* befand sich in *C. difficile* nicht wie in *E. acidaminophilum* im 3'-Bereich der Gene der Glycin-Reduktase-Proteine. Stromaufwärts des 5'-Endes von *orfU* lag nach den höchsten Homologien das Gen einer  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase. Hier wurden die höchsten Homologien zum Protein aus *Synechococcus* PCC7942 (39 % Identität und 61 % Ähnlichkeit) gefunden. Nach dem 3'-Ende von *orfU* folgte, nach den Homologien beurteilt, das Gen der  $\beta$ -Untereinheit der Glutamat-Synthase. Die höchsten Homologien wurden zu *Thermotoga maritima* (58 % Identität und 71 % Ähnlichkeit) gefunden.

**Tab. 11 Proteine, zu denen das Genprodukt *orfU*' aus *E. acidaminophilum* Homologien zeigte.**

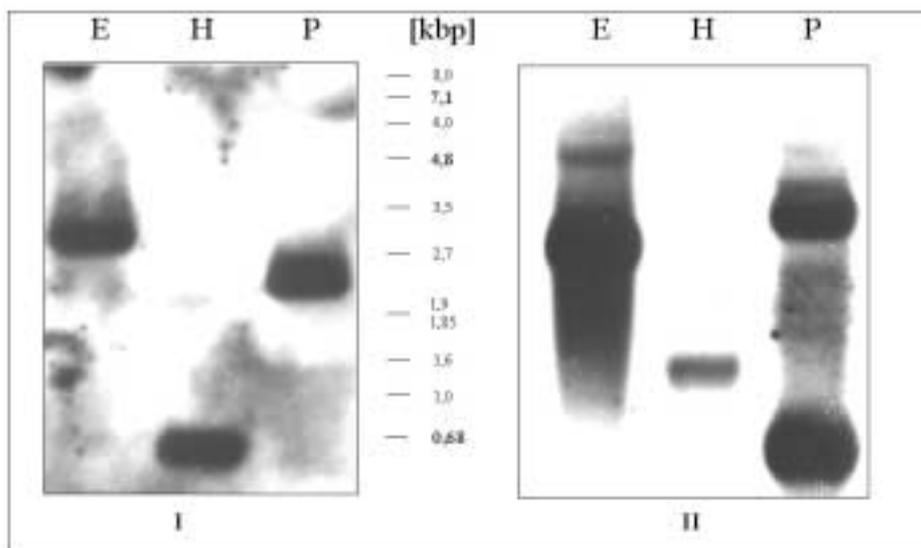
Protein	Organismus	Homologie		Accession No.
		Identität %	Ähnlichkeit %	
Hypothetisches Protein	<i>Clostridium difficile</i>	66	86	
Hypothetisches Protein	<i>Clostridium beijerinckii</i>	71	42	M84723
Hydrogenase-Untereinheit HydG	<i>Pyrococcus furiosus</i>	28	47	CAA53035
Hypothetisches Protein	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	35	55	AP000004
Hydrogenase – Untereinheit HydG homologes Protein	<i>Treponema pallidum</i>	38	62	AAC65704
Hypothetisches Protein	<i>Thermotoga maritima</i>	42	58	AE0010806
Dihydroorotat-Dehydrogenase-Untereinheit PyrDII	<i>Bacillus subtilis</i>	29	47	G39845
Untereinheit AsrB Anaerobe Sulfid-Reduktase	<i>Salmonella typhimurium</i>	28	49	P26475

### 3.5. Heterologe Hybridisierung von chromosomaler DNA aus *Clostridium litorale*

Die Gene *grdC* und *grdD* der Untereinheiten von Protein C aus *C. litorale* sollten kloniert werden, um über Sequenzvergleiche mit den Untereinheiten aus *E. acidaminophilum* Homologien zwischen den Proteinen beider Organismen ermitteln zu können. Für die Klonierung der Gene *grdC* und *grdD* aus *C. litorale* mußten die Fragmentgrößen, auf denen sich die Gene nach Restriktionsverdau von chromosomaler DNA befanden, bestimmt werden. Dazu wurde mit *EcoRI*, mit *HindIII* und mit *PstI* geschnittene chromosomale DNA von *C. litorale* nach Southern-Blot mit *grdC*- und *grdD*-spezifischen DNA-Sonden, die aus chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* hergestellt wurden, heterolog hybridisiert. Für eine *grdD*-spezifische DNA-Sonde wurde ein 990 bp PCR-Produkt mit den Primern PC48-1 und PC48-2 (s. 3.3.) amplifiziert und markiert. *grdC* wurde mit den Primern 57Bam und 57Kpn aus chromosomaler DNA hergestellt. Alle beiden PCR-Produkte wurden nach Markierung als DNA-Sonde zu heterologen Hybridisierung eingesetzt (Tab. 12).

Als Ergebnis der heterologen Hybridisierung schienen *grdC* und *grdD* im Genom von *C. litorale* im Vergleich zu *E. acidaminophilum* nur einmal auf einem gemeinsamen oder zwei verschiedenen 3 kb *EcoRI*-DNA-Fragmenten vorzuliegen. Daneben traten zusätzlichen Signale der *grdC* spezifischen Sonde bei 5,0 bzw. 1,5 kb nach *EcoRI*-Restriktion auf (Abb. 12).

Weiterhin zeigte die Hybridisierung *HindIII*-geschnittener chromosomaler DNA, daß *grdC* auf einem 1,5 kb langen Fragment lag. Nach der Hybridisierung mit der *grdD*-spezifischen Sonde wurde ein anderes Signal bei 0,7 kb detektiert, das kürzer als die Sequenz von *grdD* von *E. acidaminophilum* (1155 bp) war und kleiner, als die eingesetzte DNA-Sonde (990 bp). Demnach befand sich das 5'-Ende von *grdD* auf einem 0,7 kb. Die Signale nach dem *PstI*-Restriktionsverdau ließen vorläufig vermuten, daß *grdC* auf einem 3,4 kb und *grdD* auf einem 2,6 kb *PstI*-DNA-Fragment lag. Dem Resultat dieser Hybridisierungsergebnisse zu Folge wurde versucht, das 3,0 kb *EcoRI*-Fragment über heterologe Hybridisierung mit einer *grdD* spezifischen Sonde aus *E. acidaminophilum* zu klonieren.



**Abb. 12 Heterologe Hybridisierung von chromosomaler DNA von *C. litorale*.** Chromosomale DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (E), *HindIII* (H) und *PstI* (P) geschnitten und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Als Template für die Synthese der Sonden dienten PCR-Produkte, die aus chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* mit den Primern PC48\_1 und PC48\_2 (I) und 57Bam und 57Kpn (II) amplifiziert wurden. Die heterologe Hybridisierung wurde bei 60 °C durchgeführt.

Chromosomale DNA aus *C. litorale* wurde mit *EcoRI* vollständig verdaut, die Fragmente mittels Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und anschließend geerntet. Nach der Bestimmung der Fragmentgrößen in den geernteten Fraktionen wurden mit den Fraktionen, die DNA-Fragmente im Bereich von 2,5 bis 3,5 kb enthielten, ein Dot-Blot durchgeführt. Die Membran mit der aufgetragenen DNA wurde mit einer *grdD*-spezifischen Sonde (siehe vorheriges Kapitel) heterolog bei 60 °C hybridisiert, um die Fraktionen, in denen das gesuchte DNA-Fragment enthalten war, zu ermitteln. Die Fraktionen mit dem stärksten Hybridisierungssignal wurden nach Dialyse zur Ligation mit *EcoRI* geschnittenem pUC18 eingesetzt.

**Tab. 12. Fragmentgrößen der DNA-Fragmente, die Signale nach heterologer Hybridisierung von chromosomaler DNA von *C. litorale* gaben.** Um zu ermitteln auf welchen DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* *HindIII* und *PstI* die Gene *grdC* und *grdD* in *C. litorale* vorkamen, wurden für die Gene spezifische Sonden eingesetzt. Die fett hervorgehobenen Fragmentgrößen [kb] waren die Hybridisierungssignale, die nach Hybridisierung mit beiden Sonden auftraten.

Sonden	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>
<i>GrdD</i> <sup>1</sup>	<b>3,0</b>	0,7	2,6
<i>GrdC</i> <sup>1</sup>	<b>3,0</b> 5,0 1,5	1,5	3,4 0,8

<sup>1</sup> 990 bp DNA-Sonde im Kapitel 3.3. erläutert

<sup>2</sup> Das eingesetzte PCR-Produkt wurde mittels der Primer 57Bam und 57Kpn amplifiziert (s. Tab. 6)

Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* XL2Blue transformiert. Jedoch war nach Blau/Weis-Selektion die Zahl der Transformanten, die ein Insert enthielten, für eine Klonierung zu gering. Darum wurde der Wirtstamm bei der Transformation gewechselt. Für weitere Versuche zur Klonierung von chromosomaler DNA aus *C. litorale* wurde der Stamm *E. coli* XL1BlueMRF<sup>+</sup> und elektrokompetente Zellen der Firma Stratagene eingesetzt. Insgesamt wurden 1500 Transformanten mit Insertgrößen von 2,5 bis 3,5 kb durch heterologe Kolonie-Hybridisierung bei 60 °C überprüft. Jedoch konnte kein positives Signal festgestellt werden.

### 3.6. Klonierung von *grdC* und *grdD* in Vektoren zur heterologen Proteinexpression

Das Protein C der Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* wurde von Schröder und Andreesen (1992) und Harms (1995) durch Bestimmung der Enzymaktivität der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat (s. 2.8.2.) bis zur Homogenität gereinigt und charakterisiert. Die 48 kDa-Untereinheit GrdD wurde als Untereinheit identifiziert, die die Freisetzung des Acetylthioesters als Acetylphosphat katalysiert (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992), somit sollte die Rolle der 57 kDa-Untereinheit GrdC in der reduktiven Spaltung des Carboxyselenoethers an Protein A und in der Bildung des Acetylthioesters liegen (s. Abb. 32). Der Komplex aus beiden Untereinheiten zeigte ein ausgeprägtes Assoziations- und Dissoziationsverhalten (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992). Um beide Untereinheiten getrennt charakterisieren zu können, sollten deren Gene getrennt in *E. coli* exprimiert werden.

In den nachfolgenden Experimenten wurden *grdC* und *grdD* in Vektoren zur heterologen Protein-Expression in *E. coli* kloniert. Dazu wurden Primer entworfen und beide Gene als PCR-Produkte mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in den Expressionsvektor amplifiziert. Die Klonierung der PCR-Produkte in den Expressionsvektor erfolgte zunächst in *E. coli* XL1BlueMRF<sup>+</sup>. Für die Untersuchungen zur Protein-Expression wurden spezielle *E. coli*-Stämme eingesetzt, die im nachfolgend beschrieben werden.

### 3.6.1. Klonierung von *grdD* in pQE30 in *Escherichia coli* M15 (pRep4)

Mittels der Primer 48-Bam und 48-Kpn wurde *grdD* bei 50°C amplifiziert und anschließend nach Restriktionsverdau mit *KpnI* und *BamHI* in den Vektor pQE30 kloniert, um am N-Terminus mit sechs Histidinresten fusioniert in *E. coli* M15 (pREP4) exprimiert zu werden. Dieser 6xHis-tag sollte eine wirksame Bindung des Proteins als Metall-Chelat-Komplex und eine effektive Ein-Schritt-Reinigung über Affinitäts-Chromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zulassen.

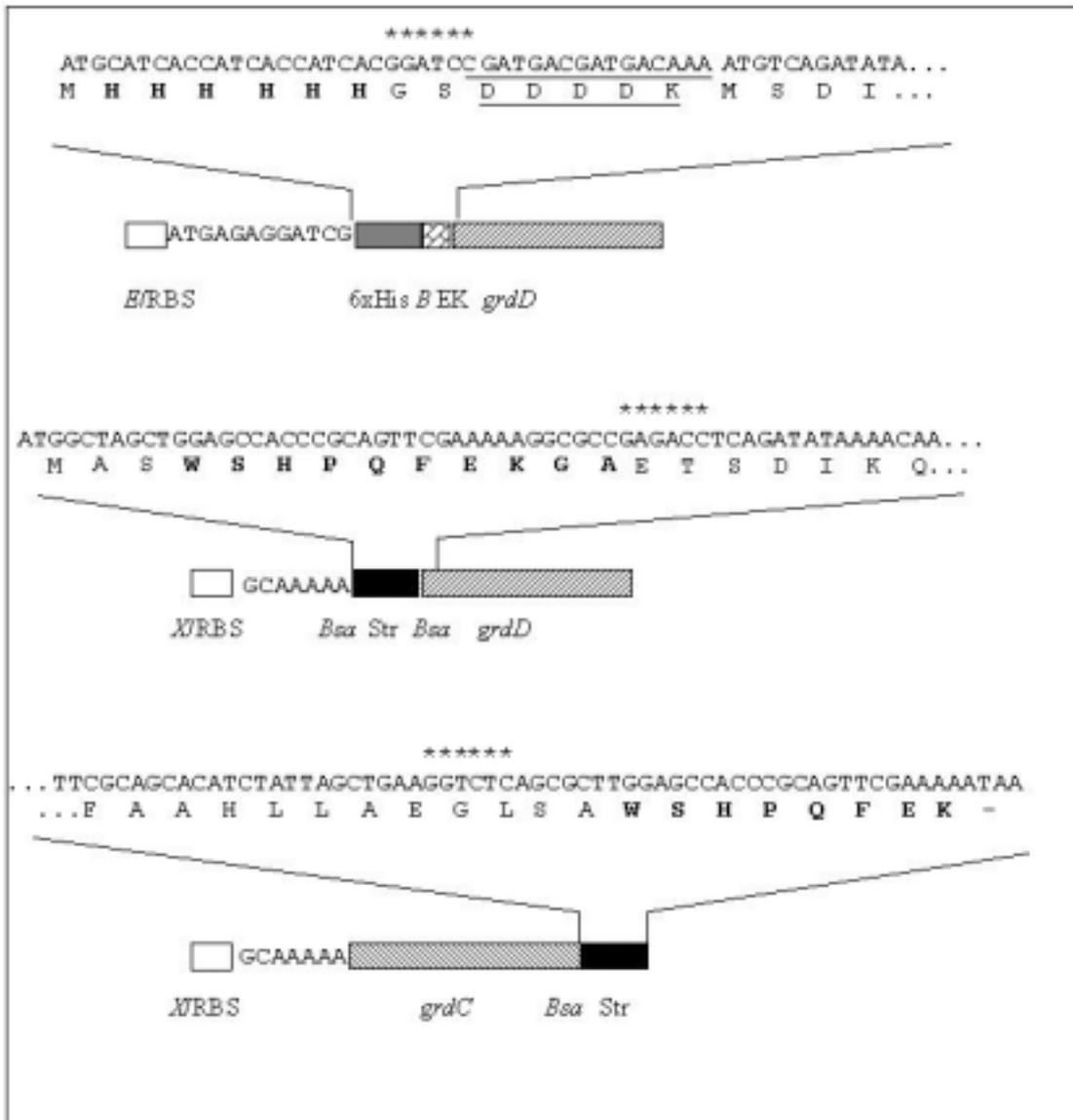
Mit dem Primer 48-Bam wurde zwischen der Sequenz für den N-terminalen 6xHis-tag und den Genen 15 bp codierend für eine Enterokinase-Signalsequenz 'in frame' zu *grdD* amplifiziert, so daß ein 1183 bp PCR-Produkt entstand (s. Abb. 13).

### 3.6.2. Klonierung von *grdD* und *grdC* zur Expression als *Strep*-tag-Fusionsproteine

Mittels der Primer Bsa 48f1 und Bsa 48r2 (s. 2.6.) wurden aus der Plasmid-DNA von pMK374 *grdD* als 1160 bp PCR-Produkt, flankiert von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *BsaI*, amplifiziert. *BsaI* gehört zu den Restriktionsenzymen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, so daß die Orientierung des PCR-Produkts bei der Klonierung festgelegt ist. Die Sequenzen der Primer wurden so gewählt, daß *grdD* nach Klonierung in den Vektor wieder herausgeschnitten werden konnte. Die PCR wurde bei 48 °C mittels *Pwo*-Polymerase durchgeführt. Das entstandene Produkt wurde in Expressionsvektor pASK-IBA5 ligiert und in *E. coli* X11BlueMRF' transformiert, so daß ein N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein exprimiert wurde (s. 3.10.2). Das durch Restriktion und Sequenzierung überprüfte Plasmid wurde zur heterologen Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

*grdC* wurde als 1570 bp PCR-Produkt durch die Primer Bsa-57f und Bsa-57r nach der selben Klonierungsstrategie wie *grdD* in den Vektor pASK-IBA 5 kloniert für die heterologe Expression von GrdC als N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein. Durch einen Fehler im Primer Bsa-57F wurde eine Mutation amplifiziert. Es entstand das Codon CGA statt CCA für Arginin anstelle von Prolin an Position 3 der Aminosäuresequenz von GrdC, woraus eine *grdC* P3→R-Mutante entstand, die zu exprimieren versucht wurde.

Daneben wurde *grdC* in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert, um ein C-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein zu exprimieren. Die Primer 57f3 und 57r3 enthielten ebenfalls an den Enden die Erkennungssequenz für *BsaI* für die Klonierung. Die Sequenz des Primers am 3'-Ende des PCR-Produktes war so gewählt, daß nach der Klonierung *grdC*, im Gegensatz zu *grdD*, nicht mehr über *BsaI* herausgeschnitten werden konnte. Am 5'-Ende blieb die Schnittstelle erhalten, so daß der Vektor mit *BsaI* linearisiert werden konnte.

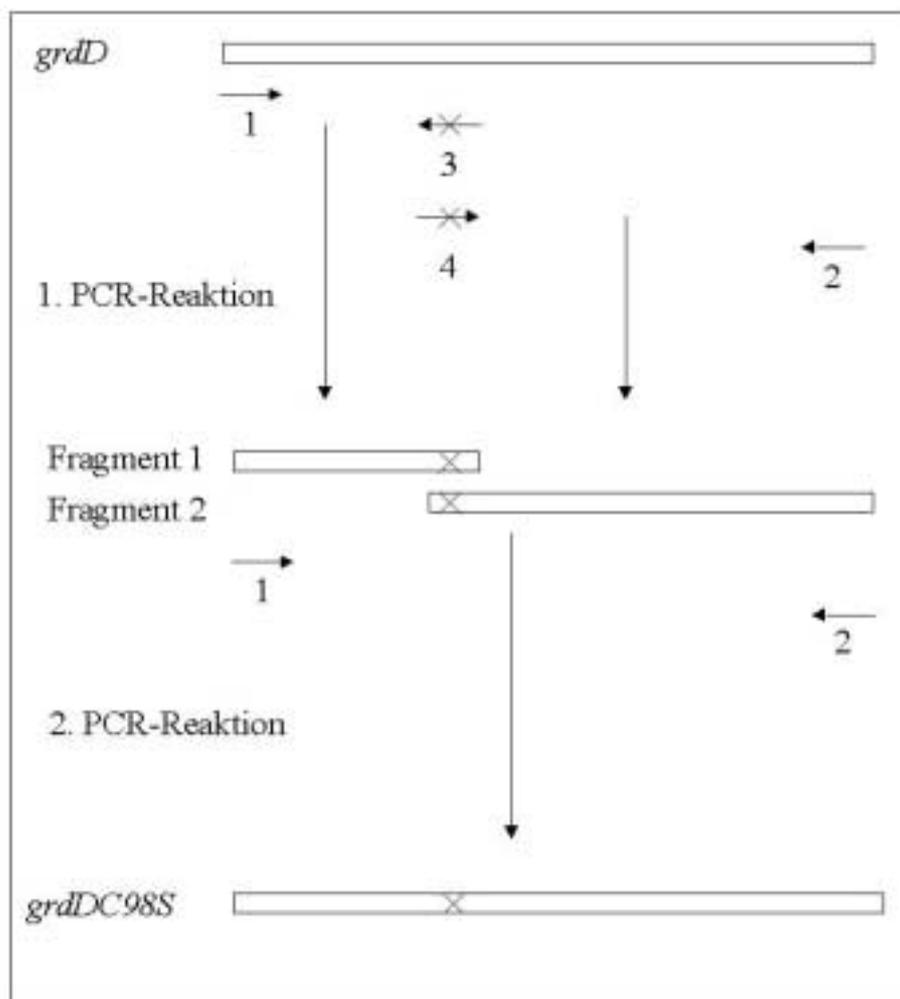


**Abb. 1. Schematische Darstellung der Gene *grdC* und *grdD* mit den Sequenzen von His- bzw. *Strep*-tag.** *grdD1* wurde als PCR-Produkt in dem Expressionsvektor pQE30 und in den Expressionsvektor pASK5-IBA ligiert und damit am 5'-Ende mit den Sequenzen für His- und *Strep*-tag fusioniert. *grdC* als PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pASK-IBA5 (nicht dargestellt) und pASK-IBA3 ligiert und dadurch am 3'-Ende mit dem *Strep*-tag versehen. Die Gensequenzen und resultierenden Aminosäuresequenzen im Fusionsbereich wurden dargestellt, die von 6xHis-tag (6xHis) und *Strep*-tag (Str) wurden fett hervorgehoben, die Enterokinase-Erkennungssequenz zum proteolytischen Abbau des 6xHis-tag unterstrichen. Die Ribosomen-Bindestelle (RBS) und wichtige Restriktionsenzyme *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Bsa*I (Bsa) *Xba*I (X), wurden dargestellt, die Erkennungssequenzen für die Enzyme *Bam*HI und *Bsa*I wurden mit Sternen markiert.

### 3.7. In vitro-Mutagenese von *grdD1*

Zur Charakterisierung der katalytisch relevanten Thiol-Gruppen in GrdD sollten Mutanten hergestellt werden, die statt Cystein in der Aminosäuresequenz Serin oder Alanin enthielten. Dieser Austausch der Thiol-Gruppe gegen eine Hydroxyl-Gruppe bzw. Methyl-Gruppe im katalytischen Zentrum sollte zum Verlust der katalytischen Aktivität der Mutante führen. Die entsprechenden Mutanten sollten wie zuvor GrdD als *Strep*-tag-Fusionsproteine überexprimiert werden und deren Enzymaktivität mit der von GrdD verglichen werden. Anhand der unterschiedlichen Enzymaktivität von Wildtyp und Mutante sollte festgestellt werden, an welcher Thiol-Gruppe der Acetylthioester (s. 3.8.) vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Cystein 98-Serin-Mutation und eine Cystein 359-Alanin-Mutation mittels "overlap-Extension"-PCR (s.2.6.2.) amplifiziert: Beide Cysteine in *grdD* wurden durch das Triplet TGC kodiert. Das mutierte Gen *grdD* C98→S enthielt die Sequenz AGC an Position 292. Um ein Alanin in Position 359 zu exprimieren, befand sich im mutierten Gen *grdD* C359→A das Triplet GCA statt TGC. Die genannten Mutationen wurden im ersten Schritt der *Overlap extension*-PCR amplifiziert, indem zwei mutierte DNA-Fragmente mittels zweier Mutationsprimer und den Flankenprimern 48f und 48r2 erzeugt wurden (s. Abb. 14). Diese PCR-Produkte hatten im Bereich der Mutation identische Sequenzen von 30 bp. Beide PCR-Produkte wurden in gleichen Mengen in einer zweiten PCR mit den Flankenprimern 48f und 48r2 eingesetzt. Durch die identischen Sequenzen im Bereich der Mutation bildeten sich durch Renaturierung aus den Einzelsträngen beider PCR-Produkte ein doppelsträngiger Bereich, aus dem während der zweiten PCR-Reaktion mit den Primern 48f und 48r2 ein vollständiges PCR-Produkt mit 1160 bp amplifiziert wurde, das die Mutation enthielt. Die mutierten PCR-Produkte wurden wie *grdD1* als PCR-Produkt (s. 3.8.2.) nach Spaltung mit *BsaI* in den Expressionsvektor pASK5-IBA in *E. coli* XL1Blue MRF' kloniert. Die heterologe Expression der Mutanten pMK98S (C98→S) und pMK359A (C359→S) erfolgte in *E. coli* BL21(DE3).



**Abb. 2** Schematische Darstellung der *in vitro*-Mutagenese von *grdD*. Stellvertretend für die konstruierten Mutanten wurde der Ablauf der Mutagenese von Cystein 98 dargestellt. die Primer 48f (1) und 48r2 (2) und die internen Primer Pr5(Ser98) (3) und Pr6(Ser98) (4), die die Mutation codierten, wurden aufgeführt. Die Mutation wurde mit einem Kreuz gekennzeichnet.

### 3.8. Heterologe Expression der rekombinanten Untereinheiten von Protein C in *Escherichia coli*

Die vollständige Klonierung des Gens *grdC* (Lübbers, 1993) und die vollständige Klonierung von *grdD1* im Rahmen dieser Arbeit war die Voraussetzung für eine getrennte Reinigung und Charakterisierung beider Untereinheiten als rekombinante Proteine nach Expression in *E. coli*. Für die heterologe Expression der beiden rekombinanten Untereinheiten wurden einmal das System QIAexpressionist (Fa. QIAGEN, Hilden) und *Strep*-tag®-Expressionssystem (Fa. IBA, Göttingen) angewendet. Wie unter 3.8. beschrieben wurden *grdC* und *grdD* in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert.

#### 3.8.1. Reinigung von GrdD als N-terminales 6xHis-tag -Fusionsprotein

*grdD1* wurde, wie unter 3.8.1. beschrieben, in den Expressionsvektor pQE30 kloniert, um das entsprechende Protein, am N-Terminus mit sechs Histidin-Resten fusioniert, in *E. coli* M15 (pREP4) zu exprimieren. Durch diesen 6xHis-tag sollte eine wirksame Bindung des Proteins als Metall-Chelat-Komplex zur Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose erzeugt werden, die eine effektive Ein-Schritt-Reinigung über Affinitäts-Chromatographie zuließ. Die Expression von GrdD nach Induktion wurde mit Rohextrakt im Vergleich zu einer pQE30-Kontrolle mittels SDS-PAGE überprüft. Das rekombinante GrdD war nach der Induktion als Bande bei 48 kDa zu sehen und entsprach der ermittelten Molekülmasse der kleinen Untereinheit des gereinigten Protein C aus *E. acidaminophilum* (Schräder und Andreesen, 1992). Die Enzymaktivität des Rohextraktes wurde mittels arsenatabhängiger Hydrolyse von Acetylphosphat im Vergleich zur Enzymaktivität einer pQE30-Kontrolle überprüft und enthielt eine spezifische Enzymaktivität von 9,0 U/mg.

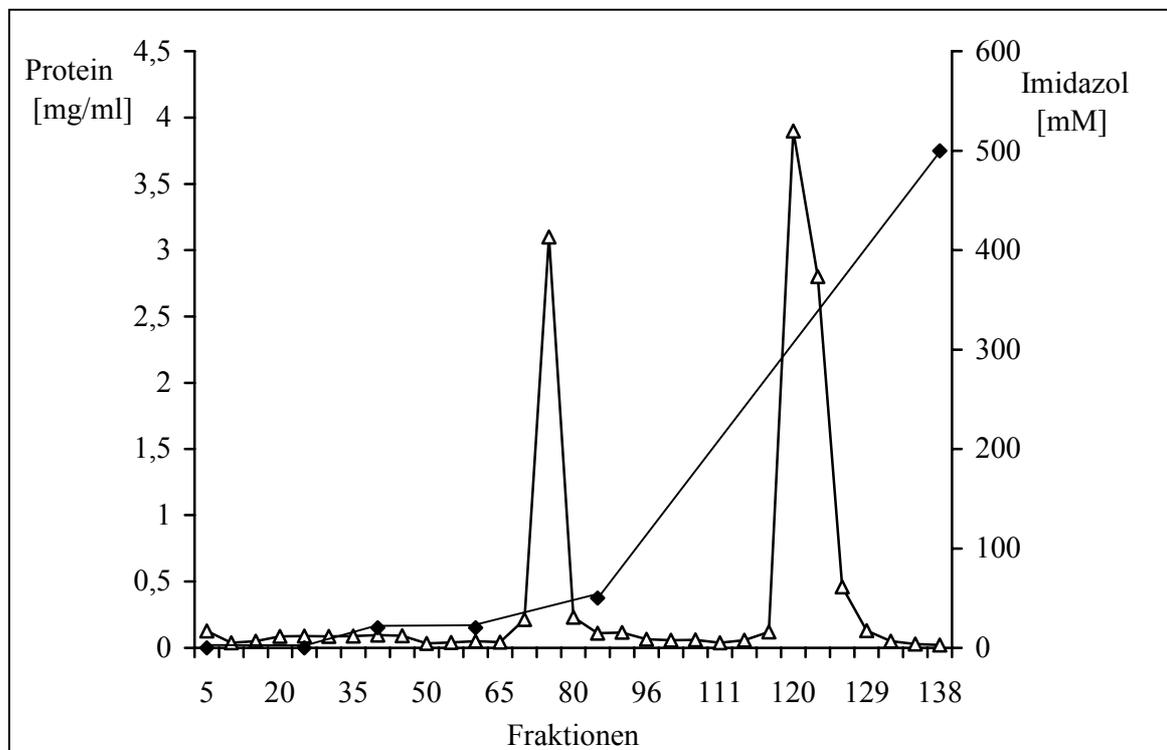
GrdD sollte zuerst als His-tag-Protein mit Imidazol als Elutionsmittel gereinigt werden. Mit Konzentrationen von 20 bis 250 mM Imidazol wird das Fremdprotein abgetrennt und mit Imidazol-Konzentrationen größer als 250 mM das gereinigte 6xHis-tag-Protein eluiert. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, daß GrdD in Gegenwart von 250 mM Imidazol nicht inaktiviert wird (Daten nicht gezeigt).

Als Schutz vor einer Oxidation der Thiol-Gruppen von GrdD wurde die Reinigung in Gegenwart von 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol durchgeführt, ohne die Säulenkapazität durch Reduktion der Ni<sup>2+</sup>-Ionen (QIAGEN, 1997) zu beeinträchtigen.

Der Rohextrakt im Lysis-Puffer (50 mM Na-Phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), der aus Zellen einer 1 l-Kultur *E. coli* M15 (pREP4) nach 5 h Induktion bei 37 °C gewonnen wurde, besaß eine spezifische Enzymaktivität von 9,0 U/mg (s. Tab. 13). Zur Bindung des 6xHis-tag-Proteins wurden 25 ml Rohextrakt mit 101 mg Protein mit equilibrierter 6 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose mit einer Kapazität von 5,0 mg/ml suspendiert. Zur Reinigung wurde die Suspension in eine Säule überführt und zuerst mit ca. acht Säulenvolumina (50 ml) Lysis-Puffer und ca. sieben Säulenvolumina (40 ml) Lysis-Puffer in Gegenwart von 20 mM Imidazol gewaschen. Dann wurden über ca. acht Säulenvolumina (50 ml) von 20 bis 50 mM Imidazol und über ca. vier Säulenvolumina (25 ml) von 50 bis 500 mM Imidazol kontinuierliche Gradienten zur Reinigung und Elution von GrdD angelegt (Abb. 15). Anschließend wurde die Proteinkonzentration in den eluierten Fraktionen überprüft. Alle proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels Mikrotiterplattentest auf arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat getestet. Nur die Fraktionen von 115 bis 133 enthielten Enzymaktivität. Nach der Kontrolle dieser Fraktionen durch SDS-PAGE wurde GrdD mit einer Molekülmasse von 48 kDa eluiert (s. Abb. 16), jedoch waren noch Kontaminationen anderer Proteine vorhanden. Von diesen wurden die Fraktionen mit Proteinkonzentrationen von 0,3 bis 4,2 mg/ml zusammengefaßt und als Pool gegen 50 mM

Tris/HCl pH 7,5 dialysiert. Nach der Dialyse betrug die Enzymaktivität 68,1 U/ml und ergab eine spezifische Aktivität von 9,2 U/mg (s. Tab. 13).

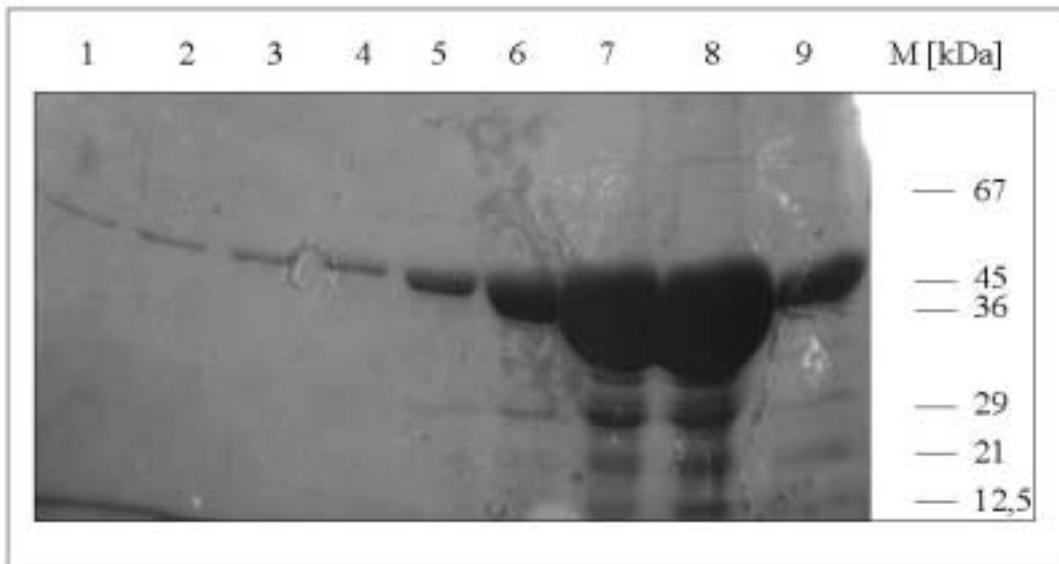
Demnach war es zu keiner Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität im Vergleich zu der des Rohextrakts gekommen, obwohl eine Aufreinigung des Proteins bei 48 kDa laut SDS-PAGE (Abb. 16) stattgefunden hatte.



**Abb. 15 Elutionsprofil von GrdD nach Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose.** 26 ml Rohextrakt in 100 mM Na-Phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol mit einer Konzentration von 3,9 mg/ml wurden im *batch*-Verfahren mit 6 ml equilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zur Bindung des exprimierten 6xHis-tag-Proteins suspendiert und anschließend in eine leere PD-10-Säule überführt. Bei der Reinigung wurde zuerst ein 50 ml Waschgradient (20 bis 50 mM Imidazol) und anschließend ein Gradient zum Eluieren des Proteins von 25 ml (50 bis 500 mM Imidazol) angelegt (s. Text). Dargestellt wurden die  $\Delta$ -Proteinkonzentration [mg/ml]; -♦- Imidazol-Konzentration [mM].

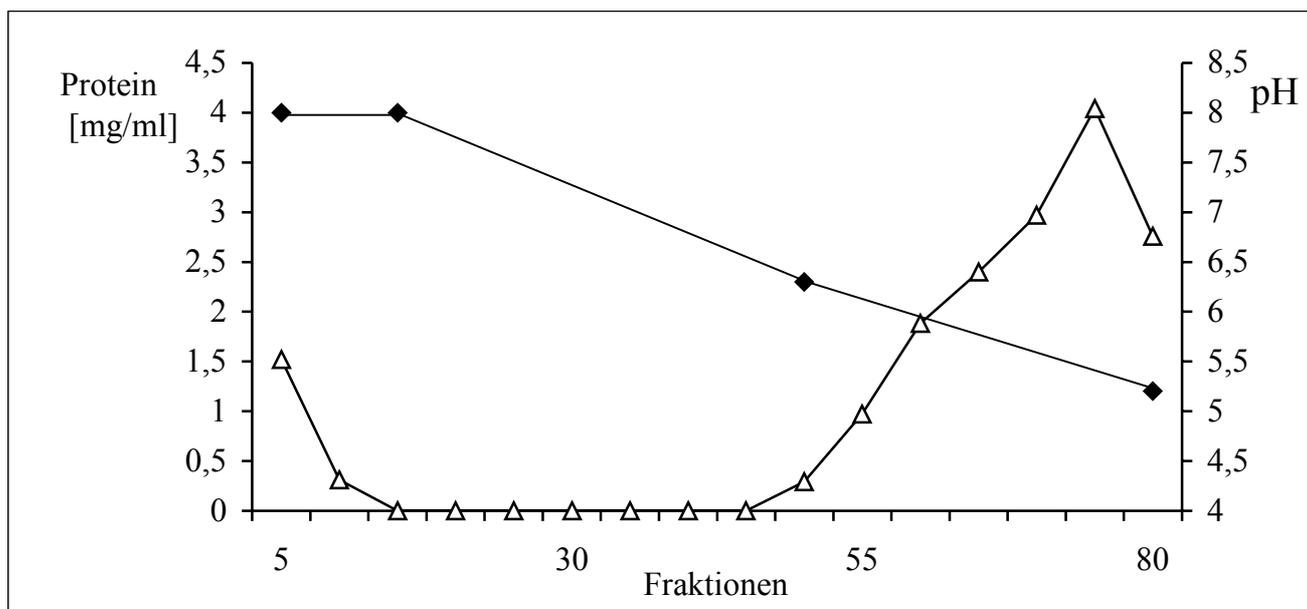
**Tab. 13 Bilanz der Reinigung von GrdD als 6xHis-tag-Protein nach Elution durch Imidazol.** Die Details zur Reinigung sind unter 2.11.5. und zum Enzymtest unter 2.7.2. beschrieben.

	Gesamtes Protein [mg]	Gesamte Enzymaktivität in [U]	Spezifische Enzymaktivität [U/mg]
Rohextrakt nach Zentrifugation	101	909	9,1
Pool nach Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5	14,8	136	9,2



**Abb. 16** 10 % ige SDS-Gel nach Coomassie-Färbung der Fraktionen mit GrdD als 6xHis-tag-Fusionsprotein nach Elution durch Imidazol-Gradienten. Dargestellt sind Fraktionen GrdD der Reinigung, wo die Fraktionen 113 (1), 114 (3), 115 (4), 116 (5), 117 (5), 118 (6), 119 (7), 120 (8), 121 (9) in Mengen von 0,2 µg bis 10 µg Protein und der eingesetzte Protein-Marker.

Bei der nächsten Reinigung wurde versucht, das GrdD als 6xHis-tag-Protein über einen pH-Gradienten zu reinigen. Dabei wurde bei pH 8,0 begonnen. Durch Senkung des pH-Wertes beim Waschen der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde gebundenes Fremdprotein von der Säule entfernt. Die Elution des gebundenen 6xHis-tag-Proteins sollte nach Senkung des pH-Wertes unter den pKA des 6xHis-tags von 6,0 erfolgen, da der 6xHis-tag dann protoniert vorlag und nicht mehr an die Ni<sup>2+</sup>-NTA binden konnte (QIAGEN, 1997). Aus den Arbeiten zur Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* und *T. creatinophila* ging hervor, daß bei einer Senkung des pH-Wertes auf 5,3, die notwendig war zur effektiven chromatographischen Trennung auf der S-Sepharose-Säule, bis zu 40 % des aktiven Protein C inaktiviert wurden (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992). Um das zu vermeiden, wurde versucht, GrdD durch Senkung des pH-Wertes von 8,0 bis 5,3 zu reinigen. 20 ml Rohextrakt in Lysis-Puffer (50 mM Na-Phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol) mit einer Konzentration von 112 mg Protein wurden mit 5 ml equilibriertem Säulenmaterial suspendiert und zur Reinigung in eine Säule überführt. Anschließend wurde mit ca. acht Säulenvolumina Lysis-Puffer (30 ml) bei pH 8,0 gewaschen und anschließend über ca. 30 Säulenvolumen (150 ml) ein kontinuierlicher Gradient von pH 8,0 bis pH 5,3 angelegt. Es wurden 2 ml Fraktionen eluiert. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurde in den Fraktionen 200 µl 100 mM Tris/HCl pH 8,0 vorgelegt. Die eluierten proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels Mikrotiterplattentest auf Enzymaktivität überprüft und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. In allen proteinhaltigen Fraktionen war keine Enzymaktivität zu messen. Die Kontrolle der proteinhaltigen Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte eine Anreicherung von Protein bei 48 kDa in den Fraktionen 70 bis 75, die auf eine Anreicherung von GrdD hindeutete (Daten nicht gezeigt). Wie nach der Reinigung über Imidazol lag kein vollständig homogenes Protein vor.



**Abb. 17** Elutionsprofil von GrdD nach Reinigung an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. 20 ml Rohextrakt mit 5,6 mg/ml nach Aufschluß von Zellen einer 1 l-Kultur wurden im *batch*-Verfahren mit 4 ml equilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA zur Bindung des exprimierten 6xHis-tag-Proteins suspendiert und anschließend in eine leere PD-10-Säule überführt. Bei der Reinigung wurde mit 15 ml Lysis-Puffer gewaschen und anschließend ein pH-Gradient (pH 8,0 bis pH 5,3) zum Eluieren des Proteins angelegt. Dargestellt wurden -Δ- Protein mg/ml; -◆- pH-Wert

**Tab. 14** Reinigung von GrdD mittels pH-Gradient. Die Details zur Reinigung sind unter 2.11.5. und zum Enzymtest unter 2.7.2. beschrieben.

	Gesamtes Protein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Enzymaktivität [U/mg]
Rohextrakt	111	909	6,7
Protein der Fraktionen 70–75	15,5	0	0

### 3.8.2. Heterologe Expression von GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein

*grdD1* wurde, wie unter 2.8. beschrieben, in den Expressionsvektor pASK-IBA5 in *E. coli* XL1Blue MRF' kloniert. Die heterologe Expression und Reinigung von rekombinantem *Strep*-tag-Protein wurden in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Der *Strep*-tag II (Schmidt und Skerra, 1994), aus der Aminosäuresequenz -WSHPQFEK- bestehend, bindet stark an Streptavidin, den Inhibitor von Biotin (Voss und Skerra, 1997). Diese Bindung ermöglicht eine effiziente Ein-Schritt-Reinigung der entweder C-terminal- oder N-terminal mit dem *Strep*-tag fusionierten Proteine am Säulenmaterial StrepTactin, das durch Immobilisierung von Streptavidin entwickelt wurde. DTT als reduzierendes Reagenz und EDTA zur Bindung von Metallionen konnten wie bei der Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992) bzw. *T. creatinophila* (Harms *et al.*, 1998) verwendet werden, ohne daß sie die Effizienz der Bindung des *Strep*-tag-Fusionsproteins an das Säulenmaterial beeinträchtigen.

Die Induktion der Expression von GrdD als N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert, indem Gesamtprotein aus 1 ml *E. coli*-Kultur vor und nach der Induktion aufgetragen wurden. Nach 3 Stunden Induktion war die Menge an induziertem

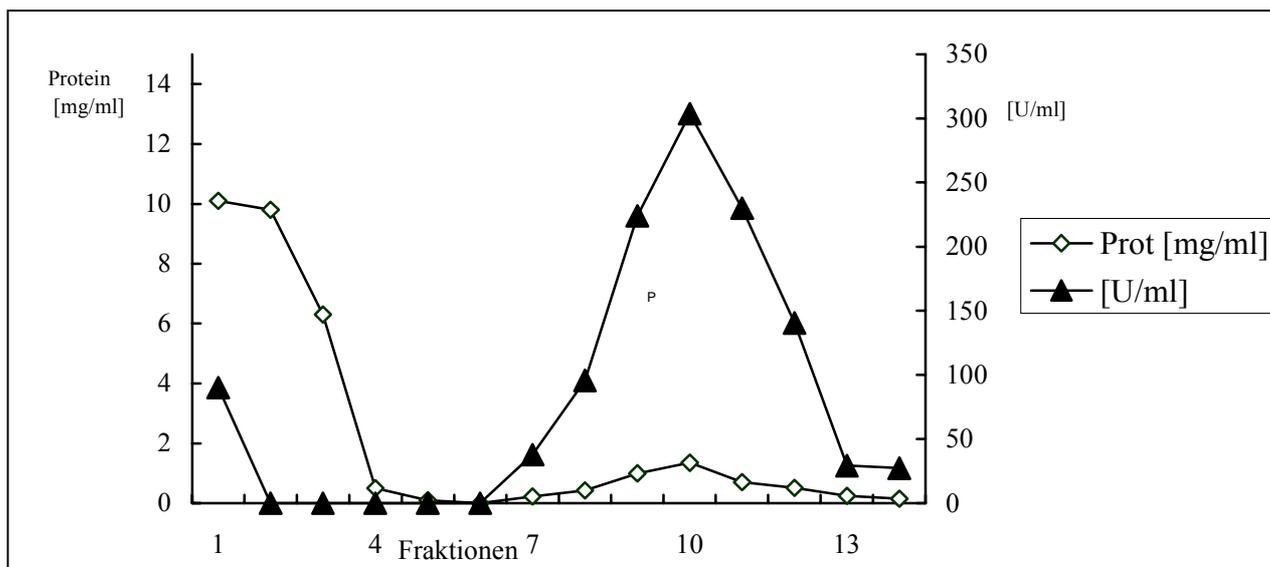
Protein am höchsten (Daten nicht gezeigt). Das Protein hatte ebenso wie das 6xHis-tag-Fusionsprotein und die gereinigte Untereinheit aus *E. acidaminophilum* eine Größe von ca. 48 kDa.

Bei der Reinigung wird das Protein auf eine equilibrierte Säule mit StrepTactin geladen und anschließend mit Puffer gewaschen, um Fremdprotein abzutrennen. In Gegenwart von 2,5 mM Desthiobiotin, dessen Affinität zu StrepTactin höher ist als die des *Strep*-tags, wird das *Strep*-tag-Protein eluiert.

Zur Gewinnung von GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein wurde von einer induzierten 1 l-*E. coli* BL21(DE3)-Kultur ausgegangen. 10 ml Rohextrakt in Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT) mit einer Proteinkonzentration von 10,3 mg/ml wurden auf die equilibrierte Säule (Säulenvolumen: 1 ml StrepTactin mit 5 mg/ml Kapazität) geladen. Anschließend wurde mit sechs Säulenvolumina Lysis-Puffer gewaschen und die Proteinkonzentration der letzten Waschfraktionen überprüft. Nachdem kein Protein zu messen war, wurde GrdD durch fünf Säulenvolumina Lysis-Puffer mit 2,5 mM Desthiobiotin in 0,5 ml Fraktionen eluiert.

Die Kontrolle durch SDS-PAGE zeigte, daß GrdD vollständig gereinigt wurde und in den Fraktionen 7 bis 14 eluiert wurde. Nach der Reinigung wurde die Enzymaktivität der proteinhaltigen Fraktionen gemessen. Die spezifische Aktivität von GrdD war in den Fraktionen der zweiten Hälfte des Elutionspeaks höher als in ersten Hälfte (s. Abb. 18). In den Fraktionen 11 und 12 betrug die spezifische Enzymaktivität 328 U/mg und 278 U/mg und war damit höher als in den Fraktionen 8 bis 10. Fraktion 10 enthielt mit 1,35 mg/ml die höchste Proteinkonzentration und eine Enzymaktivität von 303 U. Die spezifische Aktivität betrug lediglich 224 U/mg. Die Aktivität der Fraktionen 8 und 9 lag ebenfalls in diesem Bereich. In den Fraktionen mit Proteinkonzentrationen unter 0,5 mg/ml betrug die spezifische Aktivität maximal 165 U/mg.

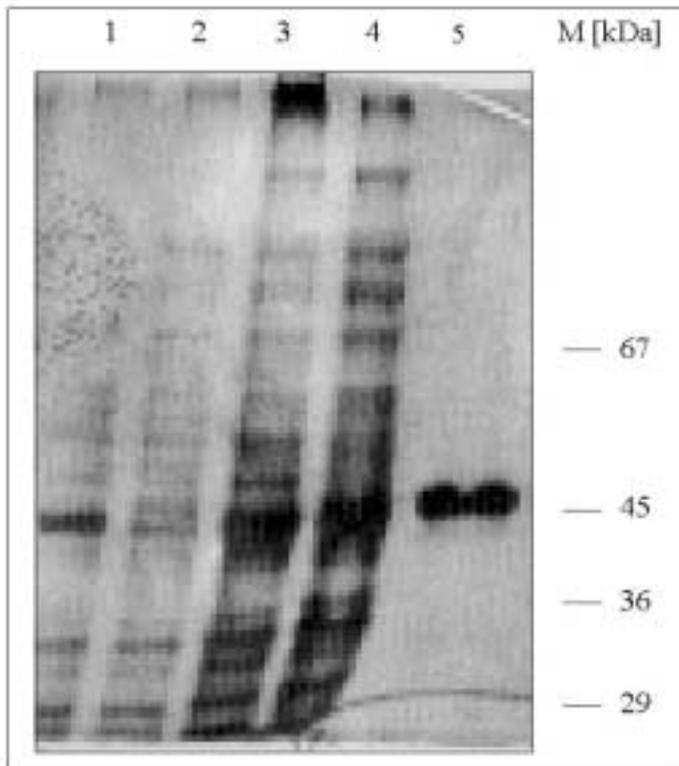
Sechs Fraktionen wurden zu einem Pool mit 12,2 mg Protein zusammengefaßt und gegen 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT zum Entfernen des Desthiobiotins dialysiert. Nach der Dialyse wurde eine spezifische Aktivität von 167 U/mg gemessen (Tab. ). Damit war die spezifische Aktivität teilweise um 50 % gesunken, jedoch um ca. das 15 fache höher als die Enzymaktivität von GrdD als 6xHis-tag-Fusionsprotein nach Elution durch Imidazol (s. 3.7.1.). Beim Überprüfen der geernteten Fraktionen mittels SDS-PAGE war eine Doppel-Bande bei 48 kDa zu sehen. Wurde das Protein länger als fünf min vor dem Auftragen gekocht, trat nur noch eine Bande auf (Abb. 19). Es handelte sich somit um homogenes Protein, das nach unzureichender Denaturierung in zwei möglichen Formen auftrat.



**Abb. 18 Elutionsprofil von GrdD nach Affinitätschromatographie an StrepTactin.** 10 ml Rohextrakt in Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT) mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml wurden auf die equilibrierte Säule der Kapazität 5 mg/ml geladen und anschließend mit 6 mal 1 ml Waschpuffer gewaschen, bis kein Protein in den 1 ml-Fractionen zu messen war. Nach dem Waschen wurde die Säule mit Elutionspuffer (2,5 mM Desthiobiotin, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT) beladen und das Protein in 0,5 ml Fractionen mit 2,5 mM Desthiobiotin in Lysis-Puffer eluiert. Dargestellt wurden die Proteinkonzentration [mg/ml],  $\diamond$ , die Enzymaktivität [U/ml],  $\blacktriangle$ , und spezifische Enzymaktivität [U/mg]  $\blacksquare$ .

**Tab. 15 Reinigung von GrdD als Strep-tag-Fusionsprotein.** Die Details zur Reinigung sind unter 2.11.5. und zum Enzymtest unter 2.8.2. beschrieben.

	Gesamtes Protein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Enzymaktivität [U/mg]	Anreicherungs-faktor
Rohextrakt	101	909	9	1
Proteinpool nach Dialyse	2	387	167	18,5



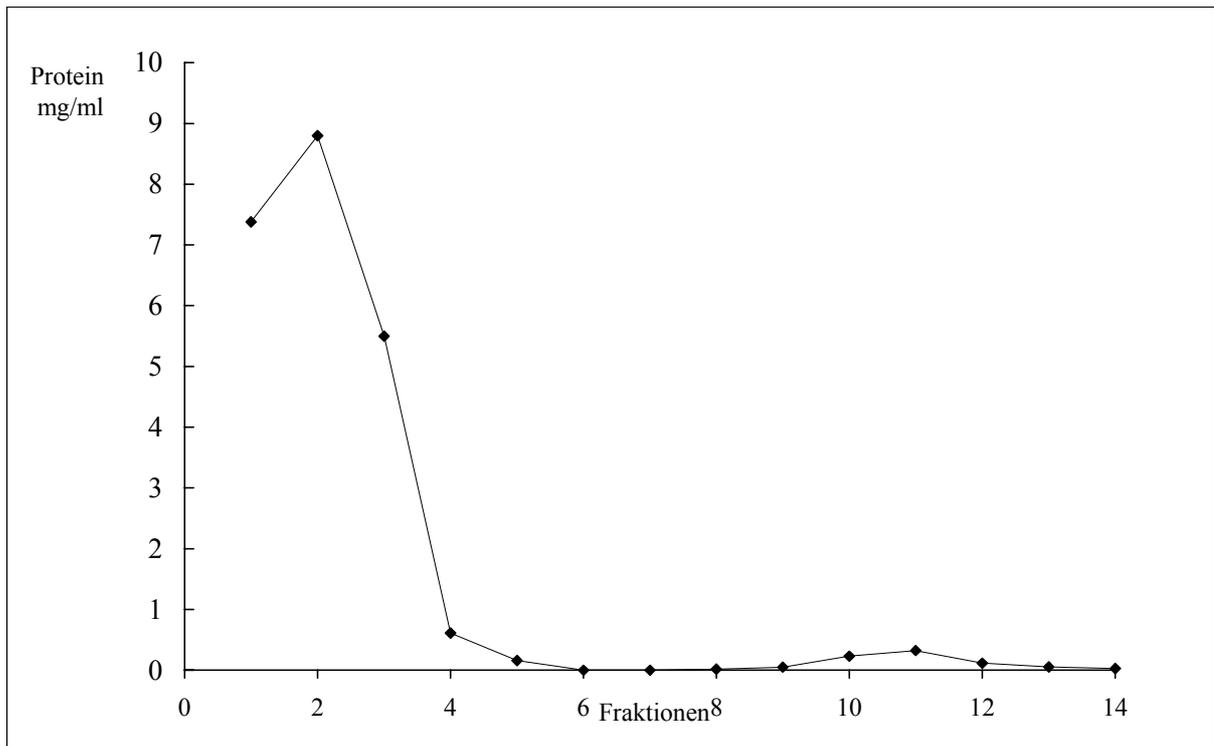
**Abb. 19 10 % iges SDS-Gel nach Silberfärbung und Darstellung der Reinigung von GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein.** Aufgetragen wurden Gesamtprotein aus 1 ml Zell-Kultur *E. coli* BL21(DE3) nach 3 h Induktion entnommen (Spur 1), Gesamtprotein uninduziert aus 1 ml Zell-Kultur (2) , 10 µg cytosolischer Rohextrakt nach Zellaufschluß (3), 10 µg von Wasch-Fraktion 1 (4) und 2 µg GrdD aus Fraktion 10. Die Reinigung wurde unter 3.7.2. beschrieben. Unter (M) sind die Banden des Protein-Markers angegeben.

### 3.8.3. Reinigung von GrdC als *Strep*-tag-Fusionsprotein

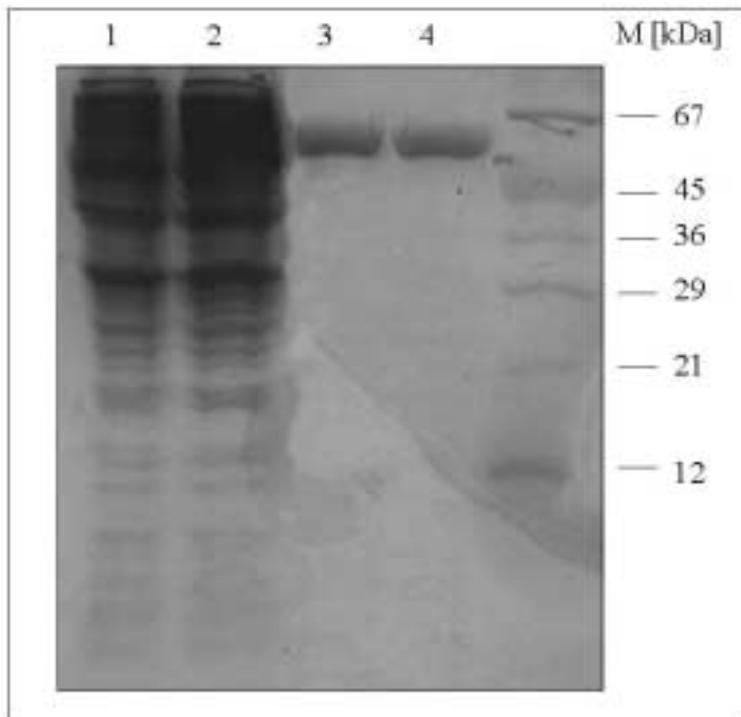
*grdC*, das Gen der großen Untereinheit von Protein C wurde wie unter 3.8. beschrieben in die Expressionsvektoren pASK5 und pASK3 kloniert, um GrdC sowohl als N-terminales als auch als C-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein zu exprimieren und anschließend zu reinigen.

Beide Proteine waren nach der Induktion als Proteinbande bei ca. 57 kDa in der SDS-PAGE im Vergleich zur Proteinprobe nicht induzierter Zellen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Zuerst wurde versucht, GrdC als N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein als cytosolisch exprimiertes Protein zu reinigen, wie bereits bei der Reinigung von GrdD beschrieben (s. 3.7.2.). Durch einen Fehler im N-terminalen Primer (s. 3.8.) wurde eine Mutante GrdC P3→R exprimiert, die statt Prolin an Position 3 der Aminosäuresequenz Arginin enthielten (s. 3.9.). Trotz dieses Fehlers wurde versucht, diese Mutante zu reinigen. Dazu wurden 9,2 mg Rohextrakt in einem ml Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT) auf die Säule geladen und anschließend gewaschen. In den anschließend mit 2,5 mM Desthiobiotin in Lysis-Puffer geernteten Fraktionen wurde jedoch kein Protein nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde das Membranpellet nach der Ultrazentrifugation mittels SDS-PAGE überprüft (Daten nicht gezeigt), wo wie bereits erwähnt eine 57 kDa-Bande erkennbar war.

Dagegen ließ sich das C-terminale *Strep*-tag-Fusionsprotein unter gleichen Bedingungen wie GrdD als cytoplasmatisch exprimiertes *Strep*-tag-Fusionsprotein reinigen. Aus 100 ml *E. coli* BL21(DE3)-Kultur konnten ein 2 ml Rohextrakt in Lysis-Puffer mit 22,4 mg Protein gewonnen werden, das zur Reinigung eingesetzt wurde. Nach der Elution wurden 0,5 mg Protein gewonnen (Abb. 20).



**Abb. 20** Elutionsprofil von GrdC nach Chromatographie an StrepTactin. 22,5 mg Rohextrakt in 2 ml Lysis-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 3 mM DTT) wurden auf eine equilibrierte Säule mit 0,5 ml StrepTactin geladen. Danach wurde mit 6 mal 1 ml Lysis-Puffer gewaschen und mit 2,5 mM Desthiobiotin in Lysis-Puffer in 0,5 ml Fraktionen eluiert.



**Abb. 21** 10 %iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung und Darstellung von GrdC als C-terminales Strep-tag-Fusionsprotein. Aufgetragen wurden 10  $\mu$ g Rohextrakt (1), 10  $\mu$ g der ersten Waschfraktion (2), 2  $\mu$ g der eluierten Fraktionen 10 und 11 (3 und 4).

**Tab. 16 Reinigung von GrdC. Die Details zur Reinigung sind unter 3.7.3. beschrieben**

	Gesamtes Protein [mg]
Rohextrakt	22,5
Protein der Fraktionen 9 bis 14	0,5

Die Messungen der Enzymaktivität des Rohextraktes und des eluierten Proteins zeigten, daß GrdC keine meßbare katalytische Aktivität bei der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat besaß.

### 3.8.4. Enzymaktivität der Untereinheiten GrdD in Gegenwart von GrdC

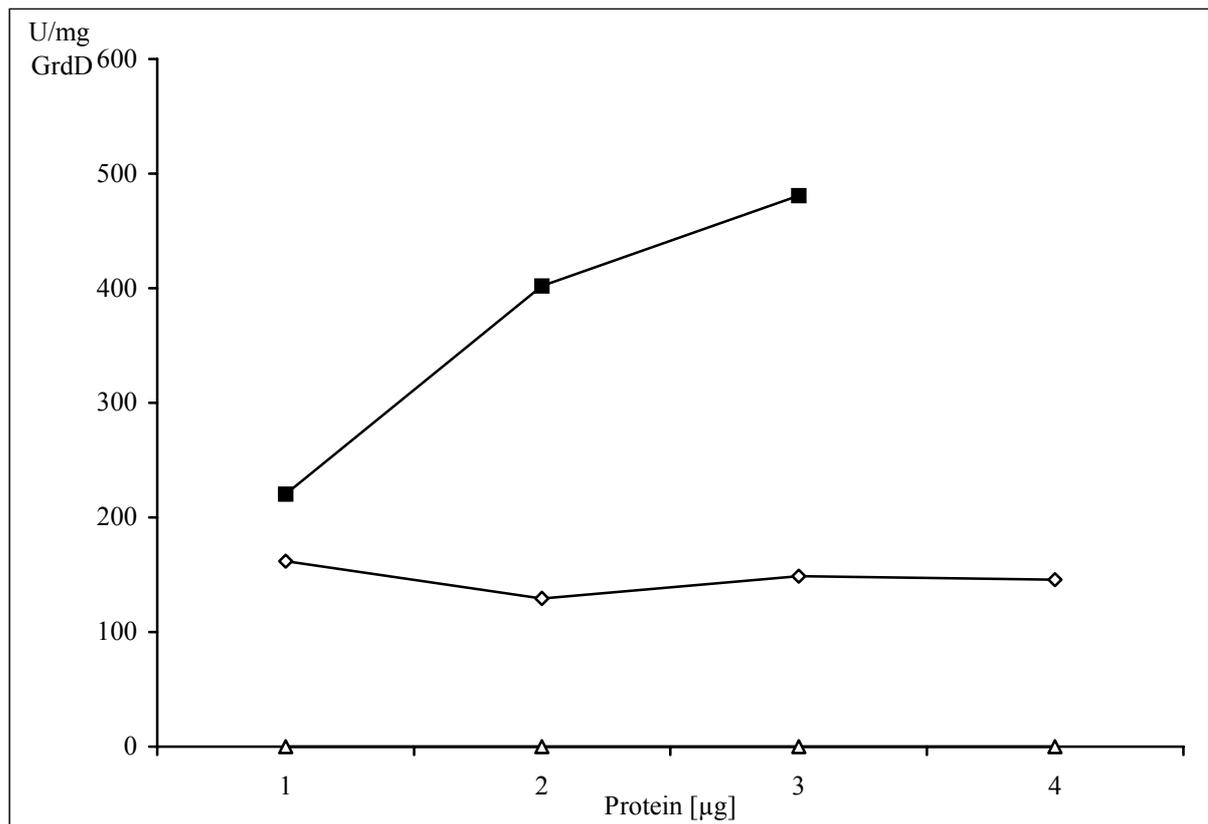
Unmittelbar nach der Reinigung zeigte GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein spezifische Enzymaktivitäten im Bereich von 200 bis 320 U/mg (s. 3.7.), die jedoch nach Zusammenfassen der Fraktionen und Dialyse in einen Bereich von 160 U/mg  $\pm$  20 sanken. Dabei gab es keine Veränderung der Proteinkonzentration. Eine Inaktivierung war auch bei GrdD als His-tag-Fusionsprotein beobachtet worden (s. 3.7.1.). Als *Strep*-tag-Fusionsprotein zeigte GrdD unmittelbar nach der Reinigung Extraktproportionalität, doch ging diese durch Lagerung bei  $-20$  °C verloren. Bei erhöhtem Proteineinsatz konnte ein Anstieg der spezifischen Aktivität im Bereich von Protein 80 bis 130 U/mg gemessen werden.

GrdC hatte als einzelne zugegebene rekombinante Untereinheit hatte, wie bereits beschrieben, keine Enzymaktivität, die durch arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat gemessen werden konnte. Um zu ermitteln, ob GrdC die Enzymaktivität von GrdD beeinflusste, wurde die Aktivität von GrdD alleine und in Gegenwart von GrdC untersucht. Zuerst wurde die Aktivität von GrdD im Bereich von 0,2 bis 0,5  $\mu$ g Protein gemessen und als Ausgangsaktivität genommen. Dann wurde die Enzymaktivität nach stöchiometrischer Zugabe an GrdC gemessen. Die spezifische Enzymaktivität von GrdD lag in diesem Bereich bei 150 U/mg, die Zugabe von GrdC in equimolarer Menge führte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von GrdD auf bis zu 400 U/mg GrdD.

GrdD wurde auf Bildung von Oligomeren im reduzierten und nicht reduzierten Zustand mittels 10 %iger SDS-PAGE untersucht. Die Ausbildung von Disulfid-Bindungen zwischen zwei Proteinmolekülen hätte im SDS-PAGE eine Proteinbande höherer Molekülmasse verursacht. Es wurde Protein mit Proben-Puffer mit und ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol auf das SDS-PAGE aufgetragen. GrdD zeigte jedoch kein verändertes Laufverhalten (Daten nicht gezeigt) somit war keine Dimer-Bildung erkennbar.

### 3.8.5. Enzymaktivität von GrdD-Mutanten

Bei der Bildung von Acetylphosphat durch Protein C aus dem Protein A gebundenen Carboxymethylselenoether wurde die Bildung eines intermediären Protein C gebundenen Acetylthioesters gezeigt (Arkowitz und Abeles, 1989; Arkowitz und Abeles, 1991; Stadtman und Davis, 1991). Ein Acetylthioesters sollte mit einer Thiol-Gruppe von der 48 kDa-Untereinheit GrdD von Protein C vorliegen, denn diese Untereinheit zeigte nach Trennung von der 57 kDa-Untereinheit GrdC eine Enzymaktivität im Enzymtest der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat (Schröder und Andreesen, 1992). Diese Aktivität sollte darauf beruhen, daß in der unphysiologischen Rückreaktion Acetylphosphat einen Thiol-Rest acetyliert, der gebildete Acetylthioester labil ist und durch Arsenat als Phosphat-Analogon hydrolysiert wird.



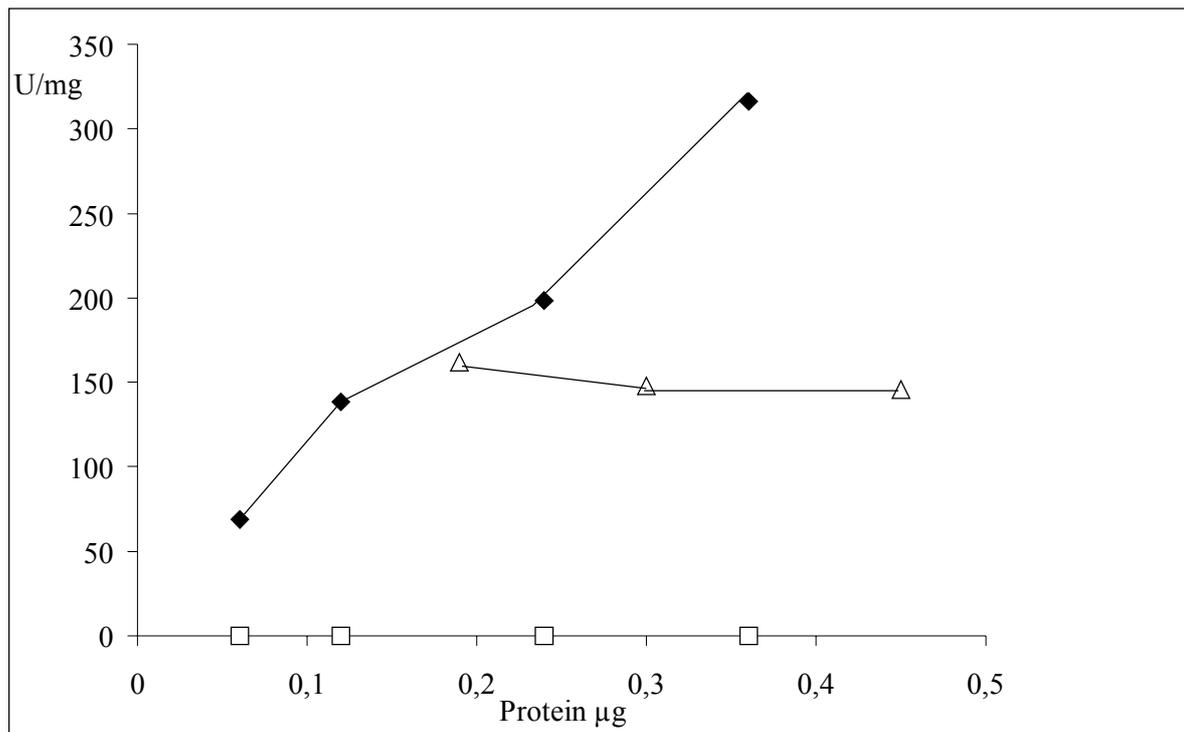
**Abb. 22 Spezifische Enzymaktivität der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat.** GrdD wurde im Bereich von 0,2 bis 0,5 µg Protein gemessen. Bei der zweiten Meßreihe wurde GrdC in equimolaren Mengen dem Meßansatz hinzugefügt und die Aktivität überprüft. Als Kontrolle wurde GrdC alleine gemessen. Dargestellt wurden die spezifische Aktivität von GrdD-◇-, von GrdD 1:1 mit GrdC -■- und GrdC -△-

GrdD enthielt an Position 98 und Position 359 der Sequenz Cysteine-Reste, deren Funktion durch gerichtete Mutagenese analysiert werden sollte.

Wie unter 3.9. beschrieben, wurde die Sequenz von *grdD* mittels „overlap-Extension-PCR“ einmal so verändert, daß die exprimierte Mutante an Position 98 statt des Cysteins ein Serin enthielt. In einer zweiten Mutante enthielt das exprimierte Protein statt des Cysteins 359 in der Sequenz ein Alanin. Die Mutanten, bezeichnet als GrdD C98→S und GrdD C359→A wurden ebenfalls als N-terminale *Strep*-tag-Fusionsproteine exprimiert und an StrepTactin über Affinitätschromatographie gereinigt. Anhand der spezifischen Enzymaktivität sollte die katalytisch essentielle Thiol-Gruppe bestimmt werden.

Die Mutante GrdD C98→S zeigte Enzymaktivität wie das rekombinante GrdD. Die spezifische Enzymaktivität von GrdD C98→S als gereinigtes Protein erhöhte sich bei Vergrößerung der Proteinmenge im Enzymtest deutlich, so daß keine Extraktproportionalität vorhanden war (s. Abb. 23). Die gemessene Enzymaktivität zeigte, daß der Verlust der Thiol-Gruppe von Cystein 98 nicht den Verlust der Enzymaktivität bedeutete. Es handelte sich demzufolge nicht um das katalytisch essentielle Cystein.

Dagegen besaß die Mutante GrdD C359→A im Test durch arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat keine Aktivität mehr. Damit konnte gezeigt werden, daß der Verlust der Thiol-Gruppe von Cystein 359 eine Inaktivierung der Proteinaktivität bedeutete. Offensichtlich handelte es sich somit um das katalytisch essentielle Cystein.



**Abb. 23 Spezifische Aktivität der Mutanten GrdDC98S und Ala359 bei der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat.** Dargestellt sind die spezifische Aktivität von GrdD  $\Delta$ -, die spezifische Aktivität von GrdD C359 $\rightarrow$ A - - und - $\blacklozenge$ - GrdD C98 $\rightarrow$ S. Die Details zum Enzymtest sind unter 2.7. beschrieben.

### 3.9. Analyse des Zink-Gehalts in GrdC

Beim katalytischen Transfer von Methyl- und Acyl-Gruppen kann  $\text{Zn}^{2+}$  als Cofaktor ligandiert auftreten, um so den Transfer von Methyl- bzw. Acyl-Gruppen auf einen Thiol-Akzeptor als Lewis-Säure zu katalysieren (Matthews und Goulding, 1997). Über den Transfer der Carboxymethyl-Gruppe von Selenoprotein A zu GrdD ist kaum etwas bekannt (Arkowitz und Abeles, 1991). Bis auf unbestätigte Untersuchungen an Protein C aus *C. sticklandii*, die auf einen Eisen-Gehalt von Protein C hinwiesen (Tanaka und Stadtman, 1979), existiert derzeit noch kein Hinweis auf die Beteiligung eines Metallions an der Katalyse. Um zu überprüfen, ob in GrdC möglicherweise  $\text{Zn}^{2+}$  gebunden ist, wurde der Zink-Gehalt von gereinigtem rekombinanten Protein über Atom-Absorptionsspektroskopie in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Marion Martienssen (Institut für Biochemie/Biotechnologie) gemessen.

Die Nachweisgrenze für Zink in der Atomabsorptionsspektroskopie lag bei 0,1 mg/l (Dr. Martienssen, persönliche Mitteilung). Dies entsprach einer Konzentration von 1,5 nmol/ml Zink. Da GrdC ein Molekulargewicht von 54 kDa hatte, mußten demzufolge mindestens 0,08 mg/ml Protein zur Analyse eingesetzt werden.

Um möglicherweise Zink in GrdC nachweisen zu können, wurde es als C-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein, wie unter 2.11. beschrieben, gereinigt, jedoch wurde dem Puffer beim Zellaufschluß kein EDTA hinzugefügt, welches das im Protein gebundene Zink während der Reinigung herauslösen könnte.

Der Zink-Gehalt der Proteinlösung wurde anhand einer Eichkurve gemessen, die im Bereich von 0,1 mg/l bis 0,5 mg/l mit granuliertem Zink als Standard erstellt wurde.

Zur Messung wurden 3 ml GrdC-Lösung mit 1,0 mg/ml Protein in 100 mM Tris/HCl pH8,0, 3mM DTT, 2,5 mM Desthiobiotin, was 55 nmol GrdC entsprach, eingesetzt. In dieser Proteinlösung wurden 0,063 mg/l Zink nachgewiesen, was zwar außerhalb der erstellten Eichkurve lag, jedoch noch reproduzierbar meßbar war. Damit konnten umgerechnet 2,9 nmol

Zink nachgewiesen werden, bei einer eingesetzten Proteinmenge von 18 nmol, d. h. 0,16 g-Atom Zink pro mol GrdC.

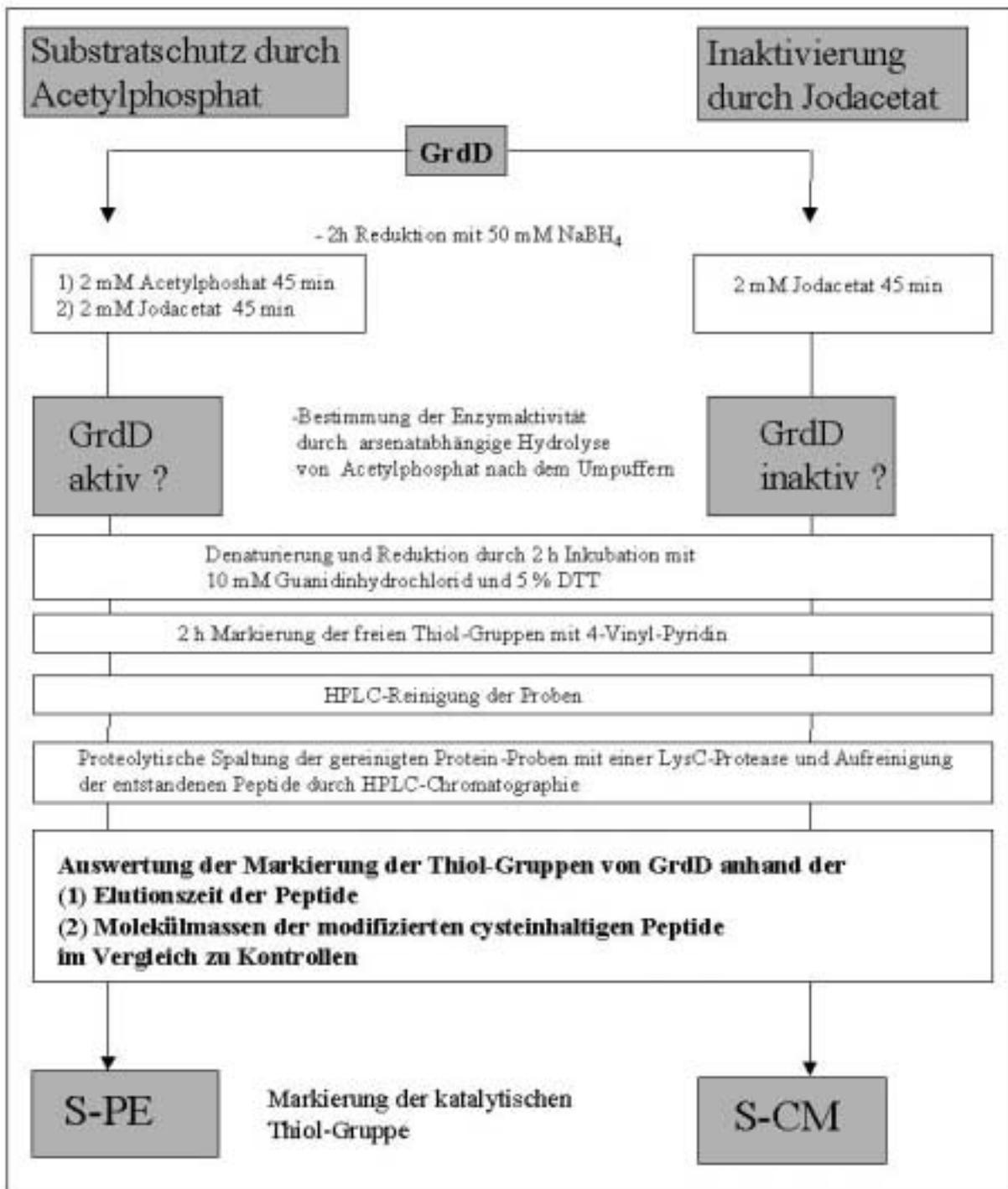
### **3.10. Untersuchungen zur Markierung des katalytisch aktiven Cysteins in GrdD**

Neben der Bestimmung der Enzymaktivität der GrdD-Mutanten (3.7.5.) wurde versucht, die katalytisch aktive Thiol-Gruppe von GrdD mit thioispezifischen Agenzien zu markieren. Untersuchungen am Protein C von *C. sticklandii* hinsichtlich der arsenatabhängiger Hydrolyse von Acetylphosphat zeigten, daß das Enzym nach Inkubation mit Jodacetat inaktiviert wurde (Stadtman und Davis, 1991). Diese Inaktivierung durch Jodacetat deutete auf eine irreversible Carboxymethylierung einer katalytisch aktiven Thiol-Gruppe hin. Dagegen blieb die Enzymaktivität von Protein C zu 100 % erhalten, wenn zuerst mit dem Substrat Acetylphosphat vor dem Zusatz von Jodacetat inkubiert wurde. Damit wurde das Protein durch die mögliche Ausbildung eines Acetylthioesters vor der Carboxymethylierung geschützt. Falls die Inaktivierung und der Substratschutz am rekombinanten GrdD ebenfalls nachzuweisen waren, sollte dies zur Markierung der katalytisch aktiven Thiol-Gruppe in GrdD ausgenutzt werden. Substratschutz und Inaktivierung sollten anhand der Enzymaktivität von GrdD gezeigt werden. Im Falle des Substratschutzes mußte die Enzymaktivität nach Entfernen von Acetylphosphat und Jodacetat erhalten bleiben, demnach sollte die Thiol-Gruppe noch unmodifiziert vorliegen und somit eine nachfolgende Markierung mit 4-Vinylpyridin als weiteres thioispezifisches Reagenz möglich sein. Im Gegensatz dazu sollte nach Inkubation mit Jodacetat GrdD inaktiviert sein, die katalytisch aktive Thiol-Gruppe carboxymethyliert vorliegen und daher eine nachfolgende Markierung durch 4-Vinylpyridin unmöglich sein. Um zu gewährleisten, daß die zwei Thiol-Reste in GrdD zugänglich sind, wurde die Markierung mit 4-Vinylpyridin im reduzierten und denaturierten Zustand durchgeführt. In Abb. 24 wurde die Strategie zur Markierung und Analyse der Thiol-Gruppen beschrieben. Durch die Kenntnis der Sequenz von GrdD war es möglich, die Peptide nach proteolytischer Spaltung über deren Massen zu bestimmen. Der Nachweis der cysteinhaltigen Peptide und deren unterschiedliche Markierung sollte daher über MALDI-Massenspektrometrien anhand entsprechender Kontrollen erfolgen (s. Tab. 18).

#### **3.10.1. Untersuchungen zum Substratschutz durch Acetylphosphat und zur Inaktivierung von GrdD durch Jodacetat**

Zuerst wurden der mögliche Substratschutz in Gegenwart von Acetylphosphat und die Inaktivierung durch Jodacetat anhand der Enzymaktivität von GrdD untersucht.

Dazu wurde GrdD mittels  $\text{NaBH}_4$  zwei Stunden unter Stickstoff/ $\text{H}_2$  in einer Anaerobier-Box (s. 2.7.7.) reduziert und die spezifische Aktivität des reduzierten Proteins als Ausgangsaktivität für weitere Untersuchungen gewertet. Der reduzierte Ansatz wurde geteilt und die resultierenden Proben in Parallelansätzen erst mit Acetylphosphat und dann Jodacetat bzw. nur mit Jodacetat umgesetzt. Die Reaktionsansätze wurden gestoppt und die Proben zur Bestimmung der spezifischen Aktivität umgepuffert. Die Enzymaktivität blieb nach Zusatz von Acetylphosphat vor der Inkubation mit Jodacetat erhalten. Dagegen war nach Inkubation mit Jodacetat allein keine Enzymaktivität mehr zu messen (s. Tab. 17). In den Ansätzen mit  $\text{NaBH}_4$  und nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat gab es keine Extraktproportionalität.



**Abb. 24 Strategie zur Markierung der katalytisch aktiven Thiol-Gruppe in GrdD nach Substratschutz durch Acetylphosphat und Inaktivierung durch Jodacetat.** Dargestellt wurden die einzelnen Schritte bis zum Nachweis der Markierung der katalytischen Thiol-Gruppe. Mit S-PE wurde eine Thiol-Gruppe nach Pyridyl-Ethylierung, mit S-CM wurde die Thiol-Gruppe nach Carboxymethylierung bezeichnet. Die Methode wurde unter 2.7.7. aufgeführt. Zur Denaturierung und Markierung wurden 1 nmol Protein eingesetzt.

**Tab. 17 Spezifische Aktivitäten von GrdD bei der Untersuchung zum Substratschutz durch Acetylphosphat.** Die spezifische Aktivität wurde nach der Reduktion mit NaBH<sub>4</sub>, nach der Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat und nach der Inkubation nur mit Jodacetat wie unter 2.7.7. beschrieben ermittelt.

Enzymaktivität von GrdD gemessen:	Eingesetzte Proteinmenge [µg]	Spezifische Aktivität [U/mg]
Nach Reduktion durch NaBH <sub>4</sub>	0,5	130
	0,8	346
Spezifische Aktivität nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat	0,6	164
	0,9	350
Spezifische Aktivität nach Inkubation mit Jodacetat ohne Acetylphosphat	0,6	0
	0,9	0
	1,6	0

### 3.10.2. Weiterführung der Ansätze durch Markierung von GrdD mit 4-Vinylpyridin und Analyse der proteolytischen Spaltungsprodukte

Die folgenden Arbeiten dazu wurden in Zusammenarbeit Dr. Peter Rücknagel und Frau Dr. Angelika Schierhorn von der Forschungsstelle "Enzymologie der Peptidbindung" der Max-Planck-Gesellschaft Halle durchgeführt.

Die Enzymaktivität und die Inaktivierung von GrdD in den zuvor beschriebenen Ansätzen deuteten an, daß nach Umsatz mit Acetylphosphat und Jodacetat die katalytische Thiol-Gruppe noch unmodifiziert vorliegen sollte. Die Inaktivierung nach Inkubation mit Jodacetat entsprach einer Carboxymethylierung der katalytischen Thiol-Gruppe. Als nächster Schritt wurden die freien Thiol-Gruppen beider Ansätze mit 4-Vinylpyridin markiert. Eine Analyse der Markierungen anhand von Kontrollen (Tab. 18) sollte zeigen, ob eine der Thiol-Gruppe nach Inaktivierung carboxymethyliert vorlag und ob dieselbe Thiol-Gruppe sich nach Substratschutz mit 4-Vinylpyridin markieren ließ.

Als Kontrollen dienten zum einen eine Probe, bei der beide Thiol-Gruppen pyridylethylt (Ansatz A) vorliegen sollten, zum anderen eine Probe mit unmodifizierten Thiol-Gruppen (Ansatz B). Zur Analyse der Markierung der Cysteine wurden die Proteinproben mit einer Lys-C-Protease gespalten, die entstandenen Peptidgemische über HPLC chromatographisch aufgetrennt und anschließend durch MALDI-Massenspektrometrie untersucht.

Durch die bekannte Aminosäuresequenz von GrdD waren die theoretisch entstehenden Peptide und ihre Molekülmasse bekannt. In Tab. 19 wurden die cysteinhaltigen Peptide mit ihren theoretischen Massen nach Pyridylethylierung und Carboxymethylierung aufgeführt, die nach vollständiger Spaltung von GrdD mit einer Lys-C-Protease entstehen sollten. Nach Markierung mit 4-Vinylpyridin würde sich die Masse eines cysteinhaltigen Peptides um 105 Da erhöhen, dagegen würde sich die Masse des Peptides nach Carboxymethylierung lediglich um 58 Da erhöhen.

Die Elution der Fraktionen mit den zwei pyridylethylt Peptiden (Ansatz A) wurde durch Absorption bei einer Wellenlänge von 256 nm registriert, sie eluierten nach 44 min (Peptid I) und nach 52 min (Peptid II, s. Abb. 25). Die Analyse beider Fraktionen durch Massenspektrometrie ergab für Peptid I 2930,9 Da, was nicht mit den theoretischen Massen beider cysteinhaltigen Peptide nach Markierung mit 4-Vinylpyridin übereinstimmte, sondern der Masse eines größeren Peptides entsprach. Es lag möglicherweise eine unvollständige Spaltung des Proteins vor, so daß ein größeres cysteinhaltiges Peptid entstanden war. Der Vergleich mit den Massen der unmodifizierten Peptide mußte zeigen, um welches Peptid es sich handelte (Tab. 12). Peptid II hatte eine Masse von 4228,9 Da, was der theoretischen Masse des Peptides mit Cystein 98 und einer zusätzlichen Pyridylethylierung entsprach (s. Tab. 19).

**Tab. 18 Erläuterung der Ansätze und Kontrollen mit GrdD bei der Identifikation der katalytischen Thiol-Gruppe an GrdD.** Nach der Markierung wurden die Proteinproben mit einer LysC-Protease gespalten und über HPLC chromatographisch getrennt. Die Details zur Methode sind unter 2.7. erläutert.

Ansatz	Inkubationen und Markierung
A	Reduziertes und denaturiertes GrdD wurde mit 4-Vinylpyridin inkubiert, als Kontrolle für eine Pyridylethylierung beider Thiol-Gruppen
B	unmodifiziertes GrdD wurde zur Spaltung eingesetzt
C	GrdD nach Substratschutz <sup>1</sup> wurde reduziert, denaturiert und mit 4-Vinylpyridin inkubiert
D	GrdD nach Inaktivierung <sup>2</sup> wurde reduziert, denaturiert und mit 4-Vinylpyridin inkubiert
E	Reduziertes und denaturiertes GrdD wurde mit Acetylphosphat und Jodacetat inkubiert und zusätzlich mit 4-Vinylpyridin markiert, um zu überprüfen, ob der Substratschutz nur mit nativen Protein stattfand.

<sup>1</sup> Weiterführung des Ansatzes nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat s. Tab. 17

<sup>2</sup> Weiterführung des Ansatzes nach Inkubation mit Jodacetat s. Tab. 17

Als zweite Referenz wurde das nichtmodifizierte Protein denaturiert, proteolytisch gespalten und das Peptidgemisch über HPLC aufgetrennt (Ansatz B). Bis auf die genannten zwei Fraktionen, die nach 46,6 min und nach 53,3 min eluierten, stimmte das Chromatogramm mit Ansatz A überein. Es handelte sich um die Fraktionen mit cysteinhaltigen Peptiden, die unmodifiziert vorlagen und daher anders eluierten. Die Analyse der Masse der Fraktion nach 46,6 min ergab 2825,3 Da (Abb. 25) für Peptid I. Die Differenz der Massen von Peptid I in Ansatz A und B betrug 105 Da, was einer Pyridylethylierung entsprach. Die Masse des unmodifizierten Peptid I bestätigte eine unvollständige Spaltung von GrdD, so daß ein größeres Peptid mit Cystein 359 von Alanin 349 bis Lysin 376 entstanden war (s. Tab. 19 und Tab. 20). Das cysteinhaltige Peptid mit Cystein 98 hatte in Ansatz B eine Masse von 4123,9 Da. Dieses entsprach der theoretischen Masse des unmodifizierten Peptids.

Anhand dieser Kontrollen wurde die Elutionszeit und die Markierung der cysteinhaltigen Peptide nach Substratschutz durch Acetylphosphat (Ansatz C) und nach Inaktivierung mit Jodacetat (Ansatz D) und Markierung der freien Thiol-Gruppen mit 4-Vinylpyridin (s. Tab. 19 und Tab. 20) überprüft. Die Elutionszeiten der Peptide in Ansatz C waren identisch zur pyridylethylierten Referenz (s. Abb. 25). Die ermittelten Massen der Peptide mit 2932,2 Da und 4228,3 Da bestätigten dieses Ergebnis, beide Cysteine lagen pyridylethyliert vor. Beim Ansatz D eluierte das Peptid II mit Cystein 98 nach 52 min wie nach Pyridylethylierung und die Masse von 4228,3 Da (Tab. 20) bestätigte dies. Das andere cysteinhaltige Peptid eluierte nach 45 min, was weder dem pyridylethylierten noch dem unmodifizierten Peptid entsprach. Die Analyse durch MALDI-Massenspektrometrie ergab 2884,2 Da, welches dem Peptid I mit Cystein 359 zuzüglich der Masse von 60 Da einer Carboxymethylierung entsprach. Alle anderen Fraktionen eluierten wie bei den vorangegangenen Proben.

Das Cystein 359 lag demzufolge nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat (Ansatz C) als freie SH-Gruppe vor und konnte erst nach Aufhebung des Substratschutzes durch den Acetylthioester mit 4-Vinylpyridin markiert werden. Nach Inaktivierung mit Jodacetat (Ansatz D) lag dieselbe SH-Gruppe jedoch carboxymethyliert vor und daher wurde die enzymatische Inaktivierung beobachtet. Demzufolge war Cystein 359 das katalytisch aktive Cystein.

**Tab. 19 Kalkulierte Massen der cysteinhaltigen Peptide in GrdD nach Modifikation mit 4-Vinylpyridin bzw. nach Carboxymethylierung und anschließender proteolytischer Spaltung durch eine Lys-C-Protease.** Am Sequenzbeginn, am Cystein und am Ende der Peptide wurde die Position in der Aminosäuresequenz angegeben. Die Sequenz und die Molekülmasse der entstehenden Peptide wurden über das Programm PC/Gene ermittelt.

Cystein	Sequenz des Peptides	Molekülmasse der unmodifizierten Peptide [Da]	Molekülmasse nach Markierung mit 4-Vinylpyridin [Da]	Molekülmasse nach Carboxymethylierung [Da]
98	K <sub>86</sub> MEELLDSGYIHS C <sub>98</sub> VTVHYNFPIGVS TVGRVVTPGMGK <sub>122</sub> = Peptid II <sup>1</sup>	4123	4228	4181
359	A <sub>349</sub> GIYAESGMG C <sub>359</sub> TGPIVMVNEAK <sup>2</sup>	2198	2304	2257
359	A <sub>349</sub> GIYAESGMG C <sub>359</sub> TGPIVMVNEAK VEEAAK <sup>3</sup> = Peptid I <sup>1</sup>	2826	2931	2884

<sup>1</sup> Bezeichnung des Peptid, die nach Reihenfolge der Elution von der HPLC und Auswertung der Massenspektrometrie

<sup>2</sup> Sequenz des cysteinhaltigen Peptides nach vollständiger proteolytischer Spaltung mit einer LysC-Protease

<sup>3</sup> Sequenz des cysteinhaltigen Peptides nach unvollständiger proteolytischer Spaltung mit einer LysC-Protease

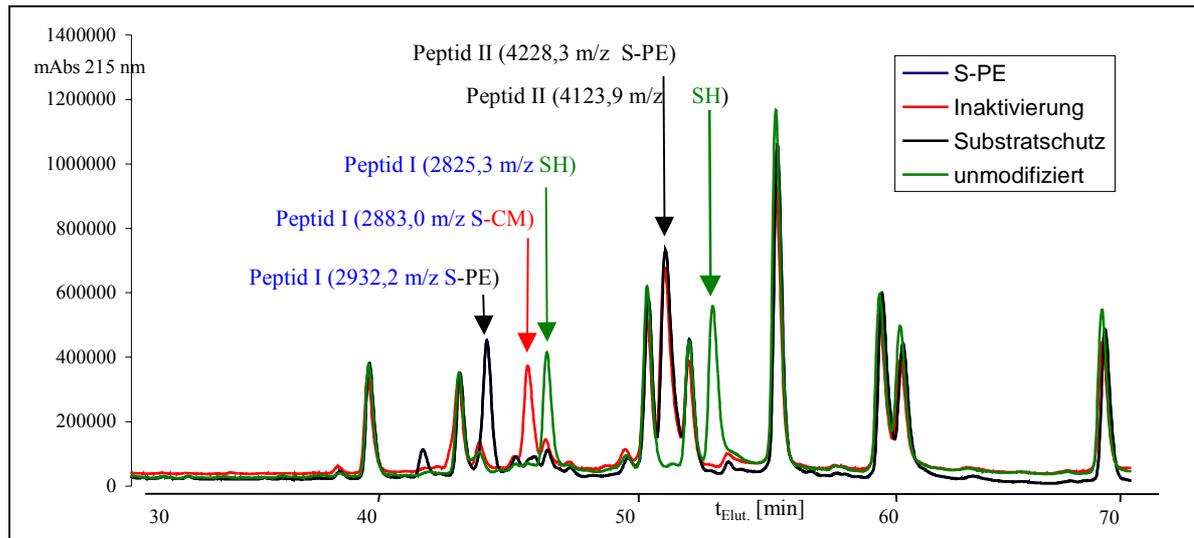
Im Vergleich dazu lag Cystein 98 sowohl in Ansatz C und als auch in Ansatz D pyridylethyliert vor und war offensichtlich im nativen Zustand unzugänglich für eine Carboxymethylierung. Als weitere Kontrolle für diese Vermutung wurde reduziertes und denaturiertes Protein im Ansatz E nacheinander mit Acetylphosphat, Jodacetat (wie in Ansatz C) und zusätzlich mit 4-Vinylpyridin inkubiert. Die Elutionszeit und die Masse des Peptides I mit Cystein 359 entsprachen dem des carboxymethylierten Peptides (Tab. 20). Die Elutionszeit und die Masse des Peptides II entsprachen der theoretischen Masse einer Carboxymethylierung von Cystein 98 (Tab. 19 und Tab. 20). Daraus folgte zum einen, daß Cystein 98 erst im denaturierten Zustand zugänglich für eine Carboxymethylierung ist. Zum anderen war abzuleiten, daß Cystein 359 nur im nativen Protein vor einer Carboxymethylierung durch die Bildung eines Acetylthioesters geschützt wurde. Eine chemische Reaktion zwischen Acetylphosphat und Jodacetat, die die Carboxymethylierung von Cystein 359 verhindert hätte, war nicht zu erwarten. In Tab. 20 wurden die theoretischen und ermittelten Massen der Peptide und deren Modifikationen zusammengefaßt.

**Tab. 20 Kalkulierte und ermittelte Massen (M) der cysteinhaltigen Peptide und deren unterschiedliche Modifikationen nach proteolytischer Spaltung durch eine Lys-C-Protease.** Die Erläuterung der Ansätze A, B, C und D erfolgte in Tab. 18. Details sind unter 2.7.7. beschrieben.

Peptid	M nach Substrat-schutz <sup>1</sup> [Da] Ansatz C	M nach Inaktivierung [Da] Ansatz D	M der unmodifizierten Peptide [Da] Ansatz B		M nach Pyridylethylierung [Da] Ansatz A		M nach Denaturierung und Carboxymethylierung [Da] Ansatz E	
	Ermittelt	ermittelt	theor.	Ermittelt	theor.	ermittelt	theor.	ermittelt
I	2932,2	2884,2	2826	2825,3	2931	2930,9	2884	2884,2
II	4227,5	4228,3	4123	4123,9	4228	4228,3	4181	4181,5

Die Mutante GrdD C359→A wurde wie GrdD mit Jodacetat inkubiert und anschließend im denaturierten Zustand mit 4-Vinylpyridin markiert. Cystein 98 lag wie bei GrdD nach

Inkubation mit Jodacetat pyridylethylert vor, so daß es wie in GrdD offensichtlich strukturell bedingt im nativen Zustand für eine Markierung mit Jodacetat unzugänglich war.

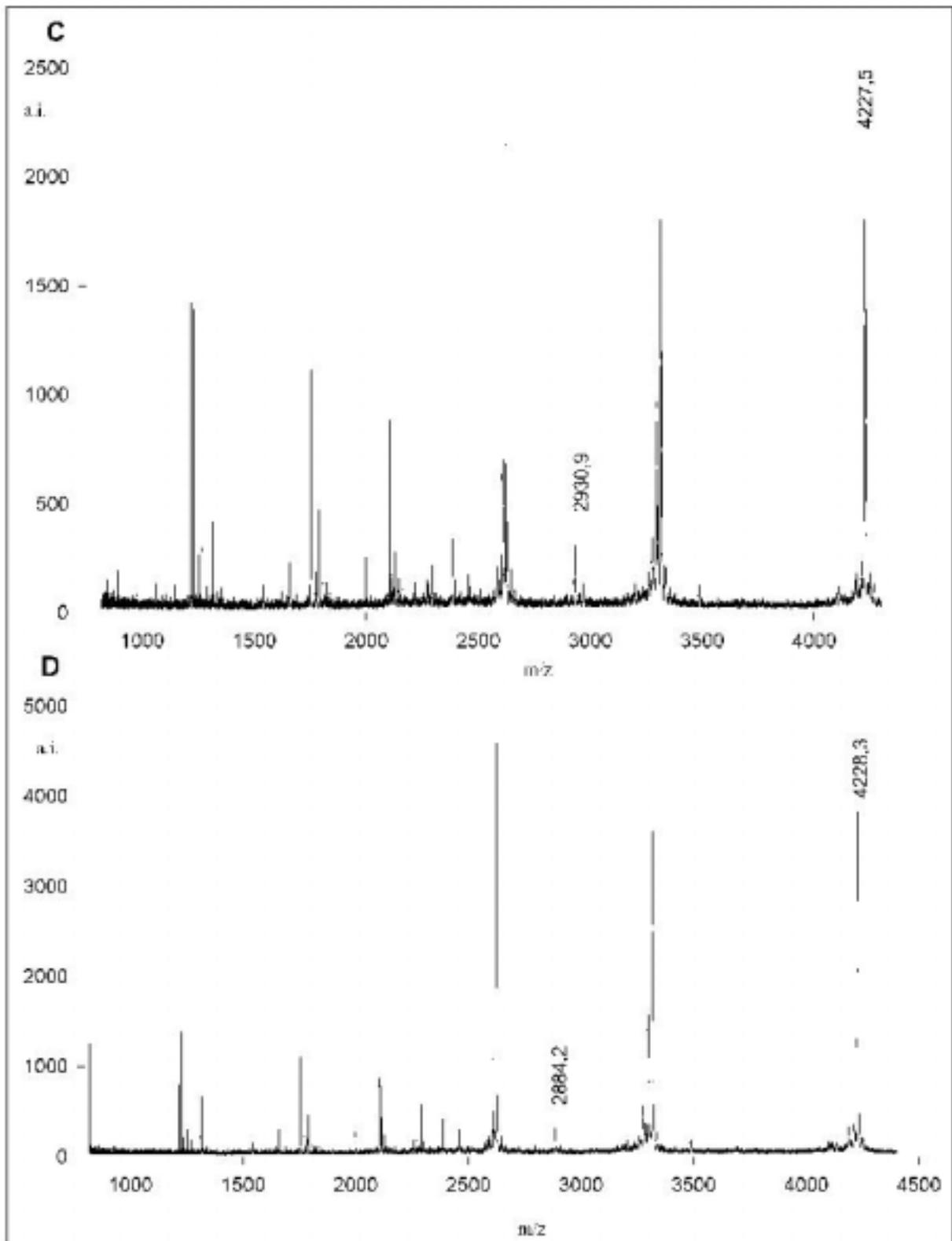


**Abb. 25** Elutionsprofil der Peptide von GrdD nach Modifikation der Cysteine, proteolytischer Spaltung des Proteins und HPLC-Auftrennung. Dargestellt sind das Elutionsprofil der ersten Kontrolle in der beide Cysteine pyridylethylert (S-PE) vorliegen als blaue Linie, die zweite Kontrolle mit unmodifizierten Cysteinen (SH) als grüne Linie vorliegen. Als schwarze Linie ist die Probe nach Substratschutz (Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat) und Pyridylethylierung dargestellt. Diese Probe hatte das selbe Elutionsprofil wie die Kontrolle nach Pyridylethylierung. Das Elutionsprofil der Probe nach Inaktivierung mit Jodacetat und Pyridylethylierung ist als rote Linie dargestellt. An den Peaks wurden die durch MALDI-Massenspektrometrien analysierten Massen der Peptide mit angegeben.

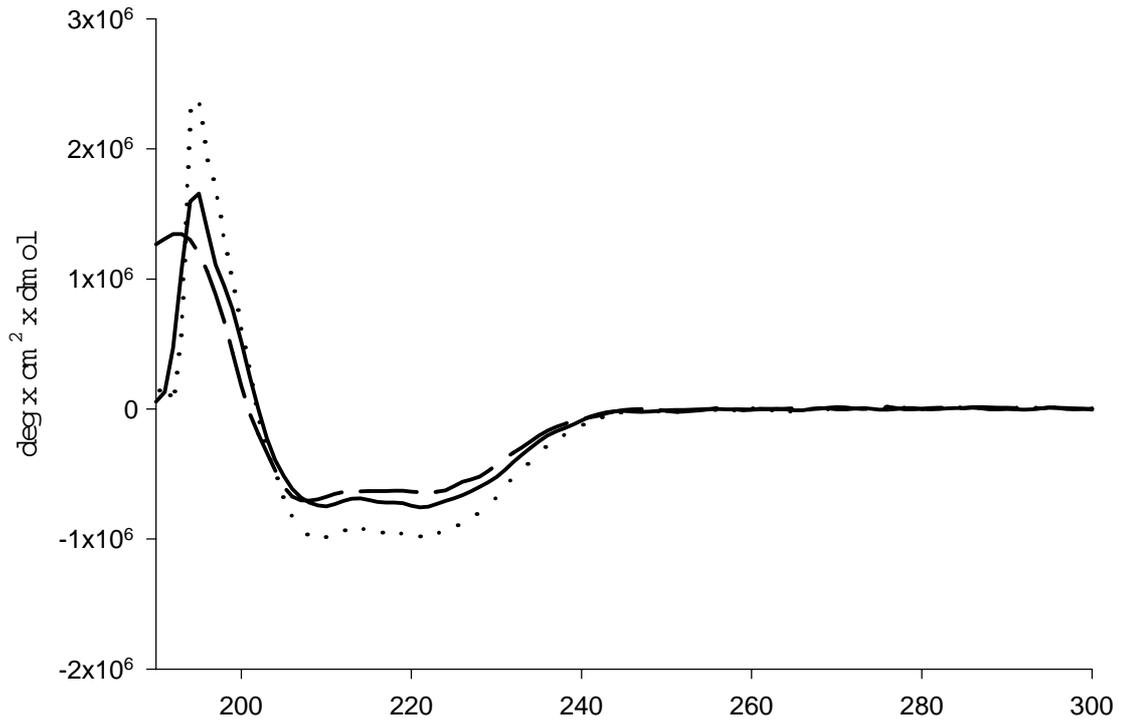
### 3.10.3. Untersuchung der modifizierten Proteine und der Mutante GrdD C359→A durch CD-Spektroskopie

Nach den bisherigen Untersuchungen konnte nicht ausgeschlossen werden, daß eine Änderung der Proteinstruktur bei Inkubation von GrdD mit Acetylphosphat an GrdD den Substratschutz vor einer Carboxymethylierung bewirkte.

Um zu überprüfen, daß keine Änderung der Sekundärstruktur nach Inkubation mit Acetylphosphat stattgefunden hatte, wurden Fern-UV-CD-Spektren der Ansätze B und C (s. Tab. 18) aufgenommen. Zur Messung der Spektren wurde das Protein nach der Bestimmung der Enzymaktivität in 0,1 M Phosphat-Puffer pH 8,0 aufgenommen und die Proben auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml eingestellt. 300 µl Proteinlösung wurden zum Messen eingesetzt. Das Maximum der Fern-UV-CD-Spektren bei 195 nm und die beiden negativen Maxima bei 208 nm und bei 221 nm deuteten auf einen dominierenden Anteil an  $\alpha$ -Helices im Protein hin, der nach Inkubation mit Jodacetat noch höher war als nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat. In der Mutante GrdD C359→A war der Gehalt an  $\alpha$ -Helices im Vergleich zu GrdD annähernd gleich. In keinem der Spektren war eine ungeordnete Struktur erkennbar, die durch negative Maxima im Bereich von 195 bis 200 nm sichtbar geworden wären.



**Abb. 26 MALDI-TOF-Massenspektren Ansätze zur Markierung der Thiol-Gruppen in GrdD. Dargestellt sind die Ansätze:** B) nach Substratschutz (s Tab. 18 und C) Inaktivierung (s Tab. 18) nach der Markierung mit 4-Vinylpyridin und Spaltung mit einer Lys-C-Protease. Hervorgehoben sind in beiden Spektren die Peaks für das Peptid mit Cystein 98, das in beiden Fällen pyridylethylert vorlag und Massen von 4228 Da (B) und 4228 Da (C) hatte. Das Peptid mit Cystein 359 hatte deutlich voneinander abweichende Massen von 2930 Da (B) pyridylethylert und 2884 (C) carboxymethyliert.



**Abb. 27 Fern-UV-CD-Spektren von GrdD und GrdD C359→A.** Dargestellt sind GrdD aus den Ansätzen B (durchgehende Linie) und C (Punkte ) und die GrdD C359→A (gestrichelte Linie). Die Spektren wurden in 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8,0 gemessen. Zur Messung wurden 300  $\mu$ l mit ca. 0,1 mg/ml Proteinlösung eingesetzt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Protein C der Glycin-Reduktase

Protein C der Glycin-, Betain- und Sarkosin-Reduktase führt die Synthese von Acetylphosphat als energiereiches Endprodukt durch. Substrate dieser Reaktion sind freies Phosphat und der Carboxymethyl-Rest, der als Selenoether am Protein A gebunden ist. Acetylphosphat wurde als Endprodukt der Reaktion von gereinigtem carboxymethylierten Selenoprotein A (Garcia und Stadtman, 1991) und Protein C von *C. sticklandii* (Arkowitz und Abeles, 1989) und *E. acidaminophilum* (Schräder und Andreesen, 1992) nachgewiesen. Während der Katalyse kommt es zur Bildung des Acetyl-Protein C-Intermediats (Arkowitz und Abeles, 1991). Die Reaktion erfolgt CoA-unabhängig. Das ist eine Besonderheit, da Acetylphosphat als energiereiches Stoffwechsel-Intermediat sonst nur aus Acetyl-CoA und freiem Phosphat durch die Phosphotransacetylase, die Phosphoketolase oder die Pyruvat-Oxidase bei einigen Milchsäurebakterien synthetisiert wird.

Protein C besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten und wurde aus *C. sticklandii* (Stadtman, 1989; Tanaka und Stadtman, 1979), *E. acidaminophilum* (Schräder und Andreesen, 1992) und *T. creatinophila* (Harms *et al.*, 1998) bis zur Homogenität gereinigt. Nach der Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* konnte gezeigt werden, daß die 48 kDa Untereinheit GrdD in der Lage ist, die arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat zu katalysieren. Daher wurde postuliert, daß die Synthese von Acetylphosphat an GrdD stattfindet (Schräder und Andreesen, 1992). Die Untereinheiten von Protein C wurden bislang nur durch Elektroosmose unter denaturierenden Bedingungen voneinander getrennt (Harms, 1995), somit konnte die 57 kDa Untereinheit GrdC noch nicht getrennt charakterisiert werden. In molekularbiologischen Untersuchungen zur Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* wurde *grdC*, das Gen der 57 kDa Untereinheit von Protein C, kloniert, dagegen lag das Gen der 48 kDa noch nicht vollständig vor (Lübbers, 1993).

Daraus ergab sich eine Zielstellung dieser Arbeit, das Gen *grdD* der 48 kDa-Untereinheit vollständig zu klonieren, um so eine Basis für eine getrennte heterologe Expression beider Untereinheiten in *E. coli* und die Charakterisierung der Untereinheiten GrdC und GrdD als rekombinante Proteine zu erhalten. Die Kenntnis der Sequenz von GrdD war die Voraussetzung für den Nachweis des reaktiven Cystein-Restes in GrdD, der in der unphysiologischen Reaktion von Acetylphosphat acetyliert wird.

### 4.2. Klonierung von *grdD* aus *Eubacterium acidaminophilum*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Klonierung von pMK374, auf dem die Gene *grdAI*, *grdCI* und *grdDI* vorlagen, die Gensequenz von *grdDI* aus *E. acidaminophilum* vervollständigt. Das Gen *grdDI* hatte eine Länge von 1155 bp, was umgerechnet ein Protein von 40,0 kDa ergab. Damit entsprach die Größe nicht der nach der Proteinreinigung ermittelten apparenten Molekülmasse von 48 kDa (Schräder und Andreesen, 1992). Der Unterschied zwischen errechneter Molekülmasse des Genprodukts und der apparenten Molekülmasse des Proteins fiel bereits bei *grdC* auf (Lübbers, 1993). Die Molekülmasse des Genprodukts betrug 54 kDa (Lübbers, 1993) und lag unter den von Schräder (1992) ermittelten 57 kDa. Der Vergleich der apparenten Molekülmassen von 58 kDa und 49 kDa der Untereinheiten von Protein C aus *C. sticklandii* (Tanaka und Stadtman, 1979) mit 53 kDa und 39 kDa der Genprodukte (Gräntzdörffer *et al.*, 2000) zeigt ebenfalls diesen deutlichen Unterschied.

Die beiden Kopien des Gens *grdC* der großen Untereinheit von Protein C von *E. acidaminophilum* wurden durch Lübbers, (1993) auf zwei *PstI*-DNA-Fragmenten mit den Gensätzen I und II der Glycin-Reduktase kloniert. Auf diesen *PstI*-Fragmenten folgten dem 3'-Ende von *grdC* nach einer kurzen intergenen Region die ersten 632 bp der beiden Kopien von *grdD*, dem Gen der kleinen Untereinheit von Protein C. Dies zeigte der Vergleich der Sequenz des Genprodukts mit der ermittelten N-terminalen Proteinsequenz (Schröder und Andreesen, 1992).

Aus dieser Anordnung der Gene ergab sich die Strategie, die Verlängerung der 3'-Enden der *PstI*-DNA-Fragmente mittels einer homologen DNA-Sonde aus einer partiellen *MboI*-Genbank zu klonieren. Es wurden insgesamt vier Klone in der partiellen *MboI*-Genbank chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* identifiziert, die *grdD1* enthielten. Dies war eindeutig, da das Insert von pMK374 im Gen des Selenoprotein A, *grdA1*, begann und stromabwärts *grdC* und *grdD* folgten (Lübbers und Andreesen, 1993; Wagner *et al.*, 1999). Im Vergleich dazu gab es keinen Klon in der Genbank, der die zweite Kopie *grdD2* und den Gensatz II der Glycin-Reduktase-Gene enthielt. Offensichtlich lag in der Genbank, die aus 4500 Klonen bestand, nicht das gesamte Genom von *E. acidaminophilum* vor. Ursache dafür war möglicherweise *MboI*, das als Restriktionsenzym beim Anlegen der Genbank eingesetzt wurde. *MboI* ist ein Isomer von *Sau3A*, das im Gegensatz zu *Sau3A* methylierte DNA nicht schneidet. Daher wurde die DNA von *E. acidaminophilum* möglicherweise nicht an allen bekannten *Sau3A*-Restriktionsschnittstellen gespalten. Das Restriktionsenzym *Sau3A* bzw. sein Isomer *MboI* erkennen die Erkennungssequenz GATC. Aus *E. acidaminophilum* wurde eine Methyltransferase kloniert, die zu einem Restriktase/Methylase-System gehört, durch die die DNA wirtskontrolliert modifiziert wird. Die Restriktase *EacI*, die zum Typ IIS gehört, erkennt die Erkennungssequenz 5'-GGATC-3' und schneidet die unmethylierte DNA außerhalb dieses Bereiches in einem definierten Abstand. Die dazu gehörende Methylase überträgt einen Methyl-Rest auf diese Erkennungssequenz (Gräntzdörffer, 2000). Dadurch wird die DNA von *E. acidaminophilum* nicht gespalten. Diese Methylierung war möglicherweise die Ursache dafür, daß ein Teil der *Sau3A*-Erkennungssequenzen durch *MboI* beim Restriktionsverdau nicht gespalten wurde. In der Sequenz des Gensatz II der Glycin-Reduktase gibt es zwei *Sau3A*-Schnittstellen bei 453 bp und 1889 bp mit der Sequenz GGATC, die methyliert vorliegen müßten und wo *MboI* nicht geschnitten haben dürfte.

Der Gensatz II der Glycin-Reduktase mit *grdD2* befand sich auf einem *EcoRI*-DNA-Fragment, das über 10 kbp groß ist (Lübbers, 1993). Dies war wahrscheinlich auch die Ursache dafür, daß dieses Fragment nicht in der partiellen Lambda ZAP<sup>®</sup> II-*EcoRI*-Genbank enthalten war, in die 7 bis 10 kb große *EcoRI*-DNA-Fragmente der chromosomalen DNA von *E. acidaminophilum* kloniert wurden. Die Hybridisierung der chromosomalen DNA mit einer Sonde des 3'-Endes von *grdD1* und *grdD2* zeigte, daß sie sich auf 1,4 und 1,6 kb großen *PstI*-DNA-Fragmenten befanden. Durch die Klonierung von pMK374 konnte gezeigt werden, daß das 3'-Ende von *grdD1* auf einem *PstI*-DNA-Fragment größer als 1,4 kb liegen mußte, denn auf dem Insert war nach dem 3'-Ende von *grdD1* keine weitere Schnittstelle vorhanden. Die Hybridisierung ergab demzufolge keine neue Möglichkeit zur Klonierung des 3'-Endes von *grdD2*. Die Sequenzen von *grdD1* und *grdD2* waren auf den ersten 632 bp völlig identisch (Lübbers, 1993). Die fünf Unterschiede von GrdC1 und GrdC2 von *E. acidaminophilum* (Lübbers, 1993) betrafen im Vergleich zu den Sequenzen von GrdC der Organismen *C. sticklandii* (Gräntzdörffer, 1997), *C. difficile*, *Ct. hydrogeniformans* und *T. denticola* keinen Bereich konservierter Aminosäuren.

### 4.3. Vergleich der funktionellen Genorganisation der Glycin-Reduktase und Proteine aus verschiedenen Organismen

Zum Zeitpunkt der vollständigen Klonierung von *grdD1* aus *E. acidaminophilum* lagen die Sequenzen der Gene der Glycin-Reduktase aus anderen Organismen bis auf *C. litorale* noch nicht vor, so daß zum Vergleich die Gene *grdC* und *grdD* aus der verwandten Art *C. litorale* kloniert werden sollten. Parallel zu dieser Arbeit wurden die Gene der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* kloniert (Gräntzdörffer, 1997; Gräntzdörffer *et al.*, 2000). Neben diesen Daten liegen die Sequenzdaten aus Genomsequenzierungen der Organismen *C. difficile*, *Ct hydrogenoformans* und *T. denticola* vor. Die nun vorliegenden Sequenzdaten der glycin-Betain- und Sarkosin-Reduktasen verschiedener Organismen lassen einen präziseren Vergleich von Genorganisation und Proteinen zu.

Im Genom von *E. acidaminophilum* liegen die Gene der Glycin-Reduktase auf drei verschiedenen DNA-Bereichen verteilt vor. Gensatz I umfaßt das Gen der 47 kDa-Untereinheit *grdB1* des Substrat-spezifischen Selenoproteins B<sub>Glycin</sub>, zwei Kopien des Selenoproteins A kodierenden Gens *grdA3* und *grdA1*, die Gene des Thioredoxin-Systems *trxB1* und *trxA1* und die für die Untereinheiten des Protein C der Glycin-Reduktase *grdC1* und *grdD1* (Lübbers, 1993; Lübbers und Andreesen, 1993; Sonntag, 1998; Wagner *et al.*, 1999, diese Arbeit). Auf dem Gensatz II befinden sich weitere Kopien der Gene des Thioredoxin-Systems und von Protein C (Lübbers, 1993). Der Gensatz III der Glycin-Reduktase enthält das Gen des Proprotein von Protein B<sub>Glycin</sub> *grdE*, eine weitere Kopie *grdA2* des Gens für Selenoprotein A und eine weitere Kopie *grdB2*, der selenocysteinhaltigen 47 kDa-Untereinheit von Protein PB<sub>Glycin</sub> (Wagner *et al.*, 1999) (s. Abb. 28). Diese Genanordnung *grdEAB*, *trxBA* und *grdCD* von Substrat-spezifischen und von der Funktion zusammengehörenden Proteinen wurden ebenfalls in den anderen bekannten Genclustern der Glycin-Reduktase in *C. sticklandii* (Gräntzdörffer *et al.*, 2000) und *C. litorale* (Kreimer und Andreesen, 1995) gefunden (s. Abb. 28).

*E. acidaminophilum* und *C. litorale*, in denen die Gene der Substrat-spezifischen Proteine B in mehreren Kopien vorliegen (Sonntag, 1998), sind laut Bestimmung der 16S-rDNA einander näher verwandt (Baena *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 1994) als *C. sticklandii*, in dessen Genom die Gene *grdEAB* nur einmal auftreten (Gräntzdörffer *et al.*, 2000). Während in *E. acidaminophilum* auch die Gene *grdC* und *grdD* in zwei transkribierten Gensätzen (Sonntag, 1998) vorkommen, wurden sie im Genom von *C. litorale* nur einmal nachgewiesen (diese Arbeit), wie in *C. sticklandii* (Gräntzdörffer *et al.*, 2000). Zwei Kopien von *trxB* und *trxA* wurden aus *C. litorale* analog zu *E. acidaminophilum* (Kreimer und Andreesen, 1995) kloniert, von *grdA* existieren möglicherweise drei Kopien. Die Anordnung *grdE*, *grdA*, *grdB*, *trxB1* und *trxA1* aus *C. litorale* (s. Abb. 28) ist identisch zu *E. acidaminophilum* (Kreimer und Andreesen, 1995; Sonntag, 1998). Im Vergleich dazu liegen die Gene des Thioredoxin-Systems in *C. sticklandii* stromaufwärts von *grdE*. Alle Genannten Gene existieren nur einmal in *C. sticklandii* (Gräntzdörffer *et al.*, 2000).

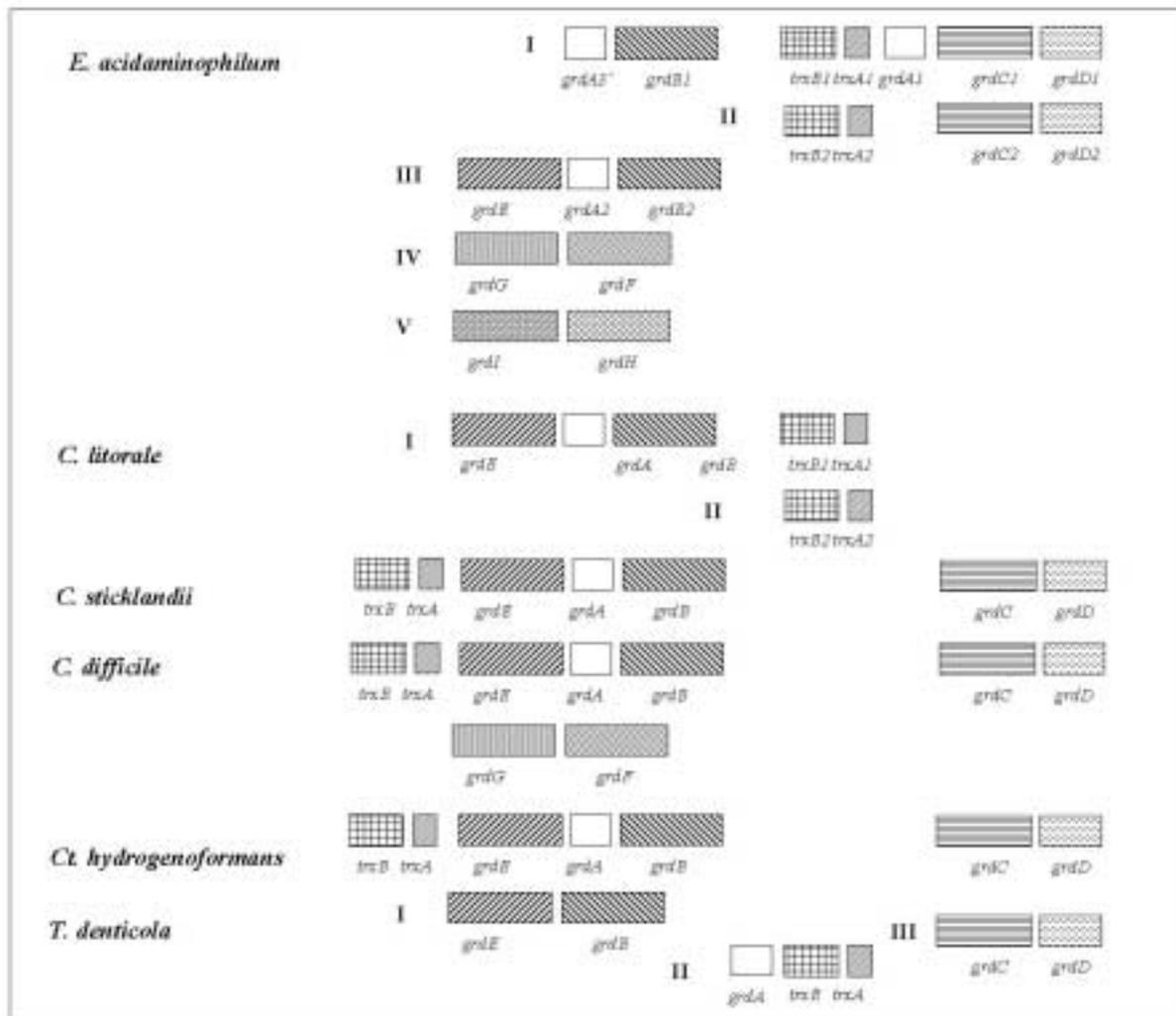
In den vergangenen Jahren wurde am Sanger-Center (<http://www.sanger.ac.uk/>) das Genom von *C. difficile* sequenziert, ein pathogenes Bakterium, das Pseudomembranöse Kolitis verursacht. Diese Krankheit wirkt über zwei Toxine. Toxin A verursacht eine vermehrte Sekretion von Flüssigkeit und Elektrolyten, Toxin B, ein Zytotoxin, bewirkt Epithelschäden am Kolon (Sears und Kaper, 1996). *C. difficile* gehört phylogenetisch in den Cluster XI der Clostridien, zu dem auch *E. acidaminophilum*, *C. sticklandii* und *C. litorale* zählen. In *C. difficile* wurden die Gene des Thioredoxin-Systems und der Glycin-Reduktase in der selben Reihenfolge wie *C. sticklandii* (Gräntzdörffer *et al.*, 2000) gefunden. Ebenfalls wurden die Gene des Proteins B<sub>Sarkosin</sub> *grdF* und *grdG* im Genom von *C. difficile* gefunden.

Die gleiche Genanordnung der Glycin-Reduktase wie *C. sticklandii* und *C. difficile* enthält *Ct. hydrogenoformans*, ein Bakterium, dessen Genom derzeit von TIGR

(<http://www.tigr.org/cgi-bin/Blastsearch/blast.cgi?>) sequenziert wird (Abb. 28). *Ct. hydrogenoformans* ist ein obligat anaerobes, thermophiles Bakterium, das in der Lage ist, Kohlenmonoxid als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Gonzalez und Robb, 2000; Svetlichny *et al.*, 1991).

Ein weiterer Organismus, dessen Genom derzeit bei TIGR sequenziert wird und in dem Gene der Glycin-Reduktase-Proteine identifiziert wurden, ist *T. denticola*, ein Spirochaete. *T. denticola* ist in der Lage, die Aminosäuren Glycin, Serin, Alanin und Cystein zu fermentieren. Das Produkt Acetylphosphat wurde aus Pyruvat, Serin und Cystein nachgewiesen, aber es wurde nicht geklärt, ob der Umsatz der Aminosäuren paarweise über eine Stickland-Reaktion erfolgt (Hespell und Canale-Parola, 1971). Die Präsenz der Glycin-Reduktase-Gene deutet dies jedoch an. Die Sequenzdaten von *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola* stehen über die Datenbank zur Verfügung, sind derzeit aber noch unvollendet und daher nicht alle zugänglich.

Die Gene der Glycin-Reduktase und der Thioredoxin-Reduktase befinden sich in *T. denticola* in drei Genclustern *grdEB*, *trxBAgrdA* und *grdCD* in drei unterschiedlichen Bereichen der chromosomalen DNA. Damit unterscheidet sich die Genanordnung der Glycin-Reduktase-Gene von der in den übrigen genannten Organismen, weil erstmals die Gene des Substrat-spezifischen Selenoprotein B nicht durch das Gen von Selenoprotein A getrennt wurden.



**Abb. 28 Schematischer Vergleich der Organisation der Glycin-Reduktase-Gene in den verschiedenen Organismen.** *grdE* Gen des 46 kDa Proproteins GrdE von Protein B<sub>Glycin</sub>, *grdB* Gen des 47 kDa Selenoprotein von Protein B<sub>Glycin</sub>, *grdG* Gen des 46 kDa Proprotein von Protein B<sub>Sarkosin</sub>, *grdF* Gen des 47 kDa Selenoprotein von Protein B<sub>Sarkosin</sub>, *grdI* Gen des 48 kDa Untereinheit von Protein B<sub>Betain</sub>, *grdH* Gen des 45 kDa Selenoprotein von Protein B<sub>Betain</sub>; *grdA* Gen des Selenoproteins A, *trxB* Gen der Thioredoxin-Reduktase, *trxA* Gen von Thioredoxin, *grdC* 54 kDa-Untereinheit von Protein C, *grdD* 40 kDa-Untereinheit von Protein C. Dargestellt

wurden die Reihenfolge der Gene in den Gensätzen I (L04500), II (Lübbbers, 1993) und III (Y14275) der Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (Lübbbers, 1993, Wagner, 1999 #218), Gensatz IV Sarkosin-Reduktase (Y17872), Gensatz V Betain-Reduktase-Gene (Y17145), der Gensatz I und II aus *C. litorale* (Kreimer und Andreesen, 1995; Kreimer *et al.*, 1997), die Gene aus *C. sticklandii* (AJ276209) (Gräntzdörffer *et al.*, 2000), die putativen Gene der Glycin- und Sarkosin-Reduktase aus dem sequenzierten Genom von *C. difficile* (<http://www.sanger.ac.uk/>), die putativen Gene der Glycin-Reduktase der Organismen *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/Blastsearch/blast.cgi?>).

Abb. 29 zeigt einen Vergleich der Konsensus-Sequenzen der Proteine von Glycin-Reduktase und des Thioredoxin-Systems der genannten Organismen. In der Sequenz von Thioredoxin von *Ct. hydrogenoformans* steht an Position 37 der Aminosäuresequenz ein Tryptophan (Abb. 29A), wie u.a. in der Sequenz von *E. coli* (Eklund *et al.*, 1991). In den bisher bekannten anaeroben Bakterien, die Aminosäuren über eine Stickland-Reaktion abbauen und das Thioredoxin-System als primärer Elektronendonator für die Glycin-, Betain- und Sarkosin-Reduktion nutzen (Andreesen, 1994; Harms *et al.*, 1998; Kreimer und Andreesen, 1995; Kreimer *et al.*, 1997; Lübbbers und Andreesen, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Stadtman, 1978; Stadtman und Davis, 1991), befindet sich anstelle des Tryptophan ein Glycin bzw. ein Serin (nur in *T. creatinophila*). Ein Glycin befindet sich ebenfalls in der Sequenz von Thioredoxin von *T. denticola*. Untersuchungen am Thioredoxin aus *C. litorale* zeigten, daß ein Austausch dieses Glycin gegen Tryptophan eine Inaktivierung auf 5 % der Aktivität des nativen Thioredoxin zur Folge hatte (Kreimer *et al.*, 1997) und die Mutante trotz eines Tryptophan in der Sequenz keine Interaktion mit der Thioredoxin-Reduktase von *E. coli* zeigte. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß der Austausch des Tryptophan gegen einen weniger großen Aminosäure-Rest wie Glycin bzw. Serin einen Vorteil für die Interaktion mit dem gemischten Sulfid-Selenid von Selenoprotein A der Glycin-Reduktase in anaeroben Bakterien sein könnte (Harms *et al.*, 1998). Den Austausch G/VE in der redoxaktiven Sequenz, der in *T. denticola* analog zu bisher bekannten anaeroben Organismen mit Glycin-Reduktase vorliegt, gibt es ebenfalls nicht in *Ct. hydrogenoformans*. Demnach scheint das Thioredoxin aus *T. denticola* derselben Gruppe wie die Thioredoxine von anaeroben Bakterien wie *E. acidaminophilum* und *C. litorale* anzugehören (Kreimer *et al.*, 1997), Thioredoxin aus *Ct. hydrogenoformans*, trotzdem der Organismus eine Glycin-Reduktase zu enthalten scheint, dagegen einer anderen. Neben den genannten Unterschieden zeigt Thioredoxin *Ct. hydrogenoformans* eine weitere Besonderheit, denn die Konsensus-Sequenz VL an Position 16 und 17 der Sequenz von *E. coli* fehlt völlig. Die höchste Identität mit 68 % zeigt die Sequenz nach Eingabe in die Datenbank (NCBI-Blast) zu der von Thioredoxin aus *B. subtilis* (Chen *et al.*, 1989).

Von der Thioredoxin-Reduktase aus *T. denticola* konnte aus den über die Datenbank zur Verfügung stehenden Sequenzdaten die volle Aminosäuresequenz noch nicht abgeleitet werden, der N-Terminus fehlt. Daher ist es nicht möglich zu sagen, ob das N-terminale FAD-Bindemotiv (GXGXXG) vorhanden ist. Die anderen charakteristischen Konsensus-Sequenzen, die aus den Sequenzen der Thioredoxin-Reduktasen von *E. acidaminophilum* (Lübbbers und Andreesen, 1993), *C. litorale* (Kreimer und Andreesen, 1995; Kreimer *et al.*, 1997) und *C. sticklandii* (Gräntzdörffer, 1997; Gräntzdörffer *et al.*, 2000) sowie aus den Sequenzen von *E. coli* (Russel und Model, 1988) und *B. subtilis* (Antelmann *et al.*, 1997) bekannt sind, die redoxaktive Sequenz CXXC an (Position 134 bis 136 Sequenz von *E. acidaminophilum*), die NADP-Bindestelle GGGXXA (152 bis 156) und die C-terminale FAD-Bindestelle TXXXGXXXXGD (272 bis 282) liegen streng konserviert in allen genannten Sequenzen vor.

Die Genprodukte von *grdE* und *grdB* in *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola* wiesen ebenfalls die Konsensus-Sequenz NC auf, an der sich die autoproteolytische Spaltung in die 25 kDa- bzw. 22 kDa-Untereinheiten vollzieht, analog zu den bekannten Proproteinen GrdE der Glycin-Reduktase und GrdG der Sarkosin-Reduktase von *E. acidaminophilum* (Sonntag, 1998; Wagner *et al.*, 1999). Die Sequenzen wurden im Alignment mit denen des Proproteins PrdA der Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (Kabisch *et al.*, 1999) und GrdI von Protein

B<sub>Betain</sub> aus *E. acidaminophilum* verglichen und die Konsensus-Sequenzen dargestellt (Abb. 29). In den zu GrdB aus *E. acidaminophilum* homologen Genprodukten von *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola* liegt in der redoxaktiven Sequenz UXXCXXC ein Selenocystein (U) vor, weil das Gen wie in den bisher bekannten Proteinen durch TGA-Codon unterbrochen ist. Diese Genprodukte von *grdE* und *grdB* wurden ebenso mit den Proteinen GrdF (Sarkosin) bzw. GrdI (Betain) aus *E. acidaminophilum* verglichen. Demnach sollte es sich bei beiden Organismen um Protein B<sub>Glycin</sub> handeln. Neben den genannten Proteinen *T. denticola* scheinen auf einem weiteren Contig *grdE* und *grdB* homologe Genprodukte vorzuliegen, die aber nicht weiter untersucht werden konnten, weil die Sequenzdaten bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zugänglich waren.

In den GrdA homologen Genprodukten wurde die redoxaktive Sequenz CXXU identifiziert und im Alignment zu den anderen bekannten Genprodukten dargestellt (Garcia und Stadtman, 1992; Gräntzdörffer *et al.*, 2000; Kreimer und Andreesen, 1995; Lübbers und Andreesen, 1993).

#### 4.4. Der Sequenzvergleich der Untereinheit GrdD

GrdD ist die Untereinheit von Protein C, an der die Freisetzung von Acetylphosphat stattfindet (Schräder und Andreesen, 1992). Vor der Freisetzung sollte an GrdD ein Protein gebundener Acetylthioester vorliegen, dessen Energie als Acetylphosphat konserviert wird.

GrdD aus *E. acidaminophilum* enthielt zwei Cysteine, die für die Bildung des Acetylthioesters während der Katalyse des Proteins in Frage kamen. Beide Cysteine lagen über vier der bekannten Sequenzen von GrdD konserviert vor. Erst die Kenntnis einer fünften Sequenz von GrdD aus *Ct. hydrogenoformans* zeigte im Vergleich zu den anderen vier bekannten Sequenzen, daß anstelle des N-terminalen Cystein an Position 120 ein Alanin stand (s. Abb. 6) und daß dieses Cystein nicht in allen Sequenzen vorkommt. Damit sollte dieses Cystein im Katalysemechanismus von Protein C keine Rolle spielen. Das Ala 120 wird in *grdD* von *Ct. hydrogenoformans* durch das Codon GCC codiert, Cystein wird dagegen generell durch die Codons TGC bzw. TGT codiert. Somit ist eine Verschiebung des Leserahmens, wie sie möglicherweise in GrdC von *T. denticola* (s. 4.5.) vorliegt, nicht aus der Sequenz abzuleiten.

Cystein 359 ist in allen fünf bekannten Sequenzen vorhanden und liegt in der konservierten Region LWKXGIYAESGMGCTGP, die offensichtlich die Substrat-bindende Region von GrdD darstellt, an der die Acetylerfreisetzung erfolgt und die arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat als quasi Rückreaktion katalysiert wird. Cystein 359 lag laut Hydrophathie-Blot (Kyte und Doolittle, 1982) in einem hydrophoben Sequenzabschnitt (s. Abb. 6) mit 'coiled' Sekundärstruktur zwischen zwei Abschnitten mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Voraussetzung für die Acetylthioesterbildung ist eine dissoziierte Thiol-Gruppe, die einen nucleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Acetyl-Rests durchführt. Durch welche Säure oder Base die Thiol-Gruppe „aktiviert“ wird, ließ sich aus der Sequenz von GrdD nicht ableiten, jedoch deutet die Enzymaktivität von Protein C aus *E. acidaminophilum* bei pH 7,5 an, daß es sich um eine dissoziierte Thiol-Gruppe handeln muß (Harms, 1995; Schräder und Andreesen, 1992).

A

32

TrxA1\_Ea MSALLVEIDKDKQFQAEVLEAEGYVLVDYFSD**GCV**P**CKAL**  
 TrxA\_C1 ----MLMLDKDFTFKTEVLEGTGYVLVDYFSD**GCV**P**CKAL**  
 TrxA\_Csp ----MLVLDKKTFEEEEVLKTKGYVLVDYFGD**GCV**P**CEAL**  
 TrxA\_Cd ----MLDLDKATFEEEEVLNAEGFVFDVFWSE**GCE**P**CKAL**  
 TrxA\_Tiscr ----MIELDKSNFEEEEVLKAEGTVLVDVFWSP**SCE**P**CKAL**  
 TrxA\_Td ----MIELTKENFEQEVHQSKGVTFVDFWSD**GCV**P**CKQL**

TrxA\_Cth MA--IVNANDQSFAAET--SEGVVLLDFWAP**WCG**P**CKMI**  
 TrxA\_Bs MA--IVKATDQSFSAET--SEGVVLAADFAP**WCG**P**CKMI**

TrxA1\_Ec MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAE**WCG**P**CKMI**  
 : : . \* : . \* : \* : . \* \* : :

B

	FAD			NADP	FAD
	11	135		150	272
TrxB1_Ea	--MENVYDLAIIIGSGPAGL	<b>CATCD</b>		GGGDTA	TNVEGVFAAGD
TrxB1_C1	--MENVYDIAIIGSGPAGL	<b>CATCD</b>		GGGDTA	TNVEGVFAAGD
TrxB_Cd	--MENVYDLVIGSGPAGL	<b>CATCD</b>		GGGDSA	TNIPGVFAAGD
TrxB_Cs	--MSKIYDLVIGAGPAGL	<b>CATCD</b>		GGGDSA	TNIPGVFAAGD
TrxB_Cth	--MER-YDVIIIGAGPAGL	<b>CATCD</b>		GGGDSA	TNIPGIYAAGD
TrxB_Td	-----	<b>CATCD</b>		GGGDSA	TNVPGIYGVGD
TrxB_Bs	MSEEKIYDVIIIGAGPAGM	<b>CAVCD</b>		GGGDSA	TKVEGIFAAGD
TrxB_Ec	MGTTKHSKLLIIGSGPAGY	<b>CATCD</b>		GGGNTA	TSIPGVFAAGD
	. . : * : * : * : * : *	** . **		*** : *	* . : * : * : * : *

C

25 kDa-UE      22 kDa-UE  
 236      ▼

GrdG\_Ea ITSG**NC**VAPCD  
 GrdG\_Cd IISG**NC**VAPCD  
 GrdE\_Cs ILSG**NC**VSACD  
 GrdE\_Cd IVSG**NC**VSACD  
 GrdE\_Ea ILSG**NC**VSSCD  
 GrdE\_Cth IVSG**NC**VSACD  
 GrdE\_Td IVSG**NC**VSACD  
 PrdA\_Cs IHAL**TC**IGPAS  
 GrdI\_Ea IISG**SF**MPCSS  
 \* : . : ..

D

	9	56	84	120	236	243
GrdB1_ea	YINQFFAGVGGEEKAD	CGDSY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdB2_ea	YINQFFAGVGGEEKAD	CGDSY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdB_c1	YINQFFAGIGGEEKAD	CGDSF	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdB_cs	YLNQFFAGIGGEEKAD	CGDSY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdB_cd	YINQFFAGIGGEEKAD	CGDSY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdB_Cth	YLNQFFGQIGGEEKAD	CGDSY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdF_ea	YINNFAGVGGEEKAN	CGDSY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDR
GrdF_cd	YINNFAGIGGEEKAD	CGDTY	AGPAFNAGRY	ENPG	GGI	NPDK
GrdB_Td	YINQFFAGKGGEDMAD	CGDNF	AGPGFNAGRY	ENPG	GGV	NPDR
GrdH_ea	YLNQFFGQVGGEDKAD	CGDNF	AGPAFQAGRY	ENPG	GGI	NPDR
PrdB_Cs	-----	-----	-----	----	AGV	DKR-
	* : * : * . * : * : *	*** . :	*** . * : * : * : *	****	** :	:

	347	366
GrdB1_Ea	TST <b>UGTCTRC</b> GASMVKEIER	GANR
GrdB2_Ea	TST <b>UGTCTRC</b> GASMVKEIER	GANR
GrdB_c1	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIER	GANR
GrdB_cs	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIER	GANR
GrdB_cd	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIEK	GANR
GrdB_Cth	TST <b>UGTCTRC</b> GAAAMVKEIER	GANR
GrdF_Ea	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIER	GANR
GrdF_cd	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIER	GANR
GrdB_Td	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIER	GANR
GrdH_Ea	TST <b>UGTCTRC</b> GATMVKEIER	GANK
PrdB_Cs	TAG <b>UGTCHRS</b> AVIVQRAIEE	GTPR
	* : * : * * . . . : : * : *	* : :

E

40

GrdA\_Ea **TECFVUTA**  
 GrdA\_C1 **TECFVUTA**  
 GrdA\_Cs **TECFVUTA**  
 GrdA\_Cd **TECFVUTA**  
 GrdA\_Csp **TECFVUTA**  
 GrdA\_Cth **TECFVUTA**  
 GrdA\_Td **TECFVUTS**  
 \* : \* : \* : \* : \* : \*

**Abb. 29 Darstellung der Konsensussequenzen aus dem Thioredoxin-System und der Glycin-, Betain- und Sarkosin-Reduktasen.** A) N-Terminus von Thioredoxin, die redox-aktiven Sequenzen wurden rot hervorgehoben. TrxA1\_Ea: Thioredoxin aus *E. acidaminophilum* des Gensatz I der Glycin-Reduktase Acc-Nr. L04500 (Lübbers und Andreesen, 1993), TrxA\_Cl: Thioredoxin aus *C. litorale* (Kreimer *et al.*, 1997) Acc-Nr. U24268; TrxA\_Csp: N-terminale Sequenz von Thioredoxin aus *C. sporogenes* P81108 (Harms *et al.*, 1998), TrxA\_Cs: Thioredoxin aus *C. sticklandii* (AJ276209) (Gräntzdörffer *et al.*, 2000), TrxA\_Tiscr: N-terminale Sequenz von Thioredoxin aus *T. creatinophila* (P81110) (Harms *et al.*, 1998) TrxA\_Cd: homologes Protein aus *C. difficile* (<http://www.sanger.ac.uk>) TrxA\_Td homologes Protein aus *T. denticola* TrxA\_Cth: homologes Protein aus *Ct. hydrogenoformans* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/Blastsearch/blast.cgi?>), TrxA\_Ec: Thioredoxin aus *E. coli* (P00274) (Eklund *et al.*, 1991), TrxA\_Bs: Thioredoxin aus *B. subtilis* P14949 (Chen *et al.*, 1989), B) wurden dargestellt die C-terminale und die N-terminale FAD-Bindestelle (eingerahmt), die redoxaktive Sequenz (rot) und die NADP-Bindestelle (grau unterlegt) der Thioredoxin-Reduktasen (TrxB) aus *Eubacterium acidaminophilum* (Ea) aus dem Gensatz I der Glycin-Reduktase, *C. litorale* (Cl), *C. sticklandii* (Cs), *C. difficile* (Cd), *E. coli* (Ec) (P09625), (Russel und Model, 1988), *B. subtilis* (P80880) (Antelmann *et al.*, 1997), die putativen Thioredoxin-Reduktasen *Ct. hydrogenoformans* (Cth) und *T. denticola* (Td), TrxB\_Td konnte bisher kein vollständiger Leserahmen aus der Datenbank abgeleitet werden, C) die Konsensussequenzen der autoproteolytischen Spaltstellen (Pfeil) der Proproteine GrdE (Glycin-Reduktase), GrdG (Sarkosin-Reduktase) und GrdI (Betain-Reduktase) ohne Spaltstelle: aus *E. acidaminophilum* (Ea) GrdE (Y14275), GrdG (Y17872) und GrdI (Y17145), aus *C. sticklandii* (Cs) GrdE, aus *C. difficile* (Cd) die putativen Sequenzen von GrdE und GrdG und aus *Ct. hydrogenoformans* (Ct), D) redoxaktive Sequenz (rot) der Selenocystein-Untereinheiten der Proteine B GrdB (Glycin) GrdF (Sarkosin) und GrdG (Betain) dargestellt. GrdF wurde aus *E. acidaminophilum* und putativ aus *C. difficile* dargestellt. GrdG ist lediglich aus *E. acidaminophilum* bekannt, GrdB wurden aus *E. acidaminophilum* (Ea) aus *C. sticklandii*, und die homologen Proteine aus *C. difficile*, *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola* dargestellt, E) redoxaktive Sequenz von Selenoprotein A aus *E. acidaminophilum*, *C. sticklandii*, *C. litorale* (Cl) (Garcia und Stadtman, 1992) und *C. purinolyticum* (Garcia und Stadtman, 1991) und der homologen Proteinen aus *Ct. hydrogenoformans* und *T. denticola*.

Als Aminosäure-Reste in der konservierten Sequenz um Cystein 359, die die Dissoziation von Cystein 359 beeinflussen könnten, kämen das Lysin 348, Glutamat 354 bzw. Prolin 361 in Frage. Um herauszufinden, ob es sich um katalytisch relevante Aminosäuren handelt, müßten Mutanten, in denen diese geladenen Aminosäuren gegen ungeladenen Aminosäure-Reste ausgetauscht sind, konstruiert und deren Enzymaktivität getestet werden.

Es wurde eine Homologie von GrdD zur Phosphotransacetylase postuliert (Lübbers, 1993), weil für beide Enzyme ein Acetylthioester und Acetylphosphat Substrate sind. Nach Abgleich der vollständigen Sequenz von GrdD mit den Sequenzen in der Datenbank wurden keine Homologien zur Phosphotransacetylase gefunden. Die Ursache mag darin liegen, daß die Synthese von Acetylphosphat durch Protein C der Glycin-Reduktase im Gegensatz zur Phosphotransacetylase unabhängig von CoA abläuft (s. 4.7.), und die Bildung von Acetylphosphat nach Acetylthioester-Bindung direkt am Protein C abläuft (Arkowitz und Abeles, 1991).

GrdD zeigte Homologien zum Phospholipid-Synthese-Protein PlsX. Das Gen dieses Proteins wurde bei Untersuchungen von Auxotrophie-Mutanten für *sn*-Glycerol-3-Phosphat in *E. coli* (Larson *et al.*, 1984) entdeckt, die zur Charakterisierung der *sn*-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase von *E. coli* erzeugt wurden (Bell, 1975). Dieses ist ein Membran-Protein und katalysiert den ersten Schritt in der Synthese von Membranlipiden, die Acylierung von Glycerol-3-Phosphat (Bell, 1974; Bell, 1975). Enzymatische Untersuchungen der Auxotrophie-Mutanten nach Membran-Präparation ergaben einen erhöhten  $K_M$ -Wert der *sn*-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase für Glycerol-3-Phosphat. Das Gen der *sn*-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase *plsB* wurde bei 92 min identifiziert (Lightner *et al.*, 1980). Die genetische Analyse der Mutante *E. coli* BB2636 mit der Mutation *plsB26* ergab, daß neben dieser eine weitere Mutation für den Glycerol-3-Phosphat-Auxotrophie-Phänotyp (Larson *et al.*, 1984) verantwortlich sein mußte. Die zweite Mutation wurde bei 24 min auf der Genkarte von *E. coli* identifiziert und mit *plsX50* bezeichnet. Auf welche Art und Weise *plsX50* einen Einfluß auf die Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase-Aktivität hatte, blieb unklar (Larson *et*

al., 1984). Die molekulare Masse des Genprodukts von *plsX* in *E. coli* beträgt 37 kDa und die genaue Reihenfolge der Gene ist *rpmF-plsX-fabH-fabD-fabG* (Oh und Larson, 1992). Durch Klonierung und Sequenzierung von Genclustern aus dem Bereich der Fettsäure- und Phospholipid-Synthese konnte gezeigt werden, daß *plsX* homologe Gene ubiquitär auftreten und gewöhnlich im Operon stromaufwärts des Gens der  $\beta$ -Keto-Acyl-Carrier-Protein-Synthase III *fabH*, zu der *grdC* Homologien aufweist, vorkommen. Weil die Funktion der PlsX noch ungeklärt ist, gibt es keinen Hinweis auf eine Wechselwirkung von PlsX und FabH, wie es bei der GrdC und GrdD bekannt ist.

Untersuchungen zur Transkription von *plsX* zeigten, daß *rpmF*, das Gen des ribosomalen Protein L32, und *plsX* cotranskribiert werden. Daher entstand die Hypothese, daß PlsX ein wichtiges Bindeglied in der Regulation von Ribosomen und Phospholipid-Synthese ist (Podkovyrov und Larson, 1995). Die Erzeugung einer polaren Allel-Duplikation in *E. coli* durch das Gen *plsX* aus *Salmonella typhimurium* zeigte ebenfalls, daß *rpmF* und *plsX* auf einem Transkript liegen (Zhang und Cronan, 1998).

Der Bereich der Homologie zwischen GrdD und PlsX von Position 180 bis 234 der Sequenz von *E. acidaminophilum* wurde in Abb.9 gezeigt und erstreckt sich nicht um das katalytische aktive Cystein 359 (s. 4.7.) der Sequenz von GrdD.

#### 4.5. Sequenzvergleich der Untereinheit GrdC

Protein C katalysiert zwei Reaktionen: (1) Die reduktive Umwandlung des Carboxymethylselenoethers gebunden an Protein A unter Transfer der Carboxymethyl-Gruppe auf Protein C, wobei ein Acetylthioester und oxidiertes Protein A gebildet wird. (2) Die Freisetzung von Acetylphosphat aus dem an der Untereinheit GrdD gebundenen Acetylthioester und freiem Phosphat, was in der unphysiologischen Rückreaktion als Hydrolyse von Acetylphosphat gemessen werden kann. Während die Reaktion an GrdD über die arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat charakterisiert und die katalytisch aktive Thiol-Gruppe bestimmt werden konnte (s. 4.7.), existieren wenig Daten über die Rolle von GrdC beim Transfer der Carboxymethyl-Gruppe nach GrdD.

Für die reduktive Spaltung des Carboxymethylselenoethers, gebunden an Protein A, wurden folgende Mechanismen diskutiert:

Zum einen wurde die reduktive Spaltung unter Freisetzung von  $H_2O$  und Bildung eines intermediären reaktiven Ketens (Buckel, 1990) diskutiert, das anschließend durch einen nucleophilen Angriff eines reaktiven Cysteins von Protein C als Acetylthioester gebunden wird. Ebenfalls denkbar wäre die reduktive Spaltung analog zur Reduktion von Acyloinen durch 1,3-Propanediol. Dies wäre bei einem nucleophilen Angriff des Cysteins in der Nachbarschaft des Selenocysteins (UXXC) in Protein A auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Fall. Es käme zur Freisetzung von  $H_2O$  und Ausbildung eines internen Thiolactons. Im nächsten Schritt käme es durch den nucleophilen Angriff eines Cysteins von Protein C zur Auflösung dieses Intermediats und zur Bildung des Acetylthioesters. Als dritte Variante könnte ein direkter nucleophiler Angriff des Cysteins von Protein C an den Carbonyl-Kohlenstoff zur Bildung eines kovalenten Protein A-Acetyl-Protein C-Intermediates und Freisetzung von  $H_2O$  kommen und anschließend durch den Angriff des in Nachbarschaft zum Selenocystein befindlichen Cysteins zur Spaltung des Intermediats, Bildung eines gemischten Selenid-Sulfid und Freisetzung des Acetylthioesters an Protein C (Dr. B. Söhling und Prof. J. R. Andreesen, persönliche Mitteilung). Die Bildung eines Acetylthioesters an Protein C aus dem Carboxymethyl-Rest von Protein A wurde beschrieben (Arkowitz und Abeles, 1991), jedoch blieb unklar, welche Untereinheit acetyliert wurde. Daher kann mit diesen Experimenten auch der Transfer des Carboxymethyl-Rest nach GrdC und ein Acetyl-GrdC-Intermediat charakterisiert worden sein. Dazu wäre eine leicht dissoziierbare Thiol-Gruppe eines Cystein-Rests in der Sequenz von GrdC Voraussetzung.

Lübbers, (1993) klonierte zwei Kopien vom Gen *grdC*. Sonntag (1998) wies nach, daß beide Gensätze der Glycin-Reduktase transkribiert werden. Die Identität der Genprodukte betrug 99 %. Diese beiden Sequenzen aus *E. acidaminophilum* wurden mit den Sequenzen der anderen bekannten Organismen, die die Gene der Glycin-Reduktase enthielten, verglichen (s. Abb.6). Die Sequenzen der anderen Organismen waren zu GrdC1 aus *E. acidaminophilum* zu über 60 % identisch. Zwei der sechs Cysteine von *E. acidaminophilum*, C223 und C261, waren in allen fünf Sequenzen identisch. Das Cystein 228 der Sequenz von *E. acidaminophilum* ist lediglich über fünf von sechs bekannten Sequenzen konserviert, denn in der Sequenz von *T. denticola* steht an dessen Stelle ein Alanin (s. Abb. 6). Da die Sequenzierung des Genoms von *T. denticola* noch nicht abgeschlossen ist, besteht die Möglichkeit, daß in der vorhandenen Sequenz Fehler sind. In Abb. 30 sind zwei mögliche Sequenzfehler aufgeführt. Möglicherweise befinden sich an Position 672 und 673 zwei Thymin-Nukleotide hintereinander, so daß sich im abgeleiteten Genprodukt von *grdC* ein Cystein statt eines Alanins an Position 220 befindet. Damit würde sich das Leseraster verschieben und die Sequenz wäre drei Aminosäuren weiter zu Ende. Falls sich aber an Position 675 der Nukleotidsequenz ein Thymin „zuviel“ befände, wäre der Leseraster so verschoben, daß die Konsensussequenz CSEEAAGDI/MNQR entstände, die in allen sechs Sequenzen konserviert ist. Tyrosin 170 steht anstelle eines Cysteins in der Sequenz von GrdC von *C. difficile* und wird durch TAT codiert. Bei Austausch des Adenin gegen Guanin befände sich das Codon TGT in der Nukleotidsequenz und ein Cystein statt Tyrosin würde in *C. difficile* exprimiert werden.

### A

```
632 GGATGTCGAATACATCATCGAATGTTCTGAAGAAGCTGCTGGCGATATTAACCAGAGAGG
- G C R I H H R M F * R S C W R Y * P E R
- D V E Y I I E C S E E A A G D I N Q R
- M S N T S S N V L K K L L A I L T R E
```

### B

```
632 GGATGTCGAATACATCATCGAATGTTCTGAAGAAGCTTGCGGCGATATTAACCAGAGAGG
- G C R I H H R M F * R S L R R Y * P E R
- D V E Y I I E C S E E A C G D I N Q R
- M S N T S S N V L K K L A A I L T R E
```

**Abb. 30 Darstellung des Sequenzbereichs von *grdC* aus *T. denticola* mit einem möglichen Sequenzierfehler.** A) In der ersten Zeile wurde die sequenzierte Nucleotid-Sequenz aufgeführt, in den Zeilen darunter die drei resultierenden Leseraster. Davon ist der mittlere durchgehende Leseraster die Aminosäuresequenz von GrdC von Aspartat 213 bis Arginin 231. B) In der ersten Zeile wurde die editierte Nucleotid-Sequenz aufgeführt, mit einem zusätzlichen Thymin (T). Das nächste folgende Thymin (T) wurde herausgenommen. Die resultierende Aminosäuresequenz von GrdC wurde mit fetten Buchstaben gekennzeichnet.

Die Sequenzhomologien, die GrdC zu anderen Proteinen nach Abgleich mit der Datenbank zeigte, deuteten darauf hin, daß ein Acetylthioester an Cystein 261 von GrdC aus *E. acidaminophilum* bei der reduktiven Spaltung des Carboxymethylselenoether an Protein A und Transfer des Carboxymethyl-Restes nach GrdD als Intermediat vorliegen könnte, bevor durch GrdD die Freisetzung von Acetylphosphat erfolgt, denn GrdC zeigte nach Eingabe in die Datenbank Homologien zu zwei Proteinklassen, bei denen ein Acetylthioester als Katalyse-Intermediat gebildet wird. Es bestanden Homologien zur  $\beta$ -Keto-Acyl-Carrier-Protein-Synthase III (FabH), einem ubiquitär vorkommenden Enzym des dissoziierten Fettsäure-Synthese-Systems. Die  $\beta$ -Keto-Acyl-Carrier-Protein-Synthase III katalysiert die initiale Kondensationsreaktion von Acetyl-CoA mit einem Malonyl-Rest, gebunden am Acyl-Carrier-Protein, so daß Acetoacetyl-Acyl-Carrier-Protein entsteht (Tsay *et al.*, 1992). Der Acetyl-Rest wird zuerst als Thioester am Cystein im katalytischen Zentrum gebunden, anschließend erfolgt die Kondensation des Acetyl-Rest mit dem aktivierten Malonyl-Rest, der

an die SH-Gruppe des Acyl-Carrier-Proteins (ACP) gebunden ist, zum Produkt Acetoacetyl-Carrier-Protein. Neben dieser Reaktion wurde in *E. coli* nachgewiesen, daß FabH ebenfalls den Transfer des Acetyl-Rests von Acetyl-CoA auf die freie SH-Gruppe des ACP katalysiert. Die Rate der Kondensationsreaktion ist 200-fach höher als die der Acetylierung (Tsay *et al.*, 1992).

Die höchste Homologie von GrdC zur FabH bestand im Sequenzbereich um das wahrscheinlich katalytisch aktive Cystein 261 (Abb. 8). Da GrdC möglicherweise den Transfer des Acetyl-Rest auf GrdD, die FabH dagegen den von Acetyl-CoA zum Malonyl-ACP katalysiert, liegen unterschiedliche Substrate und Produkte der Katalyse vor, wobei die Spezifität über die übrige Sequenz beider Proteine bestimmt wird. Jedoch bestehen die Homologien zwischen GrdC und den Sequenzen der FabH genau zum katalytisch essentiellen Cystein, an dem der Acetylthioester als Intermediat gebildet wird, und zum konservierten Cystein 261 von GrdC aus *E. acidaminophilum*.

Cystein 261 zeigte ebenfalls Homologien zum katalytischen Cystein der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Thiolase aus *A. calcoaceticus* (Shanley *et al.*, 1994). Thiolasen katalysieren entweder die Spaltung von -C-C-Bindungen von Fettsäuren bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren (Thiolasen I) in einer Gleichgewichtsreaktion oder bevorzugt eine Claisen-Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA (Thiolase II). Thiolasen II werden substratspezifisch unterteilt: Der einen Gruppe dienen Acyl-Reste von C4 bis C16 als Substrat, die anderen haben eine Kettenlängenspezifität von C3 bis C5, was bei der Keton-Körper-Synthese, bei der Isoprenoid- und Steroidbiosynthese und bei der Synthese von Poly-3-Hydroxyalkanonaten eine Rolle spielt (Madison und Huisman, 1999).

Die Reaktion besteht aus zwei Teilschritten und resultiert im Produkt Acetoacetyl-CoA. In der ersten Halbreaktion wird nach nucleophilem Angriff des Thiolats des N-terminalen konservierten Cystein 89 auf Acetyl-CoA ein Acetyl-Enzym-Intermediat gebildet. In der zweiten Halbreaktion wird ein weiteres Acetyl-CoA deprotoniert, so daß es aktiviert für die Kondensation mit dem anderen Molekül zu Acetoacetyl-CoA vorliegt (Masamune *et al.*, 1989). Die Rolle von Cystein 89 wurde über Markierung mit  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA und  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat und anschließender tryptischer Spaltung und Sequenzierung der markierten Peptide aufgeklärt (Thompson *et al.*, 1989). Die Gemeinsamkeit von FabH und Thiolasen im Reaktionsmechanismus ist die Bildung eines Acetylthioesters am katalytisch essentiellen Cystein, zu dem GrdC Homologien zeigt. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß an Cystein 261 von GrdC ein Acetylthioester gebildet wird.

Die FabH gehört wie ihre Isoenzyme Fettsäuresynthase I (FabG) und Fettsäuresynthase II (FabF) zu den Enzymen, die die Kondensation von -C-C-Bindungen zwischen einem Carrier-Protein gebundenen Acyl-Primer und einer Acyl-Gruppe zur Kettenverlängerung katalysieren. In den meisten dieser Enzyme liegt das katalytische Cystein in einer Konsensus-Sequenz von 45 Aminosäuren, von der jedoch die der FabH am meisten abweicht (Siggaard-Andersen *et al.*, 1991). Die Identität und Ähnlichkeit über die gesamten Sequenzen von FabF und FabH betragen lediglich 14 %, in den 160 Aminosäuren, die in der Struktur gleich sind, bereits 21 %. Die katalytisch relevanten Aminosäuren sind identisch (Siggaard-Andersen *et al.*, 1991). Diese geringe Identität der Kondensationsenzyme untereinander mag ein Grund sein, warum GrdC lediglich zu zwei Arten Homologien zeigte.

Die Analyse der Kristallstruktur von FabH aus *E. coli* konnte im Vergleich mit den Kristall-Strukturen der Keto-Acyl-Carrier-Protein-Synthase II (FabF) und der Thiolase I aus *E. coli* zeigen, daß die katalytisch essentiellen Aminosäuren mit der gleichen Funktion in den Proteinstrukturen an der selben Position mit ähnlicher Entfernung zueinander (Qiu *et al.*, 1999), jedoch an unterschiedlichen Positionen in der Aminosäuresequenz liegen. Histidin 244 ist in der FabH für die Bildung des katalytischen Nucleophils am Cystein 112 verantwortlich. In einer Entfernung von 3,4 Å von Cystein 112 wirkt es als Base, welche die Thiol-Gruppe

von Cystein 112 deprotoniert, so daß der nucleophile Angriff von Cystein 112 auf Acetyl-CoA erfolgen kann. Die Position des Acetyl-Rests zu Cystein 112 wird durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen dem Wasserstoff der Aminogruppen von Glycin 306 und Cystein 112 und dem Carbonyl-Sauerstoff festgelegt. Über ein tetraedrisches Intermediat wird ein Carboxyanion gebildet, das wiederum durch die Aminogruppen von Glycin 306 und Cystein 112 stabilisiert wird. Die Leucin-Reste 142 und 205 sowie die Phenylalanin-Reste 157 und 87 bilden in der Kristallstruktur eine hydrophobe Tasche um den Acetyl-Rest (Qiu *et al.*, 1999). Ob es bei der postulierten Bildung eines Acetyl-GrdC-Intermediats zu einer ähnlichen Stabilisierung des Acetylrests durch die Proteinstruktur kommt, geht aus den Sequenzhomologien nicht hervor. Die Bildung einer hydrophoben Tasche durch GrdC wurde postuliert, falls es bei der reduktiven Umwandlung des Carboxymethylselenoethers an Selenoprotein A in einen Acetylthioester an Protein C (Arkowitz und Abeles, 1991; Schröder und Andreesen, 1992) zur Bildung eines Keten-Intermediats käme (Buckel, 1990). Durch die Sequenzhomologien der FabH zu GrdC konnte nicht geklärt werden, welche der hydrophoben Reste in GrdC eine hydrophobe Tasche bildeten. Laut Hydrophathie-Blot der Sequenz von *E. acidaminophilum* (Lübbers, 1993) befanden sich Cystein 261 und Histidin 266 in einem hydrophoben Bereich von 238 bis 294 der Sequenz (s Abb. 7). Dieser käme für die Bildung einer hydrophoben Tasche in Frage. Histidin 266 liegt in unmittelbarer Nähe von Cystein 261 und käme als Base in Frage, die Cystein 261 aktiviert.

Die Aktivierung der katalytischen Thiol-Gruppe durch ein Histidin als Base ist auch aus der Polyhydroxybutyrat-Synthase und aus Cystein-Proteasen bekannt (Jia *et al.*, 2000; Roberts und Belsham, 1995; Schmidt *et al.*, 1998; Storer und Menard, 1994). In der Sequenz der FabF sind Cystein 165 und Histidin 303 und in der Thiolase Cystein 125 und Histidin 375 die Aminosäuren mit analoger Funktion. Trotz erheblicher Unterschiede in der Aminosäuresequenz dieser Proteine haben sie im katalytischen Zentrum dieselbe Struktur.

Die Thiol-Gruppe als katalytisches Nucleophil von Cystein 261 in GrdC befand sich in der Konsensus-Sequenz RGFCAG/AP. Diese Konsensus-Sequenz ist „ähnlich“ zu GX SXG, der Konsensus-Sequenz um das katalytische Serin in Lipasen. Lipasen katalysieren die Hydrolyse von Fettsäureestern. Neben dem Histidin als Base wirkt hier die Carboxyl-Gruppe eines Aspartat-Rests in einer katalytischen Triade zur Deprotonierung der Hydroxyl-Gruppe und Aktivierung des Nucleophils. Während der Katalyse entsteht ein tetraedrisches Acetyl-Enzym-Intermediat. Die Sekundärstruktur, in der das katalytisch aktive Serin in Lipasen und Serin-Proteasen liegt, bilden ein  $\beta$ -Faltblatt aus sechs Aminosäure-Resten, vier Aminosäure-Reste einschließlich des Serins in  $\epsilon$ -Konformation, die einen 'Turn' bilden, und eine  $\alpha$ -Helix, die parallel zu den  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen liegt. Die invarianten Glycin-Reste sind dabei für die Kompaktheit der Sekundärstruktur verantwortlich (Derewenda und Derewenda, 1991; Jaeger *et al.*, 1994).

Die für GrdC aus *E. acidaminophilum* theoretisch vorausgesagte Sekundärstruktur gab es in GrdC 46 %  $\alpha$ -Helices, 24 % coil-Struktur, 19 %  $\beta$ -Faltblatt', und 11 %  $\beta$ -turn. Danach befand sich Cystein 261 im Bereich einer coil-Struktur, umgeben von Bereichen aus  $\alpha$ -Helices. Die genaue Proteinstruktur läßt sich erst nach Kristallisation des Proteins ermitteln. Die Genauigkeit einer aus der Sequenz berechneten Sekundärstrukturvorhersage liegt im Vergleich zu einer nach Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse ermittelten Proteinstruktur bei lediglich 72 % (Lottspeich und Zorbas, 1998)

#### 4.6. Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Untereinheiten von Protein C nach heterologer Expression in *Escherichia coli*

Bisher wurde Protein C aus den Organismen *C. sticklandii* (Arkowitz und Abeles, 1989; Stadtman, 1989; Tanaka und Stadtman, 1979), *E. acidaminophilum* (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992) und aus *T. creatinophila* (Harms *et al.*, 1998) gereinigt.

Für die Untersuchungen der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde die Enzymaktivität, beruhend auf der Rekonstitution der drei Proteine A, B und C der Glycin-Reduktase unter Zugabe von DTT als Elektronendonator, Phosphat und ADP gemessen, wobei relativ große Mengen an Protein gebraucht und die entstandene Menge an Ammonium und Acetat ermittelt wurde (Tanaka und Stadtman, 1979). Daneben wurde Protein C anhand der unphysiologischen Enzymaktivität der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat gereinigt (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992; Stadtman, 1989).

Acetylphosphat, eigentlich Produkt der Katalyse von Protein C, wird aus einem Acetyl-Enzym-Intermediats gebildet (Arkowitz und Abeles, 1989). Jedoch katalysiert die 48 kDa-Untereinheit GrdD ebenfalls die Rückreaktion, die Bildung eines Acetyl-Enzym-Intermediats aus Acetylphosphat. Durch die Zugabe von Arsenat als Phosphatanalogon kommt es zur Spaltung des Acetyl-Enzym-Intermediats und zur möglichen Bildung von instabilem Acetyl-Arsenat, so daß Acetat als Hydrolyseprodukt entsteht. Der eingesetzte Überschuß an Arsenat verschiebt das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Hydrolyse zu den Produkten Acetat und Phosphat. Nach Stoppen der Reaktion im diskontinuierlichen Enzymtest wird die nicht umgesetzte Menge an Acetylphosphat (bzw. aktivierter Essigsäure) durch die Bildung eines  $\text{Fe}^{3+}$  Acetat-Hydroxamat-Komplexes unter sauren Bedingungen bei 540 nm gemessen (Lippman, 1944). Dieser Nachweis des Acetylphosphats wurde durch den Einsatz einer  $\text{FeCl}_3$ -Lösung nach Veidelek und Kalac (1982) und in Abhängigkeit vom pH-Wert optimiert, so daß die Inkubationszeit nach Zugabe des Hydroxamats auf 1 min verkürzt wurde (Wagner, 1997). Dieser Enzymtest ist unphysiologisch und damit kein Maß für die eigentlich stattfindende Synthese von Acetylphosphat.

Protein C aus *E. acidaminophilum* wurde über zwei Chromatographie-Schritte an Phenyl-Sepharose und S-Sepharose gereinigt (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992). Der pH-Wert für die Chromatographie an S-Sepharose wurde über eine Fällung von pH 8,0 auf pH 5,3 eingestellt. Ebenso erfolgte die Reinigung von Protein C aus *T. creatinophila* über zwei Chromatographieschritte (Harms *et al.*, 1998). Nach dem ersten Reinigungsschritt, Chromatographie an Phenyl-Sepharose, wurde eine zusätzliche Dialyse und eine Chromatographie an Q-Sepharose zum vollständigen Entfernen des Ammoniumsulfats eingefügt, das bei der Bindung von Protein C an die S-Sepharose stört. Die Titration des pH-Wertes in den sauren Bereich hatte eine Inaktivierung von 40 % der Enzymaktivität zur Folge (Harms, 1995; Harms *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit mußte eine Strategie entwickelt werden, um die rekombinante Untereinheit GrdD nach heterologer Expression in *E. coli* zu reinigen und die Enzymaktivität durch arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat zu charakterisieren. Dazu wurde mit zwei Expressionssystemen gearbeitet. Zum einen wurde GrdD als N-terminales 6xHis-tag-Fusionsprotein durch Affinitäts-Chromatographie an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose gereinigt. Zum anderen erfolgte die Reinigung über Affinitäts-Chromatographie an StrepTactin nach Expression als N-terminales Strep-tag-Fusionsprotein.

Bei der Reinigung von GrdD als 6xHis-tag-Protein wurde einmal mit Imidazol als Elutionsmittel und zum anderen mit Hilfe eines pH-Gradienten gearbeitet. Beide Arten der Reinigung konnten in Puffern mit Phosphat-Ionen, die keinen negativen Einfluß auf Aktivität von Protein C aus *E. acidaminophilum* (Schröder und Andreesen, 1992) hatten, nach Vorschrift von Fa. Qiagen (QIAGEN, 1997) durchgeführt werden. Wie bei den vorher beschriebenen Reinigungen von Protein C wurde unter reduzierenden Bedingungen

gearbeitet, jedoch mußte auf den Einsatz von DTT verzichtet werden, da mehr als 1 mM DTT zur Reduktion der  $\text{Ni}^{2+}$  zu  $\text{Ni}^+$  geführt und damit das Säulenmaterial inaktiviert hätten (QIAGEN, 1997). DTT besitzt mit -0,33 V im Vergleich zu  $\beta$ -Mercaptoethanol mit -0,26 V das niedrigere Redoxpotential pH 7,0 (Cleland, 1964). Anstelle von DTT wurden 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol eingesetzt, trotzdem lag GrdD nach der Reinigung inaktiv vor. Bei der Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* und *T. creatinophila* wurden 3 mM DTT für reduzierende Bedingungen und 2 mM EDTA zur Entfernung von Metallionen zum Puffer zugesetzt (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992). EDTA konnte zur Reinigung nicht eingesetzt werden, da es durch Komplexbildung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen die Bindung des 6xHis-tags an das Säulenmaterial verhindert hätte. Möglicherweise wurde eine Oxidation der katalytisch aktiven Thiol-Gruppe durch Metallionen hervorgerufen, die sich in der Lösung befanden. Durch die sechs Histidin-Reste am N-Terminus wurde die Menge an Metallionen an den Proteinmolekülen noch erhöht, so daß die Oxidation der Thiol-Gruppe noch gefördert wurde. Nach der Reinigung über einen pH-Gradienten im Bereich von pH 8,0 bis 5,3 lag GrdD ebenfalls inaktiv vor. Dies stellte einen Widerspruch zur Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* und *T. creatinophila* dar, wo in Vorbereitung der Chromatographie an S-Sepharose eine Titration des pH-Wertes von 8,0 auf 5,3 durchgeführt wurde und Protein C dann noch aktiv war (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992). Erst bei einer Senkung des pH-Wertes unter 5,2 trat eine vollständige Inaktivierung ein, bei der das Protein vollständig denaturierte und ausfiel.

Auf eine Titration der Thiol-Gruppe am inaktivierten GrdD als His-tag-Fusionsprotein wurde zugunsten der Expression von GrdD in einem anderen System verzichtet. Die Expression einer stabilen Enzymaktivität war die Voraussetzung für einen Nachweis der katalytischen Thiol-Gruppe an GrdD (s. 4.7.).

GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein konnte nach der Reinigung in Gegenwart von DTT und EDTA dialysiert werden, ohne daß eine völlige Inaktivierung wie beim 6xHis-tag-Protein eintrat. Die spezifische Enzymaktivität von GrdD zeigte in den einzelnen gereinigten Fraktionen Schwankungen. Die höchste spezifische Enzymaktivität befand sich nicht in den Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration (s. Abb. ). Die unterschiedlichen spezifischen Enzymaktivitäten könnten auf die Bildung von Protein-Oligomeren zurückzuführen sein. Die Ermittlung des nativen Molekulargewichts für das Protein C zeigte ein Assoziations- und Dissoziationsverhalten im Bereich von 200 bis 420 kDa für Protein C, was für die Ausbildung von  $\alpha_2\beta_2$  bzw. höheren Oligomeren spricht (Harms *et al.*, 1998; Schröder und Andreesen, 1992; Tanaka und Stadtman, 1979). Möglicherweise bildete die rekombinante Untereinheit ebenfalls Oligomere, so daß die katalytische Thiol-Gruppe zum Teil nicht zugänglich für eine Acetylthioesterbildung ist.

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Enzymaktivitäten könnte das Fehlen von GrdC sein. Es ist unklar, ob sich GrdD trotz des Fehlens von GrdC in der gleichen nativen Proteinstruktur faltet. Neben dem Fehlen der zweiten Untereinheit kann die Fusion mit dem *Strep*-tag auch zu Veränderungen der Sekundärstruktur der Untereinheit führen. Das Fehlen von GrdC verursachte jedenfalls keine völlige Inaktivierung von GrdD als N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein, wie es beim His-tag-Protein der Fall gewesen war. In weiterführenden Untersuchungen wurde GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein ohne Zusatz von DTT und EDTA gereinigt, ohne daß eine Inaktivierung des rekombinanten Proteins (M. Reuter, persönliche Mitteilung) eintrat.

Nach der Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* wurde GrdD als einzelne Untereinheit in einigen Fraktionen eluiert und die Enzymaktivität dieser Untereinheit durch arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat nachgewiesen (Schröder und Andreesen, 1992). Die einzelne Untereinheit wurde anschließend nicht näher charakterisiert. Eine vollständige Trennung beider Untereinheiten war nur über eine Elektroosmose unter denaturierenden Bedingungen möglich (Harms, 1995).

Die ermittelte spezifische Aktivität der rekombinanten Untereinheit GrdD lag mit 150 U/mg um etwa das dreifache höher als die Enzymaktivität des gereinigten Protein C aus *E. acidaminophilum* (Schräder und Andreesen, 1992). Die Ursache dafür liegt in der optimierten Form der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat, die bei 37 °C und durchgeführt wurde (Wagner *et al.*, 1999). Ein anderer Grund sind die 6 mM Acetylphosphat, die im Test als Substrat eingesetzt wurden, im Vergleich zu den Messungen an Protein C von *E. acidaminophilum*, wo 10,5 mM Acetylphosphat zur Messung der Enzymaktivität verwendet wurden. Acetylphosphat wirkte substratinhibierend auf die Enzymaktivität von Protein C (Harms *et al.*, 1998; Schräder und Andreesen, 1992). Mit dieser niedrigeren Konzentration an Acetylphosphat wurde gearbeitet, um Extinktionen höher als 1,0 bei der Bestimmung der Enzymaktivität zu vermeiden. GrdD wurde in Abwesenheit von GrdC gereinigt. Möglicherweise war die Faltung von rekombinantem GrdD ohne GrdC anders als in dessen Gegenwart.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte GrdC als einzelnes rekombinantes C-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein heterolog exprimiert und anschließend gereinigt werden. Der Versuch der Reinigung von GrdC als N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein scheiterte offensichtlich an der Ausbildung von 'inclusion bodies', denn nach Induktion der Expression war GrdC als Proteinbande zwar sichtbar, ließ sich aber nicht als cytosolisches Protein reinigen. Die Ursache könnte in einer Mutation an Position drei der Aminosäuresequenz liegen, wo ein Arginin statt einem Prolin exprimiert wurde, ist jedoch aufgrund der Lage direkt am N-Terminus in der Aminosäuresequenz unwahrscheinlich. Dieses Prolin ist nur in vier der fünf bekannten Sequenzen von GrdC konserviert (s. Abb. 5). Weil eine C-terminale *Strep*-tag-Fusion von GrdC exprimiert und als cytosolisches Protein gereinigt werden konnte, ist der N-terminale *Strep*-tag wahrscheinlich für die Bildung der 'inclusion bodies' verantwortlich.

GrdC besaß im Vergleich zu GrdD keine *in vitro* durch arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat nachweisbare Enzymaktivität. GrdC als C-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein hatte keinen nachweisbaren spezifischen Einfluß auf die Enzymaktivität von GrdD. Zwar erhöhte sich die Enzymaktivität von GrdD durch Zugabe von GrdC in equimolaren Mengen beträchtlich, jedoch trat nach Zugabe von denaturiertem GrdC oder Rinderserumalbumin derselbe Effekt ein (M. Reuter, persönliche Mitteilung). Nach der Reinigung von Protein C aus *E. acidaminophilum* hatte GrdD in einigen Fraktionen ohne GrdC vorgelegen. Aus diesen Messungen waren keine Unterschiede der Enzymaktivität der einzelnen oder beider Untereinheiten bekannt (Schräder und Andreesen, 1992). Ob GrdC einen Einfluß auf die Bildung des Acetylthioesters an GrdD hat, läßt sich demzufolge nicht über die arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat nachweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die reguläre Faltung von GrdC nach der Expression und Reinigung nicht untersucht. Offensichtlich werden beide Untereinheiten durch Wechselwirkungen verbunden, wie das starke Assoziationsbestreben und die Coelution beider Untereinheiten zeigen (Harms, 1995; Harms *et al.*, 1998; Schräder und Andreesen, 1992). Ein Zusammenhalt über Disulfid-Brücken konnte nach Auftrennung der beiden Untereinheiten im SDS-Page unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen ausgeschlossen werden, da sich unter beiden Bedingungen kein verändertes Laufverhalten des Proteins zeigte. Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials im Cytoplasma ist die Bildung von Disulfid-Brücken zwischen den Untereinheiten unwahrscheinlich.

#### 4.7. Die Rolle von Zink im Katalysemechanismus von Protein C

Die im Kapitel 3.4.4. aufgeführten Sequenzhomologien der 54 kDa-Untereinheit GrdC deuteten an, daß bei der Umwandlung des Carboxymethylselenoethers, gebunden an Selenoprotein A, zuerst ein Acetyl-Enzym-Intermediat an Cystein 261 von GrdC gebildet wird, welches zur Freisetzung als Acetylphosphat anschließend auf die katalytische Thiol-Gruppe an GrdD (s. 3.12.) transacetyliert wird. In den beiden Proteinklassen,  $\beta$ -Keto-Acyl-Carrier-Protein-Synthase III und Thiolase, zu denen GrdC Sequenzhomologien besitzt, wird die Nucleophilie des katalytischen Thiolat-Rests durch ein benachbartes Histidin als Base gesteigert (s. 4.4.).

In Enzymen, die den Transfer von Methyl-Gruppen aus Methanol und die Acylierung von Proteinen durch aktiviertes Farnesyl- und Geranyl-Geranyl-diphosphat katalysieren, wurde  $Zn^{2+}$  als Cofaktor nachgewiesen, das als Lewis-Säure wirkend die Akzeptor-Thiol-Gruppe aktiviert (Matthews und Goulding, 1997).

Möglicherweise katalysiert GrdC ebenfalls unter Beteiligung von  $Zn^{2+}$  den Transfer des Carboxymethyl-Rests von Protein A zu GrdD. Um festzustellen, ob GrdC ebenfalls  $Zn^{2+}$  enthielt, wurden erste Studien mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie vorgenommen. Es wurde nachgewiesen, daß die rekombinante Untereinheit GrdC 0,2 g Atom Zn pro mol GrdC enthielt. Diese Messungen wurden am rekombinanten GrdC durchgeführt, das in Abwesenheit von EDTA gereinigt wurde. Die Messungen zeigten, daß Zn in der Proteinlösung im Vergleich zur eingesetzten Pufferlösung vorhanden war, muß jedoch durch weitere Messungen mit mehr Protein bzw. durch den Zn-Nachweis mittels einer anderen Methode nochmals überprüft werden. Messungen des Zn-Gehalts der rekombinanten 48 kDa-Untereinheit GrdD und des nativen Protein C aus *E. acidaminophilum* wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

Die Messungen des Zn-Gehalts von nativen Protein C aus *E. acidaminophilum* wurden in einer weiterführenden Arbeit von M. Reuter durchgeführt. Hier konnte als vorläufiges Ergebnis gezeigt werden, daß zwei bis drei Zn pro Protein-Monomer im nativen Protein C enthalten waren (M. Reuter, persönliche Mitteilung). Demnach könnte in GrdD ebenfalls  $Zn^{2+}$  enthalten sein. Untersuchungen des Zn-Gehalts von rekombinanten GrdD wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ob in GrdD  $Zn^{2+}$  bei der Aktivierung der katalytischen Thiol-Gruppe, an der Acetylphosphat gebildet wird, als Lewis-Säure wirkt, ist unklar. Die Reinigung von GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein erfolgte in Gegenwart von 2 mM EDTA, so daß  $Zn^{2+}$  während der Reinigung aus dem Protein herausgelöst wurde. Trotzdem zeigte das Protein Enzymaktivität gemessen, durch arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat bei pH 7,5 (s. 3.10.2.) Diese Enzymaktivität im unphysiologischen Test zeigt, daß die katalytische Thiol-Gruppe in GrdD aktiviert vorliegen sollte und die Bildung eines Acetylthioesters und Freisetzung Acetylphosphat  $Zn^{2+}$  unabhängig verlaufen sollte.

Die Farnesyl-Protein-Transferase (Ftase) und die Geranyl-Geranyl-Protein-Transferase (GGTase) katalysieren den Transfer eines 15-C-Isoprenoids von Farnesyldiphosphat bzw. den Transfer von Geranylgeranyldiphosphat auf ein konserviertes Cystein eines Proteinakzeptors. An dem Proteinakzeptor erfolgte die Bindung in Form eines Thioethers an einem Cystein in der Konsensus-Sequenz CaaX (wobei a eine aliphatische Aminosäure ist und X Methionin, Serin, Glutamin oder Alanin sein können, bei der GGTase ist X bevorzugt Leucin). Die Ftase ist ein aus einer 48 kDa- und einer 45 kDa-Untereinheit bestehender  $\alpha\beta$ -Heterodimer. Ein  $Zn^{2+}$  pro Protein-Dimer wurde im gereinigten rekombinanten Protein nachgewiesen (Chen *et al.*, 1993).  $Zn^{2+}$  wird über Cystein, Histidin und Aspartat ligandiert. In Untersuchungen an der Farnesyl-Protein-Transferase wurde durch Dialyse gegen EDTA das gebundene  $Zn^{2+}$  aus dem Protein vollständig entfernt, und das bewirkte die Inaktivierung des Enzyms. Die Enzymaktivität konnte nach Dialyse gegen Zink jedoch vollständig reaktiviert werden. Durch Kristallisation der Ftase mit dem Substrat konnte gezeigt werden, daß die Thiol-Gruppe des CaaX-Proteinakzeptor direkt mit dem  $Zn^{2+}$  der Ftase koordiniert ist und mit dem Isoprenoid-

Rest des Farnesyldiphosphats einen ternären Komplex bildet. Der Isoprenoid-Rest steht mit Tyrosin-Resten und Tryptophan-Resten in hydrophober Interaktion (Huang *et al.*, 2000; Long *et al.*, 1998; Long *et al.*, 2000).

Die Isoenzyme der Methylcobamid-CoenzymM-Methyltransferasen MT1 und MT2 aus *Methanosarcina barkeri* katalysieren die Synthese von Methyl-Coenzym M aus Methanol und Coenzym M als Substitution, in der ein Proton durch eine Methyl-Gruppe unter Bildung eines Methylthioethers ersetzt wird. MT1 besteht aus zwei Untereinheiten, zum einen MtaB (50 kDa) und zum anderen MtaC (27 kDa), die einen Corrinoid-Cofaktor enthält. Die MT2 (MtaA) ist ein monomeres Enzym von 36 kDa ohne chromophoren Cofaktor (Grahame, 1989; Harms und Thauer, 1996). Die 50 kDa-Untereinheit MtaB der MT1 katalysiert den Zn abhängigen Transfer der Methyl-Gruppe von Methanol auf den Corrinoid-Cofaktor der MtaC. Sauer und Thauer (1997b) wiesen in ihren Untersuchungen an den Untereinheiten MtaB und MtaC der MT1 nach, daß MtaB 1 mol Zn/mol Protein enthält und als Lewis-Säure wirkt, welche das Substrat Methanol für einen nucleophilen Angriff aktiviert (Sauer *et al.*, 1997). Neben der Methylierung des Corrinoid-Faktor in MtaC katalysiert MtaB auch die Methylierung von freiem Co(I)bal-amin zu Methyl-Co(III)balamin (Sauer *et al.*, 1997).

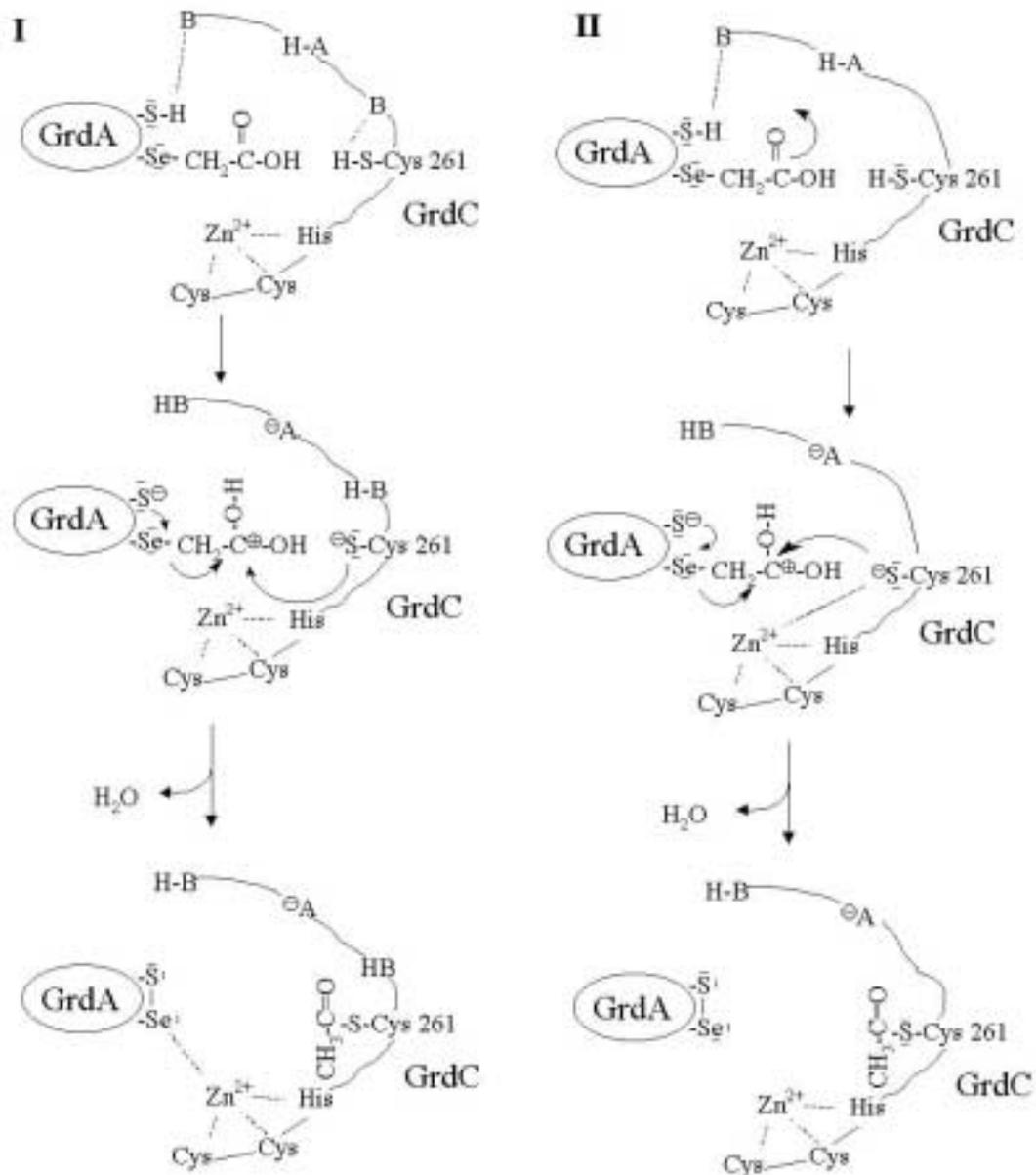
Das andere Isoenzym MT2 (MtaA) katalysiert den  $Zn^{2+}$ -abhängigen Transfer der Corrinoid-gebundenen Methyl-Gruppe von MtaC auf Coenzym M. Neben MtaC kann es auch freies Methylco(III)-amin als Methylendonator nutzen (Grahame, 1989). Von der MT2 gab es zwei Isozyme MT2-A und MT2-M, in denen 0,4 g  $Zn^{2+}$ /mol Protein und 0,9 g Zn/mol Protein einmal durch Plasma-Emissions-Spektroskopie und durch den Indikator 4-(2-Pyridyl-azo)-Resorcinol über Extinction bei 500 nm nachgewiesen wurde, (LeClerc und Grahame, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die Protonenabgabe bei Zugabe von Coenzym M zum Holoenzym, das 1 mol  $Zn^{2+}$  pro mol Protein enthält, im Vergleich zu Protein mit nur 0,2 mol  $Zn^{2+}$  deutlich gesteigert ist. Es kommt zur Bildung eines  $[CoM-S-Zn-MtaA]$ -Komplexes unter Freisetzung des Proton von Coenzym M. Daher soll  $Zn^{2+}$  als Lewis-Säure wirkend den  $pK_A$ -Wert von Coenzym M von  $>9$  auf  $<7$  verringern, wodurch die Nucleophilie der Thiol-Gruppe für eine Bindung des Methyl-Rests an Coenzym M (Sauer und Thauer, 2000) erhöht ist. Demnach besteht die katalytische Rolle des  $Zn^{2+}$  in MtaA in der Aktivierung der Thiol-Gruppe des Substrats Coenzym M, wie es u.a. auch in der Reaktion der Farnesyl-Protein-Transferase (s. oben) der Fall ist, wo die Thiol-Gruppe des Proteinsubstrats aktiviert wird oder im Falle des Ada-Protein in *E. coli* postuliert wurde (Myers *et al.*, 1993; Myers *et al.*, 1993).

Der Nachweis von substöchiometrischen Mengen an Zn in GrdC war ein erster Hinweis auf einen möglichen  $Zn^{2+}$ -abhängigen Transfer der Carboxymethyl-Gruppe von Selenoprotein A auf GrdC. Jedoch ist unklar, an welcher Stelle Zn in den Mechanismus eingreift. Es besteht die Möglichkeit, daß  $Zn^{2+}$  als Lewis-Säure in die reduktive Spaltung des Carboxymethylselenoethers eingreift und durch einen Angriff auf die freien Elektronen des Selens die Carboxymethylselenoether-Bindung labilisiert (Abb. 31). Aufgrund dessen käme es zur Freisetzung des Carboxymethyl-Rests, der anschließend als Acetylthioester an GrdC gebunden wird, sowie zur Disulfid-Bildung und Oxidation von Selenoprotein A. Das hieße, daß das  $Zn^{2+}$  sowohl von Selenol in Protein A als auch von einer Thiol-Gruppe von GrdC ligandiert würde und es käme nicht zur postulierten reduktiven Spaltung unter Bildung eines Thiolactons (4.5.).

Die Reaktivität von aromatischen Selenverbindungen aller Redoxstufen von  $-2$  bis  $+6$  mit  $Zn^{2+}$ , das von Thiolen koordiniert wird, wurde an Metallothioneinen untersucht (Jacob *et al.*, 1999). Metallothioneine sind 7 kDa-Proteine, in denen sieben Zink-Atome von den Thiol-Gruppen von 20 Cysteinen koordiniert werden. Es zeigte sich, daß Selenoether-Verbindungen, in denen Selen die Redoxstufe  $-2$  besitzt, nicht in der Lage sind, die  $Zn^{2+}$  koordinierende Thiol-Gruppen zu oxidieren und Zn aus den Verbindungen freizusetzen im Vergleich zu Selenverbindungen anderer Redoxstufen. Demnach könnte Selen des Carboxymethylselenoether an Protein A möglicherweise mit  $Zn^{2+}$ , das von GrdC koordiniert

wird, unter Freisetzung des Acetyl-Rests reagieren, ohne daß die Thiol-Gruppen, die Zn möglicherweise ligandieren, oxidiert werden. Es wurde aber auch festgestellt, daß unkoordinierte Thiol-Gruppen reaktiver gegenüber Selenverbindungen sind, als  $Zn^{2+}$ -koordinierte Thiol-Gruppen (Jacob *et al.*, 1998).

$Zn^{2+}$  kann auch bei der Dissoziation von  $H_2O$  vom Carbonyl-Kohlenstoff als Lewis-Säure eingreifen, analog zur Funktion des  $Zn^{2+}$  bei der Katalyse von MtaB, wo es die Methyl-Gruppe unter Freisetzung von  $H_2O$  aktiviert. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß  $Zn^{2+}$  als Lewis-Säure wirkend die Dissoziation der Thiol-Gruppe von Cystein 261 in GrdC zum Thiolat bewirkt, daß dieses aktiviert vorliegt für die Acetylthioester-Bildung.



**Abb. 31 Schematische Darstellung zweier hypothetischer Mechanismen der reduktiven Spaltung des Carboxymethylselenoethers an Selenoprotein A durch GrdC.**  $Zn^{2+}$  wird in GrdC möglicherweise von zwei Cystein-Resten und einem Histidin ligandiert. Ein noch unbekannter basischer Aminosäure-Rest (B) bewirkt die Dissoziation des Protons von der Thiol-Gruppe in der redoxaktiven Sequenz in Selenoprotein A, ein ebenfalls noch unbekannter saurer Aminosäure-Rest bewirkt die Protonierung des Carbonyl-Sauerstoff des Carboxymethyl-Rests, so daß es zur Wasserabspaltung kommt. (I) Die Carboxymethylselenoether-Bindung an

Protein A wird labilisiert durch  $Zn^{2+}$ , das als Lewis-Säure wirkt. Nach Spaltung des Carboxymethylselenoether kommt es möglicherweise zur zusätzlichen Ligandierung des  $Zn^{2+}$  durch Selenocystein. Der positiverte Carbonyl-Kohlenstoff wird nucleophil von der aktivierten Thiol-Gruppe von Cystein 261 angegriffen und es kommt zur Acetylthioesterbildung. (II)  $Zn^{2+}$  als Lewis-Säure wirkend aktiviert die Akzeptor-Thiol-Gruppe von Cystein 261. Dabei kommt es möglicherweise zur zusätzlichen Ligandierung des  $Zn^{2+}$  durch Cystein 261.

$Zn^{2+}$  kann in Proteinen auch für die Ausbildung der Proteinstrukturen mitverantwortlich sein und bewirkt die Assoziation von HIV-Integrase-Monomeren zu Oktameren (Lee *et al.*, 1997). Eine Proteinreinigung muß in Gegenwart von EDTA nicht zum vollständigen Verlust des  $Zn^{2+}$  im Protein führen, sondern ist abhängig von Art der Bindung von  $Zn^{2+}$  im Protein und der eingesetzten Menge an EDTA. Nach Reinigung in Gegenwart von 0,1 mM EDTA und anschließender Dialyse mit 1 mM EDTA war 0,12 g Atom  $Zn^{2+}$  pro Monomer enthalten (Lee *et al.*, 1997). Erfolgte die Reinigung der Integrase in Abwesenheit von EDTA in Gegenwart von 10  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  und wurde das Enzym anschließend in  $Zn^{2+}$ -freies Medium überführt, konnten im Apoenzym 0,62 g Atom Zn pro Integrase-Monomer nachgewiesen werden. Der Nachweis des  $Zn^{2+}$  erfolgte hier über Atom-Absorptions-Spektroskopie,  $Zn^{2+}$  wurde daneben durch Komplexbildung mit dem Indikator 4-(2-Pyridyl-azo)-Resorcinol durch Extinktion bei 500 nm nachgewiesen. Dabei wurde der Anteil an  $Zn^{2+}$ , der nach Inkubation des Proteins mit p-Hydroxy-Mercuribenzoat, einer thiol-spezifischen Agenz, aus dem Protein herausgelöst wurde, gemessen. Es wurde derselbe Gehalt an  $Zn^{2+}$  wie bei der Atomabsorptionsspektroskopie festgestellt. In der Integrase war  $Zn^{2+}$  über „HHCC“, einen Zn-Finger gebunden. Dies wurde über gerichtete Mutagenese der Cysteine und Histidine und über Nachweis des Zn-Gehalts der Mutanten durch  $Zn^{2+}$ -Blotting nachgewiesen (Bushman *et al.*, 1993). Proteine, die  $Zn^{2+}$  in ihrer Struktur integriert haben, werden nach den Liganden des  $Zn^{2+}$  in sechs Klassen eingeteilt (Karlin und Zhu, 1997).

Dehydrogenasen, in denen  $Zn^{2+}$  enthalten ist, und die Integrase gehören zur Klasse III. Hier sind Proteine eingeordnet, in denen das  $Zn^{2+}$  über wenigstens zwei Cysteine im Protein gebunden ist.  $Zn^{2+}$  kann dabei sowohl für die katalytische Aktivität als auch für die Ausbildung der Proteinstruktur zuständig sein. In der Threonin-Dehydrogenase wurde ein  $Zn^{2+}$  pro Proteinmolekül nachgewiesen, das über vier Cysteine ligandiert wird, jedoch ist dieses  $Zn^{2+}$  nicht katalytisch essentiell. Nach den Sequenzhomologien zur Alkohol-Dehydrogenase der Pferdeleber und der katalytischen Aktivität für die  $Zn^{2+}$  essentiell ist, müßte ein zweites  $Zn^{2+}$  pro Proteinmolekül über ein Cystein, Histidin und Cystein ligandiert sein. Nach den bisherigen Proteinreinigungen konnte dieses zweite  $Zn^{2+}$  in der Threonin-Dehydrogenase noch nicht nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 1998). In GrdC von *E. acidaminophilum* könnte Zn über die Cysteine 223 und 228 gebunden sein und die als katalytisch aktive postulierte Thiol-Gruppe von Cystein 261 aktivieren. Dafür spricht, daß beide Cysteine nur sechs Aminosäuren in der Aminosäuresequenz voneinander entfernt sind. Dagegen spricht, daß Cystein 228 nicht über alle fünf Sequenzen konserviert ist. In GrdC aus *T. denticola* steht an dessen Stelle ein Alanin. Aber möglicherweise liegt hier ein Sequenzierfehler vor (s. 4.3.). Aspartat 230 könnte ebenso ein Ligand für  $Zn^{2+}$  sein.

In Proteinen mit zwei Cystein-Liganden, die  $Zn^{2+}$  ligandieren, werden zwei unterschiedliche Strukturen unterschieden. Zum einen sind die beiden Cysteine und die weiteren Liganden Teil eines Turns. Dies ist bei der Carbamyltransferase, beim Tumorsupressor p53 der Fall (Karlin und Zhu, 1997). Zum anderen fungiert der erste Cystein-Ligand als Kappe einer kurzen Helix, in der sich ebenfalls der zweite Cystein-Ligand befindet. Zu diesen gehören die Cytidin-Desaminase, die humane  $\beta$ -3-Alkohol-Dehydrogenase und das Core-Protein GP32 des Bacteriophagen T4. Als weitere Liganden für Zn kämen in GrdC neben den Cysteinen die sieben konservierten Histidin-Reste in Frage oder saure Aminosäuren wie Asparat und Glutamat, von denen 17 bzw. 18 konserviert sind.

In Klasse I und II sind Proteine eingeteilt, in denen  $Zn^{2+}$  über Histidine ligandiert wird (Karlin und Zhu, 1997). In die Klasse I sind Proteine wie die neurophile Kollagenase, wo  $Zn^{2+}$  über Histidine in der Konsensus-Sequenz  $HX_3HX_5H$  komplexiert wird, eingeteilt. In Proteinen der

Klasse II wirken ebenfalls drei Histidine als Liganden des  $Zn^{2+}$ , von denen zwei in der Konsensus-Sequenz HXH nahe beieinander liegen und das dritte mehr als zwei Aminosäuren entfernt liegt. Ein Vertreter dieser Klasse ist die Metallo- $\beta$ -Lactamase. Keines von beiden Motiven konnte in GrdC gefunden werden.

In Klasse IV ist Zn über zwei Histidine, einen sauren Aminosäurerest und ein integriertes  $H_2O$ -Molekül gebunden. Dazu gehört die Carboxypeptidase A. Zur Klasse V gehört die Fructose-1,6-bisphosphatase, in der Zn lediglich durch einen sauren Aminosäurerest und ein Molekül Fructose-2,6-bisphosphat ligandiert vorliegt. In Klasse VI sind andere Liganden-Kombinationen, die Aminosäuren wie Leucin, Methionin und Threonin beinhalten, zusammengefaßt, wie das bei der Leucin-Amino-peptidase der Fall ist.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von GrdC mit anderen Proteinen, die Zn enthalten, konnte die Art der Ligandierung von Zn in GrdC nicht geklärt werden. Um herauszufinden durch welche Aminosäure-Reste in GrdC Zn ligandiert wird, ist es Voraussetzung, daß Zn in stöchiometrischen Mengen in der gereinigten rekombinanten Untereinheit bzw. im nativen Protein nachgewiesen wird. Dann ist der Vergleich des Zn-Gehalts von GrdC mit GrdC-Mutanten möglich, in denen die für die Ligandierung in Frage kommenden Aminosäure-Reste verändert wurden.

#### 4.8. Nachweis der katalytisch aktiven Thiol-Gruppe an GrdD

Arkowitz und Abeles (1991) konnten an Protein C die Bildung eines  $^{14}C$ -Acetyl-Protein-Intermediats nachweisen, zum einen nach Inkubation mit  $^{14}C$ -Acetylphosphat, zum anderen nach Inkubation mit  $^{14}C$ -carboxymethyliertem Protein A, wobei  $^{14}C$ -Acetylphosphat gebildet wurde. Das  $^{14}C$ -Acetyl-Enzym-Intermediat wurde gereinigt und charakterisiert. Die Instabilitäten des Intermediats nach Inkubation mit HCl bzw. mit  $Na_2CO_3$  bei pH 11,5 wiesen wie die Abspaltung des Acetats nach Inkubation mit Kaliumborhydrid auf die Bindung der Acetyl-Gruppe in Form eines Acetylthioesters hin (Arkowitz und Abeles, 1991). Bei diesen Untersuchungen wurde aber nicht gezeigt, an welcher Untereinheit von Protein C dieser Acetylthioester vorliegt. Die unphysiologische Enzymaktivität der 48 kDa-Untereinheit von Protein C aus *E. acidaminophilum* deutet an, daß an dieser Untereinheit eine Acetylthioesterbildung nach Inkubation mit Acetylphosphat erfolgt, während in physiologischer Reaktion Acetylphosphat aus einem Acetylthioester freigesetzt wird (Harms, 1995; Schröder und Andreesen, 1992)].

Die katalytische Aktivität der 48 kDa-Untereinheit konnte an der heterolog exprimierten Untereinheit GrdD im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. GrdD enthielt zwei Cysteine an den Positionen 98 und 359 der Aminosäuresequenz. Beide Cysteine waren in vier der fünf bekannten Sequenzen der kleinen Untereinheit von Protein C konserviert, lediglich in *Ct. hydrogeniformans* steht anstelle von Cystein 98 ein Alanin. Dabei sollte es sich um keinen Sequenzfehler handeln (s. 4.4.).

Der Austausch der katalytisch essentiellen Thiol-Gruppe gegen eine Hydroxyl-Gruppe sollte die Ausbildung eines Acetyl-Enzyms erschweren, weil eine Hydroxyl-Gruppe schwerer dissoziieren sollte als eine Thiol-Gruppe, und damit das Nucleophil für den Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff fehlt. Falls es zur Ausbildung eines Acetyl-Enzyms kommt, sollte das jedoch nicht mehr in der Lage sein, mit Arsenat zu reagieren, so daß die Mutante enzymatisch inaktiv ist. Nach Austausch des Cystein gegen Alanin könnte theoretisch überhaupt keine Esterbildung im katalytischen Zentrum mehr stattfinden und diese Mutante wäre inaktiv.

Die Mutanten GrdD C98→S und GrdD C359→A wurden unter den gleichen Bedingungen wie GrdD als *Strep*-tag-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. GrdD C359→A war enzymatisch inaktiv, da die katalytisch essentielle nucleophile Thiolat-Gruppe in der Aminosäuresequenz fehlte, somit konnte als Voraussetzung für die katalytische Aktivität kein

Acetylthioester gebildet werden. Cystein 359 erwies sich damit als essentiell für die Katalyse von Protein C. Der Austausch von Cystein 98 gegen Serin bewirkte keine Inaktivierung von GrdD, demzufolge sollte diese Thiol-Gruppe nicht katalytisch essentiell sein. Cystein 89 der Mutante GrdD C359→A war ebenso wie GrdD erst nach Denaturierung zugänglich für Markierung durch 4-Vinylpyridin. Die Mutagenese von Cystein 98 zu Alanin sollte deshalb ebenfalls keine Inaktivierung des Proteins bewirken. Diese Mutation konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr konstruiert werden. Die vorhandene katalytische Aktivität der Mutante GrdDC98S bestätigte das Ergebnis des Alignments von GrdD, wonach Cystein 98 nicht in allen vier bekannten Sequenzen konserviert war.

Parallel zur Bestimmung der Enzymaktivität der Mutanten wurde versucht, die katalytisch aktive Thiol-Gruppe von GrdD spezifisch zu markieren. Stadtman & Davis, (1991) untersuchten das Verhalten von Protein C von *C. sticklandii* durch arsenatabhängige Hydrolyse von Acetylphosphat. Dabei konnten sie zeigen, daß Protein C nach Inkubation mit den thioispezifischen Agenzien Jodacetat und Jodacetamid irreversibel inaktiviert wurde, dies aber durch Präinkubation mit Acetylphosphat verhindert werden konnte. Diese Inaktivierung von Protein C durch thioispezifische Agenzien war ein weiterer Hinweis auf eine katalytisch essentielle Thiol-Gruppe, deren Modifikation mit dem Verlust der katalytischen Aktivität des Proteins verbunden war und an der sich sonst das Acetyl-Enzym-Intermediat ausbildete, das durch Arkowitz und Abeles (1991) charakterisiert worden war. Die weiterhin vorhandene Enzymaktivität nach Präinkubation mit dem Substrat Acetylphosphat trotz Jodacetat-Behandlung deutete an, daß durch die Bindung des Acetyl-Rests an das Cystein im aktiven Zentrum ein Schutz vor der Inaktivierung des Proteins stattfand.

(Harms *et al.*, 1998) versuchte an Protein C aus *E. acidaminophilum*, die katalytische Thiol-Gruppe mit Monobrombiman, einer anderen thioispezifischen Agenz, spezifisch zu inaktivieren und zu markieren. Der Vorteil wäre gewesen, daß die Markierung spektroskopisch nachzuweisen gewesen wäre. Jedoch fand im Gegensatz zu den Untersuchungen von (Stadtman und Davis, 1991) bei Einsatz dieser Substanz kein Substratschutz durch Acetylphosphat statt. Das heißt, die Inkubation mit Acetylphosphat konnte die Inaktivierung durch die Markierung mit Monobrombiman nicht verhindern.

Um den Substratschutz an GrdD zu testen, wurde mit Jodacetat als thioispezifisches Agenz gearbeitet, weil hier Substratschutz durch Acetylphosphat bereits gezeigt wurde (Stadtman und Davis, 1991). Jodacetat bzw. Jodacetamid reagieren mit Thiol-Gruppen in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion unter Bildung von Carboxymethylcystein bzw. Carboxyamidocystein. Der Nachteil von Jodacetat war die mögliche unspezifische Reaktion mit reaktiven NH-Gruppen bei basischem pH-Wert. Bei den Untersuchungen zum Substratschutz durch Acetylphosphat wurde Protein C aus *C. sticklandii* mit NaBH<sub>4</sub> (Stadtman und Davis, 1991) zur Inaktivierung von Kontaminationen von Protein B reduziert.

Nach Inkubation mit Jodacetat allein war keine Enzymaktivität mehr nachzuweisen. Die Ergebnisse stimmten mit denen an *C. sticklandii* überein (Stadtman und Davis, 1991) und deuteten auf eine Inaktivierung durch Carboxymethylierung der katalytischen Thiol-Gruppe hin. Die Enzymaktivität von GrdD blieb nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat erhalten und deutete an, daß die katalytisch relevante Thiol-Gruppe unmodifiziert vorliegen mußte. Der Anstieg der spezifischen Aktivität wies auf eine Reaktivierung des Proteins mit zunehmender eingesetzter Proteinmenge hin. Die spezifischen Enzymaktivitäten lagen mit 300 bis 350 U/mg in dem Bereich der Aktivitäten mit gereinigtem GrdD, dessen Aktivität erst nach Dialyse in einen Bereich um 150 U/mg sank (s. 3.10.2.). Die höhere Enzymaktivität nach Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> deutete auf eine Reduktion von Disulfid-Brücken hin, doch ergab sich für deren Ausbildung im Rahmen dieser Arbeit kein Hinweis.

Der Substratschutz von Acetylphosphat gegenüber Jodacetat wurde ausgenutzt, um die katalytisch aktive Thiol-Gruppe der rekombinanten Untereinheit GrdD zuerst durch Acetylthioesterbildung vor einer Carboxymethylierung zu schützen und dann als

unmodifiziert vorliegende Thiol-Gruppe mit einem thiol-spezifischen Agens zu markieren, welches spektroskopisch nachweisbar ist und eine unterschiedliche Molekülmasse im Vergleich zu einer Carboxymethylierung haben sollte. Dies wurde durch die nachfolgende Markierung mit 4-Vinylpyridin erreicht, und das unterschiedliche Molekulargewicht der unmodifizierten cystein-haltigen Peptide, deren Pyridylethylierung bzw. Carboxymethylierung nach proteolytischer Spaltung bei Auswertung der Referenzen bestätigt.

Die Proteinproben nach Substratschutz mit Acetylphosphat und Inaktivierung durch Jodacetat wurden ebenfalls denaturiert und mit 4-Vinylpyridin markiert, um die Markierung der Cysteine anhand der vorhandenen Referenzen zu analysieren. Die Art der Markierungen der cystein-haltigen Peptide zeigte, daß Cystein 359 das katalytisch relevante Cystein sein mußte, denn es lag nach der Inaktivierung durch Jodacetat und anschließender Markierung mit 4-Vinylpyridin carboxymethyliert vor. Dagegen war es nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat sowie anschließendem Umpuffern enzymatisch aktiv. Die so noch unmodifizierte Thiol-Gruppe ließ sich danach pyridylethylieren.

Die Carboxymethylierung hatte, wie Stadtman und Davis (1991) postulierten, die Inaktivierung des Proteins bewirkt, aber die Inkubation mit Acetylphosphat vor der Inkubation mit Jodacetat hatte durch Acetylierung des Cysteins eine Carboxymethylierung verhindert. Eine Carboxymethylierung der Thiol-Gruppe ist jedoch irreversibel und auch durch 4-Vinylpyridin nicht mehr zu verdrängen.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem der Mutagenese überein, aus der ebenfalls hervorging, daß bei Austausch von Cystein 359 gegen Alanin ein katalytisch inaktives Protein vorlag. Cystein 98 lag sowohl nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat als auch nach Inkubation mit Jodacetat und anschließender Inkubation mit 4-Vinylpyridin ausschließlich pyridylethyliert vor und wurde erst nach Denaturierung von GrdD und Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat carboxymethyliert. Offensichtlich ist es in nativer Proteinstruktur nicht zugänglich für eine chemische Modifikation. Cystein 98 lag in GrdD C359→A ebenfalls nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat unmodifiziert vor, so daß es sich erst anschließend nach Denaturierung mit 4-Vinylpyridin markieren ließ. Auch in dieser Mutante war Cystein 98 demzufolge für eine Modifikation nicht zugänglich. Das spricht dafür, daß die Mutante und das native Protein dieselbe Proteinstruktur aufweisen.

Mit der Carboxymethylierung von Cystein 98 in denaturiertem GrdD konnte gezeigt werden, daß der Substratschutz von Acetylphosphat gegenüber Jodacetat nicht auf einer chemischen Reaktion beider Komponenten beruhte, sondern eine spezifische Proteinstruktur für den Substratschutz verantwortlich war. Die Sekundärstruktur von GrdD nach Inkubation mit Acetylphosphat und Jodacetat bzw. GrdD nach Inkubation mit Jodacetat wurde mittels Fern-UV-CD-Spektren untersucht. Hier war kein signifikanter Unterschied in den Sekundärstrukturen beider Proben zu erkennen. Daraus folgte, daß nach der Bindung von Acetylphosphat an das Protein keine Veränderung der Sekundärstruktur, die eine Carboxymethylierung des Proteins verhindert hatte, eingetreten war.

Daß Cystein 98 nicht zugänglich für eine chemische Modifizierung war, konnte durch eine Titration der Cysteine durch DTNB bestätigt werden (M. Reuter, persönliche Mitteilung). Dabei wurde das GrdD im Gegensatz zum Nachweis der katalytischen Thiol-Gruppe unter nicht reduzierenden Bedingungen gereinigt. Dies zeigte, daß Cystein 98 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gereinigt für eine Markierung nicht zugänglich war.

Die Strategie des Nachweises einer katalytischen Thiol-Gruppe durch Analyse der Markierung nach Substratschutz und Inaktivierung durch ein thiol-spezifisches Agens erfolgte ebenfalls an der humanen Typ I Inositol(1,4,5)P<sub>3</sub>5-phosphatase (Communi und Erneux, 1996). Hier konnte gezeigt werden, daß das Cystein 348 im katalytischen Zentrum lag. Bestätigt wurde dieser Nachweis ebenfalls über den Vergleich der Enzymaktivität von Mutanten, in denen sich Serin und Alanin anstelle von Cystein in der Sequenz befanden im Vergleich zum nativen Protein. Die Mutanten zeigten eine Inaktivierung im Vergleich zum

nativen Protein. Durch Fern-UV-CD-Spektren wurde nachgewiesen, daß die Mutagenese bzw. Markierung der Thiol-Gruppe keine Veränderung der Sekundärstruktur bewirkte.

Bei der Phosphotransacetylase, einem Enzym, das in der Lage ist, aus Acetylphosphat und CoA Acetyl-CoA zu bilden bzw. die Bildung Acetylphosphat aus Acetyl-CoA und freiem Phosphat zu katalysieren, liegt ein anderer Mechanismus und eine andere Art von katalytisch essentiellen Cystein vor. In Untersuchungen der Phosphotransacetylase von *C. klyveri*, wurde nach Inaktivierung des Proteins durch ein thiol-spezifisches Agens ebenfalls die Existenz eines katalytisch essentiellen Cysteins nachgewiesen. Es konnte jedoch keine Bildung eines Acetyl-Protein-Intermediats während der Katalyse nachgewiesen werden (Arbeles, 1976). Statt dessen wurde die Bildung eines ternären Komplex aus Acetyl-CoA, Enzym und freiem Phosphat postuliert, wobei das katalytisch essentielle die Cystein Nucleophilie erhöht durch Abstraktion des Proton von CoA-SH, so daß ein CoA-Anion gebildet wird.

Basierend auf diesen Untersuchungen wurde die katalytische Aktivität von Mutanten überprüft, in denen die konservierten Cysteine in der Aminosäuresequenz der Phosphotransacetylase von *Methanosarcina thermophila* zu Alanin ausgetauscht waren. Im Vergleich zum nativen Protein wurden die Proteine mit Thiolgruppen spezifischen Agenzien behandelt und die katalytische Aktivität gemessen (Rasche *et al.*, 1997). Durch Inkubation mit NEM wurde das Protein inaktiviert. Die Modifikation erfolgte an Cystein 302. Dagegen besaß die Mutante mit Alanin 302 volle Enzymaktivität, die Mutante mit Alanin 159 war dagegen enzymatisch inaktiv. Daran war erkennbar, daß Cystein 159 katalytisch essentiell war, die chemische Modifizierung von Cystein 302 blockierte das aktive Zentrum wohl aus sterischen Gründen (Rasche *et al.*, 1997). Eine Mutagenese von Cystein 159 gegen Serin bewirkt keine Veränderung der katalytischen Aktivität der Mutante. Dies zeigte, daß keine Acetyl-Esterbildung an dieser Hydroxyl-Gruppe erfolgte sollte, denn diese hätte eine Änderung der katalytischen Aktivität zur Folge haben müssen. Aus diesen Untersuchungen wurde geschlossen, daß bei der Katalyse der Phosphotransacetylase eine katalytisch essentielle Thiol-Gruppe existierte, an der aber kein Acetyl-Enzym-Intermediat gebildet wurde (Rasche *et al.*, 1997).

#### 4.9. Hypothetischer Mechanismus für die Katalyse von Protein C

Die vorliegenden Daten lassen sich zu einem hypothetischen Reaktionsmechanismus für die Katalyse von Protein C zusammenfassen.

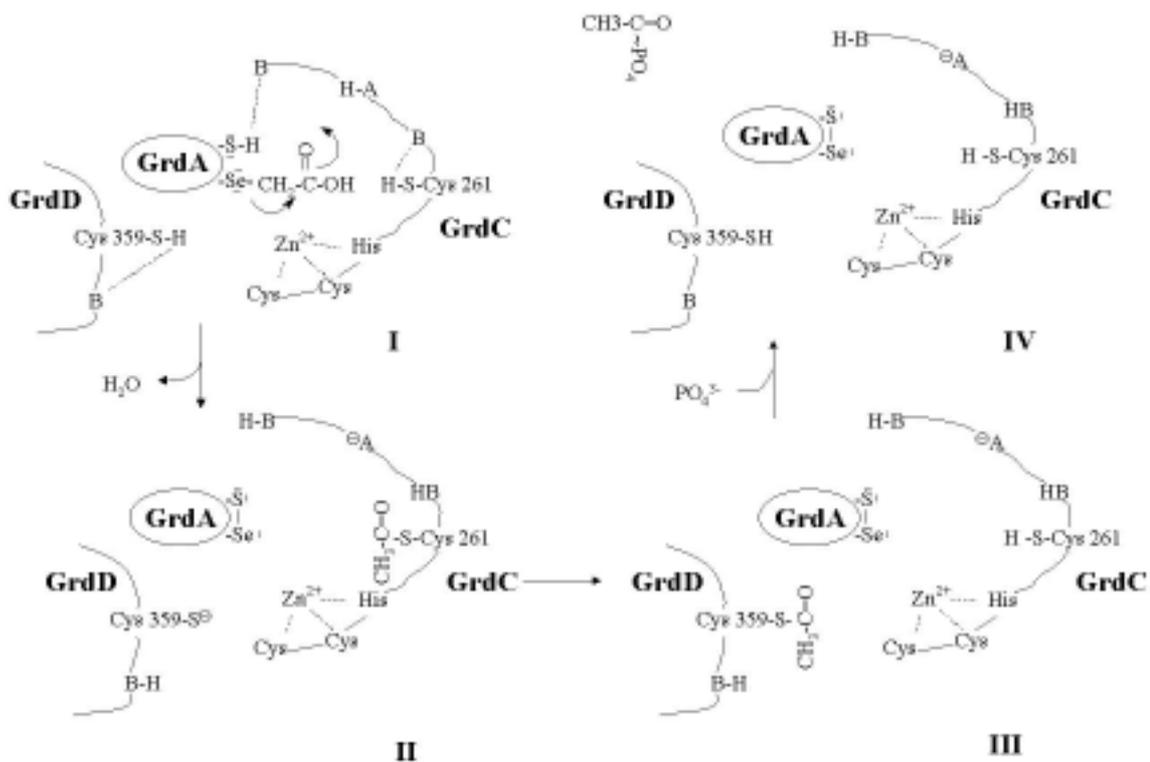
Als Substrat für die Katalyse von Protein C liegt der Carboxymethylselenoether an Selenoprotein A vor. Der Carboxymethylselenoether wird reduktiv gespalten unter Entstehung eines GrdC gebundenen Acetyl-Rests und oxidierten Selenoprotein A und Freisetzung von H<sub>2</sub>O. Vergleicht man die Stabilität einer Etherbindung zu einer Thioether-Bindung und einer Selenoether-Bindung nimmt deren Stabilität in der genannten Reihenfolge aufgrund der höheren Nucleophilie des Selens gegenüber Schwefel und Sauerstoff ab. Die reduktive Spaltung kann möglicherweise durch Zn<sup>2+</sup> begünstigt werden, das in GrdC ligandiert wird und als Lewis-Säure elektrophil auf die freien Elektronen des Selenols wirkt. Auf diese Art und Weise wird die Selenoether-Bindung labilisiert. Dabei käme es zu einer Koordination des Zn<sup>2+</sup> zwischen Selenoprotein A und GrdC. Ebenso kann Zn als Elektrophil die Freisetzung von H<sub>2</sub>O begünstigen (nicht gezeigt). Dabei könnte es zur Entstehung eines reaktiven Keten-Intermediat (Buckel, 1990) kommen. Allerdings müßte es durch hydrophobe Aminosäure-Reste von der hydrophilen Umgebung abgeschirmt werden. Nach den Sequenzhomologien von GrdC zur  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III erfolgt ein nucleophiler Angriff der Thiol-Gruppe von Cystein 261 in GrdC an den Carbonyl-Kohlenstoff. Der nucleophile Angriff der Thiolat-Gruppe kann aber auch an den noch an

Selenoprotein A gebundenen Carboxymethyl-Rest unter Bildung eines Protein A-Acetyl-GrdC-Intermediats erfolgen, so daß es nicht zur Entstehung eines Ketens kommen muß.

Es besteht ebenso die Möglichkeit, daß  $Zn^{2+}$  als Lewis-Säure wirkend die S-H-Bindung an Cystein 261 labilisiert und die Dissoziation der Thiol-Gruppe von Cystein 261 begünstigt. Anschließend kommt es zur Bildung eines Acetylthioesters an Cystein 261. Neben der Aktivierung der Thiol-Gruppe von Cystein 261 durch Zn ist die Aktivierung durch einen benachbarten Aminosäure-Rest in der Proteinstruktur, wie es in der  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III und in der Thiolase bzw. in Cystein-Proteasen der Fall ist, möglich. Dafür käme Histidin 266 in Frage, das wie Cystein 261 in einem hydrophoben Sequenzbereich liegt.

Als nächster Schritt erfolgt eine Transacetylierung an die Thiol-Gruppe von Cystein 359 in GrdD, an der es ebenfalls zur Bildung eines Acetylthioesters kommt und anschließend die Energiekonservierung durch die Freisetzung von Acetylphosphat. Bei diesem Schritt wird die Umwandlung eines energiereichen Acetylthioesters an Protein C in eine Phosphoanhydridbindung realisiert. Welche positiv geladenen Aminosäure-Reste (Arginin bzw. Lysin) möglicherweise an der Bindung des anorganischen Phosphat an GrdD beteiligt sind, bevor es zur Freisetzung von Acetylphosphat kommt, ist derzeit unklar.

In unphysiologischer Richtung bei der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat kommt es zur Spaltung des gebildeten Acetylthioester an Cystein 359 durch Arsenat als Phosphat-Analogon. Unklar ist, auf welche Art und Weise die Thiol-Gruppe von Cystein 359 aktiviert wird. Die Enzymaktivität, gemessen bei pH 7,5 deuten an, daß die Thiol-Gruppe dissoziiert und damit aktiviert vorliegen muß. Das freigesetzte Acetylphosphat wird im weiteren Stoffwechsel von *E. acidaminophilum* entweder von einer Acetat-Kinase zur ATP-Synthese verwendet bzw. durch eine Phosphotransacetylase zu Acetyl-CoA umgewandelt.



**Abb. 32** Schematische Darstellung eines hypothetischer Mechanismus der Umwandlung des Carboxymethylselenoether an Protein A in Acetylphosphat, katalysiert durch Protein C. Erläuterungen s. Text.  $Zn^{2+}$  wird in GrdC möglicherweise von zwei Cystein-Resten und einem Histidin ligandiert. Welcher basische Aminosäure-Rest (B), der die Deprotonierung der Thiol-Gruppe an Selenoprotein A begünstigt (I) bzw. der saure Aminosäure-Rest (H-A), der die an der Aktivierung der Carboxymethyl-Gruppe beteiligt (I) sind noch unklar.

#### 4.10. *orfU* aus *Eubacterium acidaminophilum* und *Clostridium difficile*

Dem 3'-Ende von *grdD1* folgte auf pMK374 ein Leserahmen, von dem lediglich die ersten 485 bp kloniert werden konnten. Nach Eingabe in die Datenbank zeigte das Genprodukt von *orfU* Homologien zu Elektronentransfer-Untereinheiten verschiedener Enzymkomplexe. Um eine vollständige Sequenz mit der Datenbank vergleichen zu können, wurde im Genom von *C. difficile* nach einem Leserahmen mit hoher Identität zu OrfU gesucht. Die höchste Identität mit 66 % bestand zu einem Leserahmen, der 280 Aminosäuren kodierte.

Nach Abgleich mit der Datenbank wurden Identitäten und Ähnlichkeiten zur Untereinheit HydG der Ni-Fe-Hydrogenase aus *P. furiosus* gefunden. In Untersuchungen zum Schwefel-Metabolismus von *P. furiosus* wurde gezeigt, daß die cytoplasmatisch nachgewiesene Schwefel-reduzierende Aktivität mit einer löslichen Hydrogenase-Aktivität verbunden ist, woraus auf eine Kopplung der cytoplasmatischen Produktion von Sulfid mit der Reduktion von Protonen durch ein bifunktionelles Enzym geschlossen wurde (Ma *et al.*, 2000). Um dies näher zu charakterisieren, wurden die Gene der Hydrogenase-Untereinheiten kloniert (Pedroni *et al.*, 1995). Die Ni-Fe-Hydrogenase besteht danach aus vier Untereinheiten, als  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\alpha$ -Untereinheit bezeichnet, die von den Genen *hydB*, *hydG*, *hydD* und *hydA* codiert werden. Die Genprodukte von *hydD* und *hydA* besitzen Homologien zur kleinen und großen Untereinheit der Ni-Fe-Hydrogenasen zahlreicher Prokaryoten und Eukaryoten (Pedroni *et al.*, 1995). Homologien von HydB und HydG bestehen dagegen zu den Untereinheiten AsrA und AsrB der Sulfit-Reduktase aus *S. typhimurium*. HydB scheint wie ArsA ferredoxin-ähnliche Fe-S-Cluster zu enthalten. Im Vergleich dazu enthalten AsrB, HydG und das Genprodukt von OrfU aus *C. difficile* eine homologe glycinreiche Region, die als Flavin-Bindung-Motiv der Nitrat-Reduktasen von *Arabidopsis thaliana*, *Aspergillus nidulans* und der Cytochrom-Reduktase vom Rind gefunden wurde (Pedroni *et al.*, 1995). Daneben enthielten die HydG und AsrB vier konservierte Cysteine, die möglicherweise für ein Eisen-Schwefel-Cluster verantwortlich waren. Drei dieser Cysteine waren in OrfU ebenso wie in den hypothetischen Proteinen aus *P. abyssi*, *T. maritima* und *T. pallidum* hoch konserviert. In *T. pallidum* und *C. difficile* befand sich anstelle des vierten Cysteins ein Aspartat in der Sequenz (s. Abb. 33). In diesen genannten Proteinen wurde die Art des Metalls und dessen Ligandierung noch nicht nachgewiesen.

Zu den Proteinen, in denen diese vier konservierten Cysteine und die konservierte Flavin-bindende Region ebenfalls auftraten, zählt die Untereinheit PyrDII der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *B. subtilis*. Die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHOD) katalysiert die vierte Reaktion der Pyrimidin-Biosynthese und besteht aus zwei heterologen Untereinheiten PyrDI und PyrDII (Quinn *et al.*, 1991). PyrDI enthält FMN und ist für die Hydrogenaseaktivität verantwortlich, jedoch kann es als einzelne rekombinante Untereinheit kein NAD<sup>+</sup> reduzieren. Diese Eigenschaft der Dihydroorotat-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktaseaktivität besitzt die DHOD nur als Holoenzym (PyrDI<sub>2</sub>PyrDII<sub>2</sub>-Hetero-Dimer) (Kahler *et al.*, 1999). PyrDII, läßt sich als rekombinante Untereinheit in Abwesenheit von PyrDI reinigen. Es konnten am rekombinanten Protein 1 mol FAD und 1 mol [2Fe 2S] pro mol PyrDII nachgewiesen werden. Über gerichtete Mutagenese konnten die zu Alanin mutierten vier Cysteine als Liganden für das [2Fe 2S]-Zentrum nachgewiesen werden.

Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, daß es sich in OrfU von *C. difficile* möglicherweise ebenfalls ein [2Fe 2S]-Cluster handelt, das jedoch anstelle von vier Cysteinen von einem Aspartat und drei Cysteinen gebunden wird. Ein solcher [2Fe 2S]-Cluster wurde in der Untereinheit SudA der Sulfid-Dehydrogenase in *P. furiosus* charakterisiert (Hagen *et al.*, 2000). Für OrfU aus *E. acidaminophilum* kann diese Aussage erst nach Klonierung des Gens und Vergleich der vollständigen Sequenzen getroffen werden.



schlossen die Autoren, daß der ligandierter [2Fe 2S]-Cluster für die NADH-Oxidoreduktase-Aktivität essentiell ist. Nach diesen Untersuchungen handelt es sich bei der Sequenz von OrfU aus *C. difficile* und *E. acidaminophilum* um eine elektronenübertragende Untereinheit, die in jedem bisher bekannten Fall mit einer zweiten Untereinheit, von der sie die Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  überträgt, zusammenwirken muß. Welcher Art von Enzymkomplex OrfU' in *E. acidaminophilum* zugehört, kann nur durch Klonierung der stromabwärts von pMK374 befindlichen chromosomalen DNA-Region geklärt werden.

Es ist unwahrscheinlich, daß es sich beim Genprodukt von *orfU'* um die Untereinheit einer Ni-Fe-Hydrogenase analog zu *P. furiosus* handelt. Nach bisherigen Untersuchungen zur Hydrognaseaktivität in *E. acidaminophilum* (Granderath, 1993) gibt es in *E. acidaminophilum* zwei Fe-Hydrogenasen, deren Genregion bereits einschließlich der stromaufwärts und stromabwärts befindlichen Gene kloniert wurde (Gräntzdörffer, 2000; Happe, 1998; Keil, 1999).

Die Transkription von *orfU'* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Eine Terminator-Sequenz nach dem 3'-Ende von *grdD1* deutete auf eine von den Glycin-Reduktase-Genen unabhängige Transkription von *orfU'* (Sonntag, 1998) hin.

Die Untersuchung der Transkription der stromaufwärts von *orfU'* befindlichen Glycin-Reduktase-Gene und Gene des Thioredoxin-System durch RT-PCR ergab eine mögliche gemeinsame Transkription der Gene *grdB1-trxA1-trxB1-grdA1-grdC1-grdD1* als polycistronische mRNA. Diese würde ein gemeinsames Transkript einer Mindestlänge von 6-7 kb umfassen (Sonntag, 1998), was jedoch durch Northern-Hybridisierung nicht bestätigt werden konnte.

## 5. Zusammenfassung

1. Das Gen *grdD1* der 48 kDa-Untereinheit des gemeinsamen Protein C der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* und die stromabwärts des 3'-Endes liegende Genregion wurden kloniert. Damit wurde der Gensatz I der Glycin-Reduktase-Gene vervollständigt und die ersten 485 bp eines stromabwärts folgenden Leserahmens identifiziert und dessen Genprodukt aufgrund von Sequenzhomologien diskutiert. Das Genprodukt von *grdD1* hatte eine Molekülmasse von 40 kDa und wich von der proteinchemisch ermittelten Molekülmasse von 48 kDa erheblich ab.
2. Aufgrund von Sequenzhomologien wurden Gene *grdC* der 54 kDa Untereinheit und *grdD* der 40 kDa-Untereinheit von Protein C in den Genomen von *C. difficile*, *C. hydrogeniformans* und *T. denticola* identifiziert und deren Genprodukte mit den Untereinheiten aus *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* verglichen. In den Sequenzen von GrdC gibt es zwei Cysteine an Position 223 und Position 261, die über alle fünf bekannten Sequenzen konserviert sind.
3. Für GrdC besteht in einem Teilbereich eine Sequenzhomologie zur  $\beta$ -Ketoacyl-Carrier-Protein-Synthase III (FabH), was darauf hinweisen könnte, daß zuerst eine Acetylthioesterbildung an GrdC erfolgt und anschließend eine Transacetylierung nach GrdD.
4. Aufgrund der Sequenzhomologien der vier bekannten Sequenzen von GrdD gibt es ein konserviertes Cystein an Position 359 der Aminosäuresequenz, während der Cystein 98 nicht in allen Sequenzen vorkommt.
4. Die zwei Untereinheiten GrdC und GrdD wurden in *E. coli* heterolog exprimiert und gereinigt. GrdD als N-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein ließ sich mittels arsenatabhängiger Hydrolyse von Acetylphosphat charakterisieren, dagegen ließ sich GrdD als N-terminales 6xHistag-Protein zwar exprimieren, jedoch erwies sich die Enzymaktivität bei der arsenatabhängigen Hydrolyse von Acetylphosphat als sehr instabil. GrdC als C-terminales *Strep*-tag-Fusionsprotein zeigte im Gegensatz zu GrdD keine nachweisbare Enzymaktivität.
5. Durch gerichtete Mutagenese wurde jeweils ein Cystein verändert, um so einen Hinweis auf die Beteiligung an der Katalyse zu erhalten. Die Mutanten GrdD C98→S und GrdD C359→A wurden als *Strep*-tag-Fusionsproteine heterolog exprimiert und gereinigt. Die Mutante GrdD C→98S besaß katalytische Aktivität, während GrdD C359A inaktiv war. Cystein 359 war offensichtlich die katalytisch essentielle Thiol-Gruppe, an der es zur Acetylthioesterbildung kam.
6. An GrdD als rekombinante katalytisch aktive Untereinheit konnte gezeigt werden, daß die beiden Cystein-Reste nach Inaktivierung durch Jodacetat unterschiedlich modifiziert vorlagen. Eine Carboxymethylierung von Cystein 359 konnte nach Inaktivierung des Proteins durch Peptid-Mapping und Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Nach Substratschutz durch Acetylphosphat vor der Inaktivierung durch Jodacetat lag Cystein 359 unmodifiziert vor und ließ sich erst dann mit 4-Vinylpyridin zu markieren. Cystein 98 war im nativen Zustand unzugänglich für eine Modifikation und ließ sich erst nach Denaturierung des Proteins carboxymethylieren bzw. pyridylethylieren. So konnte Cystein 359 als katalytisch essentieller Aminosäure-Rest identifiziert und das Ergebnis der Mutagenese bestätigt werden.
7. Durch Atomabsorptionsspektroskopie wurde in heterolog exprimierten GrdC Zink nachgewiesen. Eine Funktion als möglicher Cofaktor beim Transfer der Carboxymethyl-Gruppe von Selenoprotein A über GrdC nach GrdD wurde diskutiert.

## 6. Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402
- Andreesen, J.R.**, 1994. Acetogenesis. In: Drake, H.L., ed (Hrsg.) , Chapman & Hall, New York pp 568-629
- Andreesen, J.R.** (1994). Glycine metabolism in anaerobes. *Ant. v. Leeuwenhoek* 66: 223-37
- Andreesen, J.R., Bahl, H., Gottschalk, G.**, 1989. Clostridia. In: Minton, N.P., Clark, D.P.e. (Hrsg.) *Biotechnology Handbook*, Plenum Press, New York pp 227-66
- Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Mach, H., Volker, U., Hecker, M.** (1997). First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 18: 1451-63
- Argos, P., Rao, J.K.** (1986). Prediction of protein structure. *Methods Enzymol* 130: 185-207
- Arkowitz, R.A., Abeles, R.H.** (1989). Identification of acetyl phosphate as the product of clostridial glycine reductase: evidence for an acetyl enzyme intermediate. *Biochemistry* 28: 4639-44
- Arkowitz, R.A., Abeles, R.H.** (1990). Isolation and Characterization of a Covalent Selenocystein Intermediate in the GlycinReductase System. *J Am 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: 4090-7
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Woo, T.H.S., Ollivier, B., Labat, M., Patel, B.K.C.** (1999). Phylogenetic relationship of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, *Selenomonas acidaminophila* and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16SrDNA 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
- Bednarski, B.** (1999). Molekulare Analyse der Pyruvyl-bildenen Proenzyme GrdE und PrdA der Glycin- und D-Prolin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit Halle
- Bell, R.M.** (1974). Mutants of *Escherichia coli* defective in membrane phospholipid synthesis: macromolecular synthesis in an sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase Km mutant. *J Biol Chem* 117: 1065-76
- Bell, R.M.** (1975). Mutants of *Escherichia coli* defective in membrane phospholipid synthesis. Properties of wild type and Km defective sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activities. *J Biol Chem* 250: 7147-52
- Bibb, M.J., Sherman, D.H., Omura, S., Hopwood, D.A.** (1994). Cloning, sequencing and deduced functions of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide antibiotic frenolicin. *Gene* 142: 31-9
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23
- Blum, H., Gross, H.J., Beier, H.** (1989). The expression of the TMV-specific 30-kDa protein in tobacco protoplasts is strongly and selectively enhanced by actinomycin. *Virology* 169: 51-61
- 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: 248-54
- Buckel, W.**, 1990. Amino acid fermentation: coenzym B12-independent pathways. In: Hauska, G., Thauer, R. (Hrsg.) *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp 22-30

- Bushman, F.D., Engelman, A., Palmer, I., Wingfield, P., Craigie, R.** (1993). Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3428-32
- Carty, S.M., Colbeau, A., Vignais, P.M., Larson, T.J.** (1994). Identification of the *rpmF-plsX-fabH* genes of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett* 118: 227-31
- Chen, J.S.** (1995). Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiol Rev* 17: 263-73
- Chen, N.Y., Zhang, J.J., Paulus, H.** (1989). Chromosomal location of the *Bacillus subtilis* aspartokinase II gene and nucleotide sequence of the adjacent genes homologous to *uvrC* and *trx* of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 135: 2931-40
- Chen, W.J., Moomaw, J.F., Overton, L., Kost, T.A., Casey, P.J.** (1993). High level expression of mammalian protein farnesyltransferase in a baculovirus system. The purified protein contains zinc. *J Biol Chem* 268: 9675-80
- Cleland** (1964). Dithiothreitol, a new protective Reagent for SH-Groups. *Biochemistry* 3: 480-2
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Corboba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H.a., E., F.J.A.** (1994). The phylogeny of the genus *clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 812-826
- Communi, D., Erneux, C.** (1996). Identification of an active site cysteine residue in human type I Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 5-phosphatase by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Biochem J* 320: 181-6
- Cone, J.E., Del Rio, R.M., Davis, J.N., Stadtman, T.C.L.** (1976). Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2659-63
- Davis, J.T., Moore, R.N., Imperiali, B., Pratt, A.J., Kobayashi, K., Masamune, S., Sinskey, A.J., Walsh, C.T., Fukui, T., Tomita, K.** (1987). Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. I. Preliminary characterization and analysis of proton transfer reaction. *J Biol Chem* 262: 82-9
- Derewenda, Z.S., Derewenda, U.** (1991). Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cell Biol* 69: 842-51
- Dietrichs, D., Meyer, M., Rieth, M., Andreesen, J.R.** (1991). Interaction of selenoprotein PA and the thioredoxin system, components of the NADPH-dependent reduction of glycine in *Eubacterium acidaminophilum* and *Clostridium litorale* [corrected] [published erratum appears in *J Bacteriol* 1992 Feb;174(4):1432]. *J Bacteriol* 173: 5983-91
- Dietrichs, D., Meyer, M., Schmidt, B., Andreesen, J.R.** (1990). Purification of NADPH-dependent electron-transferring flavoproteins and N-terminal protein sequence data of dihydroliipoamide dehydrogenases from anaerobic, glycine-utilizing bacteria. *J Bacteriol* 172: 2088-95
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-45
- Dürre, P., Andreesen, J.R.** (1982). Selenium-dependent growth and glycine fermentation by *Clostridium purinolyticum*. *J Gen Microbiol* 128: 1457-66
- Dürre, P., Andreesen, J.R.** (1983). Purine and glycine metabolism by purinolytic clostridia. *J Bacteriol* 154: 192-9
- Eklund, H., Gleason, F.K., Holmgren, A.** (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* 11: 13-28
- Fendrich, C., Hippe, H., Gottschalk, G.** (1990). *Clostridium halophilum* sp. nov. and *Clostridium litorale* sp. nov., an obligate halophilic and marine species degrading betaine in the Stickland reaction. *Arch Microbiol* 154: 127-32

- Fraser, C.M., Norris, S.J., Weinstock, G.M., White, O., Sutton, G.G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E.K., Clayton, R., Ketchum, K.A., Sodergren, E., Hardham, J.M., McLeod, M.P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J.K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M.D., Venter, J.C., et al. (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete [see comments]. *Science* 281: 375-88
- Freier, S.M., Kierzek, R., Caruthers, M.H., Neilson, T., Turner, D.H. (1986). Free energy contributions of G.U and other terminal mismatches to helix stability. *Biochemistry* 25: 3209-13
- Freudenberg, W., Andreessen, J.R.L. (1989). Purification and partial characterization of the glycine decarboxylase multienzyme complex from *Eubacterium acidaminophilum*. *J Bacteriol* 171: 2209-15
- Freudenberg, W., Dietrichs, D., Lebertz, H., Andreessen, J.R. (1989). Isolation of an atypically small lipamide dehydrogenase involved in the glycine decarboxylase complex from *Eubacterium acidaminophilum*. *J Bacteriol* 171: 1346-54
- 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 [published erratum appears in *J Bacteriol* 1991 Aug;173(15):4908]. *J Bacteriol* 173: 2093-8
- Garcia, G.E., Stadtman, T.C. (1992). *Clostridium sticklandii* glycine reductase selenoprotein A gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 7080-9
- Geourjon, C., Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* 11: 681-4
- Gonzalez, J.M., Robb, F.T. (2000). Genetic analysis of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* carbon monoxide dehydrogenase genes *cooF* and *cooS*(1). *FEMS Microbiol Lett* 191: 243-7
- Grahame, D.A. (1989). Different isozymes of methylcobalamin:2-mercaptoethanesulfonate methyltransferase predominate in methanol- versus acetate-grown *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem* 264: 12890-4
- Granderath, K. (1993). Charakterisierung der Formiat-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase als wolframhaltige Proteine von *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation Universität Göttingen
- Gräntzdörffer (1997). Molekularbiologische Analyse Genen der Glycin-Reduktase und des Thiothredoxin-System aus *C. sticklandii*. Diplomarbeit Universität Halle
- Gräntzdörffer, A. (2000). Formiat-Stoffwechsel in *Eubacterium acidaminophilum*: Molekulare und biochemische Charakterisierung der Wolfram- und Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen sowie einer Eisen-Hydrogenase. Dissertation Halle
- Gräntzdörffer, A., Pich, A., Andreessen, J.R. (2000). Molecular analysis of the *grd*-operon coding for genes of the glycine reductase and thiothredoxin system from *Clostridium sticklandii*. in press
- Gursinsky, T. (1996). Klonierung, Sequenzierung und Analyse von Genen des Selenocysteineinbaus in Proteine von *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit Universität Halle
- Hagen, W.R., Silva, P.J., Amorim, M.A., Hagedoorn, P.L., Wassink, H., Haaker, H., Robb, F.T. (2000). Novel structure and redox chemistry of the prosthetic groups of the iron-sulfur flavoprotein sulfide dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus*; evidence for a [2Fe-2S] cluster with Asp(Cys)<sub>3</sub> ligands. *J Biol Inorg Chem* 5: 527-34
- Happe, C. (1998). Charakterisierung einer für Hydrogenase-Untereinheiten codierenden Genregion aus *Eubacterium acidaminophilum* und Experimente zur Klonierung des *selC*-Gens aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit Universität Halle

- Harms, C.** (1995). Anaerober Kreatin-Stoffwechsel in *Tissierella creatinophila*: Anreicherung und Charakterisierung beteiligter Proteine, besonders von verschiedenen Komponenten der Sarkosin-Reduktase. Dissertation Universität Göttingen
- Harms, C., Ludwig, U., Andreesen, J.R.** (1998). Sarcosine reductase of *Tissierella creatinophila*: purification and characterization of its components. Arch Microbiol 170: 442-50
- Harms, C., Meyer, M.A., Andreesen, J.R.** (1998). Fast purification of thioredoxin reductases and of thioredoxins with an unusual redox-active centre from anaerobic, amino-acid-utilizing bacteria. Microbiology 144: 793-800
- Harms, C., Schleicher, A., Collins, M.D., Andreesen, J.R.** (1998). *Tissierella creatinophila* sp. nov., a gram-positive, anaerobic, non-spore-forming, creatinine-fermenting organism. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 3: 983-93
- Harms, U., Thauer, R.K.** (1996). Methylcobalamin: coenzyme M methyltransferase isoenzymes MtaA and MtbA from *Methanosarcina barkeri*. Cloning, sequencing and differential transcription of the encoding genes, and functional overexpression of the *mtaA* gene in *Escherichia coli*. Eur J Biochem 235: 653-9
- Hespell, R.B., Canale-Parola** (1971). Amino acid and glucose Fermentation by *Treponema denticola*. Arch Microbiol 78: 234-51
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77: 51-9
- Hormann, K., Andreesen, J.-R.** (1989). Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum*. Mol Microbiology 153: 50-59
- Huang, Miller** (1991). . Adv. Appl. Math 12: 337-57
- Huang, C., Hightower, K.E., Fierke, C.A.** (2000). Mechanistic studies of rat protein farnesyltransferase indicate an associative transition state. Biochemistry 39: 2593-602
- Jacob, C., Maret, W., Vallee, B.L.** (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 3489-94
- Jacob, C., Maret, W., Vallee, B.L.** (1999). Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 1910-4
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O.** (1994). Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 15: 29-63
- Jia, Y., Kappock, T.J., Frick, T., Sinskey, A.J., Stubbe, J.** (2000). Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. Biochemistry 39: 3927-36
- Johnson, A.R., Chen, Y.W., Dekker, E.E.** (1998). Investigation of a catalytic zinc binding site in *Escherichia coli* L-threonine dehydrogenase by site-directed mutagenesis of cysteine-38. Arch Biochem Biophys 358: 211-21
- Kabisch, U.C., Gräntzdörffer, A., Schierhorn, A., Rücknagel, K.P., Andreesen, J.R., Pich, A.** (1999). Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. J Biol Chem 274: 8445-54
- Kahler, A.E., Nielsen, F.S., Switzer, R.L.** (1999). Biochemical characterization of the heteromeric *Bacillus subtilis* dihydroorotate dehydrogenase and its isolated subunits. Arch Biochem Biophys 371: 191-201
- Kahler, A.E., Switzer, R.L.** (1996). Identification of a novel gene of pyrimidine nucleotide biosynthesis, *pyrDII*, that is required for dihydroorotate dehydrogenase activity in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 178: 5013-6
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R.W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W., Stephens, R.S.** (1999). Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. Nat Genet 21: 385-9
- Karlin, Zhu** (1997). Classification of mononuclear zinc metal site in protein structures. Proc Natl Acad Sci USA 94: 14231-6

- Keil, C.** (1999). Klonierung und Charakterisierung einer Fe-Hydrogenase - und einer Acetat-Kinase-Genregion aus *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit Universität Halle
- 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: 192-9
- Kreimer, S., Söhling, B., Andreesen, J.R.** (1997). Two closely linked genes encoding thioredoxin and thioredoxin reductase in *Clostridium litorale*. *Arch Microbiol* 168: 328-37
- Kyte, J., Doolittle, R.F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-32
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Larson, T.J., Ludtke, D.N., Bell, R.M.** (1984). sn-Glycerol-3-phosphate auxotrophy of *plsB* strains of *Escherichia coli*: evidence that a second mutation, *plsX*, is required. *J Bacteriol* 160: 711-7
- LeClerc, G.M., Grahame, D.A.** (1996). Methylcobamide: coenzyme M methyltransferase isozymes from *Methanosarcina barkeri*. Physicochemical characterization, cloning, sequence analysis, and heterologous gene expression. *J Biol Chem* 271: 18725-31
- Lee, S.P., Xiao, J., Knutson, J.R., Lewis, M.S., Han, M.K.** (1997).  $Zn^{2+}$  promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase *in vitro*. *Biochemistry* 36: 173-80
- Lightner, V.A., Larson, T.J., Tailleux, P., Kantor, G.D., Raetz, C.R., Bell, R.M., Modrich, P.** (1980). Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Cloning of a structural gene (*plsB*) of the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem* 255: 9413-20
- Lippman, F.** (1944). Enzymatic synthesis of acetyl phosphate. *J Biol Chem* 155: 55-70
- Long, S.B., Casey, P.J., Beese, L.S.** (1998). Cocystal structure of protein farnesyltransferase complexed with a farnesyl diphosphate substrate. *Biochemistry* 37: 9612-8
- Long, S.B., Casey, P.J., Beese, L.S.** (2000). The basis for K-Ras4B binding specificity to protein farnesyltransferase revealed by 2 Å resolution ternary complex structures. *Structure Fold Des* 8: 209-22
- Lottspeich, F., Zorbas, H.** (1998). *Bioanalytik, Spektrum, Akad Verl, Heidelberg, Berlin*
- Lübbers, M.** (1993). Klonierung, Sequenzierung und Analyse von Genen des Thioredoxin-Systems und der Glycin-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Doktorarbeit Universität Göttingen
- Lübbers, M., Andreesen, J.R.** (1993). Components of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Cloning, sequencing and identification of the genes for thioredoxin reductase, thioredoxin and selenoprotein P<sub>A</sub>. *Eur J Biochem* 217: 791-8
- Ma, K., Weiss, R., Adams, M.W.** (2000). Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *J Bacteriol* 182: 1864-71
- Madison, L.L., Huisman, G.W.** (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 21-53
- Masamune, S., Palmer, M.A.J., Gamboni, S., Thompson, S., Davis, J.T., Williams, S.F., Peoples, O.P., Sinkey, A.J., Walsh, C.T.** (1989). Bio-Claisen condensation catalyzed by thiolase from *Zoogloea ramingeri*. Active site cysteine residues. *J Am Chem Soc* 111: 1879-81
- Matthews, R.G., Goulding, C.W.** (1997). Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: the role of zinc. *Curr Opin Chem Biol* 1: 332-9
- Merkler, I., Retey, J.** (1981). Stereochemical investigation of the phosphoketolase reaction. The formation of chiral [2H1,3H]acetyl phosphate. *Eur J Biochem* 120: 593-7
- Meyer, M., Granderath, K., Andreesen, J.R.** (1995). Purification and characterization of protein PB of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine

- reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Eur J Biochem 234: 184-91
- Moran, C.P., Lang, N., Le Grice, S.F.J., Lee, G., Stephenson, M., Soneshin, A.L., Pero, J., Losik, P.** (1982). Nucleotid sequence that signal the initiation in *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet 186: 339-346
- Morbidoni, H.R., de Mendoza, D., Cronan, J.E., Jr.** (1996). *Bacillus subtilis* acyl carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes. J Bacteriol 178: 4794-800
- Müller, Y.A., Schulz, G.E.** (1993). Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. Science 259: 965-7
- Myers, L.C., Terranova, M.P., Ferentz, A.E., Wagner, G., Verdine, G.L.** (1993). Repair of DNA methylphosphotriesters through a metalloactivated cysteine nucleophile. Science 261: 1164-7
- Myers, L.C., Verdine, G.L., Wagner, G.** (1993). Solution structure of the DNA methyl phosphotriester repair domain of *Escherichia coli* Ada. Biochemistry 32: 14089-94
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., Fraser, C.M., et al.** (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature 399: 323-9
- Oh, W., Larson, T.J.** (1992). Physical locations of genes in the *rne (ams)-rpmF-plsX-fab* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. J Bacteriol 174: 7873-4
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T.** (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci 4: 2411-23
- Palmer, M.A., Differding, E., Gamboni, R., Williams, S.F., Peoples, O.P., Walsh, C.T., Sinskey, A.J., Masamune, S.** (1991). Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. Evidence for a mechanism involving Cys-378 as the active site base. J Biol Chem 266: 8369-75
- Pearson, W.R., Lipman, D.J.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 2444-8
- Pedroni, P., Della Volpe, A., Galli, G., Mura, G.M., Pratesi, C., Grandi, G.** (1995). Characterization of the locus encoding the [Ni-Fe] sulfhydrogenase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a relationship to bacterial sulfite reductases. Microbiology 141: 449-58
- Platt, T.** (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann Rev Biochem 55: 339-72
- Podkovyrov, S., Larson, T.J.** (1995). Lipid biosynthetic genes and a ribosomal protein gene are cotranscribed. FEBS Lett 368: 429-31
- Qiagen** (1992). The QIAexpressionist- the high level expression and purification system, The Qiagen GmbH, Hilden
- QIAGEN** (1997). A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Qiagen GmbH, Hilden
- Qiu, X., Janson, C.A., Konstantinidis, A.K., Nwagwu, S., Silverman, C., Smith, W.W., Khandekar, S., Lonsdale, J., Abdel-Meguid, S.S.** (1999). Crystal structure of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. A key condensing enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis. J Biol Chem 274: 36465-71
- Quinn, C.L., Stephenson, B.T., Switzer, R.L.** (1991). Functional organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon. J Biol Chem 266: 9113-27
- Rasche, M.E., Smith, K.S., Ferry, J.G.** (1997). Identification of cysteine and arginine residues essential for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*. J Bacteriol 179: 7712-7

- Rifaat, M.M., Chen, J.S.** (1993). Direct Submission. Biochemistry, Virginia Tech, Blacksburg, VA24061, USA
- Roberts, P.J., Belsham, G.J.** (1995). Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology* 213: 140-6
- Russel, M., Model, P.** (1988). Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* 263: 9015-9
- Saito, H., Miura, K.J.** (1963). Preparation of transforming desoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochem Biophys Acta* 72: 619-629
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory press
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7
- Sauer, K., Harms, U., Thauer, R.K.** (1997). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *Eur J Biochem* 243: 670-7
- Sauer, K., Thauer, R.K.** (2000). Methyl-coenzyme M formation in methanogenic archaea. Involvement of zinc in coenzyme M activation. *Eur J Biochem* 267: 2498-504
- Schmidt, G., Selzer, J., Lerm, M., Aktories, K.** (1998). The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity. Cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. *J Biol Chem* 273: 13669-74
- Schmidt, T.G., Skerra, A.** (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep-tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 676: 337-45
- Schröder, T., Andreesen, J.R.** (1992). Purification and characterization of protein PC, a component of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur J Biochem* 206: 79-85
- Sears, C.L., Kaper, J.B.** (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 60: 167-215
- Shanley, M.S., Harrison, A., Parales, R.E., Kowalchuk, G., Mitchell, D.J., Ornston, L.N.** (1994). Unusual G + C content and codon usage in *catIJF*, a segment of the ben-cat supra-operonic cluster in the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosome. *Gene* 138: 59-65
- Shine, J., Dalgarno, L.** (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1342-6
- Siggaard-Andersen, M., Kauppinen, S., von Wettstein-Knowles, P.** (1991). Primary structure of a cerulenin-binding beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase from barley chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4114-8
- Sonntag, D.** (1998). Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Organisation und Transkription der Glycin-, Sarkosin-, und Betain-spezifischen Gensätze. Doktorarbeit Universität Halle
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Stadtman, E.R.** (1955). Preparation and assay of acetylphosphate. *Methods of Enzymol* 3: 228-231
- Stadtman, T.C.** (1978). Selenium-dependent clostridial glycine reductase. *Methods Enzymol* 53: 373-82
- Stadtman, T.C.** (1989). Clostridial glycine reductase: protein C, the acetyl group acceptor, catalyzes the arsenate-dependent decomposition of acetyl phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7853-6
- Stadtman, T.C., Davis, J.N.L.** (1991). Glycine reductase protein C. Properties and characterization of its role in the reductive cleavage of Se-carboxymethyl-selenoprotein A. *J Biol Chem* 266: 22147-53

- Storer, A.C., Menard, R.** (1994). Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* 244: 486-500
- Svetlichny, V.A., Sokolova, T.G., Gerhardt, M., Ringpfeil, M., Kostrikina, N.A., Zavarin, G.A.** (1991). *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing thermophilic anaerobic bacterium from hydrothermal environment of Kunashir Island. *Syst Appl Microbiol* 14: 254-260
- Tai, H., Jaworski, J.G.** (1993). 3-Ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach (*Spinacia oleracea*) is not similar to other condensing enzymes of fatty acid synthase. *Plant Physiol* 103: 1361-7
- Tanaka, H., Stadtman, T.C.** (1979). Selenium-dependent clostridial glycine reductase. Purification and characterization of the two membrane-associated protein components. *J Biol Chem* 254: 447-52
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80
- Thompson, S., Mayer, F., Peoples, O.P., Masamune, S., Sinkey, A.J., Walsh, C.T.** (1989). Mechanistic studies on beta-ketoacyl thiolase from *Zoogloea ramigera*: identification of active site nucleophile as Cys89, its mutation to Ser89, and kinetic and thermodynamic characterization of wildtype and mutant enzymes. *Biochemistry* 28: 5735-5742
- Tsay, J.T., Oh, W., Larson, T.J., Jackowski, S., Rock, C.O.** (1992). Isolation and characterization of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* 267: 6807-14
- Uhlenbeck, O.C., Borer, P.N., Dengler, B., Tinoco, I., Jr.** (1973). Stability of RNA hairpin loops: A 6 -C m -U 6. *J Mol Biol* 73: 483-96
- Voss, S., Skerra, A.** (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 10: 975-82
- Wagner, M.** (1997). Untersuchungen zu Protein-Komponenten der substratspezifischen Einheiten der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation Universität Halle
- Wagner, M., Sonntag, D., Grimm, R., Pich, A., Eckerskorn, C., Sohling, B., Andreesen, J.R.** (1999). Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur J Biochem* 260: 38-49
- 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: 103-19
- Zhang, Y., Cronan, J.E., Jr.** (1998). Transcriptional analysis of essential genes of the *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous *Salmonella typhimurium* gene cluster. *J Bacteriol* 180: 3295-303
- Zindel, U., Freudenberg, W., Rieth, M., Andreesen, J.R., Schnell, J., Widdel, F.** (1988). *Eubacterium acidaminophilum* sp.nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H<sub>2</sub> or formate. *Arch Microbiol* 150: 254-266

## **Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen für die Überlassung der interessanten Thematik und für seine stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft zur laufenden Arbeit.

Frau Dr. B. Söhling danke ich ganz besonders für die hervorragende wissenschaftliche Anleitung und Betreuung, besonders dabei für jedes kritische und auch motivierende Wort.

Herrn Dr. P. Rücknagel, Frau Dr. A. Schierhorn und Dr. M. Jacob von der Forschungsstelle "Enzymologie der Peptidbindung" der Max-Planck-Gesellschaft Halle sei für die hervorragende Zusammenarbeit beim Nachweis der katalytischen Thiol-Gruppe an GrdD gedankt.

Frau Dr. M. Martienssen vom Institut für Biochemie/Biotechnologie der Universität Halle gilt Dank für die Anleitung und Unterstützung bei den Arbeiten zur Zink-Analytik.

Neben Frau Dr. Brigitte Söhling möchte ich den anderen Mitarbeitern des Labors 211 Claudia Hammerschmidt, Ulrike Noack, Katrin Fritsche, Denise Sonntag, Torsten Gursinsky, Jana Jäger, Christoph Happe, Tina Parther, Claudia Keil, Andre Lechelt, Michael Reuter und Daniel Gröbe für die gute fachliche, vertrauensvolle und freundschaftliche Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren danken.

Ich danke allen nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für hilfreiche Unterstützung in den letzten Jahren.

Bei allen Freunden und meiner Familie, die mir auch im Alltag mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden haben und damit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, bedanke ich mich.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt und Stellen, die sinngemäß und im Wortlaut aus aneren Werken entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 23.12.2000

.....  
(Martin Kohlstock)

## Lebenslauf

**Name** Ulf-Martin Norbert Kohlstock

23. 09. 1969 geboren in Eberswalde-Finow

## Schulbildung

1976-1986 Polytechnische Oberschule

1986-1988 Erweiterte Oberschule mit Abschluß:  
Reifezeugnis der DDR

## Wehrdienst

1988-1990 Grundwehrdienst

## Studium

1990-1995 Biochemie-Studium in Halle an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
Diplomarbeit angefertigt im Institut für Pflanzenbiochemie Halle zum  
Thema:  
"Transformation von cDNAs jasmonat-induzierter Proteine aus  
*Hordeum vulgare* L.cv. Salome in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh und  
die Analyse der Transformanten"  
29.09.1995 Abschluß als Diplom-Biochemiker

## Berufliche Tätigkeit

seit 01. 11. 1995 Arbeit im Institut für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

01.11.1999-  
30.04.2000 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Virologie an  
der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden