

**Proteinchemische und molekularbiologische
Charakterisierung der D-Prolin-Reduktase
aus *Clostridium sticklandii***



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von

Frau Ute Kabisch

geb. am 10. Oktober 1968

in Merseburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. J.R. Andreesen
2. Prof. Dr. W. Buckel
3. Prof. Dr. J. Retey

Verteidigung: 03.12.2001

urn:nbn:de:gbv:3-000003052

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003052>]

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL.....	6
2.1. Organismen und Plasmide.....	6
2.2. Nährmedien.....	7
2.2.1. Minimalmedium für <i>C. sticklandii</i> (UHDE, 1990)	7
2.2.1.1. Vitaminlösung (GENTHNER <i>et al.</i> , 1981, mod.).....	8
2.2.1.2. Spurenelementlösung SL A (HORMANN & ANDREESEN, 1989, mod.).....	9
2.2.1.3. Aminosäurestammlösung (UHDE, 1990)	10
2.2.2. Komplexmedium für <i>C. sticklandii</i> (STADTMAN, 1978, mod.)	10
2.2.3. Luria Bertani Medium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)	11
2.2.4. SOC-Medium (PROMEGA CORP.).....	11
2.2.5. Medienzusätze	11
2.3. Chemikalien.....	12
3. METHODEN.....	14
3.1. Zellanzucht.....	14
3.1.1. Anzuchtbedingungen	14
3.1.2. Reinheitskontrolle und Stammhaltung	14
3.1.3. Messung des Bakterienwachstums	14
3.1.4. Zellernte	15
3.2. Proteinchemische Methoden	15
3.2.1. Herstellung von Proteinrohextrakt	15
3.2.2. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)	16
3.2.3. Bestimmung der Enzymaktivität.....	17
3.2.3.1. Fluorimetrischer Test (SETO, 1979, mod.)	17
3.2.3.2. Aktivitätsbestimmung im nativen Gel	17
3.2.4. Dialyse und Einengen von Proteinlösungen	18
3.2.5. Methoden zur Proteinreinigung.....	18
3.2.5.1. Ammoniumsulfatfällung	18
3.2.5.2. Säulenchromatographie.....	18
3.2.6. Chloroform-Methanol-Fällung (WESSEL & FLÜGGE, 1984)	19
3.2.7. Elektrophoretische Methoden	20
3.2.7.1. SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970)	20
3.2.7.2. Native Gradienten-PAGE.....	21
3.2.8. Färben und Trocknen von Polyacrylamidgelen	22
3.2.8.1. Coomassie-Färbung (WEBER und OSBORN, 1969, mod.).....	22
3.2.8.2. Silberfärbung (BLUM, 1987, mod.)	23
3.2.8.3. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen.....	24
3.2.9. Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	24
3.2.10. Chemische Modifikation von Proteinen	25
3.2.10.1. Markierung mit Fluorescein-Thiosemicarbadid (FTSC).....	25
3.2.10.2. Modifikation durch o-Phenylendiamin (DIXON & FIELDS, 1972)....	26
3.2.10.3. Markierung mit [¹⁴ C]-L-Prolin	26
3.2.10.4. Modifikation von Cysteinen mit 4-Vinylpyridin.....	26
3.2.10.5. Bestimmung von Selenocystein	27

3.2.11. Proteinsequenzierung	27
3.3. Molekularbiologische Methoden	28
3.3.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	28
3.3.2. Phenol-Chloroform-Extraktion	28
3.3.3. Fällung von DNA	28
3.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
3.3.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	29
3.3.5.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese	29
3.3.5.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	30
3.3.5.3. Größenbestimmung von Nukleinsäuren	31
3.3.6. Isolierung von Nukleinsäuren	32
3.3.6.1. Isolierung von Gesamt-DNA (BERTRAM & DÜRRE, 1989, mod.) ...	32
3.3.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA	33
3.3.6.3. Isolierung von Gesamt-RNA	35
3.3.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	35
3.3.8. Enzymatische Modifikation von DNA	36
3.3.8.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	36
3.3.8.2. Restriktionsanalyse von DNA	37
3.3.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten	37
3.3.8.4. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin	38
3.3.9. Übertragung von DNA	39
3.3.9.1. Transformation von DNA in <i>E. coli</i> XL2-Blue	39
3.3.9.2. Der X-Gal-Test zur Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	39
3.3.10. Nukleinsäure-Übertragung auf Nylonmembranen	40
3.3.10.1. Southern-Blots	40
3.3.10.2. Northern-Blot	41
3.3.10.3. Dot Blot	41
3.3.10.4. Filterherstellung für die Koloniehybridisierung	41
3.3.11. Hybridisierung	42
3.3.11.1. Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden	42
3.3.11.2. Chemilumineszenz-Nachweis	43
3.3.11.3. Wiederverwertung von Nylonmembranen	44
3.3.12. Sequenzierung von DNA	44
3.3.13. Auswertung der Sequenzdaten	46
4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	48
4.1. Zellanzucht	48
4.2. Optimierung des Enzymtests für die D-Prolin-Reduktase	49
4.3. Lokalisation der D-Prolin-Reduktase-Aktivität	50
4.4. Isolierung der D-Prolin-Reduktase	51
4.4.1. Ammoniumsulfatfällung	52
4.4.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	52
4.4.3. Affinitätschromatographie an EAH-Sepharose [®] 4B	53
4.4.4. Größenausschlußchromatographie an Superose [®] 6 HR 10/30	55
4.4.5. Bestimmung des natives Molekulargewichtes der D-Prolin-Reduktase	55
4.4.6. Bestimmung der Untereinheitsstruktur der D-Prolin-Reduktase	57
4.4.7. Zusammenfassung der Reinigung der D-Prolin-Reduktase	57
4.5. Bestimmung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität im nativen Gel	59
4.6. Trennung des nativen Proteins in der SDS-PAGE	59
4.7. Bestimmung der molekularen Massen der Untereinheiten mittels MALDI-MS ..	60
4.8. Aminoterminale Sequenzierung der Untereinheiten	61

III

4.9. Nachweis von Carbonylgruppen in der D-Prolin-Reduktase	62
4.10. Bestimmung der substratbindenden Untereinheit der D-Prolin-Reduktase.....	62
4.11. Nachweis von Selenocystein in der D-Prolin-Reduktase	63
4.12. Klonierung und Sequenzierung der Gene der D-Prolin-Reduktase.....	64
4.12.1. Klonierungsstrategie	64
4.12.2. Auswahl eines geeigneten Klonierungsvektors.....	64
4.12.3. Klonierung der D-Prolin-Reduktase	65
4.12.4. Sequenzierung spezifischer Klone	66
4.12.5. Southern-Hybridisierung gegen chromosomale DNA und die partielle Genbank von <i>C. sticklandii</i>	67
4.12.6. Sequenzierung des klonierten D-Prolin-Reduktase-Genbereiches.....	68
4.12.6.1. Analyse von <i>prdA</i>	70
4.12.6.2. Analyse von <i>prdB</i>	70
4.12.6.3. Analyse von <i>prdC</i> , <i>prdD</i> und <i>prdE</i>	71
4.13. Untersuchungen zur Transkription durch Northern-Blot-Hybridisierung.....	72
5. DISKUSSION	75
5.1. Lokalisation und Reinigung der D-Prolin-Reduktase.....	75
5.2. Analyse der klonierten Gene der D-Prolin-Reduktase.....	77
5.2.1. Die Funktion der <i>prdA</i> -Genregion.....	78
5.2.2. Die Funktion der <i>prdB</i> -Region.....	88
5.2.3. Die Funktion der <i>prdC</i> -Region.....	92
5.2.4. Die Funktion von <i>prdD</i> und <i>prdE</i>	96
5.3. Weitere Gene des D-Prolin-Reduktase-Operons.....	99
5.4. Transkription des D-Prolin-Reduktase-Operons	103
5.5. Vergleich der Proteine des Prolin-Reduktase-Operons	106
5.6. Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons.....	108
5.7. Hypothese für einen Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Reduktase	109
5.8. Zur Rolle von Prolin in <i>C. sticklandii</i>	112
6. ZUSAMMENFASSUNG	115
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
ca.	Cirka
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure
C-terminal	carboxyterminal
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5-triphosphat
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>E.</i>	<i>Eubacterium</i>
EBP	“enhancer binding protein”
ELE	“enhancer like elements”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
f-15-ATP	Fluore-Desoxyadenosin-5-triphosphat
FTSC	Fluorescein-Thiosemicarbacid
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde

HMW	Hochmolekulargewichtsmarker
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP-MS	induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
IHF	“integration host factor
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
J	Joule
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
kb	Kilobasen
KP	Kaliumphosphat
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Komplexmedium
m	Meter
M	Molarität
MALDI	”matrix assisted laser desorption/ionization”
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mod.	modifiziert
mol	mol
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Normalität
N ₂	flüssiger Stickstoff
NAD(P)	Nicotinadenindinukleotid (-phosphat), oxidiert
NADH(P)	Nicotinadenindinukleotid (-phosphat), reduziert
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
oPDA	ortho-Phenylendiamin
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pers.	persönlich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	resistent
<i>R.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Salmonella; Staphylococcus</i>
SE	Natriumchlorid-EDTA-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Stammlösung
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
t	Zeit
<i>T.</i>	<i>Treponema</i>

VI

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TED	Tris-EDTA-DTT-Puffer
TEMED	N,N,N,N,'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	sichtbar
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactosid
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
>	größer als
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
λ	lambda
o	ortho
π	pie
σ	sigma

Verwendete Vorsilben für Potenzen der Zahl Zehn:

p	Pico	1×10^{-12}	m	Milli	1×10^{-3}
n	Nano	1×10^{-9}	c	Centi	1×10^{-2}
μ	Mikro	1×10^{-6}	k	Kilo	1×10^3

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren:

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

1. EINLEITUNG

Clostridium sticklandii ist ein stäbchenförmiges, obligat anaerobes, Gram-positives Bakterium (STADTMAN & MC CLUNG, 1957), welches Endosporen bildet und den Clostridien mit geringem G+C-Gehalt zugeordnet wird (JOHNSON & FRANCIS, 1975). Es kann keine dissimilatorische Sulfatreduktion durchführen und wird aufgrund seines Wachstums auf Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle den proteolytischen Clostridien zugeordnet (ANDREESEN *et al.*, 1989; HIPPE *et al.*, 1991; COLLINS *et al.*, 1994). Die Vergärung der Aminosäuren erfolgt paarweise in einer gekoppelten Oxidations-Reduktions-Reaktion, welche als “Stickland-Reaktion” bezeichnet wird (STICKLAND, 1934). Dabei kommt es zur Oxidation einer Aminosäure, deren freiwerdende Elektronen zur Reduktion der zweiten Aminosäure genutzt werden. *C. sticklandii* verwendet Serin, Threonin, Arginin, Lysin und Alanin als Elektronendonatoren. Als Elektronenakzeptoren können nur Prolin und Glycin dienen (UHDE, 1990).

Die Glycin-Reduktion erfolgt durch die Glycin-Reduktase zu Acetyl-Phosphat und Ammonium (STADTMAN & ELLIOTT, 1956; STADTMAN, 1978; TANAKA & STADTMAN, 1979; STADTMAN & DAVIS, 1991; ARKOWITZ & ABELES, 1989; 1990, 1991; SCHRÄDER & ANDREESEN, 1992; ANDREESEN, 1994; WAGNER *et al.*, 1999). Acetyl-Phosphat kann mittels der Acetatkinase zur ATP-Synthese und somit zur Energiekonservierung verwendet werden (BARNARD & AKHTAR, 1979; ARKOWITZ & ABELES, 1989). Beim oxidativen Threonin-Abbau durch die Threonin-Dehydrogenase (WAGNER & ANDREESEN, 1995) entsteht intermediär Glycin (UHDE, 1990), was zu einer internen “Stickland-Reaktion” führt.

Die Prolin-Reduktion beginnt mit der Isomerisierung des L-Prolins zum D-Isomer durch die Prolin-Racemase (RUDNICK & ABELES, 1975). D-Prolin wird anschließend durch die D-Prolin-Reduktase (EC 1.4.1.6.) zu δ -Aminovalerat umgesetzt (SETO und STADTMAN, 1976). Für die Prolin-Reduktion konnte bislang kein energie-konservierender Schritt in Form einer wie für die Glycin-Reduktase beschriebenen Substratkettenphosphorylierung nachgewiesen werden (ARKOWITZ *et al.*, 1994), obwohl bei Wachstum auf beiden Elektronenakzeptoren Prolin vor Glycin umgesetzt wird (UHDE, 1990). Wachstumsphysiologische Untersuchungen zeigten, daß Prolin essentiell für das Wachstum von *C. sticklandii* ist (A. PICH, pers. Mitteilung). Das

Bakterium ist im Gegensatz zu den verwandten Organismen *Clostridium litorale* und *Eubacterium acidaminophilum* (BAENA *et al.*, 1999) nicht in der Lage, auf Glycin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (ZINDEL *et al.*, 1988; UHDE, 1990; DIETRICH *et al.*, 1991).

Für *Clostridium sporogenes* wurde postuliert, daß die Prolin-Reduktion mit der Erzeugung eines pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran verbunden ist, der möglicherweise zur Energiekonservierung genutzt werden kann. Ob dieser Protonengradient an eine Elektronentransportkette verbunden mit einer ATP-Synthese gekoppelt ist, konnte nicht nachgewiesen werden (LOVITT *et al.*, 1986).

Die Glycin-Reduktase wurde bereits aus *E. acidaminophilum* (ANDREESEN, 1994; WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999), *C. litorale* (KREIMER & ANDREESEN, 1995) und *C. sticklandii* (STADTMAN, 1966; TURNER & STADTMAN, 1973; STADTMAN & DAVIS, 1991; GARCIA & STADTMAN, 1992; ANDREESEN, 1994; GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001) und weiteren Organismen biochemisch und molekularbiologisch eingehend untersucht. Im Gegensatz zu *C. sticklandii* können andere Gram-positive Bakterien, wie *E. acidaminophilum* und *C. litorale* auch die N-methylierten Glycin-Derivate Betain und Sarkosin reduzieren (HORMANN & ANDREESEN, 1989; FENDRICH *et al.*, 1990; ANDREESEN, 1994). *Tissierella creatinophilum* ist in der Lage, Kreatinin vollständig über Kreatin, Sarkosin und Glycin zu den Produkten Acetat, Monomethylamin, Ammonium und Kohlendioxid zu reduzieren (HARMS *et al.*, 1998a, 1998b).

Das Glycin-Reduktase-System besteht aus drei Komponenten, dem Selenoprotein A (TURNER & STADTMAN, 1973; GARCIA & STADTMAN, 1991; 1992), den substratspezifischen Proteinen B, einem Komplex aus drei Untereinheiten (MEYER *et al.*, 1995; WAGNER, 1997; WAGNER *et al.*, 1999) und den Proteinen C, welche sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen (STADTMAN & DAVIS, 1991; SCHRÄDER & ANDREESEN, 1992). Die 22 kDa-Untereinheit des Glycin-spezifischen Protein B-Komplexes enthält eine Pyruvyl-Gruppe und entsteht zusammen mit der 25 kDa-Untereinheit aus einem 47 kDa-Protein GrdE (WAGNER *et al.*, 1999; BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001). Die dritte Untereinheit des Protein B-Komplexes, die 47 kDa-Untereinheit GrdB, enthält Selen in Form von Selenocystein

(WAGNER *et al.*, 1999; SONNTAG, 1998; GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001). Die Elektronen zur Reduktion des Glycins stammen aus dem NADPH und werden über das Thioredoxin-System auf das Selenoprotein A der Glycin-Reduktase übertragen. Das Thioredoxin-System besteht aus zwei Proteinen, der Thioredoxin-Reduktase und dem Thioredoxin (DIETRICH *et al.*, 1991).

Der Reaktionsmechanismus der Glycin-Spaltung gestaltet sich wie folgt (Abb. 1.1):

Glycin wird kovalent als Schiff'sche Base an eine Carbonyl-Gruppe der 47 kDa-Untereinheit des Proteinkomplexes B gebunden (TANAKA & STADTMAN, 1979; ARKOWITZ & ABELES, 1989, 1991; MEYER *et al.*, 1995; HARMS *et al.*, 1998b; WAGNER *et al.*, 1999; GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001). Dieses Protein enthält Selen in Form eines TGA-kodierten Selenocysteins. Es erfolgt ein nukleophiler Angriff des Selenol-Anions am α -C-Atom des Glycins, wodurch die C-N-Bindung gespalten wird und Ammonium und ein Carboxymethyl-Selenoether entstehen (ARKOWITZ & ABELES, 1990, 1991; STADTMAN & DAVIS, 1991; WAGNER *et al.*, 1999). Dieser wird vom Selenoprotein A übernommen und in einen Protein C-gebundenen Acetyl-Thioester überführt. Dieser Acetyl-Thioester wird zu Acetylphosphat gespalten und durch die Acetat-Kinase in Acetat und ATP umgesetzt (STADTMAN, 1989; ARKOWITZ & ABELES, 1989; 1990; 1991; STADTMAN & DAVIS, 1991; SCHRÄDER & ANDREESSEN, 1992; KOHLSTOCK, 2001). Die im Verlauf dieses Reaktionsmechanismus oxidierte Selenid-Sulfid-Gruppe am Selenoprotein A wird durch das Thioredoxin-System wieder reduziert (DIETRICH *et al.*, 1991; WAGNER *et al.*, 1999).

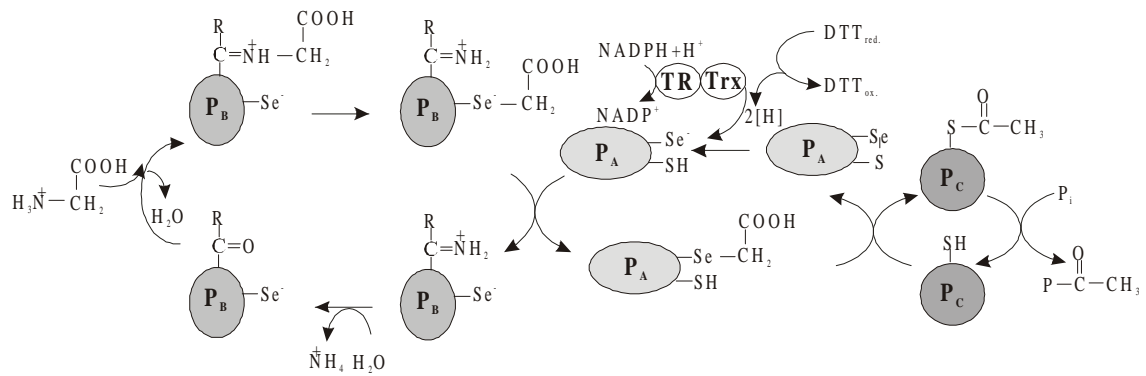


Abb. 1.1: Postulierter Reaktionsmechanismus der reduktiven Spaltung von Glycin durch die Glycin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (WAGNER, 1999). P_B : substratspezifischer Protein-B-Komplex, P_A : Selenoprotein A, P_C : Protein-C-Komplex, TR: Thioredoxin-Reduktase, Trx: Thioredoxin, P_i : anorganisches Phosphat

Die kodierenden Gene für die Proteine A, B und C des Glycin-Reduktase-Systems sowie für die Komponenten Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase des Thioredoxin-Systems sind in einem Operon organisiert (LÜBBERS & ANDREESEN, 1993; WAGNER *et al.*, 1999; GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001).

Die D-Prolin-Reduktase wurde bisher nur aus *C. sticklandii* biochemisch untersucht und teilweise charakterisiert (SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a; ABELES *et al.*, 1994).

Die D-Prolin-Reduktase wurde als ein membrangebundenes, homodekameres Protein mit einer molekularen Masse von 300 kDa beschrieben. Jede der zehn Untereinheiten enthält eine kovalent gebundene Pyruvyl-Gruppe (HODGINS & ABELES, 1967, 1969; SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a) und ist aminoterminal blockiert. Es wurde angenommen, daß die Pyruvyl-Gruppe in einem Peptid mit einer molekularen Masse von 4,6 kDa lokalisiert sei (SETO, 1979; 1980a; 1980b). Bei Zugabe von Selen zum Wachstumsmedium erreicht die D-Prolin-Reduktase eine dreifach höhere Enzymaktivität. Im Gegensatz zur Glycin-Reduktase wurde in der D-Prolin-Reduktase jedoch kein Selen nachgewiesen (SETO & STADTMAN, 1976).

Das Enzym katalysiert die reduktive C-N-Ringspaltung des D-Prolins in Gegenwart von Elektronendonatoren, z.B. DTT (HODGINS & ABELES, 1969; SETO, 1980a). Dabei wird D-Prolin durch eine enzymgebundene Pyruvyl-Gruppe aktiviert und der Ring soll durch einen nukleophilen Angriff des Dithiols auf das α -C-Atom des Prolins zu δ -

Aminovalerat gespalten werden. *In vivo* fungiert NADH als Elektronendonator, von dem aus die Elektronen über eine FAD-abhängige NADH-Dehydrogenase und ein eisenhaltiges Protein auf die D-Prolin-Reduktase übertragen werden sollen (STADTMAN, 1965; SCHWARTZ & MÜLLER, 1979; SETO, 1980a) (Abb. 1.2).

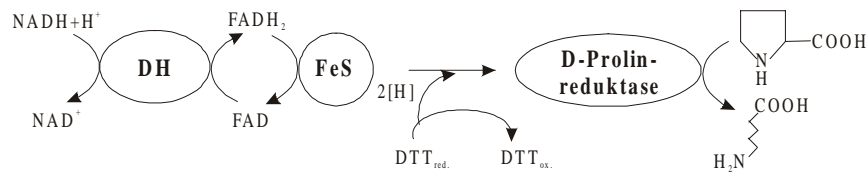


Abb. 1.2: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der reduktiven Spaltung von D-Prolin durch die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (SETO, 1980a). DH: FAD-abhängige NADH-Dehydrogenase, FeS: Eisen-Schwefel-Protein,

δ -Aminovalerat ist das Endprodukt der D-Prolin-Reduktase-Reaktion und kann im weiteren Stoffkreislauf durch andere strikt anaerobe Bakterien zu Ammonium, Acetat, Propionat, Butyrat und Valerat umgesetzt werden, z.B. durch *Clostridium aminovalericum* (HARDMAN & STADTMAN, 1960; BARKER *et al.*, 1987; EIKMANN & BUCKEL, 1991). Ein weiterer δ -aminovalerat-verwertender Organismus wurde von BARKER *et al.* (1987) isoliert. BUCKEL *et al.* (1994) charakterisierten diesen Organismus und bezeichneten ihn als *Clostridium viride*.

C. sticklandii kann δ -Aminovalerat auch aus Arginin bzw. seinem Abbauprodukt Ornithin über Prolin als Zwischenprodukt synthetisieren (DYER & COSTILOW, 1968). Die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase konnte in *C. sticklandii* charakterisiert werden (KENKLIES *et al.*, 1999).

Aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden Daten zum Reaktionsmechanismus und zur Regulation der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* sowie der möglichen Beteiligung einer noch nicht aufgeklärten Elektronentransportkette über zwei redoxaktive Proteine (ein Flavo- und ein eisenhaltiges Enzym), war das Ziel dieser Arbeit, die D-Prolin-Reduktase weiter proteinchemisch und auch molekularbiologisch zu untersuchen. Das Enzym sollte dazu zunächst bis zur Homogenität gereinigt und danach charakterisiert werden. Anschließend sollte das zugehörige Gen identifiziert und analysiert und der Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Reduktase untersucht werden.

2. MATERIAL

2.1. Organismen und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1, eingesetzte Vektoren und konstruierte Plasmide in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.1: Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>Clostridium sticklandii</i> (HF, DSM 519 ^T)	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>]	STRATAGENE GmbH, Heidelberg

Tab. 2.2: Plasmide und Vektoren

Plasmide/Vektoren	relevantes Merkmal ¹⁾	Herkunft/Referenz
pBluescript II SK+	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i> , ColE1, <i>f_{ori}</i>	STRATAGENE GmbH, Heidelberg
pGEM®-T	Amp ^r , <i>lacPOZ'</i> , <i>f_{ori}</i>	PROMEGA CORP., Madison, USA
pPRO1	pGEM®-T mit 1,3 kb-PCR-Fragment	diese Arbeit
pPRO2	pGEM®-T mit 0,9 kb-PCR-Fragment	diese Arbeit
pUK1	pBluescript II SK+ mit 4,85 kb-Fragment der <i>C. sticklandii</i> -Genbank	diese Arbeit

¹⁾Phänotypbezeichnungen: Amp^r: Ampicillinresistenz, POZ': Promotor, Operator und α -Peptid (N-terminale Aminosäuren 1-59) der β -Galaktosidase aus *E. coli*.

2.2. Nährmedien

Anaerobe Medien wurden nach der Hungate-Technik (HUNGATE, 1950, BRYANT, 1972) hergestellt und unter einer Stickstoffatmosphäre abgekühlt. Für Nähragar-Platten wurde BACTO-AGAR der Fa. DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA verwendet. Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.2.1. Minimalmedium für *C. sticklandii* (UHDE, 1990)

		Endkonzentration im Medium
Glycin	1,5 g	20 mM
L-Serin	2,1 g	20 mM
L-Threonin	2,4 g	20 mM
L-Arginin	3,5 g	20 mM
L-Lysin-HCl	3,65 g	20 mM
L-Histidin	0,47 g	3 mM
L-Tyrosin	0,02 g	0,11 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g	0,81 mM
NH ₄ Cl	0,5 g	9,3 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (10 g/l)	1 ml	68 µM
KP-Puffer (1 M, pH 7,0)	10 ml	10 mM
Aminosäurestammlösung	20 ml	
Spurenelementlösung SL A	1 ml	
Resazurin (1 g/l)	1 ml	4 nM
Vitaminlösung ^{*)}	5 ml	
NaHCO ₃ (84 g/l) ^{*)}	10 ml	10 mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O (60 g/l) ^{*)}	5 ml	1,25 mM
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml	

^{*)}Diese Komponenten wurden dem Medium vor dem Animpfen der Zellen steril zugesetzt.

Der pH-Wert des Mediums wurde nach dem Autoklavieren nochmals auf pH 7,0 korrigiert.

2.2.1.1. Vitaminlösung (GENTHNER *et al.*, 1981, mod.)

Na-Pantothenat	50 mg
Riboflavin	50 mg
Pyridoxamin-HCl	10 mg
D-(+)-Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Nicotinsäure	25 mg
Nicotinamid	25 mg
Thiamin-HCl	50 mg
Cyanocobalamin	50 mg
p-Aminobenzoessäure	50 mg
α -Liponsäure	60 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Die Vitaminlösung wurde steril filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.2. Spurenelementlösung SL A (HORMANN & ANDREESEN, 1989, mod.)

		Endkonzentration im Medium
HCl (25 %, v/v)	10 ml	
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g	7,5 x 10 ⁻⁶ M
ZnCl ₂	0,07 g	5,1 x 10 ⁻⁷ M
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g	5,1 x 10 ⁻⁷ M
H ₃ BO ₃	0,006 g	9,7 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g	8,0 x 10 ⁻⁸ M
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002 g	1,2 x 10 ⁻⁸ M
NiCl ₂ x 2 H ₂ O	0,024 g	1,0 x 10 ⁻⁷ M
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036 g	1,5 x 10 ⁻⁷ M
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,033 g	1,0 x 10 ⁻⁷ M
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,26 g	1,0 x 10 ⁻⁶ M
Na ₂ VO ₃ x 2 H ₂ O	0,014 g	1,0 x 10 ⁻⁷ M
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml	

FeCl₂ x 4 H₂O wurde zunächst in der 25 %igen HCl gelöst, danach erfolgte die Zugabe der anderen Komponenten. Die Spurenelementlösung SL A wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.3. Aminosäurestammlösung (UHDE, 1990)

L-Valin	2,93 g
L-Leucin	3,28 g
L Isoleucin	3,28 g
L-Prolin	2,88 g
L-Cystein	3,03 g
L-Methionin	3,73 g
L-Phenylalanin	4,13 g
L-Tryptophan	5,11 g
L-Glutamat	3,68 g
L-Glutamin	3,66 g
L-Asparagin	3,75 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Bei Zugabe von 20 ml dieser Lösung zu 980 ml Nährmedium lagen alle Aminosäuren in einer Konzentration von 0,5 mM vor. Die Aminosäurestammlösung wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2. Komplexmedium für *C. sticklandii* (STADTMAN, 1978, mod.)

Trypton	20 g
Hefeextrakt	10 g
KH ₂ PO ₄	0,68 g
K ₂ HPO ₄	1,04 g
Spurenelementlösung SL A	1 ml
Resazurin (1 g/l)	1 ml
Na ₂ S x 9 H ₂ O (60 g/l) ^{*)}	10 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

^{*)}Diese Komponente wurde dem Medium vor dem Animpfen der Zellen steril zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde nach dem Autoklavieren auf pH 7,0 eingestellt.

2.2.3. Luria Bertani Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

2.2.4. SOC-Medium (PROMEGA CORP.)

Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl (1 M)	1 ml
KCl (1 M)	0,5 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O / MgSO ₄ x 7 H ₂ O (je 1 M) ^{*)}	1 ml
Glukose (2 M) ^{*)}	1 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

^{*)}Diese Komponenten wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugesetzt.

2.2.5. Medienzusätze

Zur Selektion transformierter *E. coli*-Zellen zugegebene Substanzen sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Zugabe erfolgte nach Abkühlung der autoklavierten Medien auf mindestens 50 °C. Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.3: Medienzusätze

Substanzen	Stammlösung	Konzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
IPTG	40 mg/ml H ₂ O _{dest.}	40 µg/ml
X-Gal	48 mg/ml DMF	48 µg/ml

2.3. Chemikalien

Falls nachfolgend nicht anders angegeben, wurden Chemikalien des höchsten handelsüblichen Reinheitsgrades von den Firmen SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, (Deisenhofen) und MERCK (Darmstadt) bezogen. Darüber hinaus erfolgte der Einsatz von Chemikalien folgender Firmen:

AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH GmbH, Freiburg:

Phenylsepharose[®]CL-4B, EAH-Sepharose[®]4B, Superose 6 HR 10/30, HMW-Molekulargewichtsmarker, "AutoRead Sequencing KIT", Fluore-15-ATP, T7-DNA-Polymerase

APPLIGENE ONCOR, Heidelberg:

Ampicillin, Lysozym, Restriktionsenzyme

BIORAD:

Biobeads

BIOZYM DIAGNOSTIK GmbH, Hess. Oldendorf:

Tfl-DNA-Polymerase

CARL ROTH GmbH + Co, Karlsruhe:

IPTG, X-Gal, Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung 40% (v/v), Ethanol, Methanol (HPLC), Einmal-Sterilfilter

DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA:

BACTO-AGAR

MESSER GRIESHEIM GmbH, Frankfurt:

N₂

MILLIPORE GmbH, Eschborn:

PVDF-Membran "Immobilon P"

NEW ENGLAND BIOLABS GmbH, Schwalbach:

Restriktionsenzyme

QIAGEN GmbH, Hilden:

DNA-Extraktions-KIT, DNA- bzw. RNA-Isolierungs-KIT, Nylon-Membranen

ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim:

DNase I, RNase A, RNA-Größenstandard, "DIG DNA Labeling Kit", "DIG Luminescent Detection Kit", Restriktionsenzyme

3. METHODEN

3.1. Zellanzucht

3.1.1. Anzuchtbedingungen

Die Anzucht von *C. sticklandii*-Kulturen bis zu 10 ml erfolgte anaerob in Hungate-Röhrchen mit Butyl-Gummi-Septen (Fa. BELLCO GLASS INC., Vineland, New Jersey, USA). Kulturen im Maßstab von 50 ml bis 500 ml wurden in Schraubverschlußflaschen (Fa. MAAG, Hübendorf) mit Gummisepten (Fa. MÜLLER & KREMPEL, Zürich, Schweiz) kultiviert. Die Zellen wurde immer 10 %ig angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen zur Proteinreinigung wurden freundlicherweise von Dr. A. Pich (Institut für Mikrobiologie, MLU Halle) zur Verfügung gestellt.

E. coli-Zellen wurden in LB-Flüssigmedium (2.2.3.) bzw. auf Nähragarplatten bei 37 °C über Nacht angezogen. Im Bedarfsfall erfolgte die Zugabe von Medienzusätzen (2.2.5.).

3.1.2. Reinheitskontrolle und Stammhaltung

Die *C. sticklandii*-Kulturen wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop auf einheitliche Zellmorphologie untersucht. Zur Stammhaltung wurden die Kulturen in Hungate-Röhrchen mit Glycerin (Endkonzentration 20 % v/v) versetzt und bei -20 °C aufbewahrt. Eine Überprüfung der *E. coli*-Kulturen erfolgte mittels Vereinzelausstrichen auf Agarplatten. Stammkulturen von *E. coli* wurden durch Zugabe von Glycerin zu logarithmisch wachsenden Kulturen (Endkonzentration 25 % v/v) hergestellt und bei -80 °C eingefroren.

3.1.3. Messung des Bakterienwachstums

Der Wachstumsverlauf der *C. sticklandii*-Kulturen wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm direkt in Hungate-Röhrchen in einem Spectronic 20⁺ Spektrophotometer (Fa. OCHS, Bovenden) oder in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer UV1202 (Fa. SHIMADZU, Jena) gegen unbeimpftes

Nährmedium gemessen. Bei Überschreitung einer OD_{600} von 0,3 wurden die Proben mit unbeimpftem Nährmedium verdünnt.

3.1.4. Zellernte

Die Zellernte erfolgte bei 4 °C durch Zentrifugation für 10 min in einer Hettich Universal 30 RF-Zentrifuge (Fa. HETTICH-ZENTRIFUGEN, Tuttlingen) bei 13 000 x g in 30 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen bzw. für 5 min bei 23 000 x g in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Die abzentrifugierten Zellen wurden bei -80 °C gelagert oder sofort verwendet.

3.2. Proteinchemische Methoden

Alle Arbeiten mit Proteinlösungen erfolgten soweit nicht anders angegeben bei 4 °C.

3.2.1. Herstellung von Proteinrohextrakt

Je 1 g *C. sticklandii*-Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 1,5 ml TED-Puffer aufgenommen. Zum Zellaufschluß wurde der Zellsuspension 1/10 des Volumens Lysozymlösung zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch ein- bis dreimalige Passage durch eine vorgekühlte French-Press bei einem Druck von 1 100 psi (Fa. AMERICAN INSTRUMENTS COMP. INC., Silver Spring, Maryland, USA) vollständig aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 20 min bei 13 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in einer Ultrazentrifuge (Fa. BECKMAN, USA) 1 h bei 120 000 x g zentrifugiert. Der Überstand bei -20 °C eingefroren oder sofort verwendet.

Die Membranen wurden in TED-Puffer oder TED-Puffer mit 0,1 M KCl aufgenommen und durch eine weitere Ultrazentrifugation (s.o.) gewaschen. Die Membranen wurden in 1 ml TED-Puffer resuspendiert, mit 1 % (v/v) Triton X 100 und 1,5 % (v/v) Natriumdesoxycholat versetzt und 30 min gerührt. Die Entfernung der Detergenzien erfolgte durch Zugabe von Biobeads (Fa. BIORAD) und Rühren für 1 h. Der Ansatz wurde bei 4 000 x g kurz zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C aufbewahrt.

Der Aufschluß kleiner Zellmengen erfolgte mit einem Ultraschallgerät. Beschallt wurde kontinuierlich 6 x 10 s. Dazwischen wurde die Probe jeweils 20 s im Eisbad abgekühlt.

<u>TED-Puffer, pH 8,6:</u>	TRIS	6,050 g	50 mM
	EDTA	0,372 g	1 mM
	DTT	0,154 g	1 mM
	H ₂ O _{dest}	ad 1 000 ml	

<u>Lysozymbilösung:</u>	Lysozym	10 mg
	DNase I	1 mg
	PMSF (0,2 M in Isopropanol)	10 µl
	TED, pH 8,6	ad 1 ml

3.2.2. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

20 µl Probe wurden in einer 1 ml Kunststoffküvette mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 595 nm gegen Puffer gemessen. Die Eichkurve wurde mit BSA im Bereich von 0-20 µg/µl aufgenommen.

<u>Bradford-Reagenz:</u>	Serva Blau G 250	70 mg
	Ethanol (96% [v/v])	50 ml
	H ₃ PO ₄ (85% [v/v])	100 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

3.2.3. Bestimmung der Enzymaktivität

3.2.3.1. Fluorimetrischer Test (SETO, 1979, mod.)

<u>Standardisierter Testansatz:</u>	0,5 M KP-Puffer, pH 8,0	100 μ l
	0,1 M MgCl ₂	50 μ l
	0,2 M DTT	50 μ l
	0,1 M D-Prolin	50 μ l
	Protein	x μ l
	H ₂ O _{dest}	ad 500 μ l

Die Enzymreaktion wurde mit Proteinlösung gestartet. Der Ansatz wurde 30-60 min bei 30 °C in einem Thermoblock (Fa. EPPENDORF, Hamburg) inkubiert und die Reaktion anschließend mit 300 μ l 5 % (v/v) Perchlorsäure abgestoppt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 23 000 x g und 4 °C. Als Leerwert wurde ein Ansatz ohne D-Prolin mitgeführt.

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte bei RT in einem Fluoreszenzphotometer (Fa. KONTRON AG, Zürich, Schweiz) bei einer Extinktion von 330 nm und einer Emission von 450 nm. Dazu wurden 50 μ l Probe mit 1,95 ml o-Phthaldialdehydlösung gemischt und nach 30 s gemessen. Vor jeder Meßreihe wurde das Fluoreszenzphotometer mit einem δ -Aminovalerat-Standard (60 nmol/50 μ l) kalibriert.

<u>o-Phthaldialdehydlösung</u>	0,4 M K ₃ BO ₃ -Puffer, pH 9,7	100 ml
	β -Mercaptoethanol	200 μ l
	o-Phthaldialdehyd (80 mg/ml in Ethanol)	1 ml

3.2.3.2. Aktivitätsbestimmung im nativen Gel

Für die Aktivitätsbestimmung im nativen Gel (3.2.7.2.) wurde das Gel nach dem Lauf 5 x kurz mit 20 ml 100 mM KP-Puffer, pH 8,0 gewaschen. Die Spuren des Gels wurden anschließend mit einem Skalpell in 3 mm breite Stücke zerschnitten. Die Gelabschnitte wurden zum Testansatz (3.2.3.1.) gegeben und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am

nächsten Tag erfolgte die Aktivitätsbestimmung der Proben am Fluoreszenzphotometer wie unter 3.2.3.1. beschrieben.

3.2.4. Dialyse und Einengen von Proteinlösungen

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden Dialyseschläuche (Fa. SERVA, Heidelberg) mit unterschiedlichen Porendurchmessern verwendet. Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch nach Anleitung des Herstellers gekocht, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Proteinlösungen wurden im Dialyseschlauch unter langsamem Rühren für mehrere Stunden gegen ein bis zu 1 000-faches Volumen des neuen Puffers dialysiert. Der Puffer wurde dabei zweimal gewechselt.

Das Einengen von Proteinlösungen erfolgte je nach Menge entweder durch Zentrifugation in Centricon-Konzentratoren mit einer Ausschlußgrenze von 10 000 Da (Fa. AMICON, Witten) oder durch Einlegen der in einen Dialyseschlauch gegebenen Proteinlösung in festes PEG-6000.

3.2.5. Methoden zur Proteinreinigung

3.2.5.1. Ammoniumsulfatfällung

Nach der Ultrazentrifugation wurde der cytoplasmatische Überstand zunächst bis 25 % (w/v), anschließend bis 60 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Nach Zugabe der errechneten Ammoniumsulfat-Mengen (WOOD, 1976) wurde jeweils 45 min unter Rühren äquilibriert und das ausgefallene Protein anschließend 20 min bei 11 000 x g in einer Beckman-Zentrifuge J2-21 (Fa. BECKMAN, USA) abzentrifugiert.

3.2.5.2. Säulenchromatographie

Die säulenchromatographischen Trennungen der D-Prolin-Reduktase von den anderen Proteinen des Rohextraktes wurden mit einem HighLoad-Gerät sowie einem FPLC-Gerät (Fa. AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH GmbH, Freiburg) durchgeführt. Die gepackten Säulen wurden vor dem Auftragen der Proteinlösung mit dem entsprechenden Puffer bis zu einer konstanten Extinktion des Eluates äquilibriert. Nach dem Auftragen

der Proteinlösung wurde die Säule zunächst mit Äquilibrationpuffer gewaschen und anschließend entsprechend der verwendeten Elutionsmethode mit ansteigendem oder abfallendem Salzgradienten eluiert.

Tabelle 3.1: Molekulare Massen und Konzentrationen der Eichproteine für die Größenausschlußchromatographie.

	Protein	Molekulargewicht [kDa]	Konzentration [mg/ml]
Proteinlösung I	Chymotrypsinogen A	25	3
	Aldolase	158	2
	Ferritin	440	0,6
	Blue Dextran	2 000	1
Proteinlösung II	Rinderserumalbumin	67	6,5
	Katalase	232	3
	Thyroglobulin	669	2

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

Stark verdünnte oder salzhaltige Proteinlösungen wurden mittels einer Chloroform-Methanol-Fällung gefällt. 100 µl Proteinlösung wurden mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform versetzt und geschüttelt. Es wurden 300 µl H₂O_{dest} zugegeben, nochmals geschüttelt und der Ansatz 5 min bei 8 000 x g in einer Tischzentrifuge (Fa. EPPENDORF, Hamburg) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgehoben und verworfen. Die untere Phase und die Interphase wurden mit 300 µl Methanol versetzt, vorsichtig geschwenkt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das ausgefallene Protein luftgetrocknet und in H₂O_{dest} und der entsprechenden Menge Probenpuffer aufgenommen.

3.2.7. Elektrophoretische Methoden

3.2.7.1. SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970)

Mit der SDS-PAGE wurden der Verlauf der Proteinreinigung verfolgt und das Molekulargewicht der D-Prolin-Reduktase unter denaturierenden Bedingungen bestimmt. Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-Gelapparatur der Fa. BIOMETRA, Göttingen durchgeführt. Es wurden diskontinuierliche Gele aus einem 12 %igen (v/v) Trenngel und einem 3,76 %igen (v/v) Sammelgel hergestellt.

<u>Trenngel, 12 % (v/v):</u>	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40 % (v/v))	15 ml
	3 M TRIS/HCl, pH 8,8	6,25 ml
	SDS 10 % (w/v)	0,5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml
<u>Sammelgel, 3,76 % (v/v):</u>	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40 % v/v)	4,7 ml
	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8	12,5 ml
	SDS 10 % (w/v)	0,5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml

Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese bis knapp über die Geltaschen mit 1:10 verdünntem Elektrodenpuffer gefüllt.

<u>Elektrodenpuffer (10 x):</u>	TRIS/HCl	121 g
	Glycin	75 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Die Proben wurden in einem Verhältnis von 4:1 mit Denaturierungspuffer (HARRIS & ANGEL, 1989, mod.) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz in einer Tisch-zentrifuge zentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der MW-SDS-70-KIT (Fa. ALDRICH-SIGMA CHEMIE, Deisenhofen) verwendet. 10 µl dieses Markers wurden wie die Proben vorbereitet und aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde zum Einwandern der Proben bei 25 mA, danach bei 40 mA durchgeführt.

<u>Denaturierungspuffer:</u>	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8	2,5 ml
	SDS	1 g
	Glycerin	2 ml
	Bromphenolblau (0,1 % [w/v])	2 ml
	β -Mercaptoethanol	2 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 10 ml

<u>MW-SDS-70-Kit:</u>	Lysozym	14,3 kDa
	β -Lactoglobulin (Untereinheit)	18,4 kDa
	Trypsinogen	24,0 kDa
	Pepsin	34,7 kDa
	Ovalbumin	45,0 kDa
	Rinderserumalbumin	66,0 kDa

3.2.7.2. Native Gradienten-PAGE

Die native Gradienten-PAGE diente der Bestimmung des Molekulargewichtes der D-Prolin-Reduktase unter nicht denaturierenden Bedingungen. Es wurde das unter 3.2.7.1. beschriebene Laemmli-System ohne Zusatz von SDS verwendet. Das Trenngel wurde mit einem Gradientenmischer in einem Bereich von 3 % (v/v)-27 % (v/v) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe gegossen. Das Sammelgel wurde unter Verwendung der 3 %igen Acrylamidlösung wie unter 3.2.7.1. beschrieben hergestellt.

<u>Acrylamidlösung, 3 % (v/v):</u>	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40 % v/v)	3,75 ml
	3 M TRIS/HCl, pH 8,8	6,25 ml
	Glycerin	-
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml

<u>Acrylamidlösung, 27 % (v/v):</u>	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40 % v/v)	33,75 ml
	3 M TRIS/HCl, pH 8,8	6,25 ml
	Glycerin	4 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml

Als Molekulargewichtsmarker wurde der HMW-KIT der Fa. AMERSHAM-PHARMACIA verwendet. Die Proben und 5 µl Marker wurden in einem Verhältnis von 4:1 mit Beschwererlösung versetzt und in die Geltaschen des vorbereiteten Geles pipettiert.

<u>Beschwererlösung:</u>	Saccharose (40 % [w/v])
	Bromphenolblau (0,05 % [w/v])

<u>HMW-Kit</u>	Rinderserumalbumin	67 kDa
	Lactat-Dehydrogenase	140 kDa
	Katalase	232 kDa
	Ferritin	440 kDa
	Thyroglobulin	669 kDa

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C und 100 V über Nacht durchgeführt.

<u>Elektrodenpuffer:</u>	TRIS	12,1 g
	Glycin	7,5 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

3.2.8 Färben und Trocknen von Polyacrylamidgelen

3.2.8.1. Coomassie-Färbung (WEBER und OSBORN, 1969, mod.)

Die Gele wurden in einer Glasschale 30 min in Färbelösung geschwenkt, danach in Entfärberlösung entfärbt und gewässert. Die Entfärberlösung wurde mehrmals gewechselt.

<u>Färbelösung:</u>	Serva Blau G 250	1,2 g
	Methanol	227 ml
	Eisessig	46 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 500 ml
 <u>Entfärberlösung:</u>		
	Methanol	330 ml
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 000 ml

3.2.8.2. Silberfärbung (BLUM, 1987, mod.)

Die Gele wurden in einer Glasschale unter ständigem Schwenken gefärbt:

1. 1 h in Fixierlösung inkubieren
2. 3 x 10 min mit Waschlösung oder H₂O_{dest} waschen
3. 1 min in Lösung I inkubieren
4. 3 x 20 s mit H₂O_{dest} waschen
5. 20 min in Lösung II inkubieren
6. 2 x 20 s mit H₂O_{dest} waschen
7. Inkubation in Lösung III, bis die Proteinsignale erkennbar sind (max. 10 min)
8. 2 x 20 s mit H₂O_{dest} waschen
9. 15 min in Stopplösung inkubieren
10. mindestens 20 min mit H₂O_{dest} waschen

Erfolgte die Silberfärbung im Anschluß an eine Coomassiefärbung, wurde mit Schritt 3 begonnen.

<u>Fixierlösung:</u>	Methanol	500 ml
	Eisessig	120 ml
	Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

<u>Waschlösung:</u>	Ethanol	500 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
<u>Lösung I:</u>	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,2 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
<u>Lösung II:</u>	AgNO ₃	2 g
	Formaldehyd (37 % [v/v])	0,75 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
<u>Lösung III:</u>	Na ₂ CO ₃	60 g
	Lösung I	0,5 ml
	Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
<u>Stopplösung:</u>	Methanol	500 ml
	Eisessig	120 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

3.2.8.3. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Die gefärbten Gele wurden 15 min in einer Lösung aus 3 % (v/v) Glycerin und 10 % (v/v) Methanol inkubiert und anschließend auf einem Gelrockner GSD-4 (Fa. AMERSHAM-PHARMACIA) zwischen zwei Lagen Zellophan-Folie 75 min bei 40 W getrocknet.

3.2.9. Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurden die Proteine aus ungefärbten Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran (Fa. MILLIPORE, Eschwege) übertragen. Die Proteinübertragung erfolgte durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Tank-Blot-Apperatur (Fa. BIOMETRA, Göttingen). Die PVDF-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, 2 min in Methanol und weitere 10 min in CAPS-Puffer äquilibriert.

Weiterhin wurden 6 Filterpapierstücke (Whatman-3MM-Chromatographie-Papier) und die beiden Fiberkissen in CAPS-Puffer eingelegt. Das Gel wurde 5 min in CAPS-Puffer gewaschen und die Blotkammer mit CAPS-Puffer gefüllt. Auf ein Fiberkissen wurden drei Lagen Filterpapier, das Gel, die PVDF-Membran, drei Lagen Filterpapier sowie das zweite Fiberkissen luftblasenfrei gestapelt und zwischen den Halteplatten in die Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte unter leichtem Rühren für 1 h bei 250 mA und für weitere 30 min bei 350 mA.

<u>CAPS-Puffer:</u>	0,1 M CAPS, pH 11 mit NaOH	100 ml
	Methanol (HPLC _{rein})	100 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Die Membran wurde 2 min gefärbt, 2-5 min entfärbt und an der Luft getrocknet.

<u>Färber:</u>	Coomassie Brilliant Blau R-250	0,1 g
	Methanol	50 ml
	Eisessig	7,5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 100 ml

<u>Entfärber:</u>	Methanol	50 ml
	Eisessig	7,5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 100 ml

3.2.10. Chemische Modifikation von Proteinen

3.2.10.1. Markierung mit Fluorescein-Thiosemicarbacid (FTSC)

Aufgrund der Spezifität von FTSC für Carbonylgruppen wurden Proteine nach dem Prinzip von BAUMANN *et al.* (1981) mit dieser Verbindung umgesetzt.

Dazu wurden 10 µg Protein mit 10 µl 0,3 M Kaliumacetat-Puffer, pH 4,6 und 1 µl 0,1 % w/v FTSC in DMSO versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 80 µl H₂O_{dest} zugegeben und der Ansatz einer Methanol-Chloroform-Fällung (3.2.6.) unterzogen. Nach einer SDS-PAGE (3.2.7.1.) wurde das markierte Protein an

einem PhosphorImager "Storm" (Fa. MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld) im blauen Fluoreszenzbereich detektiert.

3.2.10.2. Modifikation durch o-Phenylendiamin (DIXON & FIELDS, 1972)

Proteine, deren N-Termini durch eine α -Ketocarbonsäure blockiert sind, können durch Umsatz mit o-Phenylendiamin und daraus resultierender Abspaltung dieser Gruppe der aminoterminalen Sequenzierung über den Edman-Abbau zugänglich gemacht werden.

Es wurden zwei Volumina Proteinlösung (ca. 20 μ g) mit einem Volumen 0,12 M o-Phenylendiamin in 0,75 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,8 versetzt und 17 h bei 37 °C inkubiert. Durch eine Chloroform-Methanol-Fällung (3.2.6.) wurde das deblockierte Protein anschließend gefällt.

3.2.10.3. Markierung mit [¹⁴C]-L-Prolin

Die D-Prolin-Reduktase wurde von Dr. A. Pich (Institut für Mikrobiologie, MLU Halle) mit [¹⁴C]-L-Prolin (> 8,33 GBq/mmol, AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg) markiert. Da nur [¹⁴C]-L-Prolin kommerziell verfügbar war, wurden 100 μ g gereinigtes Protein und 0,5 mg Rohextrakt, welcher die Prolin-Racemase enthielt (RUDNICK & ABELES, 1975), gemischt und mit [¹⁴C]-L-Prolin als Substrat im Enzymtest (3.2.3.1.) bei 30 °C 2 min inkubiert. Anschließend wurden 150 μ l 200 mM NaBH₄ zugegeben, um das über eine Schiff'sche Base an das Protein gebundene ¹⁴C-Prolin zu reduzieren und eine kovalente Bindung herzustellen. Das Protein wurde in einer SDS-PAGE getrennt, die Gelspur in Stücke zerschnitten und die Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen.

3.2.10.4. Modifikation von Cysteinen mit 4-Vinylpyridin

Um das Phenylthiocarbamoylderivat von Cystein bei der Aminosäuresequenzanalyse nachweisen zu können, wurden die D-Prolin-Reduktase mit 4-Vinylpyridin umgesetzt. Das gereinigte und durch eine Chloroform-Methanol-Fällung (3.2.6.) entsalzte Protein wurde in 50 μ l 6 M Guanidinhydrochlorid in 250 mM TRIS/HCl, pH 8,5 gelöst. Zum Ansatz wurden 2,5 μ l β -Mercaptoethanol zugegeben und dieser 2 h bei Raumtemperatur

unter Lichtausschluß inkubiert, um die Disulfidbrücken zu reduzieren. Die Modifikation der Cysteinreste erfolgte nach Zugabe von 2 µl 4-Vinylpyridin bei Raumtemperatur ebenfalls im Dunkeln für 2 h unter N₂-Atmosphäre. Die pyridylethylierten Proteine wurden entsalzt und über Reversed Phase-Chromatographie (ET 125/5 Nucleosil 500-C₃PPN, MACHEREY & NAGEL, Düren) getrennt. Diese Bestimmung wurde von Dr. P. Rücknagel (Forschungsstelle Enzymologie der Peptidfaltung der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

3.2.10.5. Bestimmung von Selenocystein

Die D-Prolin-Reduktase wurde von Dr. P. Rücknagel auf den Gehalt an Selenocystein untersucht. Dazu wurden zunächst die Cysteine, einschließlich eventuell vorhandener Selenocysteine, mit 4-Vinylpyridin modifiziert. Das gereinigte Protein wurde in 50 µl 250 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0 mit 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 mM EDTA, 0,3 mg Tricarboxyethylphosphin und 2 µl 4-Vinylpyridin für 2 h unter Stickstoff-Atmosphäre inkubiert. Das Selenocystein enthaltende Peptid wurde entsalzt, über Reversed Phase-Chromatographie getrennt und mittels Edman-Abbau sequenziert (3.2.11.). Als Referenzsubstanz wurde ein selenocysteinhaltiges synthetisches Peptid, welches von S. Pegoraro (MPI für Biochemie, München) zur Verfügung gestellt wurde, eingesetzt.

3.2.11. Proteinsequenzierung

Die aminoterminalen Sequenzierung der auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine (3.2.9.) wurden von Dr. P. Rücknagel an einem Proteinsequenzer (Modell 476A, APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt) durchgeführt.

Um interne Proteinsequenzen zu erhalten, wurden die Proteine im Gel mit Trypsin, Proteine auf der Membran mit Endoproteinase Lys-C über Nacht bei 37 °C in 120 mM NH₄HCO₃, pH 8,5 verdaut. Die Analyse der molekularen Masse der Peptide erfolgte an einem MALDI-Massen-Spektrometer (BRUKER FRANZEN) bei Dr. A. Schierhorn (Institut für Biochemie, MLU-Halle-Wittenberg). Die Peptide wurden an einer Reversed Phase-HPLC-Säule an einem HPLC-System (SHIMADZU, Duisburg) getrennt und mittels Edman-Abbau sequenziert.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit 96 % Ethanol gespült oder abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert. Für das Arbeiten mit RNA wurden aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber RNasen alle Geräte und Lösungen mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und doppelt autoklaviert. RNA-haltige Lösungen wurden aliquotiert, bei -80 °C aufbewahrt und erst kurz vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.

3.3.2. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen erfolgte eine Extraktion mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1). Die Phasen wurden durch Schwenken gut gemischt und zur Phasentrennung für 2 min bei 12 000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde sorgfältig abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Der resultierende Überstand wurde anschließend gefällt (3.3.3.).

3.3.3. Fällung von DNA

Um den Gehalt an monovalenten Kationen zu erhöhen, wurden dem Ansatz zunächst 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat oder 0,5 Volumen 7 M Ammoniumacetat zugegeben. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (96 %) oder 0,7-0,8 Volumen Isopropanol. Der Ansatz wurde 10-30 min bei -20 °C inkubiert und bei 23000 x g 10-20 min zentrifugiert. Die ausgefallene DNA wurde mit 70 %igem (v/v) eiskalten Ethanol gewaschen, nochmals 10 min zentrifugiert und an der Luft oder in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac Concentrator, Fa. BACHOFER, Reutlingen) getrocknet. Anschließend wurde die DNA in dem gewünschten Volumen H₂O_{dest.} aufgenommen.

3.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in Quarzglasküvetten bestimmt. Eine $OD_{260} = 1$ entsprach dabei 50 μg doppelsträngiger DNA bzw. 40 μg RNA.

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung konnte durch das Verhältnis $OD_{260} : OD_{280}$ ermittelt werden. Bei proteinfreien DNA-Lösungen sollte der Wert zwischen 1,7 und 1,8 liegen.

3.3.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

3.3.5.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA wurden horizontale Agarose-Gel-Elektrophoresen in Kammern der Fa. BIOMETRA, Göttingen durchgeführt. Zur Trennung von Plasmid-DNA wurden 1,25 %ige Agarose-Gele (w/v) in TAE-Puffer hergestellt, der auch als Laufpuffer diente. Für die Trennung chromosomaler DNA wurden 0,7 %ige (w/v) Gele verwendet. Die Proben wurden vor der Auftrennung im Verhältnis 4:1 mit Stop-Lösung versetzt. Nach der Elektrophorese bei 80 V wurde die DNA für 10-15 min in Ethidiumbromid-Lösung (1 μg Ethidiumbromid/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) gefärbt und kurz gewässert. Die DNA-Banden wurden mit einem Image Master™ VDS (PHARMACIA, Freiburg) sichtbar gemacht und fotografiert.

<u>TAE-Puffer (20 x), pH 8,0:</u>	TRIS	96,88 g
	EDTA	7,446 g
	Essigsäure	22,84 ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

<u>Stop-Lösung (5 x):</u>	Glycerol	4 ml
	SDS	0,01 g
	EDTA	0,372 g
	Bromphenolblau	0,02 g
	1 x TAE-Puffer	ad 10 ml

3.3.5.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehydhaltigen Agarose-Gel. Zur Herstellung von 100 ml eines 1,5 %igen (w/v) Gels wurden 1,5 g Agarose in 87 ml H₂O_{dest.} und 10 ml 10 x MOPS-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50 °C wurden 3 ml 37 %, (v/v) Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen.

<u>MOPS-Puffer (10 x), pH 7,0</u>	MOPS	41,8 g
	Natriumacetat	4,1 g
	EDTA	1,86 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Die RNA-Proben wurden wie folgt vorbereitet:

RNA-Lösung (mind. 1 µg)	6 µl
MOPS-Puffer (10 x)	2,5 µl
Formamid	12,5 µl
Formaldehyd (37 % [v/v])	4 µl

Die Ansätze wurden 15 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 3 µl Stop-Lösung und 1 µl Ethidiumbromid wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 2-3 h bei 50 V in 1 x MOPS-Puffer, bis die Lauffront das untere Drittel des Gels erreicht hatte.

<u>Stop-Lösung:</u>	Glycerol	5 ml
	SDS	0,01 g
	EDTA	0,372 g
	Bromphenolblau	0,01 g
	1 x MOPS-Puffer	ad 10 ml

3.3.5.3. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Herstellung von Größenstandards für lineare DNA-Fragmente wurde DNA des Phagen λ mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *Hind* III vollständig verdaut. Die entstehenden Fragmentgrößen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Tabelle 3.2: DNA-Größenstandards

Restriktionsenzym	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III
Fragmentgröße in kb:	14,055	23,130
	11,497	9,416
	5,077	6,682
	4,749	4,361
	4,507	2,322
	2,838	2,027
	2,560	0,564
	2,459	
	2,443	
	2,140	
	1,986	
	1,700	
	1,159	
	1,093	
	0,805	
	0,514	
	sowie 14 kleinere Fragmente	

Für die Größenbestimmung von mRNA wurde ein Größenstandard der Fa. ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim verwendet. Dieser wies folgende RNA-Größen auf:

RNA in kb: 7,4 5,3 2,8 1,9 1,6 1,0 0,6 0,4 0,3

3.3.6 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.6.1. Isolierung von Gesamt-DNA (BERTRAM & DÜRRE, 1989, mod.)

3 g *C. sticklandii*-Zellen wurden in 10 ml Saline-EDTA-Puffer (SE-Puffer) suspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 10 mg Lysozym, gelöst in wenig SE-Puffer, zugegeben und der Ansatz mindestens 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Proteinase K-Lösung (2,5 mg/ml 1 x Standard-Saline-Citrat-Puffer (SSC-Puffer) sowie 0,5 ml SDS (25 % [w/v]) zugegeben. Klarte die Lösung noch nicht auf, erfolgte nochmals eine Zugabe von 0,5 ml SDS. Es wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 5 M Na-Perchlorat bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugesetzt. Daran schloß sich eine zweimalige Extraktion mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) an. Zur Phasentrennung wurde jeweils 20 min bei 4 000 x g zentrifugiert. Nach der zweiten Extraktion wurde die wäßrige Phase mit einer umgedrehten Glaspipette abgenommen, in einen Standzylinder überführt und mit 1,5 Volumen 96 %igem (v/v) Ethanol überschichtet. Da die DNA nicht gewickelt werden konnte, wurde der Inhalt des Standzylinders kurz gemischt und 20 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Die ausgefallene DNA wurde mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 ml 0,1 x SSC gelöst. Die Lösung wurde mit 0,75 ml RNase-Lösung versetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Proteinase K-Lösung und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde zunächst die SSC-Konzentration durch Zugabe von 10 x SSC auf 1 x SSC erhöht und der Ansatz nochmals einer Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen (s. o.). Die DNA wurde mit 2 Volumen Ethanol gefällt, 20 min bei 13 000 x g zentrifugiert, mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 5 ml 0,1 x SSC-Puffer gelöst. Die Qualität der erhaltenen DNA wurde in einem Agarose-Gel überprüft.

Die DNA wurde durch Zugabe von 2 ml 7 M Ammoniumacetat und 0,8 Volumen Isopropanol umgefällt, 20 min bei 13 000 x g abzentrifugiert und mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und in 100 µl-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

<u>SE-Puffer, pH 8,0:</u>	NaCl	0,15 M
	EDTA	0,1 M
<u>SSC-Puffer (10 x), pH 7,0:</u>	NaCl	1,5 M
	Na ₃ -Citrat	0,15 M
<u>RNase-Lösung (DNase-frei):</u>	RNase A	2 mg
	RNase T1	1 mg
	0,15 M NaCl, pH 5,0	1 ml

Die RNase-Lösung wurde zur Inaktivierung der DNasen 10 min bei 80 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

<u>TE-Puffer, pH 8,0:</u>	TRIS	10 mM
	EDTA	1 mM

3.3.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA

A) Analytische Plasmidisolierung (BIRNBOIM & DOLY, 1979, mod.):

Die Isolierung rekombinanter Plasmide aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse. Es wurden 3 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation für 5 min bei 23 000 x g geerntet. Die Zellen wurde in 100 µl eiskaltem Lysispuffer suspendiert. Zur Zellyse wurden 200 µl einer frisch hergestellten SDS-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zugabe von 150 µl eiskalter Kaliumacetat-Lösung und 5 min Inkubation auf Eis gefällt. Der Ansatz wurde 5 min bei 23 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Fällung des DNA mit Isopropanol (3.3.3.). Das Präzipitat wurde in 50 µl H₂O_{dest.} gelöst.

			Konzentration:
<u>Lysispuffer, pH 8,0:</u>	Glukose	9,0 g	50 mM
	TRIS	0,302 g	25 mM
	EDTA	0,372 g	10 mM
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml	
<u>SDS-Lösung:</u>	10 N NaOH	0,2 ml	0,2 N
	25 % (w/v) SDS	0,4 ml	1 % (v/v)
	H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml	
<u>Kaliumacetat-Lösung:</u>	5 M Kaliumacetat	60,0 ml	
	Eisessig	11,5 ml	
	H ₂ O _{dest.}	28,5 ml	

Die Kaliumacetat-Lösung wurde zunächst autoklaviert, anschließend wurden Eisessig und steriles H₂O_{dest.} zugefügt.

B) Präparative Plasmidisolierung (BIRNBOIM & DOLY, 1979, mod.):

Die Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* zur Sequenzierung erfolgte ebenfalls nach der Methode der alkalischen Lyse. 100 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4 000 x g geerntet. Die Zellen wurden in 5 ml eiskaltem Lysispuffer suspendiert. Es wurden 10 ml SDS-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit 5 ml eiskalter Kaliumacetat-Lösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 4 °C und 4 000 x g zur Abtrennung der denaturierten Proteine zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle filtriert, einer Isopropanolfällung (3.3.3.) unterzogen und 20 min bei 4 °C und 13 000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 1 ml TE gelöst und die RNA durch Zugabe von 1 ml LiCl-Lösung, 30 min Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13 000 x g abgetrennt. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol (3.3.3.) gefällt. Das Pellet wurde in 0,5 ml TE-Puffer gelöst, 30 min bei 37 °C mit 20 µl RNase (10 mg/ml TE-Puffer) und 15 min bei 37 °C mit 30 µl Proteinase K (2,5 mg/ml TE-Puffer)

inkubiert. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (3.3.2.) erfolgte eine erneute Fällung mit Ethanol. Das Präzipitat wurde in 50 μ l H₂O_{dest.} gelöst.

			Konzentration:
<u>LiCl-Lösung, pH 8,0:</u>	LiCl	21,2 mg	5 M
	MOPS	1,05 g	50 mM
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml	

C) Präparative Plasmidisolierung mittels "QIAGEN-Säulchen"

Alternativ zu der unter 3.3.6.2.2. beschriebenen Methode wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* zur Sequenzierung mit dem "Plasmid Midi KIT" (Fa. QIAGEN, Hilden) nach der angegebenen Vorschrift isoliert.

3.3.6.3. Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *C. sticklandii* wurde mit dem "RNeasy Total RNA KIT" (Fa. QIAGEN, Hilden) isoliert. 50 ml einer *C. sticklandii*-Kultur wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 4 000 x g geerntet. Die Zellen wurden in 100 μ l Lysozymlösung (20 mg/ml TE-Puffer) suspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde nach der angegebenen Vorschrift durchgeführt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente, die zur Ligation oder als Sonden für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden sollten, wurden mit dem "QIAEX II Agarose Gel Extraction KIT" (Fa. QIAGEN, Hilden) aus präparativen Agarose-Gelen (3.3.5.1.) nach der angegebenen Vorschrift isoliert. Die DNA wurde dabei an Silicagel-Partikel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen gebunden. Durch Puffer niedriger Ionenstärke wird die DNA wieder vom Material gelöst.

3.3.8. Enzymatische Modifikation von DNA

3.3.8.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die Reaktion wurde in einem PCR-Thermoblock (Fa. BIOMETRA, Göttingen) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden von der Fa. GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES GmbH, Eggenstein, bezogen. Der Standardreaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von ca. 1 kb setzte sich wie folgt zusammen:

DNA	30-100 ng
Oligonukleotid	50-300 pmol
dNTP-Gemisch	0,2 mM
<i>Tfl</i> -DNA-Polymerase (1U/ μ l)	1 μ l
20 x Reaktionspuffer	5 μ l
MgCl ₂	1,5-3,5 mM
H ₂ O _{dest.}	ad 100 μ l

Der Ansatz wurde zum Schutz vor Verdunstung mit 40 μ l Mineralöl überschichtet. Vor Zugabe der DNA-Polymerase wurde der Ansatz für 5 min auf 94 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu gewährleisten und unspezifische DNA-Oligonukleotid-Hybridisierungen zu verhindern. Die PCR-Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt und der Reaktionszyklus 30 mal durchlaufen:

Denaturierung:	94 °C	30 s
Hybridisierung:	37-65 °C	30 s
Extension	72 °C	60 s

Die Hybridisierungstemperatur wurde etwa 5 °C niedriger als die Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide gewählt und richtete sich nach der Länge und Qualität der Oligonukleotide. Je 10 μ l der PCR-Ansätze wurden entnommen und in einem Standard-Agarose-Gel analysiert (3.3.5.1.).

Tabelle 3.3: Zur PCR verwendete degenerierte Oligonukleotide.

Oligo-nukleotid	Sequenz	Variabilität	T _m [°C] (1 M Na ⁺)
G10	5'-AAA-GAR-CAT-GCN-AAT-GA-3'	8	56
G11	5'-TCA-TTN-GCA-TGY-TCT-TT-3'	8	56
F03	5'-CAR-TCN-GAR-ATT-TAT-GT-3'	16	54
C03	5'-ACA-TAA-ATY-TCN-GAY-TG-3'	16	55
F05	5'-CAR-AGY-GAR-ATT-TAT-GT-3'	8	55
F06	5'-ACA-TAA-ATY-TCR-CTY-TG-3'	8	55
C04	5'-ATW-GAR-GAR-CAR-GCN-GG-3'	64	62
C05	5'-CCN-GCY-TGY-TCY-TCW-AT-3'	64	62
C06	5'-CAR-GGN-ATW-GAR-AAT-GA-3'	32	57
C07	5'-TCA-TTY-TCW-ATN-CCY-TG-3'	32	57
B07	5'-ATT-GAR-GTT-ATG-AAT-GAT-GAR-GAR-TTY-GAT-3'	16	65
B08	5'-ATC-RAA-YTC-YTC-ATC-ATT-CAT-AAC-YTC-AAT-3'	16	65

Variablen: N = A+C+T+G; Y = C+T; R = A+G; W = A+T

3.3.8.2. Restriktionsanalyse von DNA

Das Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde in einem Volumen von mindestens 20 µl pro µg DNA für 1-15 h bei der für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur durchgeführt. Die Spaltung erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen. Pro 1 µg DNA wurden 1-10 U Enzym eingesetzt. Für Restriktionen mit unterschiedlichen Enzymen wurden entweder Enzyme gewählt, die das gleiche Puffersystem benötigten oder es wurde zunächst mit einem Enzym bei der niedrigeren Salzkonzentration verdaut und nach Erhöhung der Salzkonzentration das zweite Enzym zugegeben.

3.3.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von gereinigten PCR-Fragmenten (3.3.7.) wurde mit dem pGEM[®]-T-Vektor-System (PROMEGA CORP., Madison, USA) nach der angegebenen Vorschrift durchgeführt. Der Erfolg einer Ligation ist abhängig vom Verhältnis der Konzentrationen von Vektor-DNA zu Insert-DNA (DUGAICZYK *et al.*, 1975), Verhältnisse von 1:8 bis

8:1 sind möglich. Im Ligationsansatz wurde in der Regel das zu ligierende DNA-Fragment im Überschuß eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C in folgendem Ansatz:

10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl
pGEM [®] -T-Vektor (50 ng)	1 µl
PCR-Produkt	4-7 µl
T4-DNA-Ligase (3 Weiss U/µl)	1 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 10 µl

3.3.8.4. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Für Hybridisierungsexperimente wurden die DNA-Fragmente mit Digoxigenin (DIG) mit dem "DIG DNA Labeling KIT" (Fa. ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim) nach dem Verfahren des "Random Primed Labeling" (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983) markiert. Die Methode beruht auf der Anlagerung einer Mischung von Hexanucleotiden an die denaturierte DNA und Neusynthese des Komplementärstranges durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase unter Einbau DIG-markierten dUTPs.

Die DNA wurde zunächst durch Isolierung aus dem Agarose-Gel (3.3.7.) gereinigt und in H₂O_{dest.} aufgenommen. Für die Markierung wurden 15 µl DNA (ca. 1 µg) für 10 min durch Kochen im Wasserbad denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz folgende Komponenten auf Eis zugegeben:

Hexanukleotid-Gemisch	2 µl
DIG-dNTP-Gemisch	2 µl
Klenow DNA-Polymerase (2U/µl)	1 µl

Die Reaktion erfolgte über Nacht (12-20 h) bei 37 °C und wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) beendet. Der Ansatz wurde mit Ethanol für 30 min bei -80 °C gefällt (3.3.3.) und die markierte DNA in 50 µl H₂O_{dest.} gelöst.

3.3.9. Übertragung von DNA

3.3.9.1. Transformation von DNA in *E. coli* XL2-Blue

Die Transformation der hochkompetenten *E. coli* XL2-Blue-Zellen (STRATAGENE GmbH, Heidelberg) erfolgte durch Hitzeschock (HANAHAN, 1983, mod.). Die Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. 50 μ l Zellen wurden mit 0,85 μ l β -Mercaptoethanol versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min geschüttelt. 0,1-25 ng Plasmid-DNA (3.3.8.3.) wurden zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzebehandlung für 30 s bei 42 °C und sofortige Abkühlung des Ansatzes auf Eis. Nach Zugabe von 0,45 ml SOC-Medium (2.2.4.), welches zuvor auf 42 °C erwärmt worden war, wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert, je 100-200 μ l auf Nähr-Agarplatten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG (2.2.5.) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.9.2. Der X-Gal-Test zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Mit diesem Test können *E. coli*-Transformanten mit rekombinanten Plasmiden schnell und einfach selektiert werden.

Der Test beruht darauf, daß Insertionen in die multiple Klonierungsstelle des entsprechenden Vektors die Bildung einer aktiven β -Galaktosidase verhindern. Die aktive β -Galaktosidase ist in der Lage, neben dem eigentlichen Substrat Laktose auch 5-Brom-4-chlor-indoyl- β -D-Galaktosid (X-Gal) zu spalten. Dabei entsteht der Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo, der sich in Anwesenheit von Sauerstoff blau färbt (HOROWITZ *et al.*, 1964). Im X-Gal-Test werden *E. coli*-Stämme eingesetzt, die durch eine Deletion im Chromosom nur eine inaktive β -Galaktosidase ohne N-Terminus (Aminosäuren 11-41) bilden können. Dieser Effekt kann jedoch durch die Insertion von Plasmiden (z.B. pGEM-T, pBluescript-Reihe), die das *lac* POZ'-Operon tragen (Promotor, Operator sowie 5'-Ende des *lac* Z-Gens), kompensiert werden. Das hiervon codierte sogenannte α -Peptid kann die oben beschriebenen β -Galaktosidase zum aktiven Enzym komplementieren (α -Komplementation).

Da die Multiklonierungsstelle des verwendeten Vektors innerhalb des *lacZ*-Genes liegt, wird die Bildung α -Peptides verhindert, wenn der Vektor ein Insert enthält und die

Kolonien bleiben weiß. Klone ohne Insert, die nur den Vektor enthalten, zeigen eine Blaufärbung. Es wurden nach Klonierungsversuchen immer nur die weißen Kolonien ausgewählt.

3.3.10. Nukleinsäure-Übertragung auf Nylonmembranen

3.3.10.1. Southern-Blots

Für Southern-Blots wurde die chromosomale DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, in einem Standard-Agarose-Gel (3.3.5.1.) aufgetrennt und mittels Kapillarblotting (SOUTHERN, 1975) auf eine Nylonmembran (Fa. QIAGEN, Hilden) übertragen. Das Agarose-Gel wurde zweimal 5 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Dabei entstehen Strangbrüche, was einen Transfer größerer DNA-Fragmente erleichtert. Das Gel wurde zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und zweimal 15 min in Denaturierungslösung geschwenkt. Nach zweimaligem Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ erfolgte eine Neutralisation durch Inkubation des Gels für zweimal 15 min in Neutralisierungslösung I.

Die Nylonmembran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, 20 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und anschließend 15 min in 10 x SSC-Puffer (3.3.6.1.) equilibriert. 6 Lagen Filterpapier (Whatman 3 MM) wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten. Eine Glasplatte wurde auf die mit 10 x SSC-Puffer gefüllte Blot-Kammer gelegt und ein Streifen in 10 x SSC getränktes Filterpapier darüber gelegt, so daß die Enden in den Puffer eintauchten. Auf das Filterpapier wurde das Gel gelegt und an den Seiten mit Spacern abgedichtet. Darauf wurden luftblasenfrei eine Plastikfolie mit Aussparung in Gelgröße, die vorbehandelte Nylonmembran, die 6 Lagen Filterpapier und ca. 10 cm Papierhandtücher aufgebracht. Eine zweite Glasplatte sowie ein Gewicht zum Beschweren (ca. 500 g) wurden auf den Stapel gelegt. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die DNA auf der Membran durch Bestrahlen für 2 min mit einem UV-Transilluminator (Fa. VILBER LOURMAT, Cedex, Frankreich) fixiert.

			Konzentration
<u>Denaturierungslösung:</u>	NaOH	20 g	0,5 N
	NaCl	87,65 g	1,5 M
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	
<u>Neutralisierungslösung I, pH 7,5:</u>	TRIS	60,5 g	0,5 M
	NaCl	175 g	3,0 M
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

3.3.10.2. Northern-Blot

Der Transfer von RNA auf Nylonmembranen erfolgte nach Auftrennung von Gesamt-RNA in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel (3.3.5.2.). Das Gel wurde zur Entfernung von überschüssigem Formaldehyd kurz in DEPC-H₂O_{dest.} gespült und analog zu der unter 3.3.10.1. beschriebenen Methode transferiert und fixiert.

3.3.10.3. Dot Blot

Zur Herstellung von Dot-Blots wurden die DNA-Proben direkt auf die Nylonmembran aufgetragen. Dazu wurde je 1 µl DNA-Lösung mit 1 µl 2 N NaOH 15 min denaturiert, auf eine Nylonmembran getropft und 2 min durch UV-Strahlung (3.3.10.1.) fixiert und luftgetrocknet. Die Membranen wurden direkt zur Hybridisierung verwendet oder trocken zwischen Filterpapier gelagert.

3.3.10.4. Filterherstellung für die Koloniehybridisierung

Für die Untersuchung einer großen Zahl rekombinanter Klone mußte deren DNA auf Nylonmembranen übertragen werden. Dazu wurden die Klone (3.3.9.1.) mittels steriler Zahnstocher auf LB-Amp-Platten übertragen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 4 °C gekühlt. Die Übertragung der Klone auf die Nylonmembran erfolgte durch Auflegen der Membran für 1 min auf die Kolonien. Anschließend wurden die Membranen 15 min auf einem mit Denaturierungslösung getränkten Filterpapier inkubiert, auf trockenem Filterpapier getrocknet, 15 min auf mit Neutralisierungslösung

II getränktem Filterpapier inkubiert, getrocknet und 10 min mit 2 x SSC-Puffer getränktem Filterpapier inkubiert. Nach dem Fixieren der DNA auf der Membran (3.3.10.1.) erfolgte eine Proteinase-K-Behandlung für 1 h bei 37 °C mit 0,5 ml Proteinase-K-Lösung (2 mg/ml in 2 x SSC-Puffer). Zell- und Agar-Rückstände wurden durch mehrfaches Andrücken von H₂O_{dest.}-getränktem Filterpapier entfernt. Die Membran wurde direkt zur Hybridisierung verwendet oder trocken zwischen Filterpapier gelagert. Die verwendeten Agar-Platten wurden nochmals einige Stunden bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C aufbewahrt.

		Konzentration
<u>Neutralisierungslösung II, pH 7,5:</u>	TRIS	121,1 g 1 M
	NaCl	87,65 g 1,5 M
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

3.3.11. Hybridisierung

3.3.11.1. Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Auf Nylonmembranen immobilisierte DNA oder RNA wurde mit DIG-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Die Membranen wurden in ein Hybridisierungsröhrchen (Fa. BIOMETRA, Göttingen) überführt. Es wurden 20 ml Prähybridisierungslösung zugegeben und 1-2 h bei Hybridisierungstemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und 10 ml Hybridisierungslösung, welche 25 µl der zuvor 10 min in einem kochenden Wasserbad denaturierten DIG-markierten Sonde enthielt, zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht, wobei die Hybridisierungstemperatur für DNA-DNA-Hybridisierungen 68 °C, für RNA-DNA-Hybridisierungen 42-45 °C betrug.

Hybridisierungslösungen:

			Konzentration
<u>DNA:</u>	20 x SSC	5 ml	5 x SSC
	Blockierungslösung (10 %, [w/v])	2 ml	1 % (v/v)
	N-Lauroylsarcosin (10 %, [w/v])	0,2 ml	0,1 % (v/v)
	SDS (10%, [w/v])	0,04 ml	0,02 % (v/v)
	H ₂ O _{dest.}	ad 20 ml	
			Konzentration
<u>RNA:</u>	20 x SSC	19,92 ml	5 x SSC
	Blockierungslösung (10 %, [w/v])	16 ml	2 % (v/v)
	N-Lauroylsarcosin (10 %, [w/v])	0,8 ml	0,1 % (v/v)
	SDS	5,6 g	7 % (w/v)
	Formamid	40 ml	50 % (v/v)
	1 M Na-Phosphat, pH 7,0	4 ml	50 mM

Für die Blockierungslösung wurden 5 g Blockierungsreagenz in 50 ml Puffer I (3.3.11.2.) in einem Wasserbad bei 60 °C gelöst, anschließend autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.11.2. Chemiluminiszenz-Nachweis

Nach der Hybridisierung (3.3.11.1.) wurde die Membran zweimal bei Raumtemperatur für 5 min (DNA) bzw. 15 min (RNA) in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und zweimal 15 min bei 68 °C in 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (DNA) bzw. 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (RNA) gewaschen. Die Entwicklung der Membran wurde wie folgt weitergeführt:

1. 1-5 min in Waschpuffer equilibrieren
2. 30 min in 100 ml Puffer II inkubieren
3. 30 min in 20 ml Puffer II mit 2 µl (1 µl bei RNA) Anti-DIG-AP-Konjugat inkubieren
4. zweimal 15 min mit je 100 ml in Waschpuffer waschen
5. 2 min in 100 ml Puffer III inkubieren
6. 750 µl Puffer III mit 7,5 µl CSPD (CDP-*Star*TM bei RNA) versetzen
7. Membran mit Substratlösung benetzen und in Plastikfolie einschweißen

8. 15 min im Dunkeln bei 37 °C inkubieren
9. 10 min bis 3 h auf einen Röntgenfilm exponieren
10. Film in Dunkelkammer 2 min entwickeln, mit H₂O spülen, 2 min fixieren

			Konzentration
<u>Puffer I, pH 7,5:</u>	Maleinsäure	11,6 g	0,1 M
	NaCl	8,77 g	0,15 M
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 000 ml	

Puffer II: Blockierungslösung und Puffer I wurden 1:10 gemischt.

			Konzentration
<u>Puffer III, pH 9,5:</u>	TRIS	6,05 g	0,1 M
	NaCl	2,92 g	0,1 M
	H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml	

Waschpuffer: 500 ml Puffer I wurden mit 1,5 ml Tween 20 gemischt.

3.3.11.3. Wiederverwertung von Nylonmembranen

Von Nylonmembranen, die nach der DNA-DNA-Hybridisierung nicht getrocknet worden waren, konnten die gebundenen Sonden entfernt und die Membranen erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden. Dazu wurden die Membranen 1 min in H₂O_{dest.} gewaschen, zweimal 10 min in 0,2 N NaOH, 0,5 % SDS bei 37 °C inkubiert und anschließend mehrmals mit 2 x SSC gespült.

3.3.12. Sequenzierung von DNA

Doppelsträngige DNA wurde nach der Methode von SANGER (1977) an einem "A.L.F.TM-Sequencer" (PHARMACIA) sequenziert.

Die Sequenzierung wurde mit dem "AutoReadTM Sequencing KIT" (AMERSHAM-PHARMACIA) durchgeführt. Als Oligonukleotide wurden die fluoreszenzmarkierten "universal sequencing primer" und "reversed sequencing primer" eingesetzt, die sich

jeweils an einer Seite der Klonierungsstelle der verwendeten Vektoren anlagern können. Die weiterführende Sequenzierung erfolgte mit Fluorescein-15-ATP und synthetischen Oligonukleotiden, die anhand bekannter Sequenzen abgeleitet wurden.

Zur Anlagerung des Oligonukleotids wurden 10 µl (5-10 µg) DNA mit 2 µl des jeweiligen Oligonukleotids und 1,5 µl 1 N NaOH versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl 1 N HCl und 2 µl "Annealing"-Puffer zugegeben, gemischt und der Ansatz 10 min bei 37 °C und weitere 10 min (5 min bei Fluorescein-15-ATP-Sequenzierung) bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 2,5 µl der Didesoxyukleotid-Gemische wurden getrennt auf eine Mikrotiterplatte gegeben und bis zur Sequenzreaktionen auf Eis gelagert.

1. Sequenzreaktion mit "universal sequencing primer" und "reversed sequencing primer":

Zum Reaktionsansatz wurden 1 µl "Extension"-Puffer, 3,5 µl DMSO und 2 µl 1:1 mit Enzympuffer verdünnte T7-Polymerase gegeben.

2. Sequenzreaktion mit Fluorescein-15-ATP:

Der Reaktionsansatz wurde mit 1 µl Fluorescein-15-ATP und 2 µl unverdünnter T7-Polymerase versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 1 µl "Extension"-Puffer und 3,5 µl DMSO zugegeben.

Je 4,5 µl dieser Reaktionsansätze wurden zu den auf 37 °C vorgewärmten Didesoxynukleotid-Gemischen pipettiert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C und wurde nach 5 min durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung beendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel 2-3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Tabelle 3.4: Zur Sequenzierung mit Fluorescein-15-ATP und zur PCR verwendete Oligonuklotide.

Oligonukleotid	Sequenz	T _m [°C] (1 M Na ⁺)
E20-1	5'-ATC-TTC-TAA-ATT-ACT-AGG-TCC-A-3'	64
E20-2	5'-ACT-TGT-ATA-GGA-CCT-GCA-TCA-A-3'	68
E20-3	5'-AAG-GAA-AAG-ATA-TCA-ATC-TTG-A-3'	62
E20-4	5'-CAT-GAT-TTC-TTT-GAT-GAT-TAC-A-3'	62
E20-5	5'-GTA-CAG-TCT-TAC-ATC-CTC-TAA-A-3'	66
E20-6	5'-GAC-AGA-CTA-AGA-GAA-ATC-GCT-A-3'	68
E20-7	5'-TTA-AGT-GAT-GAA-GTT-AAT-GAA-A-3'	60
E20-8	5'-TTG-TCA-ATC-TCG-GAT-AAA-GAA-A-3'	64
E20-9	5'-AAG-TTC-ACC-TTC-AGA-TGA-ACC-A-3'	68
E20-10	5'-TAG-TTA-CAG-ATA-TCA-AAG-TGG-A-3'	64
E20-11	5'-TAT-GAC-AAT-TTT-ATT-TTG-CCA-A-3'	60
E20-12	5'-GAA-TTT-TAG-CTG-AAA-GGC-TAA-A-3'	64
E20-13	5'-GAT-AAA-GTA-GAA-TTT-GCA-GAA-A-3'	62
E20-14	5'-CCT-AAT-AAT-CCA-GAA-ATG-CAA-A-3'	64
E20-15	5'-ACC-AAA-AGA-AAT-TCT-CAG-AAG-A-3'	64
E20-16	5'-TCC-TGG-AAT-AAC-TCT-GAA-AGA-A-3'	66
E20-17	5'-TAT-AAT-CAC-CTT-TTC-ATT-TTA-A-3'	58
E20-18	5'-TTG-CTC-ATG-GTG-GCT-AGC-A-3'	68
E20-19	5'-CAA-CTG-ATT-TCA-TCA-CTC-AAG-A-3'	66
E20-20	5'-TCC-ATC-GAT-AAC-ACG-AGT-AA-3'	64
E20-21	5'-CAT-TTG-TCC-TGC-AAT-TGT-TA-3'	62
E20-22	5'-TTC-TAC-ATG-TCT-TCC-AGT-AA-3'	62

3.3.13. Auswertung der Sequenzdaten

Die ermittelten DNA-Sequenzdaten konnten mit dem DOS-Programm DNASIS (V5.00) miteinander verknüpft werden. Mit Hilfe des Programms CLONE 4 (CLONE MANAGER-VERSION 4.0, SCIENTIFIC & EDUCATIONAL Software, USA) konnten Aminosäuresequenzen abgeleitet, offene Leserahmen bestimmt und Restriktionskarten erstellt werden. Die Suche nach offenen Leserahmen erfolgte weiterhin mit Hilfe des Internet-Programmes "ORF-Finder" vom National Center for Biotechnological Information (NCBI). Sequenzvergleiche von Proteinen sowie die

Ableitung der DNA-Sequenz aus einer Aminosäure-Sequenz bzw. die Konstruktion degenerierter Oligonukleotide wurden mit dem Programm PC/GENE® (INTELLIGENETICS-VERSION 6.6, INC., Mountain View, USA) durchgeführt. Die Analyse von Sekundärstrukturen der DNA erfolgte mit dem Programm "Hairpin" (DNASIS).

Vergleiche von DNA- bzw. Proteinsequenzen erfolgten über das Internet-Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) vom NCBI mit den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT erfaßten Sequenzen. Sequenzalignments wurden mit den Internet-Programmen "SIM+LALNVIEW" und "ALIGN" (<http://www.expasy.ch>) sowie ebenfalls BLAST (NCBI) erstellt.

4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

4.1. Zellanzucht

Für Vorversuche zur Reinigung der D-Prolin-Reduktase wurde *C. sticklandii* in Komplexmedium unter Zugabe von D,L-Prolin in einer Endkonzentration von 50 mM und anaeroben Bedingungen in 10-50 ml-Kulturen angezogen. Die Zellen für die anschließende Proteinreinigung stammten aus einer Großanzucht in Komplexmedium mit 50 mM D,L-Prolin und wurden von Dr. A. Pich (Institut für Mikrobiologie, MLU Halle) zur Verfügung gestellt.

Die in Abb. 4.1 dargestellte Wachstumskurve gibt die Wachstumsparameter und die spezifische D-Prolin-Reduktase-Aktivität unter den angegebenen Bedingungen in Komplexmedium (2.2.2.) wieder. Nach 10 h wurde die spezifische Aktivität der D-Prolin-Reduktase in Rohextrakten mit 1,45 U/mg bestimmt. Die spezifische Aktivität in Rohextrakten aus Anzuchten in Minimalmedium (2.2.1.) betragen 1,9-3,9 U/mg.

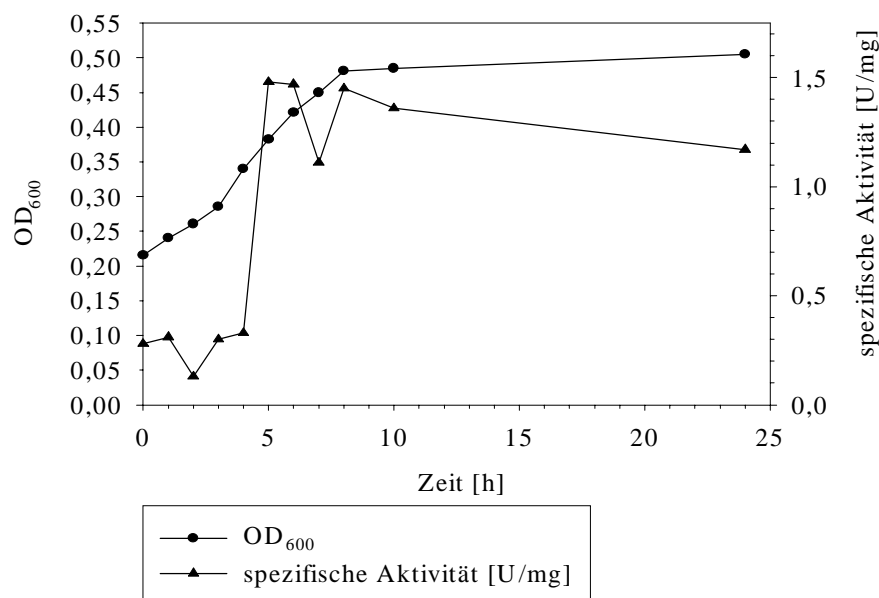


Abb. 4.1: Wachstumskurve von *C. sticklandii* und spezifische D-Prolin-Reduktase-Aktivität bei Anzucht in Komplexmedium mit 50 mM D,L-Prolin.

Wie aus der Abb. 4.1 ersichtlich, setzt die Wachstumsphase sofort nach dem Animpfen der Kultur ein und erreicht nach ca. 8-10 h ihr Maximum. Eine Erhöhung der spezifischen D-Prolin-Reduktase-Aktivität ist erst nach ca. 4 h meßbar. Die spezifische Enzymaktivität verbleibt bis zum Ende der Wachstumsphase auf diesem Niveau.

4.2. Optimierung des Enzymtests für die D-Prolin-Reduktase

Die Bestimmung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität erfolgte mit einem fluorimetrischen Testsystem nach SETO (1979) mit geringfügigen Modifikationen (3.2.3.1.). Eine Variation der Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Test ergab keine signifikanten Aktivitätsänderungen. Deshalb wurden die angegebenen Konzentrationen beibehalten.

Bis zu einem Wert von 60 nmol/100 μ l (0,6 mM) δ -Aminovalerat sind die gemessenen Fluoreszenzwerte der gebildeten δ -Aminovaleratmenge direkt proportional (SETO, 1979). Der Enzymtest wurde in Abhängigkeit von der Proteinprobe hinsichtlich der Testzeit und der eingesetzten Proteinmenge entsprechend angepaßt. Eine Proteinproportionalität (Abb. 4.2) sowie eine Zeitlinearität (Abb. 4.3) konnten für das Testsystem gezeigt werden

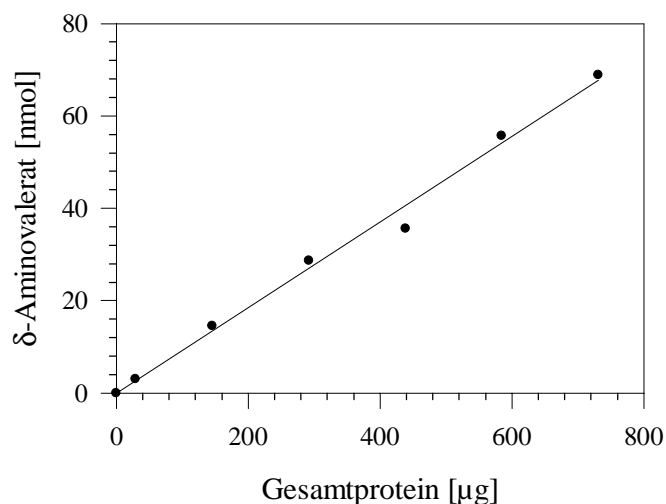


Abb. 4.2: Abhängigkeit des Enzymtests von der eingesetzten Proteinmenge bei einer Reaktionszeit von 30 min. Die Proben wurden mit 1-25 μ l Rohextrakt (30-730 μ g Gesamtprotein) bei 30 °C inkubiert.

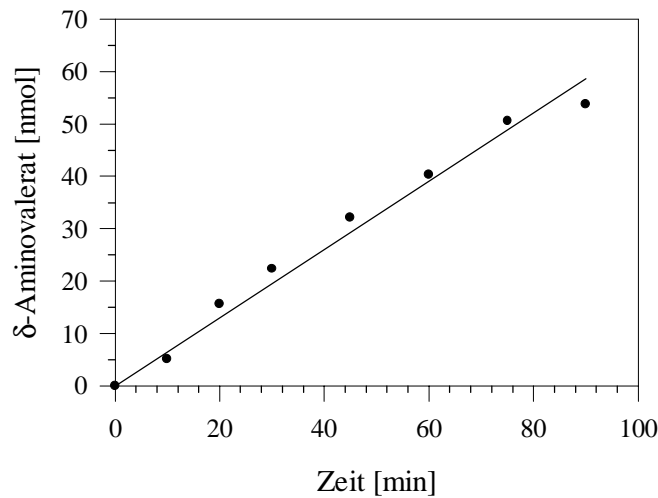


Abb. 4.3: Zeitabhängigkeit der D-Prolin-Reduktase-Reaktion bei konstanter Proteinkonzentration. Die Reaktionsansätze wurden mit je 400 µg Gesamtprotein bei 30 °C für 0-90 min inkubiert.

4.3. Lokalisation der D-Prolin-Reduktase-Aktivität

Da die D-Prolin-Reduktase als ein membrangebundenes Protein beschrieben wurde (SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a; ABELES *et al.*, 1994), wurden die *C. sticklandii*-Zellen durch dreimalige Passage durch eine French-Press aufgeschlossen (3.2.1.) und der Rohextrakt einer Ultrazentrifugation unterzogen. Die Membranfraktion wurde einmal mit TED-Puffer und anschließend noch einmal mit TED-Puffer, versetzt mit 0,1 M KCl, gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden mit Detergenzien aufgeschlossen (3.2.1.) und alle Fraktionen auf D-Prolin-Reduktase-Aktivität überprüft. Nach der Ultrazentrifugation wurden ca. 93 % der D-Prolin-Reduktase-Aktivität im cytoplasmatischen Überstand sowie weitere 6 % in den Waschfraktionen der Membranen nachgewiesen. Die Membranfraktion enthielt lediglich ca. 1 % der D-Prolin-Reduktase-Aktivität (Abb. 4.4).

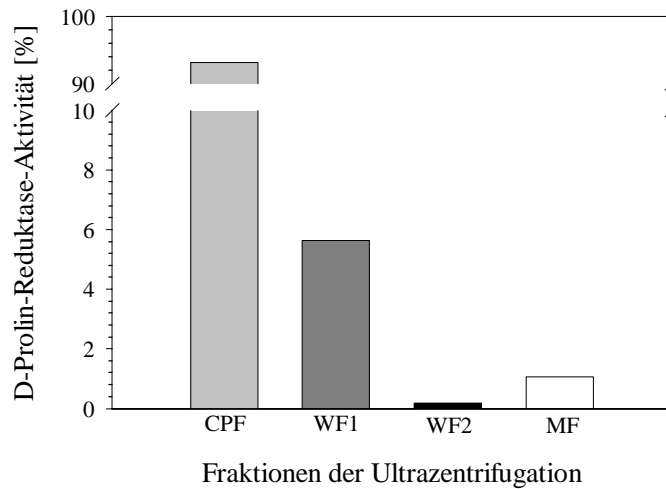


Abb. 4.4: Lokalisation der D-Prolin-Reduktase-Aktivität nach Ultrazentrifugation. Die Fraktionen wurden mit Hilfe des fluorimetrischen Enzymtests (SETO, 1979, mod.) auf D-Prolin-Reduktase-Aktivität überprüft. Die Reaktionsansätze wurden 30 min bei 30 °C inkubiert. CPF: cytoplasmatische Fraktion, WF1: Waschfraktion 1 (TED-Puffer, pH 8,6), WF2: Waschfraktion 2 (TED-Puffer + 0,1 M KCl, pH 8,6), MF: mit 1 % (v/v) Triton X 100 und 1,5 % (v/v) Natriumdesoxycholat solubilisierete Membranfraktion.

4.4. Isolierung der D-Prolin-Reduktase

In Anlehnung an das von SETO und STADTMAN (1976) publizierte Anreicherungsschema wurde eine neue Reinigungsprozedur für die D-Prolin-Reduktase entwickelt. Aufgrund des nach der Ammoniumsulfatfällung bereits enthaltenen Salzes in der Proteinlösung, wurde als erster Reinigungsschritt die hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose[®]CL-4B (Fa. AMERSHAM-PHARMACIA) gewählt. Die weitere Reinigung der D-Prolin-Reduktase erfolgte über eine Affinitätschromatographie an EAH-Sepharose[®]4B (Fa. AMERSHAM-PHARMACIA) und eine Gelfiltration an Superose[®]6 HR 10/30 (Fa. AMERSHAM-PHARMACIA) zur Homogenität.

4.4.1. Ammoniumsulfatfällung

Der hergestellte Rohextrakt wurde nach der Ultrazentrifugation mit Ammoniumsulfat gefällt (3.2.5.1.). Das Präzipitat der Fällung zwischen 25 und 60 % (w/v) Ammoniumsulfat enthielt die D-Prolin-Reduktase-Aktivität. Es wurde in 100 ml TED-Puffer, welcher 0,7 M Ammoniumsulfat enthielt, aufgenommen. Die erhaltene konzentrierte Proteinlösung wurde zur Abtrennung ungelöster Proteine kurz zentrifugiert und zur Säulenchromatographie eingesetzt.

4.4.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Das Trennprinzip der HIC beruht auf der unterschiedlichen Hydrophobizität der Proteine, welche durch Einsalzen, z.B. mit Ammoniumsulfat, erhöht werden kann und somit die Bindung an das Chromatographiematerial begünstigt. Die anschließende Elution erfolgt mit Salzlösungen abnehmender Ionenstärke und eventuell unter Zusatz unpolarer Agenzien, z.B. Ethylenglykol oder Isopropanol.

Zur Reinigung der D-Prolin-Reduktase wurde Phenylsepharose[®] CL-4B verwendet. Im Anschluß an die Ammoniumsulfatfällung wurde die salzhaltige Proteinlösung auf 57 ml Phenylsepharose (Säulendurchmesser x Gelhöhe = 5 cm x 2,9 cm) aufgebracht, die zuvor mit TED-Puffer + 0,7 M Ammoniumsulfat äquilibriert worden war. Zur Entfernung nicht gebundener Proteine wurde zunächst mit Äquilibrationpuffer gewaschen, danach mit abnehmender Molarität Ammoniumsulfat (0,7-0 M) und schließlich mit steigender Konzentration Ethylenglykol (0-20 % [v/v]) eluiert. Die Flußrate betrug 2 ml/min. Die Fraktionen ohne Ammoniumsulfat und mit beginnendem Ethylenglykolgradienten enthielten die D-Prolin-Reduktase-Aktivität (Abb. 4.5). Die Fraktionen 75-110 wurden vereinigt, mit PEG-6000 (3.2.4.) auf 50 ml eingengt und gegen TED-Puffer, welcher 0,1 M KCl enthielt, dialysiert.

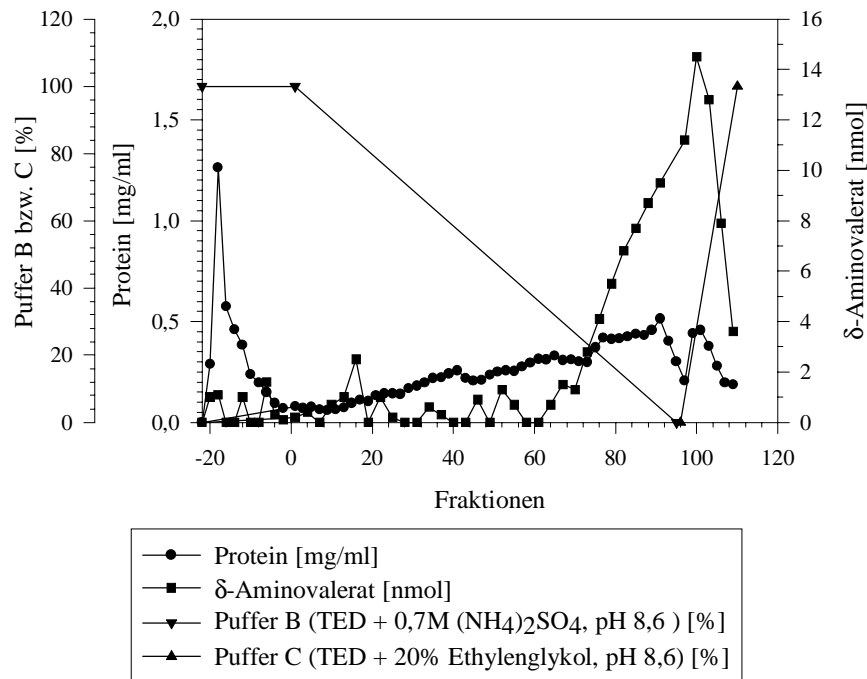


Abb. 4.5: Elutionsprofil der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* an Phenylsepharose® CL-4B.

Es wurde das in 100 ml TED-Puffer + 0,7 M (NH₄)₂SO₄, pH 8,6 gelöste Präzipitat der 60%igen Ammoniumsulfatfällung mit einem Gesamtproteingehalt von 1833 mg auf 57 ml mit TED-Puffer + 0,7 M (NH₄)₂SO₄, pH 8,6 voräquilibrierte Phenylsepharose® CL-4B aufgetragen. Eluiert wurde mit abnehmender Molarität Ammoniumsulfat und anschließend ansteigendem Ethylenglykolgradienten (s. Text).

4.4.3. Affinitätschromatographie an EAH-Sepharose® 4B

EAH-Sepharose ist ein Chromatographiematerial, bei dem ein Aminohexan-Spacer an die Sepharose gebunden vorliegt. Dieser ähnelt dem δ-Aminovalerat, dem Reaktionsprodukt der D-Prolin-Reduktase. EAH-Sepharose konnte somit als Affinitätsmaterial zur Reinigung eingesetzt werden.

Die eingengten Fraktionen der HIC, welche die D-Prolin-Reduktase enthielten, wurden auf 40 ml mit TED-Puffer + 0,1 M KCl äquilibrierte EAH-Sepharose® 4B (Säulendurchmesser x Gelhöhe = 2,3 cm x 9,5 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer gewaschen und die Proteine anschließend mit ansteigendem KCl-Gradienten (0,1-0,7 M) eluiert. Die Flußrate wurde auf 1 ml/min eingestellt. Die D-Prolin-Reduktase-Aktivität eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 0,4 M KCl (Abb.

4.6). Die Fraktionen 42-53 wurden vereinigt und mit PEG-6000 bzw. mit Centricon-30-Konzentratoren (3.2.4.) auf 2 ml eingengt.

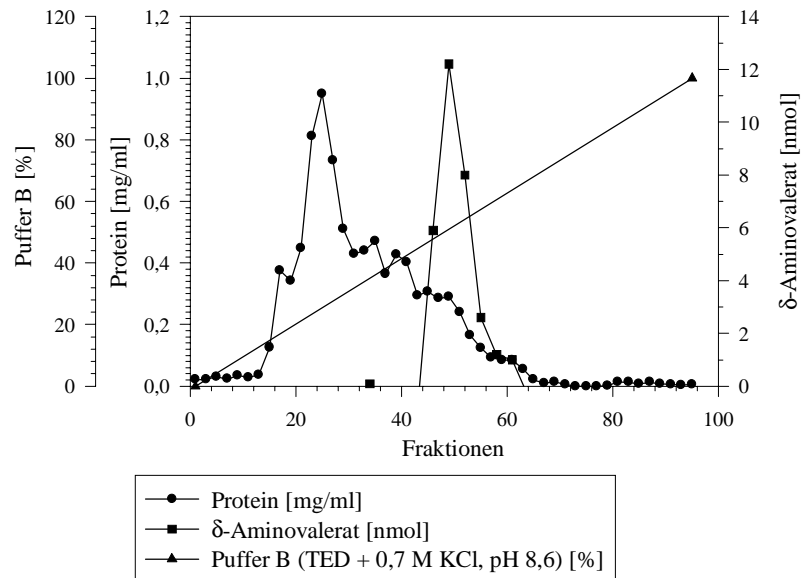


Abb. 4.6: Elutionsprofil des Phenylsepharose-Pools an EAH-Sepharose®4B.

Es wurden die vereinigten und eingengten Fraktionen 75-110 des Phenylsepharose-Laufes mit einem Gesamtproteingehalt von 183 mg auf 40 ml zuvor mit TED-Puffer + 0,1 M KCl, pH 8,6 äquilibrierte EAH-Sepharose®4B aufgetragen. Eluiert wurde mit ansteigendem KCl-Gradienten (s. Text).

4.4.4. Größenausschlußchromatographie an Superose®6 HR 10/30

Die Größenausschlußchromatographie an einer Superose®6 HR 10/30 (PHARMACIA) wurde als letzter Reinigungsschritt der Proteinanreicherung sowie zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flußrate von 0,25 ml/min in TED-Puffer, welcher 0,4 M KCl enthielt. Nach kurzer Zentrifugation bei 23 000 x g wurden ca. 1,6 mg Protein der EAH-Fraktion in 200 µl Gesamtvolumen aufgetragen. Die D-Prolin-Reduktase-Aktivität eluierte im Bereich des ersten Proteinsignals (Abb. 4.7).

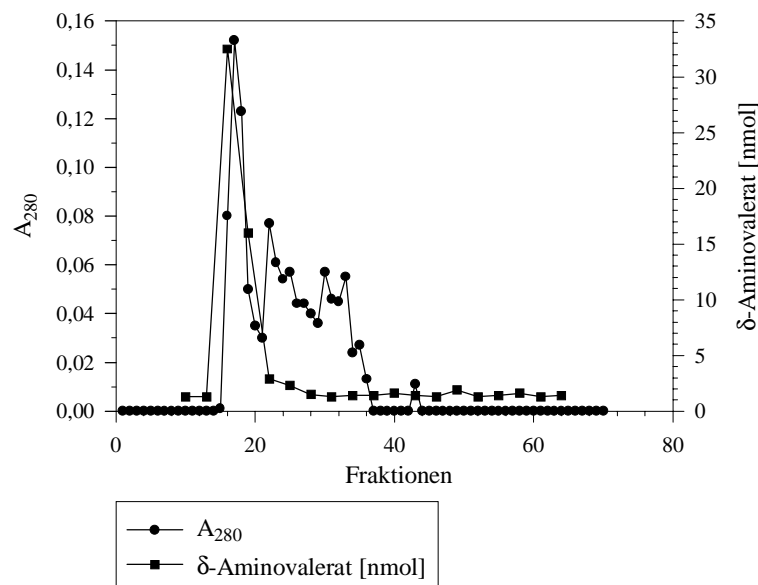


Abb. 4.7: Elutionsprofil des EAH-Pools an Superose®6 HR 10/30. Es wurde ca. 1,6 mg Gesamtprotein der vereinigten und eingeeengten EAH-Fraktionen 42-53 in 200 µl Gesamtvolumen auf die zuvor mit TED-Puffer + 0,4 M KCl, pH 8,6 äquilibrierte Säule aufgetragen.

4.4.5. Bestimmung des natives Molekulargewichtes der D-Prolin-Reduktase

Die D-Prolin-Reduktase konnte nach der Größenausschlußchromatographie, dem letzten Schritt der Proteinreinigung, als einzelne Proteinbande im nicht denaturierenden Gradientengel (3.2.7.2.) mit einem nativen Molekulargewicht deutlich höher als 669 000 nachgewiesen werden und war somit als homogen anzusehen (Abb. 4.8).

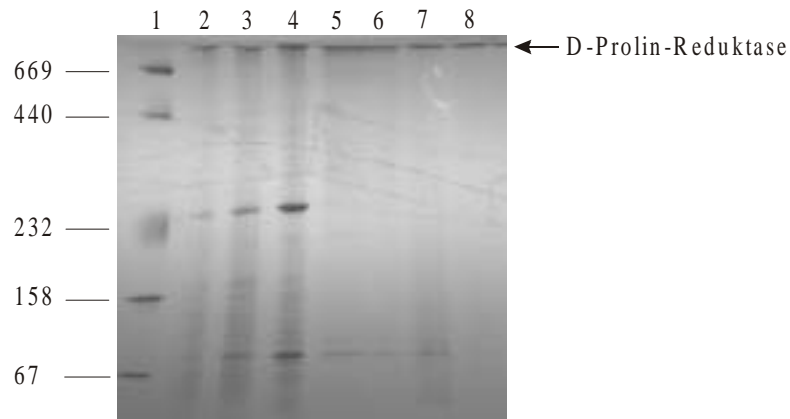


Abb. 4.8: Natives Gradientengel (3 %-27 % [v/v]) der verschiedenen Reinigungsstufen der D-Prolin-Reduktase. Die Proteine wurden mit Serva Blau G 250 gefärbt. Spur 1: Molekulargewichtsmarker in kDa, Spur 2: Rohextrakt (14,5 µg), Spur 3: Ammoniumsulfat-Fraktion (14,5 µg), Spur 4: Phenylsepharose-Fraktion (14,5 µg), Spur 5: EAH-Fraktion (14,5 µg), Spur 6: EAH-Fraktion (5,0 µg), Spur 7: Superose 6-Fraktion (14,5 µg), Spur 8: Superose 6-Fraktion (5,0 µg).

Die Gelfiltration an Superose[®]6 HR 10/30 ergab für das native Enzym eine molekulare Masse von ca. 870 kDa (Abb. 4.9).

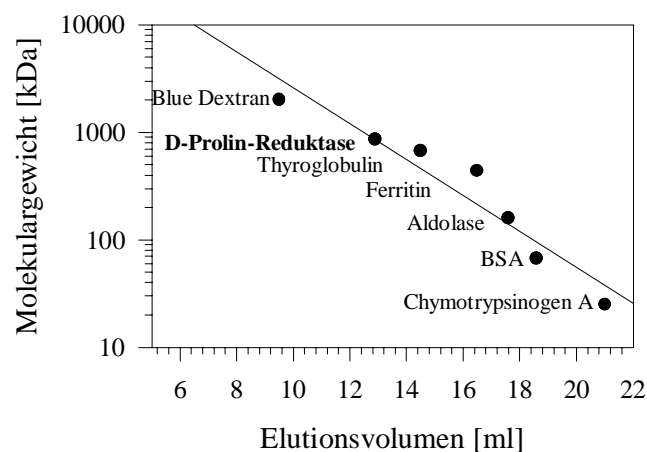


Abb. 4.9: Halblogarithmische Auftragung der molekularen Masse der D-Prolin-Reduktase gegen das Elutionsvolumen nach Gelfiltration an Superose[®]6 HR 10/30.

Blue Dextran (2000 kDa): 1 mg/ml, Thyroglobulin (669 kDa): 2 mg/ml, Ferritin (440 kDa): 0,6 mg/ml, Katalase (230 kDa): 3 mg/ml, Aldolase (158 kDa): 2 mg/ml, BSA (67 kDa): 6,5 mg/ml, Chymotrypsinogen A (25 kDa): 3 mg/ml

4.4.6. Bestimmung der Untereinheitsstruktur der D-Prolin-Reduktase

Die Untereinheitsstruktur und Größe der D-Prolin-Reduktase wurde mittels SDS-PAGE untersucht (3.2.7.1.). Hierzu wurden Aliquots der angereicherten Proteinfractionen nach Aufkonzentration und Entsalzung (3.2.6.) in einem 12 %igen (v/v) SDS-Gel aufgetrennt. Die D-Prolin-Reduktase zeigte nach der Auftrennung drei Banden entsprechend molekulare Massen von 45, 26 und 23 kDa (Abb. 4.10).

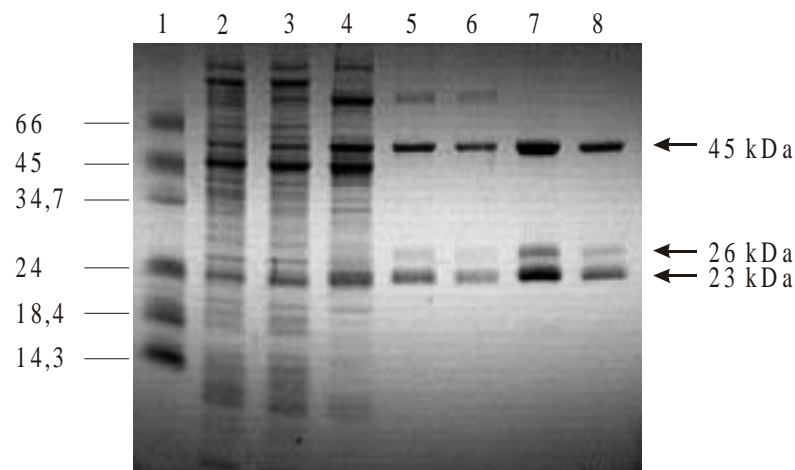


Abb. 4.10: SDS-PAGE (12 % [v/v]) der verschiedenen Reinigungsstufen der D-Prolin-Reduktase.

Die Proteine wurden mit Serva Blau G 250 gefärbt.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker in kDa, Spur 2: Rohextrakt (11 µg), Spur 3: Ammoniumsulfat-Fraktion (11 µg), Spur 4: Phenylsepharose-Fraktion (11 µg), Spur 5: EAH-Fraktion (11 µg), Spur 6: EAH-Fraktion (5,5 µg), Spur 7: Superose 6-Fraktion (11 µg), Spur 8: Superose 6-Fraktion (5,5 µg).

4.4.7. Zusammenfassung der Reinigung der D-Prolin-Reduktase

Die D-Prolin-Reduktase konnte über vier Reinigungsschritte an drei unterschiedlichen Chromatographiematerialien mit einer Ausbeute von 1,1 % isoliert werden. In Tabelle 4.1 sind die Reinigungsstufen und die zugehörigen Daten zusammengefasst. Die Tabelle steht stellvertretend für insgesamt 7 Proteinreinigungen, deren Verläufe ähnliche Daten zeigten.

Die Ammoniumsulfat-Fällung ermöglichte eine Abtrennung von 45-50 % der verunreinigenden Proteine bei nahezu gleichbleibender Gesamtaktivität und 1,7-facher Anreicherung der spezifischen D-Prolin-Reduktase-Aktivität sowie anschließend den

direkten Zugang zur hydrophoben Interaktionschromatographie. Die Reinigungsschritte an Phenylsepharose[®]CL-4B und EAH-Sepharose[®]4B erbrachten eine 16,5-fache Anreicherung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität. Während der Gelfiltration an Superose[®]6 HR 10/30 kam es zu einem Verlust der spezifischen Enzymaktivität von ca. 50 %. Eine Trennung der Superose 6-Fraktion im SDS-Gel zeigte drei Proteinbanden mit molekularen Massen von 23, 26 und 45 kDa (Abb. 4.10).

Anschließende Versuche, die drei nach der Reinigung im SDS-Gel erkennbaren Proteine zu trennen (Chromatographie an Mono Q, Gelfiltration an Superdex[™]75, denaturierende Gelfiltration unter Zusatz von 6 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumchlorid, 0,1 M SDS oder 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol) erwiesen sich als nicht erfolgreich. Um die Ergebnisse der Proteinreinigung abzusichern, wurden weitere Experimente zur Enzymaktivität und Untereinheitsstruktur der D-Prolin-Reduktase durchgeführt.

Tabelle 4.1: Reinigung der D-Prolin-Reduktase.

Reinigungs- schritt	Protein- gehalt [mg]	Gesamt- aktivität [μmol/h]	Spezifische Aktivität [μmol/h/mg]	Anreiche- rungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	3368	6592,5	1,96	-	100
(NH₄)₂SO₄- Fraktion 25-60% w/v	1833	6032	3,29	1,7	91,5
Phenyl- Sepharose	183,5	2679,7	14,6	7,6	40,6
EAH- Sepharose	16,6	526,1	31,7	16,5	8
Superose 6	4,4	70,9	16,1	-	1,1

4.5. Bestimmung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität im nativen Gel

Zur Bestimmung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität im nativen Gel wurde das Gel zunächst wie unter 3.2.3.2. beschrieben behandelt und die Enzymaktivität in den einzelnen Gelabschnitten gemessen. Wie Abbildung 4.11 zeigt, konnte die D-Prolin-Reduktase-Aktivität im Bereich oberhalb des 669 kDa-Markers nachgewiesen werden.

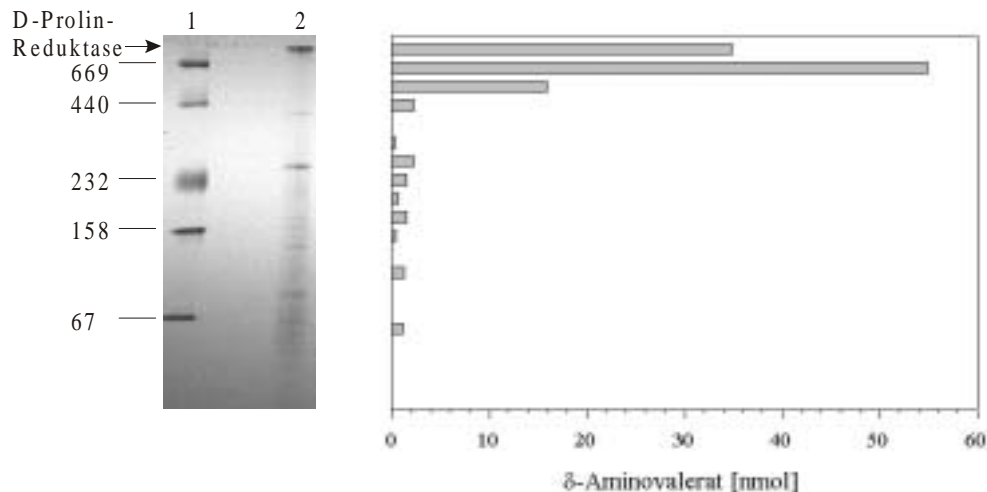


Abb. 4.11: Nachweis der D-Prolin-Reduktase-Aktivität mit Hilfe des fluorimetrischen Enzymtestes in der nativen Gradienten-PAGE (3 %-27 % [v/v]). Die Enzymreaktion erfolgte bei 30 °C über Nacht. Das Gel wurde mit Serva Blau G 250 gefärbt. Spur 1: Molekulargewichtsmarker in kDa, Spur 2: Rohextrakt (21 µg).

4.6. Trennung des nativen Proteins in der SDS-PAGE

Um die Untereinheitsstruktur der D-Prolin-Reduktase zu überprüfen, wurde zunächst die im nativen Gel angefärbte Proteinbande oberhalb des 669 kDa-Markers ausgeschnitten, zwischen zwei Deckgläschen zerrieben und mit 30 µl H₂O in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde mehrmals mit H₂O gewaschen, mit 10 µl Probenpuffer versetzt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.7.1.). Die aus dem nativen Gel ausgeschnittene Proteinbande im SDS-Gel (Abb. 4.12, Spur 5) zeigte das gleiche Bandenmuster wie das über Säulenchromatographie angereicherte Protein (Abb. 4.12, Spuren 2-4). Die Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der D-Prolin-Reduktase um ein heteromeres Protein mit einer molekularen Masse deutlich über 669 kDa handelt, welches sich aus drei Untereinheiten von 45, 26 und 23 kDa zusammensetzt. Wird das in

der Gelfiltration bestimmte native Molekulargewicht von ca. 870 000 zugrunde gelegt, kann von einer dekameren Struktur des Proteins ausgegangen werden.

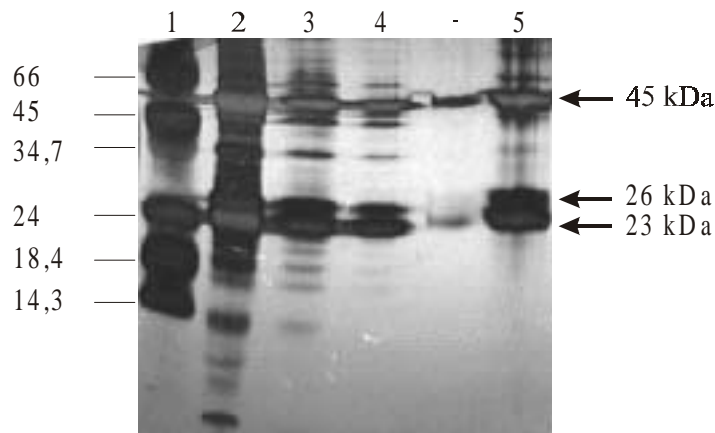


Abb. 4.12: SDS-PAGE (12 % [v/v]) der aus dem nativen Gel ausgeschnittenen Proteinbande. Die Proteine wurden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht (3.2.8.2.). Spur 1: Molekulargewichtsmarker in kDa, Spur 2: EAH-Fraktion (10 µg), Spur 3: Superose 6-Fraktion (2,5 µg), Spur 4: Superose 6-Fraktion (1,25 µg), Spur 5: ausgeschnittene Proteinbande aus nativer PAGE.

4.7. Bestimmung der molekularen Massen der Untereinheiten mittels MALDI-MS

Die Trennung pyridylethylierter sowie nicht mit 4-Vinylpyridin markierter D-Prolin-Reduktase wurde von Dr. P. Rücknagel an einer Reversed Phase-Säule durchgeführt (3.2.10.5.). Die 45 kDa-Untereinheit wurde als Einzelsignal detektiert, während die 26 kDa- und die 23 kDa-Untereinheit zusammen eluierten. Diese wurden mit Endoprotease Lys-C verdaut (3.2.11.). Anschließend wurden die genauen molekularen Massen der Untereinheiten mittels MALDI-MS bei Frau Dr. Schierhorn analysiert (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Molekulargewichte der Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase im Vergleich mit Daten der SDS-PAGE.

Molekulargewicht MALDI-MS	Molekulargewicht SDS-PAGE
44 860	45 000
25 702	26 000
22 938	23 000

4.8. Aminoterninale Sequenzierung der Untereinheiten

Die aminoterninale Sequenzierung der Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase erfolgte mittels automatischem Edman-Abbau und wurde von Dr. P. Rücknagel durchgeführt (3.2.11.). Die 45 kDa- und 26 kDa-Untereinheit der D-Prolin-Reduktase waren dem Edman-Abbau zugänglich, während sich die 23 kDa-Untereinheit als N-terminal blockiert erwies und zunächst einem tryptischen Verdau unterzogen werden mußte, um interne Aminosäuresequenzen zu erhalten. Folgende Sequenzen wurden bestimmt:

N terminale Sequenzen:

45 kDa-Untereinheit: H₂N-SITLESMAKEH ANDLAVL

26 kDa-Untereinheit: H₂N-SDLTVVKGLQ SEIYVPIT

interne Sequenzen:

23 kDa-Untereinheit: H₂N-ENNVDLIEEQAGK

H₂N-SEQGIENEIL SNNTLCPEDA I

H₂N-AAIAEEEEVK

H₂N-HYWR

Die D-Prolin-Reduktase wurde bereits als ein aminoterninal durch eine covalent gebundene Pyruvylgruppe blockiertes Protein beschrieben (HODGINS & ABELES, 1969; SETO, 1978). Daher wurde das gereinigte Protein vor der SDS-PAGE und dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit o-Phenylendiamin umgesetzt, um die Pyruvylgruppe abzuspalten und das Enzym dem Edman-Abbau zugänglich zu machen (3.2.10.2.). Die anschließende aminoterninale Sequenzierung ergab für die 23 kDa-Untereinheit folgende Sequenz, welche eine der bereits bekannten internen Sequenzen enthielt:

N terminale Sequenz:

23 kDa-Untereinheit: H₂N-IGPASKENSR **HYWREPLVIE** VMNDEEFDLA

4.9. Nachweis von Carbonylgruppen in der D-Prolin-Reduktase

Da es sich bei der beschriebenen Pyruvylgruppe um eine α -Ketocarbonsäure handelt, wurde die gereinigte D-Prolin-Reduktase zur Charakterisierung mit FTSC, welches spezifisch mit Carbonylgruppen reagiert, markiert (3.2.10.1.).

Nach dieser Markierung zeigten sowohl die 23 kDa-Untereinheit als auch 26 kDa-Untereinheit deutliche Fluoreszenzsignale (Abb. 4.13).

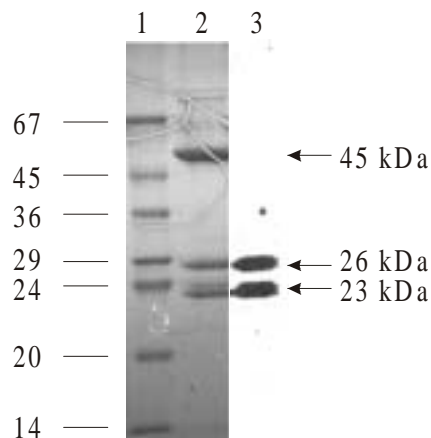


Abb. 4.13: Fluoreszenzmarkierung der gereinigten und im 12 %igen (v/v) SDS-Gel getrennten D-Prolin-Reduktase (0,5 μ g) mit FTSC. Das Gel wurde mit Serva Blau G 250 gefärbt. Spur 1: Molekulargewichtsmarker in kDa, Spur 2: D-Prolin-Reduktase nach Gelfiltration an Superose[®]6 HR 10/30, Spur 3: D-Prolin-Reduktase nach Reaktion mit FTSC und Auswertung am PhosphorImager.

4.10. Bestimmung der substratbindenden Untereinheit der D-Prolin-Reduktase

In den bisher publizierten Reaktionsmechanismen der D-Prolin-Reduktase wurde die Pyruvylgruppe als substratbindende Gruppe postuliert (HODGINS & ABELES, 1969; SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a).

Die Bestimmung der substratbindenden Untereinheit der D-Prolin-Reduktase wurde von Dr. A. Pich durchgeführt. Um die substratbindende Untereinheit nachzuweisen, wurde das Protein mit [¹⁴C]-L-Prolin unter nachträglicher Zugabe von NaBH₄ über eine Reduktion markiert (3.2.10.3.). In der 23 kDa-Untereinheit wurde die höchste Radioaktivität detektiert (Abb. 4.14). In den durchgeführten Kontrollansätzen ohne NaBH₄ als Reduktionsmittel oder mit nichtradioaktivem L-Prolin im Überschuß (500:1)

erfolgte keine Markierung der 23 kDa-Untereinheit. Es wurde jedoch eine leichte Erhöhung der Radioaktivität in der 26 kDa-Untereinheit festgestellt.

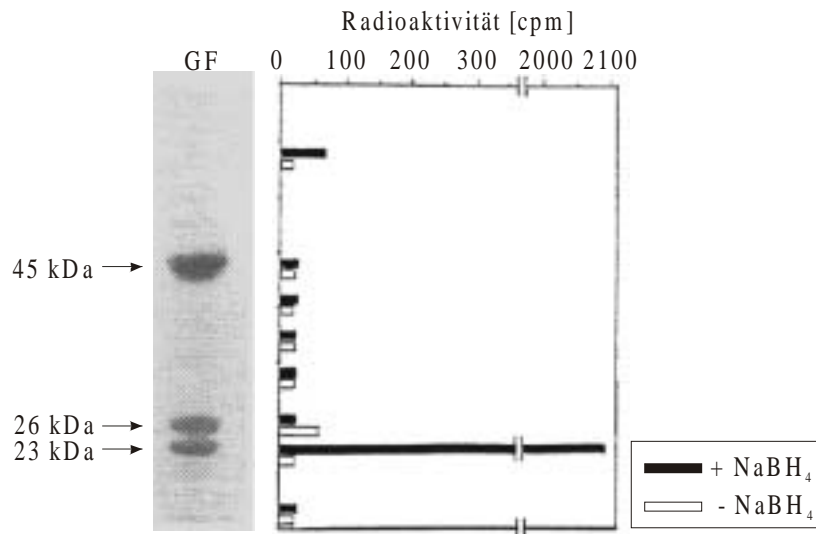


Abb. 4.14: Markierung der gereinigten D-Prolin-Reduktase (100 µg) mit [¹⁴C]-L-Prolin in Gegenwart der Prolin-Racemase (500 µg) und Trennung im 12 %igen (v/v) SDS-Gel. Das Gel wurde in Stücke geschnitten und die Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt. Das Referenz-Gel wurde mit Serva Blau G250 gefärbt. GF: gereinigte D-Prolin-Reduktase nach Gelfiltration an Superose[®] 6 HR 10/30.

4.11. Nachweis von Selenocystein in der D-Prolin-Reduktase

Um Selenocystein als die selenhaltige Komponente der D-Prolin-Reduktase zu identifizieren, wurde das gereinigte Protein von Dr. P. Rücknagel mit Vinylpyridin markiert und mittels Reversed Phase-Chromatographie und Edman-Abbau analysiert (3.2.10.6.). Unter normalen reduzierenden Bedingungen mit β-Mercaptoethanol konnten keine markierten Aminosäuren in dem selenocysteinhaltigen Peptid von Glu¹⁴⁰ bis Lys²¹² in der 26 kDa-Untereinheit (s. Anhang I) nachgewiesen werden. Erst durch den Einsatz von Tricarboxyethylphosphin als Reduktionsmittel konnte ein pyridylethyliertes Selenocystein an Position Sec¹⁵² identifiziert werden (s. Anhang I).

4.12. Klonierung und Sequenzierung der Gene der D-Prolin-Reduktase

Nach der Aufreinigung der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* und der aminoterminalen Sequenzierung ihrer drei Untereinheiten bestand nun die Aufgabe, erstmals die Gene einer D-Prolin-Reduktase zu isolieren, um weitergehende molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation an *C. sticklandii* zu ermöglichen.

Für diese Arbeiten stand bereits eine partielle Genbank der chromosomalen DNA von *C. sticklandii* zur Verfügung, welche in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Pich angelegt worden war. Zur Herstellung dieser Genbank war die Gesamt-DNA partiell mit den beiden Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Sau* 3A verdaut, in den Vektor pBluescript II SK+ ligiert und in den *E. coli*-Stamm XL2-Blue transformiert worden. Die Plasmid-DNA von je 96 Klonen wurden vereinigt. Insgesamt war die Plasmid-DNA von ca. 4 000 *Sau* 3A-Klonen mit einer durchschnittlichen Größe von 2,0 kb und ca. 2 500 *Eco* RI-Klonen mit einer durchschnittlichen Größe von 3,5 kb verfügbar.

4.12.1. Klonierungsstrategie

Aus den bekannten N-terminalen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase konnten nun degenerierte Oligonukleotide abgeleitet werden, um über PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA aus *C. sticklandii* als Template DNA-Fragmente zu amplifizieren, welche Teile der Gene der D-Prolin-Reduktase enthielten. Diese DNA-Fragmente sollten anschließend als Sonden zur Hybridisierung mit partiell verdauter Gesamt-DNA und zum Durchsuchen der vorhandenen partiellen Genbank verwendet werden, um die vollständige Gensequenz der D-Prolin-Reduktase zu isolieren und zu analysieren.

4.12.2. Auswahl eines geeigneten Klonierungsvektors

Zur Klonierung der durch PCR erhaltenen DNA-Fragmente bot sich das pGEM[®]-T-Vektor-System an, welches an der Klonierungsstelle an beiden Enden 3'-Thymidin-Überhänge besitzt. Diese 3'-Thymidin-Überhänge sind kompatibel zu den 3'-Adenin-Überhängen von PCR-Produkten, die von einigen thermostabilen DNA-Polymerasen (z.B. *Tfl*, *Taq*,) angehängt werden, so daß die Effizienz der Ligation der PCR-Fragmente

in das Plasmid sehr hoch ist. Der Vektor kommt in *E. coli* in hoher Kopienzahl vor und besitzt eine Multiklonierungsstelle mit Erkennungssequenzen für viele Restriktionsenzyme. Eine Ampicillinresistenz ermöglicht die Selektion transformierter Klone. Durch das Vorhandensein des *lacZ'*-Gens können Klone, welche ein Insert enthalten, mit Hilfe des X-Gal-Testes identifiziert werden (3.3.9.2.). Die Multiklonierungsstelle wird darüber hinaus von Sequenzen flankiert, welche komplementär zum “universal sequencing primer” bzw. “reverse sequencing primer” sind, so daß eine direkte Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente möglich ist (Abb. 4.15).

Die Ligationen erfolgten wie unter 3.3.8.3 beschrieben. Die besten Ergebnisse wurden mit einem molaren Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA von 1:3 erzielt. Als Wirtsorganismus wurde der *E. coli*-Stamm XL2-Blue eingesetzt (3.9.1.).

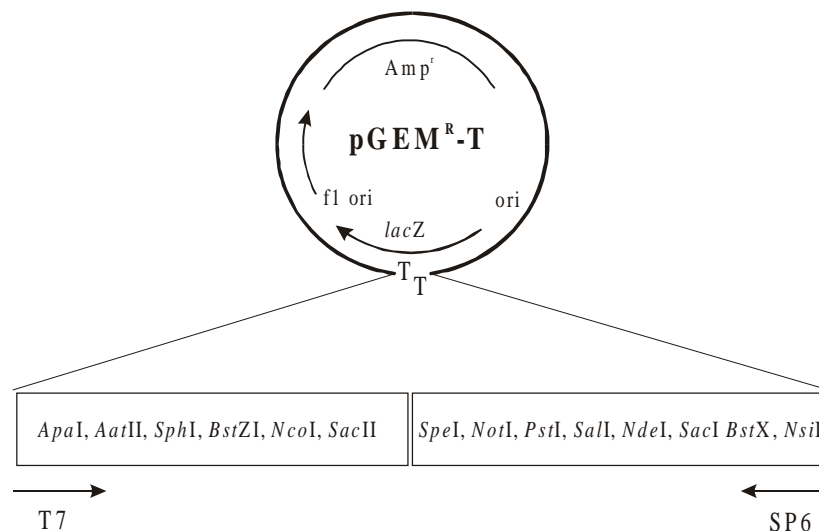


Abb. 4.15: Struktur des pGEM[®]-T-Vektors.

4.12.3. Klonierung der D-Prolin-Reduktase

Anhand der N-terminalen und internen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet.

Dazu wurden die Proteinsequenzen in die entsprechende DNA-Sequenz übersetzt und Oligonukleotide gewählt, welche eine möglichst geringe Variabilität aufwiesen. Da mit zunehmender Variabilität die Konzentration des passenden Fragmentes sinkt, wurden die Oligonukleotide überwiegend als 17-mere synthetisiert (GIBCO BRL LIFE TECHNO-

LOGIES GmbH). Diese Länge garantiert einerseits eine ausreichende Spezifität, andererseits wird die Variabilität niedrig genug gehalten.

Die Oligonukleotide wurden sowohl in N→C-Orientierung, als auch in reverser Orientierung hergestellt. Zusätzlich wurden zwei 30-mere ebenfalls in N→C-Orientierung sowie in reverser Orientierung abgeleitet, deren Variabilität durch Vergleich mit der Codonnutzungstabelle von *C. sticklandii* (GARCIA & STADTMAN, 1992) drastisch verringert wurde. Da der G+C-Gehalt von *C. sticklandii* mit 31 mol % sehr gering ist (JOHNSON & FRANCIS, 1975), wurde den Basen A und T in den variablen Positionen der Vorzug gegenüber C und G gegeben (3.3.8.1.).

Die Oligonukleotide wurden in unterschiedlichen Kombinationen mit chromosomaler DNA aus *C. sticklandii* als Template zur DNA-Amplifikation in einer PCR-Reaktion eingesetzt (3.3.8.1.). Spezifisch erscheinende PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gel-Extraktion (3.3.7.) isoliert, in den pGEM[®]-T-Vektor ligiert und in *E. coli* XL2-Blue vermehrt. Nach einer Plasmid-Präparation (3.3.6.2.) wurde durch Restriktionsanalyse (3.3.8.2.) mit *Apa* I und *Pst* I die Größe des einklonierten Fragmentes bestimmt. Entsprach die Größe des Fragmentes der des PCR-Produktes, wurde dieses Plasmid sequenziert (3.3.12.) und die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit der bereits bekannten Proteinsequenz verglichen.

4.12.4. Sequenzierung spezifischer Klone

Die Auswertung der Sequenzdaten zeigte, daß mit den Oligonukleotidkombinationen G10/B08 sowie B07/C03 (s. Anhang) zwei PCR-Produkte amplifiziert und kloniert worden waren, die bekannte aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase enthielten. Die PCR mit den Oligonukleotiden G10/B08 ergab ein ca. 1,4 kb großes PCR-Produkt, welches die aminoterminalen Sequenzen der 45 kDa- und der 23 kDa-Untereinheiten enthielt. Dieser Klon wurde pPRO1 genannt. Durch Kombination der Oligonukleotide B07/C03 wurde ein ca. 0,9 kb großes DNA-Fragment kloniert. Dieser Klon enthielt die aminoterminalen Sequenzen der 23 kDa- und 26 kDa-Untereinheiten und wurde mit pPRO2 bezeichnet (Abb. 4.16).



Abb. 4.16: Schematische Darstellung der Plasmide pPRO1 und pPRO2 und die daraus resultierende Anordnung der Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase. G10: Oligonukleotid gegen den N-Terminus der 45 kDa-Untereinheit, B07, B08: Oligonukleotide gegen den N-Terminus der 23 kDa-Untereinheit, C03: Oligonukleotid gegen den N-Terminus der 26 kDa-Untereinheit. Die Pfeile kennzeichnen die Orientierung der Oligonukleotide in Transkriptionsrichtung (→) bzw. entgegen der Transkriptionsrichtung (←).

4.12.5. Southern-Hybridisierung gegen chromosomale DNA und die partielle Genbank von *C. sticklandii*

Das Insert des Plasmides pPRO1 wurde sowohl für Hybridisierungen gegen Gesamt-DNA als auch gegen die partielle Genbank eingesetzt.

Von der Gesamt-DNA wurden je 16,5 µg mit den Restriktionsenzymen *Xba* I, *Hind* III, *Bam* HI, *Eco* RI, *Sau* 3A, *Pst* I und *Ksp* I verdaut. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac* II und *Spe* I geschnitten und das ausgeschnittene DNA-Fragment nach DIG-Markierung (3.3.8.4.) als Sonde eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß diese Sonde mit der Vektor-DNA der Genbankklone hybridisierte, da alle getesteten Klone ein Signal gaben. Deshalb wurde das unklonierte PCR-Produkt als Sonde mit DIG markiert und verwendet. Die Sonde wurde mit "PRO1" bezeichnet.

Die verdaute chromosomale DNA sowie die Genbankklone wurden auf Nylonmembranen transferiert (3.3.10.1., 3.3.10.4.) und gegen die markierte Sonde hybridisiert (3.3.11.1.).

Nach der Auswertung der Southern-Hybridisierung mittels Chemiluminiszenz-Nachweis (3.3.11.2.) konnten ein ca. 2,5 kb großes *Eco* RI-Fragment und ein ca. 2,0 kb großes *Sau* 3A-Fragment nachgewiesen werden (Abb. 4.17).

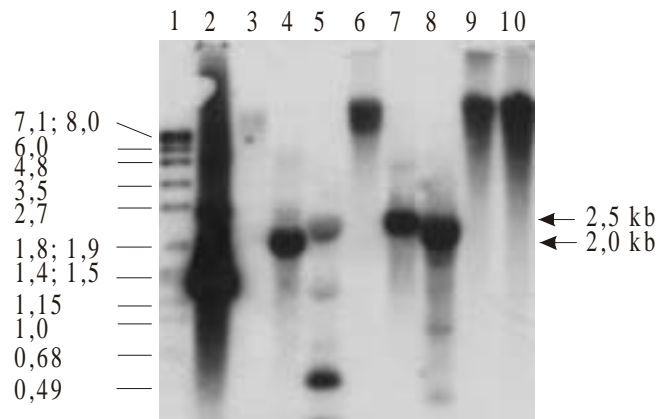


Abb. 4.17: Southern-Blot-Hybridisierung restriktionsverdauter chromosomaler *C. sticklandii*-DNA mit dem DIG-markierten Sonde "PRO1". Das 2,5 kb *Eco* RI-Fragment und das 2,0 kb *Sau* 3A-Fragment sind durch Pfeile gekennzeichnet. Spur 1: DIG-DNA-Marker in kb, Spur 2: unmarkierte Sonde (0,5 µg), Spur 3: ungeschnittene DNA (0,3 µg), Spur 4: *Xba* I, Spur 5: *Hind* III, Spur 6: *Bam* HI, Spur 7: *Eco* RI, Spur 8: *Sau* 3A, Spur 9: *Pst* I, Spur 10: *Ksp* I

Das Durchsuchen der *Eco* RI- und *Sau* 3A-Genbanken ergab zwei schwächere positive Signale unter den *Sau* 3A-Pools sowie ein starkes Signal unter den *Eco* RI-Pools. Durch Koloniehybridisierung des *Eco* RI-Pools wurden drei positive *Eco* RI-Klone erhalten, unter denen sich der Klon pUK1 befand (Abb. 4.18). Dieser Klon enthielt ein ca. 4,8 kb großes Insert und bestand aus zwei nahezu gleich großen *Eco* RI-Fragmenten (Abb. 4.17, 4.19).

4.12.6. Sequenzierung des klonierten D-Prolin-Reduktase-Genbereiches

Die Sequenzierung des Plasmides pUK1 wurde in beiden Orientierungen durchgeführt. Ausgehend von den mit dem "universal sequencing primer" bzw. "reverse sequencing primer" erhaltenen Sequenzen erfolgten weiterführende Sequenzierungen mit Fluorescein-15-ATP und synthetischen Oligonukleotiden, die anhand der aufgeklärten Sequenz hergestellt wurden (Abb. 4.18).

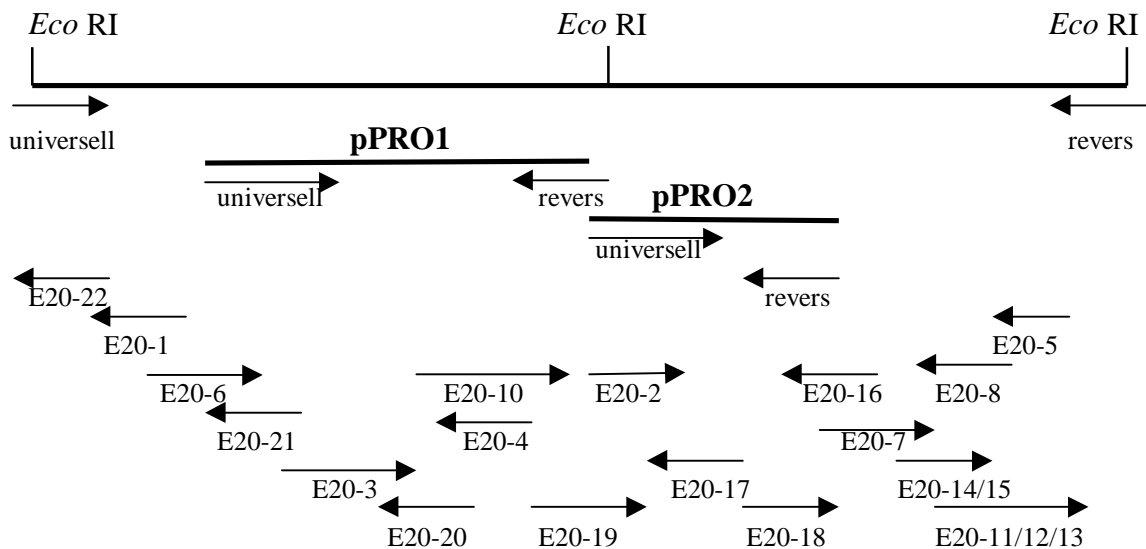


Abb. 4.18: Sequenzierschema des Plasmides pUK1. Dargestellt ist das 4,85 kb große Insert des Plasmides mit den Schnittstellen des Restriktionsenzymes *EcoRI*. Die Positionen und Orientierungen der eingesetzten Oligonukleotide sind durch Pfeile gekennzeichnet, (→) in bzw. (←) entgegen die Transkriptionsrichtung.

Es konnte die Basenfolge des gesamten Inserts des Plasmides pUK1 ermittelt werden. Das 4,85 kb lange DNA-Fragment enthält die fünf offenen Leserahmen *prdA*, *prdB*, *prdC*, *prdD* und *prdE* sowie eine weitere *EcoRI*-Schnittstelle bei 2371 bp, die auf den partiellen Verdau der chromosomalen DNA bei der Herstellung der Genbank zurückzuführen ist (Abb. 4.19, s. Anhang I). Die Bezeichnung der offenen Leserahmen mit der *prd*-Nomenklatur geschieht in Kenntnis der später vorgenommenen Zuordnungen bereits hier.

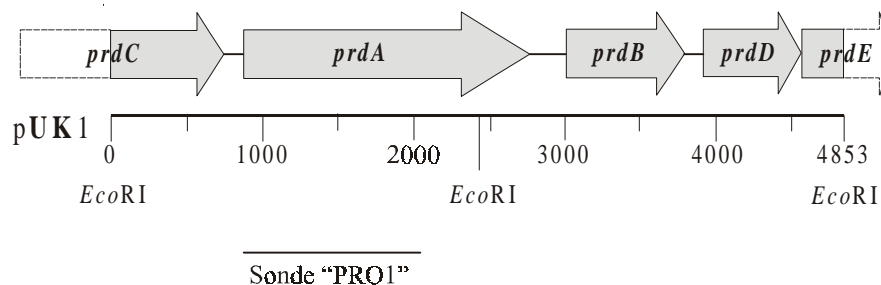


Abb. 4.19: Darstellung des 4,85 kb großen Inserts des Plasmides pUK1 und der sich nach der Sequenzierung ergebenden Genstruktur der D-Prolin-Reduktase. Die *EcoRI*-Schnittstellen sowie die zur Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzte Sonde "PRO1" sind angegeben.

4.12.6.1. Analyse von *prdA*

Der offene Leserahmen *prdA* (Abb. 4.19, s. Anhang I) kodiert für ein 630 Aminosäuren großes Protein der D-Prolin-Reduktase mit einer molekularen Masse von 68 kDa. Vor dem Startcodon befindet sich eine aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu bekannten Ribosomenbindestellen von *E. coli* (SHINE und DALGARNO, 1974) typische Shine-Dalgarno-Sequenz (Tab. 4.3). Promotorstrukturen in Anlehnung an die Konsensussequenzen der -10 und -35-Regionen für Promotoren aus Clostridien (YOUNG *et al.*, 1989) und *E. coli* (MCCLURE, 1985) wurden jedoch nicht identifiziert. Das Protein umfaßt die Sequenz der 45 kDa-Untereinheit von Val¹ bis Thr⁴²⁵ und die Sequenz der 23 kDa-Untereinheit von Ile⁴²⁷ bis Lys⁶³⁰. Die in der DNA-Sequenz enthaltene Aminosäure Cys⁴²⁶ wurde in den analysierten Proteinsequenzen der 45 kDa- und der 23 kDa-Untereinheiten nicht detektiert (4.7.). Da sich die 23 kDa-Untereinheit als aminoterminal blockiert erwiesen hatte, könnte es sich bei Cys⁴²⁶ um die Aminosäure handeln, aus der die blockierende Carbonylgruppe gebildet wird. Die DNA-Sequenz enthält stromaufwärts von Cys⁴²⁶ keine typische Shine-Dalgarno-Sequenz und kein Startcodon. Daher lag die Vermutung nahe, daß *prdA* für ein 68 kDa großes Proprotein kodiert, welches posttranslational in die 45 kDa- und die aminoterminal blockierte 23 kDa-Untereinheit gespalten wird (Kap.5.2.1.).

4.12.6.2. Analyse von *prdB*

Der 287 bp stromabwärts von *prdA* gelegene offene Leserahmen *prdB* (Abb. 4.19, s. Anhang I) kodiert für ein 242 Aminosäuren großes Protein mit einer molekularen Masse von 26 kDa. Weiterhin konnte ein TGA-Codon innerhalb von *prdB* identifiziert werden, welches für ein Selenocystein kodiert. Dieses Selenocystein wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Peptides nachgewiesen (4.11.) Direkt stromabwärts des TGA-Codons wurden jedoch keine spezifischen Haarnadel-Strukturen der mRNA für den Einbau von Selenocystein gefunden, wie sie für die Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli* nachgewiesen worden sind (ZINONI *et al.*, 1990; HÜTTENHOFER *et al.*, 1996; HÜTTENHOFER & BÖCK, 1998a,b). Stromaufwärts von *prdB* befinden sich vor dem Startpunkt eine Shine-Dalgarno-Sequenz sowie eine typische σ^{70} -Promotorsequenz und weiter stromaufwärts eine σ^{54} -Promotorsequenz (s. Anhang I, Tab. 4.3). Zwischen dem Stopcodon von *prdB* und dem in 3'-Richtung folgenden offenen Leserahmen *prdD*

wurde eine dem rho-unabhängigen Terminator in *E. coli* ähnliche Struktur mit dem Computerprogramm DNASIS identifiziert. Dieser zeichnet sich durch eine G+C-reiche Palindrom-Sequenz aus. Die freie Energie beträgt -12,5 kJ/mol (Abb. 4.20).

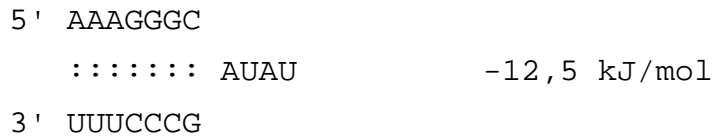


Abb. 4.20: Terminatorstruktur der von der DNA-Sequenz des Plasmides pUK1 abgeleiteten mRNA.

4.12.6.3. Analyse von *prdC*, *prdD* und *prdE*

Der 117 bp stromaufwärts von *prdA* gelegene offene Leserahmen *prdC* (s. Anhang I, Abb. 4.19) beginnt am 5'-Ende mit der *Eco* RI-Schnittstelle des Klons pUK1 und kodiert für die 237 C-terminalen Aminosäuren eines Proteins, welches keine Homologien zu bekannten Proteinsequenzen der D-Prolin-Reduktase aufweist. Im Bereich zwischen *prdC* und *prdA* konnten keine Terminatorstrukturen identifiziert werden.

Stromabwärts von *prdB* wurden hinter der Terminatorstruktur der offene Leserahmen *prdD*, welcher für ein 254 Aminosäuren großes Protein kodiert, und der unvollständige offene Leserahmen *prdE* identifiziert. Die abgeleitete Proteinsequenzen von *prdD* zeigt Homologien zum mittleren Bereich, die abgeleitete Proteinsequenz von *prdE* zum C-terminalen Bereich des Proproteins PrdA (Kap. 5.2.4.). Die offenen Leserahmen *prdD* und *prdE* sind durch 15 bp voneinander getrennt. Vor beiden Sequenzen liegen Shine-Dalgarno-Sequenzen. Bekannte Promotorstrukturen (MCCLURE, 1985; YOUNG *et al.*, 1989; WÖSTEN, 1998) konnten jedoch nicht gefunden werden (s. Anhang I; Tab.4.3).

Tab. 4.3: Potentielle Promotorsequenzen und Shine-Dalgarno-Sequenzen für die offenen Leserahmen des D-Prolin-Reduktase-Genbereiches im Vergleich mit den Konsensus-Sequenzen für *E. coli* und Clostridien (MCCLURE, 1985; YOUNG *et al.*, 1989; WÖSTEN, 1998). Stark konservierte Basen in den Konsensussequenzen sind fett gedruckt.

Gen	-35-Region bzw. -24-Region	-10-Region bzw. -12-Region	Shine-Dalgarno- Sequenz	Startcodon
<i>prdA</i>	-	-	GGAGG	GTG
<i>prdB</i>	σ^{70} TTAATG σ^{54} TGGTCT	TAATAT TTGC	GGAGG	ATG
<i>prdC</i>	-	-	-	-
<i>prdD</i>	-	-	GAAGG	ATG
<i>prdE</i>	-	-	GAAGG	ATG

<i>E. coli</i>	σ^{70} TTGAC(A)	TA(T)AAT	GGAGG	
Clostridien	σ^{70} TTGACA	TATAAT		
<i>E. coli</i>	σ^{54} TGGCAC	TTGCA/T		

4.13. Untersuchungen zur Transkription durch Northern-Blot-Hybridisierung

Nach Analyse der klonierten DNA-Sequenzen war es von Interesse, die Expression der offenen Leserahmen und die Organisation der Gene der D-Prolin-Reduktase in *C. sticklandii* zu untersuchen.

Es wurden *C. sticklandii*-Zellen auf modifiziertem Minimalmedium (2.2.1.) unter Zusatz von 20 mM D,L-Prolin angezogen und in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert (3.3.6.3.) und auf eine Nylon-Membran transferiert (3.3.10.2.). Die DNA-Sonden wurden mittels PCR gegen zwei Bereiche des *prdA*-Gens ("prdA1" gegen die 45 kDa-Untereinheit und "prdA2" gegen die 23 kDa-Untereinheit) sowie gegen das *prdB*-Gen der D-Prolin-Reduktase als Template-DNA amplifiziert und nach DIG-Markierung zur Hybridisierung mit der RNA eingesetzt (3.3.11.1.).

Es wurden neben einem unspezifischen, durch rRNA verursachten Hintergrund zwei deutliche spezifische Signale bei 4,5 und 0,8 kb detektiert. Mit der Sonde gegen das

prdA-Gen wurde ein Hybridisierungssignal bei 4,5 kb nachgewiesen. Bei 0,8 kb konnte mit dieser Sonde jedoch kein mRNA-Signal detektiert werden (Abb. 4.21).

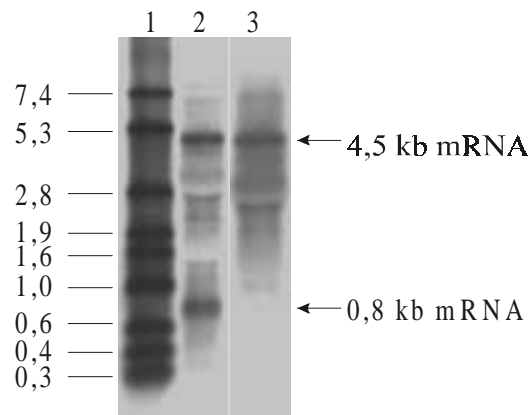


Abb. 4.21: Northern-Blot-Hybridisierung der D-Prolin-Reduktase-Region in *C. sticklandii*. Je Spur wurden 6 µg Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Gel getrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und hybridisiert. Spur 1: DIG-RNA-Marker in kb, Spur 2: Hybridisierung mit der Sonde "prdB" gegen die interne Region von *prdB*, Spur 3: Hybridisierung mit der Sonde "prdA2" gegen die interne Region von *prdA* (Bereich der 23 kDa-Untereinheit).

Das 4,5 kb-Transkript umfaßt somit die beiden Gene der D-Prolin-Reduktase *prdA* und *prdB* wahrscheinlich bis zum Terminator stromabwärts von *prdB* sowie vermutlich das *prdC*-Gen stromaufwärts von *prdA*, von dem jedoch nur der C-terminale Teil der Sequenz im Plasmid pUK1 enthalten ist. Die Gene für die drei Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase sind somit in einem Operon lokalisiert. Da das 0,8 kb-Transkript nur bei der Hybridisierung mit der Sonde gegen *prdB* detektiert wurde, kann davon ausgegangen werden, daß es sich um ein zusätzliches Transkript für das Selenoprotein PrdB handelt. Die Operonstruktur der sequenzierten D-Prolin-Reduktase-Gene des Plasmides pUK1 ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

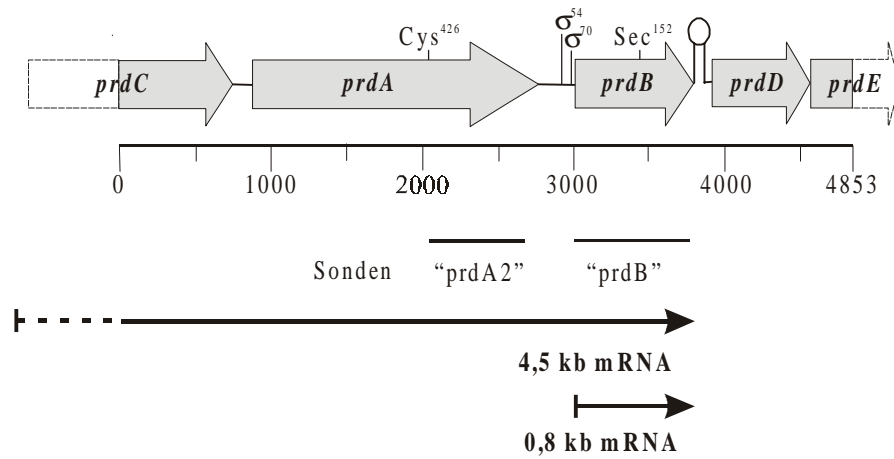


Abb. 4.22: Operonstruktur des D-Prolin-Reduktase-Genbereiches. Cys⁴²⁶: Vorläufer der amino-terminalen Carbonylgruppe der 23 kDa-Untereinheit; Sec¹⁵²: Selenocystein; σ^{54} : σ^{54} -abhängiger Promotor; σ^{70} : σ^{70} -abhängiger Promotor. Die zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzten Sonden "prdA2" und "prdB" sind angegeben.

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die im Gegensatz zur Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* bisher sehr wenig untersuchte D-Prolin-Reduktase dieses Organismus zu charakterisieren sowie anhand der gewonnenen Daten den Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Spaltung zu δ -Aminovalerat zu untersuchen. Im Vorfeld gab es Hinweise darauf, daß für die Spaltung des D-Prolins Elektronen benötigt werden, die möglicherweise über eine FAD-abhängige NADH-Dehydrogenase und ein eisenabhängiges Protein auf die D-Prolin-Reduktase übertragen werden (STADTMAN, 1965; SCHWARTZ & MÜLLER, 1979; SETO, 1980a). Ein energiekonservierender Schritt in Form einer Substratkettenphosphorylierung, verbunden mit einer ATP-Synthese wie bei der Umsetzung von Glycin durch die Glycin-Reduktase (ARKOWITZ & ABELES, 1989), konnte bisher nicht nachgewiesen werden (ARKOWITZ *et al.*, 1994). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die D-Prolin-Reduktase zur Homogenität gereinigt. Das zugehörige Gensystem wurde erstmals identifiziert und analysiert. Es konnte ein modifizierter Reaktionsmechanismus für die D-Prolin-Reduktase postuliert werden.

5.1. Lokalisation und Reinigung der D-Prolin-Reduktase

Die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit als cytoplasmatisches Protein identifiziert. Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen die D-Prolin-Reduktase als ein membrangebundenes Protein beschrieben wurde (SETO & STADTMAN, 1976), konnten in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Membranständigkeit der D-Prolin-Reduktase gefunden werden.

Als Ursache dafür kann die unterschiedliche Methodik des Zellaufschlusses in Betracht gezogen werden. Während SETO & STADTMAN (1976) Sphäroplasten präparierten und diese zur Freisetzung der membrangebundenen Proteine mit Detergenzien behandelten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Membranpräparation mittels Ultrazentrifugation (3.2.1.) durchgeführt, um cytoplasmatische Proteine von vornherein abzutrennen und nur die membrangebundenen Proteine zur Enzymreinigung einzusetzen. Durch anschließende Analyse der D-Prolin-Reduktase-Aktivität in der cytoplasmatischen Fraktion und in der Membranfraktion konnten ca. 99 % der Enzymaktivität im Cytoplasma und den Waschfraktionen der Membranen nachgewiesen werden. In der

Membranfraktion verblieb lediglich 1 % der Enzymaktivität (Abb. 4.4). Auch SCHWARTZ & MÜLLER (1979) wiesen sowohl die NADH-abhängige als auch die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität im Cytoplasma nach.

Die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität konnte nur im Rohextrakt bestimmt werden. Nach dem ersten Reinigungsschritt war nur noch die DTT-abhängige Aktivität meßbar. Es liegt also nahe, daß wenigstens eine Proteinkomponente am Transfer der Elektronen von NADH auf die D-Prolin-Reduktase beteiligt sein muß. Eine Elektronenübertragung über eine FAD-abhängige NADH-Dehydrogenase und ein Eisen-Schwefel-Protein wurde bereits postuliert (STADTMAN, 1965; SCHWARTZ & MÜLLER, 1979; SETO, 1980a). Für *Clostridium sporogenes* wurde die Kopplung der Prolinreduktion mit einem Protonentransport über die Cytoplasmamembran beschrieben (LOVITT *et al.*, 1986). Eine Assoziation der D-Prolin-Reduktase an die Zellmembran und die Existenz einer noch nicht aufgeklärten Elektronentransportkette vom NADH auf die D-Prolin-Reduktase ist daher nicht auszuschließen.

Das Genprodukt des im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Genes *prdC* zeigt Homologien zu einem elektronenübertragenden, membranassoziierten RnfC-Protein aus *Rhodobacter capsulatus*. Die Möglichkeit einer elektronentransferierenden Funktion des Proteins PrdC aus *C. sticklandii* wird in Kapitel 5.2.3. diskutiert.

Die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung und drei sich anschließende säulenchromatographische Reinigungsschritte mit einer Ausbeute von 1,1 % zur Homogenität gereinigt (Tab. 4.1). Das Enzym besitzt eine molekulare Masse von ca. 870 kDa (Abb. 4.8, 4.9) und besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten mit molekularen Massen von 23, 26 und 45 kDa (Abb.4.10). Zwei Kontrollexperimente bestätigten die von bisherigen Untersuchungen abweichenden Ergebnisse (SETO & STADTMAN, 1976) der Proteinreinigung. Die Auftrennung der im nativen Gel erhaltenen Proteinbande in der SDS-PAGE zeigte die gleiche Untereinheitsstruktur wie das Protein nach dem letzten Reinigungsschritt (Abb. 4.12). Eine Bestimmung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität im nativen Gel bestätigte ebenfalls die Ergebnisse der Proteinreinigung (Abb. 4.11). Es handelt sich im Gegensatz zu früheren Untersuchungen somit um ein aus 10 Protomeren bestehendes heterotrimeres Enzym mit einer Untereinheitenstruktur von $(\alpha\beta\gamma)_{10}$.

SETO & STADTMAN (1976) hatten die D-Prolin-Reduktase als ein homodekames Protein mit einer Molekülmasse von 300 kDa charakterisiert. Eine Auftrennung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen ergab eine aminoterminal - vermutlich durch eine kovalent gebundene Pyruvylgruppe - blockierte Untereinheit von 30 kDa (HODGINS & ABELES, 1967, 1969; SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a). Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene 23 kDa-Untereinheit erwies sich ebenfalls als aminoterminal blockiert. Die gelungene Abspaltung der blockierenden Gruppe mit o-Phenylendiamin (DIXON & FIELDS, 1972) weist auf eine Blockierung durch eine Pyruvylgruppe hin, da dieses Reagenz mit α -Ketocarbonsäuren reagiert. Die Pyruvylgruppe stellt eine solche α -Ketocarbonsäure dar. Auch konnten nach einer Markierung der gereinigten D-Prolin-Reduktase mit FTSC, welches spezifisch mit Carbonylgruppen reagiert (BAUMANN *et al.*, 1981), in den 23- und 26 kDa-Untereinheiten signifikante Fluoreszenzsignale beobachtet werden (Abb. 4.13). Diese Ergebnisse sind ebenfalls als Hinweis auf die Blockierung der 23 kDa-Untereinheit durch eine Pyruvylgruppe zu werten. Die Markierung der 26 kDa-Untereinheit mit FTSC scheint in Zusammenhang mit einer Carbonylgruppe innerhalb der Aminosäuresequenz zu stehen, die jedoch keiner Aminosäure explizit zugeordnet werden konnte.

Weiterhin wurde im Verlauf dieser Arbeit die Bindung des Substrates D-Prolin an die 23 kDa-Untereinheit nachgewiesen (Abb. 4.14). Eine Bindung des D-Prolins an die Pyruvylgruppe wurde bereits postuliert (HODGINS & ABELES, 1969; SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a). Die 23 kDa-Untereinheit könnte daher der von SETO & STADTMAN (1976) beschriebenen 30 kDa-Untereinheit entsprechen, deren Aminosäure-Zusammensetzung sich jedoch deutlich von der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten 23 kDa-Untereinheit unterscheidet.

5.2. Analyse der klonierten Gene der D-Prolin-Reduktase

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die aminoterminalen Sequenzen der drei Untereinheiten der D-Prolin-Reduktase sowie interne Sequenzen der 23 kDa-Untereinheit bestimmt (4.7.). Anhand dieser Sequenzen konnten degenerierte Oligonukleotide abgeleitet und zur PCR mit chromosomaler *C. sticklandii*-DNA eingesetzt werden (Tab. 3.3). Trotz der relativ niedrig gehaltenen Variabilität wurden mit den 17-meren nur falsch-positive PCR-Produkte amplifiziert. Erst durch die Verwendung

von zwei 30-meren konnten durch PCR und Klonierung in den pGEM[®]-T-Vektor zwei positive Klone pPRO1 und pPRO2, die das Gen der D-Prolin-Reduktase partiell enthielten, isoliert werden. Die 30 bp langen Oligonukleotide konnten aufgrund ihrer Länge spezifischer binden und lieferten trotz höherer Variabilität die richtigen PCR-Produkte (Abb. 4.16).

Durch den Einsatz der positiven PCR-Produkte als Sonden zur Hybridisierung gegen die vorhandene partielle Genbank von *C. sticklandii* konnte ein 4853 bp großer DNA-Abschnitt isoliert werden, welcher fünf offene Leserahmen und die dazwischen liegenden Intergenregionen enthielt (Abb. 4.19, s. Anhang). Zwei dieser offenen Leserahmen ließen sich als die vollständigen Gene *prdA* und *prdB* der D-Prolin-Reduktase identifizieren. Am 5'-Ende des sequenzierten DNA-Bereichs ist der noch unvollständige offene Leserahmen *prdC* lokalisiert, am 3'-Ende befinden sich das Gen *prdD* und der ebenfalls noch unvollständige offene Leserahmen *prdE*. Die klonierten und sequenzierten Gene und Genprodukte wurden näher analysiert.

5.2.1. Die Funktion der *prdA*-Genregion

Das identifizierte *prdA*-Gen kodiert nach Vergleichen mit den bekannten aminoterminalen Sequenzen für ein 630 Aminosäuren großes Protein PrdA (accession no. AJ130879), welches die 45 kDa- und die 23 kDa-Untereinheiten umfaßt. Die aminoterminalen Sequenzen beider Untereinheiten konnten ebenso wie die internen Sequenzen der 23 kDa-Untereinheit in der translatierten Sequenz vollständig identifiziert werden (s. Anhang).

Das Protein PrdA wird als 68 kDa-Proprotein translatiert und posttranslational in die 45 kDa-Untereinheit und die aminoterminal blockierte 23 kDa-Untereinheit gespalten. Als blockierende Gruppe wurde eine Pyruvylgruppe postuliert, welche das Substrat D-Prolin bindet (HODGINS & ABELES, 1967, 1969; SETO & STADTMAN, 1976; SETO, 1980a). Untersuchungen im Verlauf dieser Arbeit auf Proteinebene lieferten ebenfalls Hinweise auf die Bildung einer Pyruvylgruppe (Kap. 5.1.). Weiterhin konnte die Bindung des Substrates an die 23 kDa-Untereinheit nach Isomerisierung von [¹⁴C]-L-Prolin zum [¹⁴C]-D-Prolin durch Zugabe der Prolin-Racemase in Form von *C. sticklandii*-Rohextrakt zum Meßansatz nachgewiesen werden (Abb. 4.14).

In der translatierten Sequenz wurde als Vorläufer für die blockierende Pyruvylgruppe ein Cysteinrest, Cys⁴²⁶, identifiziert (s. Anhang). In Untersuchungen von SETO (1978) war nach Wachstum von *C. sticklandii* in Gegenwart von [¹⁴C]-Serin eine radioaktiv markierte Pyruvylgruppe detektiert worden. Diese Daten sind als weiterer Hinweis darauf zu sehen, daß die Pyruvylgruppe entweder aus einem Serin- oder einem Cysteinrest im Zuge der posttranslationalen Spaltung des Proproteins gebildet wird. In bislang untersuchten Pyruvyl-Enzymen geht die Pyruvylgruppe im Zuge der Spaltung des Proproteins aus einem Serin- oder Cysteinrest hervor (VAN POLJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998; PERLER, 1998), worauf im Laufe der Diskussion noch näher eingegangen wird. Das Vorkommen eines pyruvylhaltigen 4,6 kb großen Peptides, welches durch milde alkalische Hydrolyse zwischen einem Serin- und einem Glutamatrest von der D-Prolin-Reduktase abgespalten werden soll (SETO, 1978), konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Sequenzvergleiche des Proproteins PrdA mit der Datenbank ergaben Homologien zu dem Protein GrdE der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (Abb. 5.1). Dieses Protein ist ein 47-kDa-Protein, welches zum PrdA-Protein um 180 Aminosäuren verkürzt ist und eine Identität von 20,9 % besitzt (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001). Es wird wie PrdA posttranslational gespalten.

Relativ hohe Homologien um die Spaltstelle wurden auch zu den Proteinen GrdE der Glycin-Reduktase und GrdG der Sarkosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999) gefunden (Abb. 5.1). Auch das Protein GrdI der Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* zeigte Homologien in diesem Bereich (23,1 % Identität), allerdings weist es an der Spaltstelle statt des Cysteinrestes einen Phenylalaninrest auf (Abb. 5.1). Die Proteine GrdE der Glycin-Reduktase und GrdG der Sarkosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* zeigen einen analogen Aufbau zum Protein PrdA. Beide werden als kürzere Proproteine mit einer molekularen Masse von 47 kDa translatiert und in zwei Untereinheiten von 25 kDa und 22 kDa prozessiert (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999). Auch hier zeigte sich jeweils die kleinere Untereinheit aminoterminal blockiert und dem Edman-Abbau erst nach Behandlung mit o-Phenylendiamin zugänglich. Die 22 kDa-Untereinheit der Glycin-Reduktase war mit FTSC markierbar und enthält eine

Pyruvylgruppe, die das Substrat Glycin über eine Schiff'sche Base bindet (WAGNER, 1997, WAGNER *et al.*, 1999).

Das Protein GrdI der Betain-Reduktase besteht aus einer Untereinheit von 48 kDa und wird im Gegensatz zu den anderen Reduktasen nicht gespalten. Es weist Sequenz-Ähnlichkeiten zur 25 kDa- und 22 kDa-Untereinheit der Glycin- bzw. Sarkosin-Reduktase auf (MEYER *et al.*, 1995; WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998). Das Substrat Betain kann als ein quartäres Amin nicht über eine Carbonylfunktion aktiviert werden. Es ist bereits optimal polarisiert für einen nukleophilen Angriff durch das Selenol-Anion am α -C-Atom. Ein Cysteinrest, an dem die Spaltung erfolgen könnte, wurde nicht nachgewiesen. GrdI besitzt an dieser Stelle einen Phenylalaninrest (Abb. 5.1) und bindet das Substrat Betain wahrscheinlich über ionische Wechselwirkungen (WAGNER *et al.*, 1999).

Weiterhin wurden sehr signifikante Homologien über den gesamten Bereich von PrdA zu einem Protein des pathogenen Bakteriums *Clostridium difficile* gefunden, dessen Genom derzeit am Sanger-Center sequenziert wird (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile) (Abb. 5.1). Die Bezeichnung dieses Proteins ebenfalls mit PrdA geschieht in Kenntnis des identifizierten Prolin-Reduktase-Operons in *C. difficile* (Kap. 5.5) bereits an dieser Stelle.

Das Proprotein PrdA zeigte außerdem hohe Homologien zu einem Protein des anaeroben Eubakteriums *Treponema denticola* (Abb. 5.1). Die Sequenzierung des Genoms dieses Organismus erfolgt derzeit am "Institut for Genomic Research" (TIGR; <http://www.tigr.org>). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten kann dieses Protein jedoch eher der Gruppe der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktasen als den Prolin-Reduktasen zugeordnet werden. Da zum jetzigen Zeitpunkt eine genaue Identifizierung dieses Proteines noch nicht vorliegt, wird es in dieser Arbeit als neues potentielles Proprotein (PotP) bezeichnet (Abb. 5.1).

Die Proteine PrdA und unbP aus *C. difficile* und *T. denticola* weisen an der gleichen Position wie die Proproteine aus *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* einen konservierten Cysteinrest auf und werden daher vermutlich ebenfalls posttranslational gespalten (Abb. 5.1).

C. s. PrdA TLQKKHFQNLKVEFGPETKIE^{NTT}YIRENICEDAVKVS^NLVTDIKVEIITPADY^GKYS 238
 C. d. PrdA SLTKKHFK-IDKVEFADETKIEG^{TTL}YIREIECKEANETQELV^{DM}KLEIITPKDY^ETYS 234
 T. d. PotP VKLELGIIPINDMKFGNKTA^{VNGT}CLEVNKALEALIKEDPLVTG^{VEL}HIAKPGDN^TRII 60
 C. s. GrdE MRLEVGNIFIKDIQFGD^{STK}VENGVLVYV^{NK}QELISELSSDEHIK^SIDSMEIVR^PGESVRIA 60
 E. a. GrdE MRLEIGNIFIKDIQFGE^{QTK}VENGVLVYV^{NK}DEMICKLSVIEH^IKSVLDIAR^PGESVRI 60
 E. a. GrdG MRLELKGIFIKDVQFGE^{KTT}VEKGVLYV^{NK}QEIIDLAMQDDRI^KSVNVELAR^PGESVRIA 60
 E. a. GrdI MKLELGNFYVEEIVFGE^{KTS}FKDGVLTINKQ^{EAL}DYVMEDE^NITHAELHIV^KPGDMVRLC 60

C. s. PrdA ETIMDVQPIATKEGDGKIGQGV^{TR}VIDGAIIMVTGTDEDEGVQIG^EFGSSEG-ELDANIMW 297
 C. d. PrdA EAVLDIQPIATKE-EGELGSGI^{TR}VIDGAVMVLVTGTDEDEGVQIG^EFGSSEG-ELNTTIMW 292
 T. d. PotP PVKDLVLEPRCKVEGSGV^{CF}PGFTGEAVVGAGKTHVLKGA^{AV}VTTGTVVG-FQEGIDM 119
 C. s. GrdE PVKDVLEPRVKVEGNGG^IFPGF^LSKVDT-VGEGK^{TN}VLKGA^{AV}VTTGKVVG-FQEGIDM 118
 E. a. GrdE PVKDVLEPRVKVEGPGG^IFPGV^ISKVET-DGSGRTHVLKGA^{AV}VTTGKVVG-FQEGIVDM 118
 E. a. GrdG PVKDVLEPRVKVEGSGAM^FPGMTN^KVKT-VGSGRTHALV^GSTVLT^{CG}KIVG-FQEGVIDM 118
 E. a. GrdI PVKEALEPRIKLDGRT-Y^FPGVTDEELTRC^GEGRTHAL^KGCSVLV^GKHWG^FQDGLIDM 119

C. s. PrdA GRPGAPDKGEILIKTQVTIKAG-----TNMERPG^LA^{AH}KATDFITQEIREAL^KKL 348
 C. d. PrdA GRPGAADKGEIFIKGQVTIKAG-----TNMERPG^LA^{AH}RAF^DYV^TQEIREAL^KKV 343
 T. d. PotP G-PGA^EYTP^FSKT^{VN}LVVDCKI---QDDV^TRAI^KE^KAL^RLMGL^KTAR^LY^LGEA^AKN^VKPA 175
 C. s. GrdE TGP^GADYTP^FSKT^{CN}VVIAEP---VDGL^KQ^HDEA^ALRM^VGL^KAG^YLGEA^RNI^TPDE 175
 E. a. GrdE SGVGA^EYTP^FSKT^{LN}LVVIAEP---EDG^IE^QHR^HE^VLRM^VGL^NAG^VY^IGEA^RS^VT^PDE 175
 E. a. GrdG SGPIA^KYCP^FSET^{NN}VCIV^VEP---VEGLE^THAYEA^AARM^VGL^KAAE^VY^GKAG^LDV^EPDE 175
 E. a. GrdI GGEGA^KYTY^STL^{KN}IVLV^GDT^NED^FE^KNE^QQ^KKN^KAL^RWAG^HKLAE^YIG^KTV^KDM^EP^QE 179

C. s. PrdA DDSEVVETEELAQYRRPG^KKKV^VI^IKEIMG--QGAMHD^NL^LLP^VEP^VGV^IGAK^PN^VDLGN 406
 C. d. PrdA DNSLVVDEEVIEQYRREG^KKKV^VVI^IKEIMG--QGAMHD^NL^LLP^VEP^VGL^AQ^PN^VDLGN 401
 T. d. PotP VETYETL^PPFVEQAKQ^YPN^LPKV^GYV^YMLQ^S--QGL^LH^DT^YY^GV^DVK-----QI 222
 C. s. GrdE VKVYET^KPIFES^VK^EY^{PN}L^{PK}VAY^VYML^QT--QGL^LH^DT^YY^GV^DAK-----KI 222
 E. a. GrdE VKVYET^DTIFEGA^AK^YPN^LPKV^GYV^YML^QT--QGL^LH^DT^YY^GV^DAK-----KI 222
 E. a. GrdG VVYVET^KPLLEQ^IK^EY^{PD}L^{PK}VAY^VHML^QS--QGL^LH^DT^YY^GV^DAK-----QF 222
 E. a. GrdI VETYELE^PV^TQRSE^EV^TKL^PGV^VF^VM^QPS^QMEEL^GY^NDM^VY^GW^DMN-----RM 228

Spaltstelle der Proproteine



C. s. PrdA VPVVLSPLEVL^DGGIHALT^CIGPASK^ENSRHYWRE^{PL}VIEVMNDE--EFDL^AG^VVFV^GSP 464
 C. d. PrdA MPVVLSPLEVL^DGGIHALT^CIGPASK^EMSRHYWRE^{PL}VIRAMEDE--EIDL^VG^VVFV^GSP 459
 T. d. PotP LPTMYPTEVMDGAI^VSGN^CVSACDKN^PTYVH^QNSP^IIHEL^YKR^HG^KDIN^FM^GV^IV^TNEN 282
 C. s. GrdE IPTLIYPT^EVM^DGAI^LSGN^CVSACDKN^PTYVH^MNN^PVI^HDL^YEL^HG^KEY^NFV^GVI^IT^NEN 282
 E. a. GrdE VPTILYPT^EVM^DGAI^LSGN^CVSSCDKN^PTYVH^CNN^PME^EL^YAM^HG^KEIN^FV^GVI^IT^NEN 282
 E. a. GrdG IPTFMYPTEIMDGA^ITSGN^CVAPCDK^VTTFH^LLN^PVIED^LY^KR^HG^KDL^NSV^GV^IL^TNEN 282
 E. a. GrdI VPTYMH^PNEVL^DGAI^LSGS^FMPCSS^KW^ST^YDFQ^NFP^AL^KR^LYAE^HG^KV^NFL^GV^IMS^NL 288



C. s. PrdA QVNAEKFYV^SERL^GML^VET^MDVEGAFITTE^EGF^GNN^HID^FASH^HE^QV^GMR^GIP^VV^GMS^FCA 524
 C. d. PrdA QVNAEKFYV^SKRL^GML^VEAME^VDGAVVTE^EGF^GNN^HID^FASH^IE^QI^GMR^GIP^VV^GVS^FSA 519
 T. d. PotP VYLADKERS^NLSAK^LAQ^ML^GCD^AVIVSE^EGF^GNP^DADL^IM^NCR^KIE^EM^GIK^TV^LV^TDEY 342
 C. s. GrdE VYLADKERS^NWTAK^MEY^LGL^DGVII^SE^EGF^GNP^DDL^IM^NCK^KIT^KG^IK^TV^IL^TDEY 342
 E. a. GrdE VYLADKERS^SDWTAK^LCK^FL^GL^DGAI^VSQ^EGF^GNP^DDL^IM^NCK^KIE^ME^GV^KT^VI^ST^DEY 342
 E. a. GrdG VYLADKERS^CDM^VG^LVE^FL^GID^GV^LITE^EGY^GNP^DDL^IM^NCK^KCT^QAG^AK^VV^LI^TDE^F 342
 E. a. GrdI VALQQ^RSAL^FV^AQMA^KSLGA^QGAIV^AE^EGY^GNP^DAD^FIAC^IVALE^NE^GIK^TV^LT^NEC 348

C. s. PrdA VQ^GALV^VG^NK^YM^YM^VD^NN^KSE^QGIENE^ILS^NNT^LCPEDA^IRA^VAML^KAAIA^EEE^VK^VAE 584
 C. d. PrdA VQ^GALV^VG^NK^YMTHM^VD^NN^KSK^QGIENE^ILS^NNT^LAPEDA^VRI^MAML^KNAIE^GVE^VK^APE 579
 T. d. PotP AGQDGAS-----QSLAD^SN^LPG^NAV^SNG^NANAV^VL^PPM^KTI^IGD^VKQ--AN^VIAG^AWD 395
 C. s. GrdE AGRD^GAS-----QSLAD^AAA^DAC^VTG^GNAN^MTIV^LPK^LDKI^IGH^VSK^DVID^IAG^GFD 397
 E. a. GrdE AGRD^GAS-----QSLAD^AD^VRAN^VSNG^NAN^MV^ILP^PMD^KTIG^HI^QY--ID^TIAG^GFD 395
 E. a. GrdG PGRD^GKS-----QSVAD^ATPEA^DAVAS^CGQ^GN^LIE^HFP^AMD^KVIG^MLDY--VET^MIG^GYK 395
 E. a. GrdI TGRD^GFS-----QPL^VT^LDEKANA^IV^SCG^NVSEL^VEL^PMP^PV^VLGE^LEAL^RD^GLS^GWA 403

C. s. PrdA R--KFSKN^VKE^NN^VDLIE^QAG^KEIT^LLPNE^QVL^PMS^KRE^KE^IY^EAD^K 630
 C. d. PrdA R--KWN^PN^VK^LNN^IEAI^EK^VT^GE^KI^VLE^ENE^QSL^PMS^KK^RRE^IY^EK^DE 625
 T. d. PotP G-----SLHAD^GTIEA^EI^QVIT^GAT^NEL^GFW^NLSAR----- 426
 C. s. GrdE G-----SLRAD^GSIE^VEI^QAIT^GAT^SEV^GFN^KM^TAK^TY----- 430
 E. a. GrdE G-----SLRAD^GSIE^VEI^QAIT^GAT^NEL^GF^YL^SAK^GY----- 428
 E. a. GrdG G-----CINED^GS^FDAEL^QII^IASTIANG^YN^KL^TAR^FY----- 428
 E. a. GrdI GDEIL^GSS^VKAD^GSVIM^ENNAM^FCG^DQ^VV^GW^ST^KTM^KEF----- 442

Legende siehe nächste Seite.

Abb. 5.1: Homologievergleich des Proproteins PrdA der D-Prolin-Reduktase. *C.s.* PrdA, *C.d.* PrdA: Proproteine der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* bzw. *C. difficile* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile); *T.d.* PotP: neues potentielles Proprotein aus *T. denticola* (<http://www.tigr.org>); *C.s.* GrdE, *E.a.* GrdE: Proproteine der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (Acc. no. AJ276209) bzw. *E. acidaminophilum* (Acc.no. AJ14275); GrdG: Proprotein der Sarkosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (Acc. no. Y17872); *E.a.* GrdI: Proprotein der Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (Acc. no. Y17145). Die potentielle Spaltstelle sowie die konservierten Aminosäuren sind hervorgehoben. Nur in den Proproteinen PrdA identische Bereiche sind grau unterlegt. (↑): möglicherweise am Spaltmechanismus beteiligte Aminosäuren; (:) konservierte bzw. (.) ähnliche Aminosäuren; (-) eingefügte Lücken.

In den Aminosäuresequenzen aller Proproteine aus *C. sticklandii*, *C. difficile*, *T. denticola* und *E. acidaminophilum* sind die gleichen konservierten Regionen um die Spaltstelle zu erkennen (Abb. 5.1). Es ist möglich, daß die Aminosäuren in diesem Bereich einen wichtigen Einfluß auf die Spaltreaktion nehmen. Insbesondere die konservierten Aminosäuren Glu⁴¹⁵, Asp⁴¹⁸ und Lys⁴³² (Positionen für PrdA, s. Anhang I) könnten während der Spaltung der Proproteine eine bedeutende Rolle spielen, um die Deprotonierung des Serin- bzw. Cysteinrestes, aus welchem die Pyruvylgruppe hervorgeht, zu erleichtern und so den nukleophilen Angriff der Hydroxyl- bzw. Thiolgruppe und die Esterbildung zu ermöglichen.

Die D-Prolin-Reduktase und die Glycin-Reduktase wurden bereits aufgrund der damaligen Daten (HODGINS & ABELES, 1967, 1969; SETO & STADTMAN, 1976) in die Gruppe der Pyruvyl-Enzyme eingeordnet (VAN POLJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998; PERLER, 1998). Pyruvyl-Enzyme zeichnen sich durch eine Untereinheit aus, die aminoterminal eine Pyruvylgruppe besitzt und die durch posttranslationale Spaltung aus einem Proprotein, der π -Untereinheit, hervorgeht. Bei allen bisher untersuchten fünf Pyruvyl-Enzymen, die ausschließlich Decarboxylierungsreaktionen katalysieren, findet die Prozessierung des Proproteins an der aminoterminalen Seite eines Serin-Restes statt, der zur Pyruvylgruppe umgewandelt wird (VAN POLJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998) (Tabelle 5.1).

Die D-Prolin-, Glycin- und Sarkosin-Reduktase lassen sich in eine neue Klasse von Pyruvyl-Enzymen einordnen. Sie weisen als Besonderheit auf, daß die Pyruvylgruppe nicht aus einem Serinrest, sondern aus einem Cysteinrest generiert wird. Die Spaltung erfolgt aminoterminal vor dem Cysteinrest (Tabelle 5.1). Zusätzlich weisen die Proteine zu den beiden aus dem Proprotein hervorgehenden Untereinheiten noch eine dritte Untereinheit auf, welche ein Selenocystein enthält (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998;

HACKERT & PEGG, 1998; PERLER, 1998). Die in Kapitel 5.1. vorgeschlagene Untereinheiten-struktur $(\alpha\beta\gamma)_{10}$ der D-Prolin-Reduktase könnte daher in $(\alpha\beta)_{10}\gamma_{10}$ korrigiert werden.

Tabelle 5.1: Übersicht pyruvylhaltiger Reduktasen und Decarboxylasen (Auswahl).

Enzym	Herkunft	Spaltstelle der Proenzyme*
D-Prolin-Reduktase ¹⁾	<i>C. sticklandii</i> <i>C. difficile</i>	-GIHALT-CIGPASK- -GIHALT-CIGPASK-
Glycin-Reduktase GrdE ²⁾	<i>E. acidaminophilum</i> <i>C. sticklandii</i>	-AILSGN-CVSSCDK- -AILSGN-CVSACDK-
Sarkosin-Reduktase GrdG ²⁾	<i>E. acidaminophilum</i>	-AITSGN-CVAPCDK-
Histidin-Decarboxylase ³⁾	<i>Lactobacillus 30a</i> <i>C. perfringens</i>	-NMTTAS-SFTGVQ- -NMLTAS-SFCGVA-
S-Adenosylmethionin-Decarboxylase ³⁾	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> Säugetiere Pflanzen	-VAHLDK-SHICV- -AFLLSE-SSLFV- -AYVLSE-SSMFV- -SYVLSE-SSLFV-
L-Aspartat-1-Decarboxylase ³⁾	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	-DLHYEG-SCAIDQD- -NLNYVG-SITIDED-
Phosphatidylserin-Decarboxylase ³⁾	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>S. cerevisiae</i> (PSD1) <i>S. cerevisiae</i> (PSD2) Säugetiere	-GRFKLG-STVINLF- -GYFSFG-STVILVF- -YFKFVG-STIVLFL- -GGFELG-STVVLCF- -YFKFVG-STIIIP- -GEFNLG-STIVLIF-
4'-Phosphopantothencystein-Decarboxylase ⁴⁾	Pferd (Leber)	nicht verfügbar

* Die Spaltstelle ist durch Bindestrich (-) in der Sequenz gekennzeichnet. Die Vorläufer-Aminosäuren, die zur Pyruvylgruppe umgewandelt werden, sind hervorgehoben.

¹⁾ diese Arbeit; ²⁾ WAGNER (1997), SONNTAG (1998), WAGNER *et al.* (1999), GRÄNTZDÖRFFER *et al.* (2001); ³⁾ HACKERT & PEGG (1998); ⁴⁾ SCANDURRA *et al.* (1987, 1988).

Zwischen den pyruvylhaltigen Decarboxylasen konnten keine Ähnlichkeiten in der Tertiär- und Quartärstruktur festgestellt werden (EKSTROM *et al.*, 1999). Sie weisen außer dem konservierten Serinrest, an dem die Spaltung erfolgt, um die Spaltstelle keine homologen Sequenzen auf. Enzyme, welche die gleiche Reaktion katalysieren, zeigen jedoch einige Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Spezies (HACKERT & PEGG, 1998). Die pyruvylhaltigen Reduktasen weisen im Gegensatz dazu auch untereinander größere Sequenzübereinstimmungen auf. Der Grund mag darin liegen, daß die Organismen *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* beide phylogenetisch in das Cluster der Clostridien eingeordnet werden (COLLINS *et al.*, 1994). Außerdem katalysieren alle drei Enzyme eine ähnliche Reaktion, die reduktive Spaltung der C-N-Bindung einer Iminosäure (D-Prolin-Reduktase) bzw. Aminosäure (Glycin-, Sarkosin-Reduktase). Es liegt somit nahe, daß konservierte Strukturen vorhanden sind. Auch die Interaktion der für die Katalyse essentiellen dritten Untereinheit der substratbindenden Proteine kann von einer konservierten Domänenstruktur abhängig sein.

Trotz fehlender Sequenzhomologien und Strukturähnlichkeiten wurde ein einheitlicher Reaktionsmechanismus für die Spaltung der Proenzyme (π -Untereinheiten) und die Bildung der Pyruvylgruppe postuliert. Die Spaltung verläuft wahrscheinlich autokatalytisch ohne Beteiligung anderer Proteine, z.B. Proteasen (VAN POELJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998). Bei den Decarboxylasen wird dieser Mechanismus als Serinolyse bezeichnet und wurde bei der L-Aspartat-Decarboxylase aus *E. coli* (RAMJEE *et al.*, 1997; ALBERT *et al.*, 1998), der menschlichen und pflanzlichen S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (XIONG *et al.*, 1997; EKSTROM *et al.*, 1999), der Phosphatidylserin-Decarboxylase aus *S. cerevisiae* (VOELKER, 1997) und der Histidin-Decarboxylase aus *Lactobacillus 30 a* (VAN POLJE & SNELL, 1990; HACKERT & PEGG, 1998) bereits eingehend untersucht. Als ein weiteres pyruvylhaltiges Enzym wurde außerdem die 4'-Phosphopantothencystein-Decarboxylase aus Pferdeleber (SCANDURRA *et al.* 1987, 1988) und *E. coli* (YANG & ABELES, 1987) beschrieben. Für das Protein aus *E. coli* konnte jedoch in neuesten Untersuchungen gezeigt werden, daß es keine covalent gebundene Pyruvylgruppe enthält (STRAUSS *et al.*, 2001) und somit nicht mehr den pyruvylhaltigen Decarboxylasen zugeordnet werden kann.

Die Spaltung der π -Untereinheit erfolgt über die Bildung eines intermediären Esters durch den nukleophilen Angriff der deprotonierten Hydroxylgruppe des Serinrestes, aus dem die Pyruvylgruppe generiert wird, an der Carbonylgruppe der vorhergehenden Aminosäure (Abb. 5.2 A, I). Der Ester wird durch β -Eliminierung unter Abspaltung eines Protons am α -C-Atom in die α -Untereinheit und die β -Untereinheit gespalten. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Carboxylgruppe am C-Terminus der β -Untereinheit (aminoterminaler Teil des ehemaligen Proenzym) und der Bildung eines Dehydroalanins am N-Terminus der α -Untereinheit (C-terminaler Teil des ehemaligen Proenzym) (Abb. 5.2 A, II). Das Dehydroalanin wird über eine Iminofunktion unter Freisetzung von Ammoniak in die Pyruvylgruppe überführt (HACKERT & PEGG, 1998) (Abb. 5.2 A, III). Durch Röntgenkristallstruktur-Analysen an der L-Aspartat-Decarboxylase konnte die Bildung eines intermediären Esters nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß eine der vier π -Untereinheiten der L-Aspartat-Decarboxylase noch nicht gespalten war und als Ester vorlag (ALBERT *et al.*, 1998).

Für das Proprotein PrdA der D-Prolin-Reduktase wäre wie für die anderen pyruvylhaltigen Reduktasen ein adäquater Reaktionsmechanismus in Form einer Cysteinolyse denkbar (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001). Da die π -Untereinheiten dieser Enzyme an einem Cysteinrest gespalten werden, könnte die Bildung der Pyruvylgruppe in der D-Prolin-Reduktase analog zur Serinolyse über die Zwischenstufe eines intermediären Thioesters zwischen Thr⁴²⁵ und Cys⁴²⁶ erfolgen (Abb. 5.2 B, I). Das α -C-Atom wird durch β -Eliminierung deprotoniert und der Thioester in die N-terminale β -Untereinheit (45 kDa-Untereinheit) und die C-terminale α -Untereinheit (23 kDa-Untereinheit) gespalten (Abb. 5.2 B, II). Die β -Untereinheit trägt am C-Terminus eine Thiocarboxyl-Gruppe, die durch Hydrolyse unter H₂S-Freisetzung zur Carboxylgruppe umgewandelt wird. Die α -Untereinheit trägt nach der Thioester-Spaltung ebenfalls zunächst ein Dehydroalanin, aus dem durch Umlagerung und Hydrolyse die Pyruvylgruppe entsteht (Abb. 5.2 B, III; BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001). Die Reaktionsmechanismen der Serinolyse und der Cysteinolyse sind in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt.

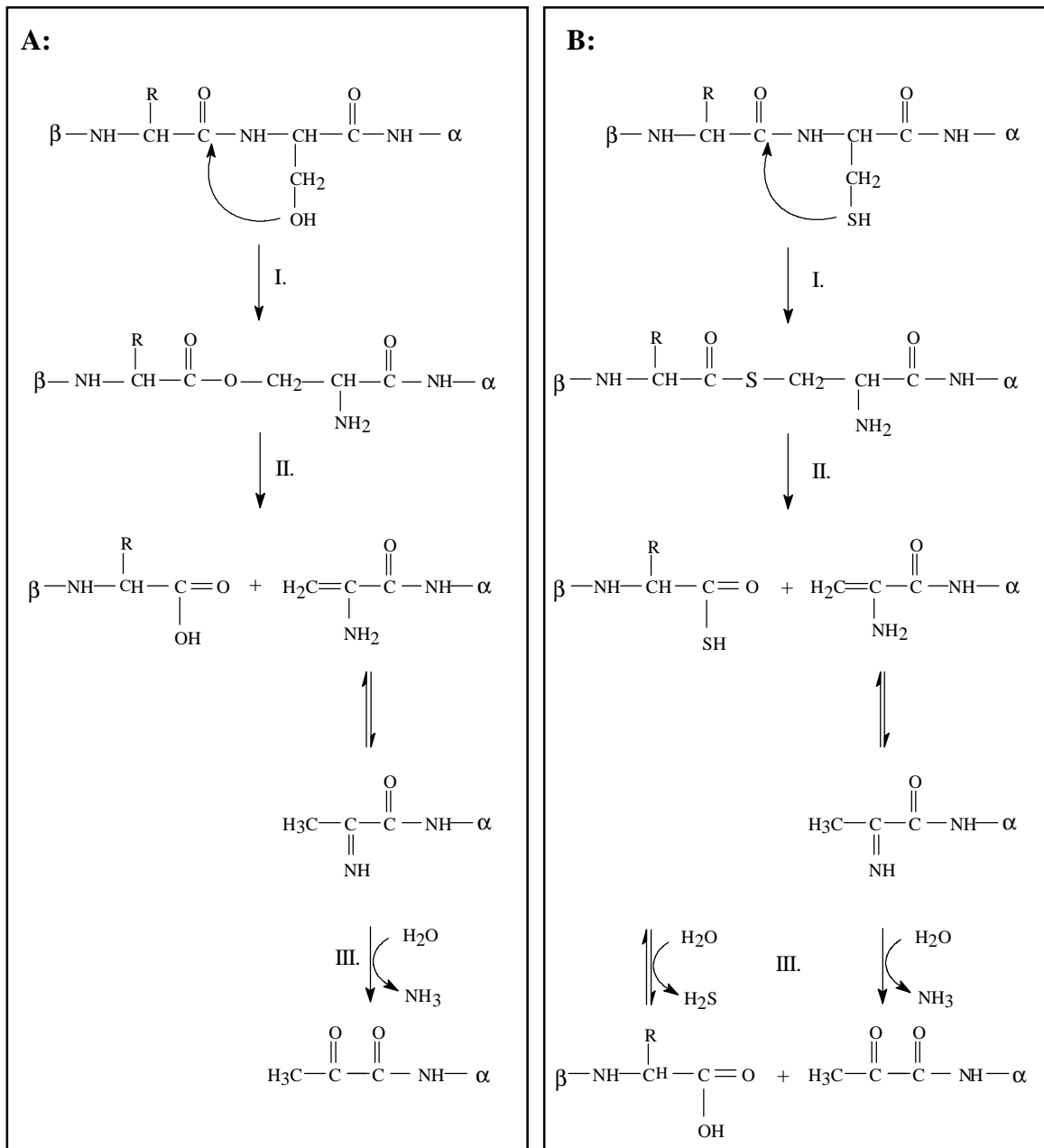


Abb. 5.2: Reaktionsmechanismen der Serinolysen und der Cysteinolysen. A: Serinolysen der L-Aspartat-Decarboxylase aus *E. coli* (ALBERT *et al.*, 1998). B: Vorgeschlagener Mechanismus der Cysteinolysen pyruvylhaltiger Reduktasen in Anlehnung an die Serinolysen (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001).

Die Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE aus *C. sticklandii* wurde in einer weiterführenden Diplomarbeit sowie derzeit laufenden Promotion *in vitro* analysiert (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001).

Die Proproteine wurden zunächst in *E. coli* BL21 überexprimiert und als “strep-tag“-Fusionsproteine angereichert. Dabei wurde das GrdE-Protein vollständig als 47 kDa-Protein überexprimiert. Von PrdA konnte nur ein um 380 Aminosäuren verkürztes

intaktes Protein erhalten werden (BEDNARSKI, 1999). Die beiden überexprimierten Fusionsproteine widersetzten sich jedoch den für serinabhängige Pyruvylenzyme gefundenen Bedingungen (HACKERT & PEGG 1998; PERLER, 1998; BEDNARSKI; 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001). Auch durch den Zusatz stickstoffhaltiger nukleophiler Verbindungen, wie Hydroxylamin, sowie reduzierender Verbindungen erfolgte keine Spaltung der Proproteine (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001). Erst durch den Einsatz des Reduktionsmittels NaBH_4 in sehr hohen Konzentrationen wurde eine Spaltung der Fusionsproteine erreicht.

Das verkürzte PrdA-Fusionsprotein konnte *in vitro* durch 200 mM NaBH_4 bei pH 7,6 und Raumtemperatur gespalten werden. Die 23 kDa-Untereinheit wurde im SDS-Gel identifiziert. Außerdem wurde ein 5 kDa großes Protein nachgewiesen (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001).

Die Spaltung des GrdE-Proteins erfolgte bei pH 7,6 unter Zusatz von 150 mM NaBH_4 bei Raumtemperatur mit einer Halbwertszeit von 20 min in die 25 kDa- und 22 kDa-Untereinheiten. Die Analyse der Spaltprodukte mittels Edman-Abbau und Massenspektrometrie zeigte, daß das Fusionsprotein tatsächlich am Cysteinrest gespalten worden war (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001). Überexprimierte Fusionsproteine von GrdE, bei denen durch gerichtete Mutation der Cysteinrest zu Serin oder Threonin ausgetauscht worden war, ließen sich mit verlangsamter Rate ebenfalls bei pH 7,6 und mit 200 mM NaBH_4 an der Mutationsstelle spalten. War der Cysteinrest durch Alanin ersetzt, erfolgte keine Spaltung (BEDNARSKI, 1999; BEDNARSKI *et al.*, 2001).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Proproteine PrdA und GrdE aus *C. sticklandii* *in vitro* unter extremen Bedingungen analog zu den serinhaltigen Pyruvylenzymen (HACKERT & PEGG 1998; PERLER, 1998) an dem Cysteinrest gespalten werden. Durch diese Ergebnisse konnte die getroffene Einordnung der Glycin- und der D-Prolin-Reduktase (VAN POLJE & SNELL, 1990) in die pyruvylhaltigen Enzyme jetzt experimentell auf der Basis vorliegender Sequenzdaten verifiziert werden.

5.2.2. Die Funktion der *prdB*-Region

Das stromabwärts hinter dem *prdA*-Gen gelegene Gen *prdB* kodiert für die dritte Untereinheit der D-Prolin-Reduktase PrdB (accession no. AJ130879) mit einer molekularen Masse von 26 kDa. Die über den Edman-Abbau bestimmte aminoterminal Sequenz der 26 kDa-Untereinheit wurde in der translatierten Sequenz vollständig identifiziert (s. Anhang I).

Innerhalb der Sequenz von *prdB* wurde ein "in-frame" TGA-Codon identifiziert, welches für ein Selenocystein kodiert (BÖCK *et al.*, 1991). SETO & STADTMAN (1976) beschrieben eine dreifache Erhöhung der spezifischen D-Prolin-Reduktase-Aktivität, wenn *C. sticklandii*-Zellen in Gegenwart von Selen gewachsen waren. Eine Markierung der D-Prolin-Reduktase mit [⁷⁵Se]-Natriumselenit wurde jedoch nicht nachgewiesen (SETO & STADTMAN, 1976). Dies steht mit den jetzigen Daten im Widerspruch.

Denn mittels ICP-MS-Analyse konnte in der D-Prolin-Reduktase ein Selengehalt von 1,06/Protomer bestimmt werden (A. Pich, pers. Mitteilung). Auf Proteinebene wurde in der 26 kDa-Untereinheit nach Modifizierung mit Vinylpyridin ein Peptid identifiziert, welches in der Aminosäuresequenz an der Stelle des "in-frame"-TGA-Codons ein Selenocystein aufweist (Kap. 4.11.). Beide Ergebnisse liefern fundierte Beweise dafür, daß es sich bei dem Protein PrdB der D-Prolin-Reduktase um ein Selenoprotein handelt.

Homologievergleiche des Proteins PrdB mit der Datenbank ergaben Übereinstimmungen zu den Proteinen GrdB der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER, 1997), *C. litorale* (KREIMER & ANDREESEN, 1995) und *E. acidaminophilum* (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999). Außerdem wurden Sequenzhomologien zu den Proteinen GrdF der Sarkosin-Reduktase und GrdH der Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* gefunden, die ebenfalls als Selenoproteine der substratbindenden Proteine P_B beschrieben werden (Abb. 5.3). Das Protein PrdB zeigte weiterhin Homologien zu Proteinen aus *C. difficile* und *T. denticola*, deren Genome derzeit sequenziert werden. In beiden Proteinen wurde eine außergewöhnliche Aminosäure detektiert, bei der es sich aufgrund eines "in frame" TGA-Codons in der DNA-Sequenz (s. Anhang II, III) vermutlich auch um ein Seleno-cystein handelt (Abb. 5.3, s. Anhang II, III). Das Protein aus *C. difficile* wird in Kenntnis des identifizierten Prolin-Reduktase-Operons in *C. difficile* (Kap. 5.5.)

durch ein Serin ersetzt, so daß sich das Motiv -U-G-T-C-H-R-S- ergibt (Abb. 5.3). Im Protein PrdB aus *C. difficile* liegt das Motiv -U-G-T-C-H-R-T vor, der dritte Cysteinrest ist durch ein Threonin ersetzt (Abb. 5.3).

Dieses Motiv zeigt Ähnlichkeiten zur inversen Sequenz des redoxaktiven Zentrums des Selenoproteins A -C-X-X-U- der Glycin-Reduktase (KREIMER & ANDREESEN, 1995) und der redoxaktiven Sequenz der Thioredoxine und Thioredoxinreduktase -C-X-X-C- (HOLMGREN & BJÖRNSTEDT, 1995; KREIMER & ANDREESEN, 1995, KREIMER *et al.*, 1997). Eine redoxaktive Funktion konnte für die Cysteine der substratspezifischen Proteine B der Glycin-Reduktase noch nicht nachgewiesen werden (WAGNER, 1997, Sonntag, 1998). Wie in der Einleitung bereits dargestellt, ist für die eigentliche Reaktion des Proteins B nur das freie Selenol-Anion nötig (Abb. 1.1).

Für das hier erstmals beschriebene Protein PrdB könnte jedoch eine redoxaktive Funktion des Selenocystein-Motivs -U-G-T-C- postuliert werden (Abb. 5.3). Das in den GrdB-Proteinen konservierte letzte Cystein ist in PrdB nicht vorhanden und scheint daher für die Enzymreaktion entbehrlich zu sein. Bisher konnte ein energiekonservierender Schritt in Form einer Substratkettenphosphorylierung, verbunden mit einer ATP-Synthese wie bei der Umsetzung von Glycin durch die Glycin-Reduktase (ARKOWITZ *et al.*, 1994) nicht nachgewiesen werden. Im Laufe dieser Arbeit ergaben sich für die D-Prolin-Reduktase auch keine Hinweise auf das Vorhandensein von Proteinen analog dem Selenoprotein A (TURNER & STADTMAN, 1973; GARCIA & STADTMAN, 1991; 1992) und den Proteinen C (STADTMAN & DAVIS, 1991; SCHRÄDER & ANDREESEN, 1992) der Glycin-Reduktase. Es liegt nahe, daß die Reduktion des D-Prolins durch die D-Prolin-Reduktase trotz der strukturellen Ähnlichkeiten zur Glycin-Reduktase nach einem anderen Reaktionsmechanismus verläuft, der sich mit der Katalyse der Glycin-Reduktase nicht unmittelbar vergleichen läßt (Kap. 5.5.).

Die Synthese und der cotranslationale Einbau von Selenocystein weisen einige Besonderheiten gegenüber den anderen 20 Aminosäuren auf. Selenocystein wird durch ein UGA-Codon kodiert (BÖCK *et al.* 1991), welches in Bakterien durch eine zusätzliche mRNA-Struktur in Form einer direkt folgenden Haarnadelstruktur mit hoher freier Energie (ca. 70 kJ/mol) als Selenocystein-Codon spezifiziert wird (ZINONI *et al.*, 1990, HÜTTENHOFER *et al.*, 1996). Diese Haarnadelstruktur dient als Erkennungssignal für einen speziellen Elongationsfaktor SelB, welcher einen Komplex

mit GTP und der Selenocystein-tRNA bildet und an den Loop-Bereich der mRNA bindet und so die Bindung des Freisetzungsfaktors sterisch hindert (HÜTTENHOFER & BÖCK, 1998a,b). Neben *selB* wurden in Untersuchungen der Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli* drei weitere Gene *selA*, *selC* und *selD* gefunden, die für Proteine kodieren, die ebenfalls an der Synthese und dem Einbau von Selenocystein beteiligt sind (BÖCK *et al.*, 1991; GURSINSKY *et al.*, 2000; GRÄNTZDÖRFFER, 2000).

In Eukaryonten (LOW & BERRY, 1996) und Archaea (WILTING *et al.*, 1997) wurden zwei verschiedene außerhalb der kodierenden Region liegende Selenocystein-Insertionssequenzen (SECIS-Elemente) beschrieben.

Spezifische mRNA-Strukturen für den Einbau von Selenocystein direkt stromabwärts des UGA-Codons, wie sie für die Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli* beschrieben wurden (ZINONI *et al.*, 1990; HÜTTENHOFER *et al.*, 1996; HÜTTENHOFER & BÖCK, 1998a,b), wurden in *prdB* nicht nachgewiesen. In den Gensequenzen von *grdA* und *grdB* der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (GARCIA & STADTMAN, 1992; GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001), *C. litorale* (KREIMER & ANDREESEN, 1995) und *E. acidaminophilum* (LÜBBERS & ANDREESEN, 1993; WAGNER *et al.*, 1999; GURSINSKY *et al.*, 2000) konnten ähnliche Strukturen zum Teil identifiziert werden. Im Selenoprotein A aus *C. purinolyticum* wurde eine mRNA-Struktur identifiziert, die am Einbau von Selenocystein beteiligt sein könnte (GARCIA & STADTMAN, 1991). Die Gene des Selenocystein-Einbaus *selA*, *selB*, *selC* und *selD* in *E. acidaminophilum* konnten inzwischen kloniert und sequenziert werden (GURSINSKY *et al.*, 2000). Für das Selenoprotein FdhA der Formiat-Dehydrogenase FDH1 aus *E. acidaminophilum* wurde eine der mRNA von FdhF aus *E. coli* (HÜTTENHOFER & BÖCK, 1998a,b) ähnliche Sekundärstruktur direkt im Anschluß an das UGA-Codon postuliert (GRÄNTZDÖRFFER, 2000). In FdhF aus *E. coli* bindet an diese Sekundärstruktur der Selenocystein-spezifische Elongationsfaktor SelB (HÜTTENHOFER & BÖCK, 1998a,b).

Auch für Eukaryonten und Archaea typische SECIS-Elemente (LOW & BERRY, 1996; WILTING *et al.*, 1997) konnten stromabwärts von *prdB* nicht nachgewiesen werden. In diesem Bereich wurde zwar eine Haarnadelstruktur identifiziert, die jedoch einen *rho*-unabhängigen Translationsterminator im Anschluß an das Stop-Codon TAA darstellt (s. Anhang I). Für *C. litorale* wurde in der 3'-untranslatierten Region des *grdAB*-Operons eine Haarnadelstruktur identifiziert, die Merkmale von SECIS-Elementen trägt

(KREIMER & ANDREESEN, 1995), jedoch nicht in anderen Genen, die für ein selenocysteinhaltiges Protein kodieren (ANDREESEN *et al.*, 1999).

Das Fehlen von bisher bekannten, typischen mRNA-Strukturen für die Synthese und den Einbau von Selenocystein in PrdB der D-Prolin-Reduktase sowie auch in GrdA und GrdB der Glycin-Reduktase deutet darauf hin, daß *C. sticklandii* wie *E. acidaminophilum* (GURSINSKY *et al.*, 2000) ein modifiziertes System zur Decodierung des UGA-Codons verwendet.

5.2.3. Die Funktion der *prdC*-Region

Stromaufwärts von *prdA* wurde ein 237 Aminosäuren umfassender offene Leserahmen PrdC, der am 5'-Ende mit der *Eco* RI-Schnittstelle des Klons pUK1 beginnt, identifiziert. (Abb. 4.19, s. Anhang). Das Gen *prdC* kodiert für den C-terminalen Teil eines Proteins, für das bei Sequenzanalysen in Datenbanken keine Homologien zu den bisher bekannten Proteinsequenzen der D-Prolin-Reduktase gefunden wurden.

Die Datenbank-Recherche ergab jedoch signifikante Übereinstimmungen zum RnfC-Protein aus *Rhodobacter capsulatus* (Abb. 5.4) und anderen RnfC-ähnlichen Proteinen aus z.B. *Pseudomonas stutzeri* A15 und *Haemophilus influenzae* KW20 (nicht gezeigt).

```

C.s. PrdC:  11 EVKILPDMYPAGDERAIVRDILGVLLLEPGQLPKAANAVIQNVETLKHIVNAIELRKPYIT
              ++ ++P  YP G E+ +V+ I G          L          V+ N+ T  + A+  +P I
R.c. RnfC: 240 KIHVVPTQYPMGSEKHLVKMITGQETPARALTADLGVVVHNIATAHAVHLAVRYGEPLIA

C.s. PrdC:  71 KDITVAGR-VMDATDGKVFMDVPGESVKKYIDLCCGYMNPHEIVMGGPFTGRHVEED-
              + +TV+G  +      + +V +  PV E +          CGG+          +++GGP  G  ++
R.c. RnfC: 300 RTVTVSGHGIRRPANLRLVIGTPVSEIIAH----CGGFTEEPDRLLLGGPMMGMPIQNPR

C.s. PrdC: 129 APITKTTGGML
              P+ K T G+L
R.c. RnfC: 356 VPVVKGTNGIL

```

Abb. 5.4: Homologievergleich von Aminosäure-Sequenzbereichen des *prdC*-kodierten Proteins aus *C. sticklandii* (*C.s.*) mit dem RnfC-Protein aus *Rhodobacter capsulatus* (*R.c.*) (KUMAGAI *et al.*, 1997). (+): ähnliche Aminosäuren, (-): eingefügte Lücken

Das RnfC-Protein wird als Bestandteil des *rnf*-Operons aus *R. capsulatus* beschrieben, welches insgesamt 7 Genprodukte umfaßt, die einen Membrankomplex bilden. Dieser Membrankomplex realisiert die Elektronenübertragung auf die Nitrogenase (SCHMEHL, *et al.*, 1993; KUMAGAI *et al.*, 1997). RnfC verfügt über Eisen-Schwefel-Cluster des Typs [4Fe-4S] mit dem Motiv -C-X₂-C-X₂-C-X₃-C-P- und ist an der

peripheren Membran der Chromatophore lokalisiert (SCHMEHL, *et al.*, 1993; KUMAGAI *et al.*, 1997). In RnfC wurden potentielle Bindestellen für NADH und FMNH₂ identifiziert (KUMAGAI *et al.*, 1997). In den homologen Sequenzbereichen von PrdC wurden derartige Elemente bisher nicht gefunden (Abb. 5.4), da die Sequenz des Proteins PrdC an dieser Stelle noch nicht vollständig vorlag.

STADTMAN (1965) postulierte wie SCHWARTZ & MÜLLER (1979) und SETO (1980a) flavin- und eisenhaltige Proteinkomponenten, die für die Elektronenübertragung vom NADH auf die D-Prolin-Reduktase verantwortlich sind. Die D-Prolin-Reduktase ist im Rohextrakt von *C. sticklandii* sowohl mit NADH als auch mit DTT als Elektronendonator meßbar. Da die NADH-abhängige Aktivität während der Reinigung verloren geht, muß eine weitere Proteinkomponente in *C. sticklandii* an der Elektronenübertragung beteiligt sein.

Die Homologien von PrdC zum RnfC-Protein aus *R. capsulatus*, welches in die Elektronenübertragung auf die Nitrogenase involviert ist (SCHMEHL, *et al.*, 1993; KUMAGAI *et al.*, 1997), können ein Hinweis sein, daß es sich bei dem von *prdC* kodierten Protein um eines der postulierten Elektronentransfer-Proteine handelt (STADTMAN, 1965; SCHWARTZ & MÜLLER, 1979; SETO, 1980a). Diese Annahme läßt sich auch durch die Tatsache bestärken, daß im 3'-untranslatierten Bereich von *prdC* keine Terminatorstrukturen sowie vor dem *prda*-Gen keine Promotorsequenzen identifiziert wurden (s. Anhang I, Tab. 4.3). In den Northern-Blot Analysen wurde ein 4,5 kb großes Transkript nachgewiesen, auf dem die Expression von *prdC* zusammen mit den Genen *prda* und *prdB* der D-Prolin-Reduktase erfolgt (Abb. 4.21; 4.22).

In einer weiterführenden Diplomarbeit (LIEBMANN, 1999) konnte das Gen *prdC* vollständig sequenziert und weiter analysiert werden. Die bereits im C-terminalen Bereich von PrdC (acc. no. AJ130879) gefundenen Sequenzhomologien zum RnfC-Protein aus *R. capsulatus* (Abb. 5.4) setzen sich über den gesamten Proteinbereich fort (Abb. 5.5). Bei Sequenzvergleichen mit dem derzeit sequenzierten Genom des Bakteriums *C. difficile* wurde ein Protein identifiziert, welches hohe Homologien zu PrdC als auch zu RnfC zeigte (s. Anhang II, Abb. 5.5). Es wird hier im Hinblick auf das identifizierte Prolin-Reduktase-Operon in *C. difficile* (Kap. 5.5.) ebenfalls mit PrdC bezeichnet.

Die beiden besonders hoch konservierten Bereiche werden als die potentiellen NADH- und FMNH₂-Bindestellen beschrieben, die Ähnlichkeiten zu denen der bakteriellen und

mitochondrialen NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase sowie der bakteriellen NAD-Hydrogenase zeigen (KUMAGAI *et al.*, 1997). Dieser Bereich ähnelt dem Pyridin-nukleotid-Bindemotiv G-X-G-X-X-G (WIERENGA *et al.*, 1985). Sekundärstruktur-Analysen zeigten, daß das Protein RnfC in diesem Bereich als $\beta\alpha\beta$ -Struktur gefaltet vorliegt, welche die Bindung von NADH begünstigt (KUMAGAI *et al.*, 1997).

<i>C.s.</i>	PrdC	MD-----IVLLLKQHVGAPCQSI	18
<i>C.d.</i>	PrdC	-----ILLKQHVGDPKPV	16
<i>R.c.</i>	RnfC	MRLPSIATLFHPLQSF SIRGGIHPETHKHLTSECEIETMPMPALIRLPLQQHIGAEAEPI	60
		: :	
<i>C.s.</i>	PrdC	VEAGQKVQKGELIAKPNG-LGANLHSSVYG VVKAVNE-----TAIIIEADENQPD----	67
<i>C.d.</i>	PrdC	VGDVVKKGTLIAEPTGLG---ANIYASVSGKISEIND-----QAIVIEADEVQED----	63
<i>R.c.</i>	RnfC	VKRDDLVLKGGQLIAKARGPLSANIHAPTSGRVIAVGHFVAPHASGLPVPTITIRPDGEDK	120
		: : : : : :	
<i>C.s.</i>	PrdC	---EFVKIKDTNTHIEAIQE---AGIVGSGGAGFP THVKLVNLEGGY--VIANGAECE	118
<i>C.d.</i>	PrdC	---TFEPLKGEI-LDLIKE---AGVVMGGAGFP THVKLVNIDLNGG--TILANAACE	113
<i>R.c.</i>	RnfC	WGPLPRLRPENAAPEEIAAQVAAAGIVGMGGATFPSAVKLNLRKYDLTTLIINGAECE	180
	 : : : : : : : : : :	
<i>C.s.</i>	PrdC	PVLGHNIKLMEEDPQLIIRGLKYVKEITNASKAYIAMKAKHRKALRIL-KTACELEPDIE	177
<i>C.d.</i>	PrdC	PLLAHNIKEIEERPEIVYQGIKYAMEVTNAGKMLAIKSKHPKAEAF-KKVIKPGDNIE	172
<i>R.c.</i>	RnfC	PYLTCDDRLMREAEIADGIGIMARALGVKQVFAIESNKPQAEAMTRYNRALGYTFK	240
		: : : : : :	
<i>C.s.</i>	PrdC	VKILPDMYPAGDERAIVRDILGVLLEPGQLPKAANAVIQNVETLKHIVNAIELRKPYITK	237
<i>C.d.</i>	PrdC	VAELVDMYPMGEERAIIVRDVLGKLEPTQLPSEANAVVINVETLTRIVEAVEQKRPIISK	232
<i>R.c.</i>	RnfC	IHVVPQYPMGSEKHLVKMITGQETPARALTADLGVVVHNIATAHAVHLAVRYGEPLIAR	300
	 : : : : : :	
<i>C.s.</i>	PrdC	DITVAGR-VMDATDGKVFMDVPVGESVKKYIDLGGYMNPHGEIVMGGPFTGRHVEED-A	295
<i>C.d.</i>	PrdC	NITVVGQ-LNSGKESIVFEDVPIGTTVGELIERAGGIKGEYGEIILGGPFTGKATTL-D	290
<i>R.c.</i>	RnfC	TVTVSGHGIRRPANLRVLIGTPVSEIIAH---CGGFTEEPDRLLLGGPMMGMPIQNPV	356
	 : : : : :	
<i>C.s.</i>	PrdC	PITKTTGGMLVAMPFVHDERKVGLLAC-EGG--AQEDRLREIAKEMGAEVVAVEKCKRMV	352
<i>C.d.</i>	PrdC	PITKTSGGIIVTMPFVNEKRKMGLLVCA-AGCP-NEERMRIATKMGVTDIVSVQKCKQAQ	348
<i>R.c.</i>	RnfC	PVVKGTNGILALTAETPEAKT--MPCIRCGRCVQCCPVGLTPFELNARIHAGD-LEGAA	416
		: : : : : : :	
<i>C.s.</i>	PrdC	EVDGRYRCDNPGIC---PGQAEKVISMKK-KGIQNLFDRYLRRLNEY---RYGSSS	401
<i>C.d.</i>	PrdC	EIKGALKCENPGHC---PGQAQKCI EFKKA-GAE-----	378
<i>R.c.</i>	RnfC	KV-GLMDCLACGCCSYNCPANLPLVQSFQFAKG--KLSERQSRKHQQEETKRLAAAR	473
	 : : : : : : : : :	

Abb. 5.5: Homologievergleich der Proteine PrdC aus *C. sticklandii* (*C.s.*) (LIEBMANN, 1999), *C. difficile* (*C.d.*) (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile) und RnfC aus *R. capsulatus* (*R.c.*) (KUMAGAI *et al.*, 1997). Die Bereiche der potentiellen Fe-S-Cluster in RnfC und in PrdC sind doppelt unterstrichen. Das potentielle NADH-Binde-Motiv ist grau unterlegt, die Cysteinreste sind farbig dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind hervorgehoben. Die NADH-Bindestelle ist einfach, die potentielle FMNH₂-Bindestelle in RnfC gestrichelt unterstrichen. (:): konservierte Aminosäuren, (.): ähnliche Aminosäuren, (-): eingefügte Lücken.

Im C-terminalen Bereich des Proteins RnfC können zwei [4Fe-4S]-Cluster mit dem Motiv -C-X₂-C-X₂-C-X₃-C-P- (SCHMEHL *et al.*, 1993, KUMAGAI *et al.*, 1997) identifiziert werden (Abb. 5.5). In den zu diesen Regionen homologen Bereichen von PrdC liegen konservierte Cysteinreste mit Abständen von einem (-C-X-C-) bzw. fünf (-C-X₅-C-) Aminosäuren vor, die am Aufbau von [2Fe-2S]-Zentren beteiligt sein könnten. Diese Dithiole könnten die Elektronen vom NADH und FMNH₂ übernehmen und auf Selenol-Thiol-Gruppe des Proteins PrdB übertragen. Allerdings weisen die in Frage kommenden Sequenzbereiche keinerlei Ähnlichkeiten zu den bekannten Konsensussequenzen der redoxaktiven Dithiole -C-A-T-C- der Thioredoxin-Reduktasen bzw. -C-L-N-V-G-C- der Dihydrolipoamid-Dehydrogenasen auf (HOLMGREN & BJÖRNSTEDT, 1995; KREIMER & ANDREESSEN, 1995; KREIMER *et al.*, 1997), die zur Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen (PNDOR) gehören.

Das Absorptionsspektrum der gereinigten D-Prolin-Reduktase zeigte nur ein Absorptionssignal aromatischer Aminosäuren bei 280 nm und lieferte keine Hinweise auf die Bindung weiterer Kofaktoren wie Eisen-Schwefel-Zentren, Chinone oder Cytochrome. Es scheint daher wahrscheinlich, daß die Elektronen von PrdC direkt an die Selenid-Sulfid-Gruppe von PrdB weitergegeben werden. Auch eine Beteiligung elektronentransportierender Proteine wie des Thioredoxinsystems, was allerdings eine NADPH-abhängige Reaktion wäre und somit nicht in Frage kommt, oder anderer Eisen-Schwefel-Proteine wie z.B. Ferredoxin oder Rubredoxin konnte bislang nicht für das D-Prolin-Reduktase-System nachgewiesen werden.

Im N-terminalen Bereich der Proteine RnfC und PrdC sind weitere, einzelne Cysteinreste enthalten, denen keine Funktion bei der Bildung von Eisen-Schwefel-Zentren oder als Dithiol zukommt.

RnfC wurde als membranassoziiertes Protein lokalisiert (KUMAGAI *et al.*, 1997). In PrdC wurde der Aminosäure-Sequenzbereich Ala⁸¹-Leu¹⁰¹ innerhalb der NADH-Bindestelle als hydrophobe Region identifiziert, eine Membranassoziation kann jedoch aufgrund der Aminosäuresequenz nahezu ausgeschlossen werden (LIEBMANN, 1999). Versuche, die NADH-abhängige Komponente aus *C. sticklandii* anzureichern, zeigten eine cytoplasmatische Lokalisation dieses Proteins (A. PICH, pers. Mitteilung)

Erste Hinweise für eine Beteiligung des Proteins PrdC am Elektronentransport auf die D-Prolin-Reduktase konnten von BEDNARSKI (1999) auf Proteinebene erbracht werden. Nach Überexpression von PrdC in *E. coli* wurde eine 50 %ige Steigerung der NADH-

abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität im Gegensatz zur DTT-abhängigen Aktivität gemessen. Die erhöhte NADH-abhängige Aktivität war jedoch nur nach Vorinkubation mit 1 mM Fe^{2+} und 0,1 mM DTT zu messen, so daß die Aktivität eisenabhängig zu sein scheint (BEDNARSKI, 1999). Es erscheint daher sinnvoll, weitere Untersuchungen hinsichtlich der Beteiligung Nichtäm-Eisen enthaltender Proteinkomponenten am Elektronentransfer auf die D-Prolin-Reduktase durchzuführen.

5.2.4. Die Funktion von *prdD* und *prdE*

Stromabwärts von *prdB* wurden hinter der Terminatorstruktur die offenen Leserahmen *prdD* und *prdE* identifiziert (s. Anhang). Das Gen *prdD* kodiert für einen 254 Aminosäuren großes Protein (ca. 28 kDa) PrdD (accession no. AJ130879). Das Gen *prdE* endet mit der *Eco* RI-Schnittstelle am 3'-Ende des Plasmides pUK1 und kodiert für ein noch unvollständiges Protein PrdE. Das Gen *prdE* konnte inzwischen über das 3'-Ende des Plasmides pUK1 hinaus vollständig sequenziert und als 156 Aminosäuren großes Protein (ca. 17 kDa) PrdE (accession no. AJ130879) identifiziert werden (LIEBMANN, 1999). Beide Proteine zeigen nach Datenbank-Recherchen hohe Homologien zum Proprotein PrdA, welche sich über den gesamten Bereich erstrecken (Abb. 5.6). Zu den 165 aminoterminalen Aminosäuren von PrdA wurden keine Sequenzübereinstimmungen gefunden. Das Protein PrdD zeigt Homologien zum mittleren Bereich, das Protein PrdE zum C-terminalen Bereich des Proproteins PrdA. Die Gene *prdD* und *prdE* wurden auch im derzeit sequenzierten Genom von *C. difficile* identifiziert. Die in dieser Arbeit ebenfalls mit PrdD und PrdE bezeichneten Genprodukte zeigen sehr hohe Homologien zu den Proteinen aus *C. sticklandii* und sind wie diese um die ersten 172 Aminosäuren von PrdA verkürzt (s. Anhang II, Abb. 5.6). Die substratspezifischen Proproteinen GrdE der Glycin- und Sarkosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* zeigten ebenfalls Sequenzhomologien. Schwache Homologien bestehen auch zum Protein GrdI der Betain-Reduktase (LIEBMANN, 1999). Eine genaue Funktion der Proteine PrdD und PrdE ist noch nicht geklärt. Denkbar wäre vielleicht eine Rolle als Chaperon, um eine korrekte Faltung des Proproteins PrdA und somit die anschließende posttranslationale Spaltung in die Untereinheiten zu ermöglichen.

<i>C. s.</i>	PrdA	MS ITLES AK EHANDLAVLCCRA EE GT VIG PSNLEDP AI FGDLEDSGLLTIPANCLKIGEV	60
<i>C. s.</i>	PrdA	LGAKLVKTADSLTPLTPELLEGVNSISEEAPKQEASAPVEAPVAEVAPAAMPVANVTGSM	120
<i>C. s.</i>	PrdA	LKI HIG E GK DINLEIPLTIAGQMGVVAP TAA APAGVAMPVASATEQVVAPAGEPK LV RTL	180
<i>C. s.</i>	PrdDE	----- ML TNEIDLR KL V--I	13
<i>C. d.</i>	PrdDE	----- MRR LV--I	6
	 PrdD →	
<i>C. s.</i>	PrdA	Q KKH FQ NLR K VEF GPETK IE NTTIYIRE NI CE DA VK VS N LV TD IK VE IT PADY GK Y SE T	240
<i>C. s.</i>	PrdDE	RSY H ---V DK VE FA E KAK IND SCL S FL SKIDN II TK YPS IK EIS V KI IK PRE HNIWTNS	70
<i>C. d.</i>	PrdDE	K PFH --- MNE V NF GS KTS IK KD VLTID LSS IDE IK EREELIT DI K VDI K PG DYDREINT	63
	 PrdE →	
<i>C. s.</i>	PrdA	IM D VQ PIAT KE GD GK IG QGV TRVID GAI IM VT GT DE D G V QI GE FG S SE GELDANIM WGR P	300
<i>C. s.</i>	PrdDE	IM D IL PIS VK VL- GN L GE G IT HTIT GAY VM IT GA DE EG TQ VA EFG S SE G IL AERL KL GR P	129
<i>C. d.</i>	PrdDE	IM D II PIS TK VL- GRL GE GIT HTLT GV Y ML TGA DE D GN Q MHE FG SSE G IL KD Q M VF GR Y	122
	 PrdE →	
<i>C. s.</i>	PrdA	GAP DKGE IL IK TQ VTIK AG T NMER PG PLA A HKA T DF IT QE IR EAL K KL DDSE VV ETE EEL A	360
<i>C. s.</i>	PrdDE	GTP SEN DYI I SF DL VLY K GK GV REA IE CH K AC DD FLE D VRL Y LK AM DS KL CTE K YK F Y	189
<i>C. d.</i>	PrdDE	GTP SV EDY I I H VD VTL KGL PF FERT LP LA A FR AC DD F IQE IR AS L KME D GR NAT QV RE YF	182
	 PrdE →	
<i>C. s.</i>	PrdA	Q YRR PG KKK V VI I KE IM GQ GAM HDN LIL PVE VP GV IG AK PN VD L GN VP VV L SP LE VL D GG	420
<i>C. s.</i>	PrdDE	DK IR K NGY K V AI VK Q VAG Q GAM Y DN FIL PN SS SV AG GR SI ID M GN MP II L SP NE YR D G A	249
<i>C. d.</i>	PrdDE	DK IR PN AKK V V IV KQ I AG Q GAM Y DN Q LFS KE PS GF EG GT SI ID MGN VP MI L SP NE YR D G A	242
	 PrdE →	
		Spaltstelle in PrdA ↓	
<i>C. s.</i>	PrdA	I H AL TC - IG P ASK ENS RHY W RE PL VIE VM NDE EF DL AG VV F VG SP VN A EK F YV SER LGM	479
<i>C. s.</i>	PrdDE	IR AM T MG VP ST K ET TL HH F RD PL LD V VS N DQ D IDL M GI I VV GT PQ S NEE K EY V GK R VAV	309
<i>C. d.</i>	PrdDE	LR AM T MG IG PST K ETS L HH F RD PL LD IV ES DK DV DL LGV IV VG TP DGN EN KTF V GQ RT A	302
	 PrdE →	
<i>C. s.</i>	PrdA	L VET M DVE G A FIT TEG F GNN HID FAS H EQV G M R GIP V VG M SF CA VQ GA LV V G N KY M KYM	539
<i>C. s.</i>	PrdDE	W LES M RAD G TI IS VD G W GN SH V DY AN TI E EIG IR GIP V VG L SF IG TQ AK FV V NQ Y MD TI	369
<i>C. d.</i>	PrdDE	W LEA M RVD G AIV SS DG W GN SH V DY AN T FEE I GK R DIP V VG V T F NGT Q AK F VV S NQ Y MD TI	362
	 PrdE →	
<i>C. s.</i>	PrdA	VD N NK SE QGI ENE IL S NN T LC PE DAI RA VAM L KAA IA EE V KVA ER KFS KN VK EN NV D LI	599
<i>C. s.</i>	PrdDE	VDF N KS K AGI ET QT V GEN T VE KL DA KK AL A FLK ----- LKM K GARR -----	410
<i>C. d.</i>	PrdDE	VDM N KS KE GIE TE V GEN-----	380
	 PrdE →	
<i>C. s.</i>	PrdA	EE QAG KEIT LLP NE QV LP MS K RE KEI YE AD K	630

Abb. 5.6: Homologievergleich der Proteine PrdD und PrdE aus *C. sticklandii* (*C.s*) und *C. difficile* (*C.d.*) (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile) mit dem Proprotein PrdA der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii*. Der Cysteinrest, an dem die Spaltung von PrdA erfolgt, sowie die Methioninreste der Translationsstarts sind farbig hervorgehoben. Konservierte Aminosäuren sind hervorgehoben. PrdDE: zusammengesetzte Proteine PrdD und PrdE, (:): identische Aminosäuren, (.): ähnliche Aminosäuren, (-): eingefügte Lücken

Von LIEBMANN (1999) wurde in Transkriptionsstudien in *C. sticklandii* eine weitere 7,5 kb große mRNA nachgewiesen, welche zusätzlich zu dem Transkript der Strukturgene *prdC*, *prdA* und *prdB* der in dieser Arbeit identifizierten 4,5 kb mRNA

(Abb. 4.21; 4.22) auch die Proteine PrdD und PrdE umfaßt. Die gemeinsame Expression dieser Gene weist auf eine Funktion von PrdD und PrdE im Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Reduktase hin (LIEBMANN, 1999). Für diese Annahme spricht auch, daß stromaufwärts von *prdD* und *prdE* keine Promotorstrukturen identifiziert werden konnten (s. Anhang I, Tab. 4.3).

Die Proproteine GrdE und GrdG der Glycin- bzw. Sarkosin-Reduktase aus *E. acidaminophilum* werden als 47 kDa große Proteine translatiert (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999) und sind somit am N-Terminus ca. 180 Aminosäuren kleiner als PrdA. Im Homologievergleich fehlen in der zusammengefügte PrdDE-Sequenz 165 bzw. 172 Aminosäuren (Abb. 5.6). Es kann vermutet werden, daß die ersten 180 aminoterminalen Aminosäuren für die Umsetzung von D-Prolin entbehrlich sind und es sich bei *prdD* und *prdE* um Genduplikationen von *prdA* handeln könnte. In proteinchemischen Untersuchungen von BEDNARSKI (1999) konnte PrdA nur als aminoterminal verkürztes Protein in *E. coli* überexprimiert werden. Daher könnten die fehlenden Aminosäuren auch einen potentiell toxischen Bereich darstellen (BEDNARSKI, 1999).

Aus dem Sequenzvergleich wird ersichtlich, daß die intergene Region zwischen PrdD und PrdE homolog zu dem Bereich in PrdA ist, an dem die Spaltung des Proproteins in die beiden Untereinheiten erfolgt. Von PrdD und PrdE kann folglich keine Pyruvylgruppe gebildet werden. Von LIEBMANN (1999) wurde für PrdD und PrdE eine Funktion ähnlich dem Protein GrdI der Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999) vermutet. Betain, ein dreifach methyliertes Derivat des Glycins, kann nicht über eine Pyruvylgruppe als Schiff'sche Base an die GrdI-Untereinheit der Betain-Reduktase gebunden werden. Das substratspezifische Protein GrdI der Betain-Reduktase wird daher nicht als Proprotein synthetisiert und nicht posttranslational gespalten (SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999). Eine Umsetzung von N-methylierten Derivaten des Prolins könnte analog der Betain-Reduktase-Reaktion erfolgen (LIEBMANN, 1999).

Wachstumsversuche mit *C. sticklandii* unter Zusatz N-methylierter Prolinderivate (Prolin-Betain, N-Methyl-Prolin), nicht N-methylierter Verbindungen (Hydroxyprolin) sowie methylierter (Trigonellin) und unmethylierter (DL-Pipecolinsäure)

Pyridinverbindungen zeigten keine erhöhte mRNA-Expression. Auch konnten im Rohextrakt dieser *C. sticklandii*-Zellen keine für die Prolinderivate spezifischen Reduktase-Aktivitäten gemessen werden (LIEBMANN, 1999). Eine Funktion der Proteine PrdD und PrdE für die Umsetzung methylierter Prolinderivate wie sie für Betain beschrieben wird (SONNTAG, 1998; WAGNER *et al.*, 1999), erscheint unter den getesteten Bedingungen somit unwahrscheinlich (LIEBMANN, 1999).

5.3. Weitere Gene des D-Prolin-Reduktase-Operons

In einer weiterführenden Diplomarbeit (LIEBMANN, 1999) wurde die DNA-Sequenz des D-Prolin-Reduktase-Operons sowohl in 5'-Richtung als auch in 3'-Richtung weiter sequenziert und analysiert.

Weiter stromaufwärts von *prdC* wurde ein Gen *prdR* identifiziert. Der Intergenbereich vor *prdC* weist sowohl eine zweite σ^{54} -abhängige als auch eine zweite σ^{70} -abhängige Promotorstruktur auf (LIEBMANN, 1999). Außerdem wurde eine Bindestelle für den "integration host factor" (IHF) identifiziert. Aminosäure-Sequenzvergleiche von PrdR (accession no. AJ130879) mit Datenbanken ergaben hohe Homologien zu einem Protein aus *C. difficile* und zu regulatorischen Proteinen der "enhancer binding protein"-Familie (EBP) vom NifA-Typ und lieferten Hinweise, daß PrdR ein potentieller Regulator für das D-Prolin-Reduktase-Operon ist (LIEBMANN, 1999). Eine Expression von PrdR konnte über eine Kreuzreaktion mit gegen NifA gerichteten Antikörpern auf Proteinebene wahrscheinlich gemacht werden (LIEBMANN, 1999).

EBP-Proteine aktivieren die Expression von Genen, die durch die σ^{54} -abhängige RNA-Polymerase transkribiert werden (MORETT & SEGOVIA, 1993). Die EBP-Proteine gliedern sich strukturell in drei Bereiche mit charakteristischen Motiven: einen variablen N-terminalen Teil, eine hochkonservierte zentrale Domäne (σ^{54} -Interaktionsdomäne) und einen C-terminalen Teil, welcher der Bindung an Enhancer-Strukturen (ELE-Elemente) dient und sich durch das Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) auszeichnet (MORETT & SEGOVIA, 1993). In der zentralen Domäne handelt es sich dabei um zwei ATP-Bindemotive (A, B) und zwei σ^{54} -Interaktionsmotive (C, Z), die ebenso wie das HTH-Motiv alle in PrdR aus *C. sticklandii* (LIEBMANN, 1999) und *C. difficile* identifiziert werden konnten (Abb. 5.7).

Die N-terminale Domäne von PrdR zeigte signifikante Homologien zu Sensor- oder Signal-Transduktions-Histidin-Kinasen und enthielt eine PAS-Domäne, welche für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (LIEBMANN, 1999) (Abb. 5.7). Zu dieser PAS-Domäne wurden auch im Protein PrdR aus *C. difficile* Homologien identifiziert (Abb. 5.7). PAS-Domänen bestehen aus einer oder mehreren Sensor-Boxen (TAYLOR & ZHULIN, 1999). Diese Sensor-Boxen reagieren auf Sauerstoff oder Redoxpotentiale (ZHULIN *et al.*, 1997). In PrdR wurde eine solche PAS-Domäne identifiziert, wie es auch für andere Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt beschrieben wurde (ZHULIN *et al.*, 1997). Es kann daher postuliert werden, daß PrdR das Redoxpotential oder die Prolinkonzentration in der Zelle messen kann (LIEBMANN, 1999).

Aufgrund des Vorhandenseins der PAS-Domäne und des HTH-Motives wird von LIEBMANN (1999) eine Dimerisierung des aktivierenden Regulators PrdR diskutiert. Voraussetzung für eine Dimerisierung ist eine effektive Bindung der Aktivator-Homodimere an multiple Bindestellen (NORTH *et al.*, 1993) Da im DNA-Bereich vor *prdC* drei ELE-Sequenzen gefunden wurden (LIEBMANN, 1999), wäre dies sehr wahrscheinlich.

In Anlehnung an ein von REIZER *et al.* (1999) beschriebenes System aus *Clostridium acetobutylicum* wird von LIEBMANN (1999) jedoch auch ein Zweikomponenten-Regulationssystem in Betracht gezogen. Im N-terminalen Bereich des σ^{54} -Regulator-Proteins aus *C. acetobutylicum* befinden sich ein Histidin- und ein Serinrest im Abstand von 36 Aminosäuren, analog zu den Phosphorylierungspunkten des Response-Regulators des Phosphotransferase-Systems (PTS) (REIZER *et al.*, 1999). Das PTS stellt ein Zweikomponenten-Regulationssystem dar, bei dem eine Sensor-Kinase den Response-Regulator in einer Phosphoenolpyruvat-abhängigen Reaktion phosphoryliert (REIZER *et al.*, 1999). Im N-Terminus von PrdR wurden ebenfalls ein Histidin- und ein Serinrest im Abstand von 36 Aminosäuren identifiziert (Abb. 5.7). Jedoch bestehen zwischen den Proteinen sonst keine Sequenzhomologien (LIEBMANN, 1999).

SONNTAG (1998) konnte stromaufwärts der Strukturgene des Sarkosin-Reduktase-Operons aus *E. acidaminophilum* einen *orfR* finden, dessen Genprodukt ein potentiell regulatorisches Protein mit Sequenzhomologien zu σ^{54} -Aktivator-Proteinen darstellt. Zusätzlich wurde noch ein zweiter *orfS* gefunden. Von SONNTAG (1998) wurde

daraufrin ein Zweikomponenten-Regulationssystem mit OrfS als Sensor-Kinase und OrfR als Response-Regulator postuliert. Da im 5'-untranslatierten Bereich der Strukturgene des Sarkosin-Reduktase-Operons keine ELE-Sequenzen identifiziert werden konnten, wird für dieses System eine direkte Bindung des Aktivators an die σ^{54} -RNA-Polymerase vermutet (SONNTAG, 1998).

In weiteren Studien wurde stromaufwärt von *prdR* das Gen *prdX* (Abb. 5.8) identifiziert, welches schwache Homologien zu Transkriptionsregulatoren mit "helix-turn-helix"-Motiven zeigt, die vermutlich als Repressor wirken (A. Pich, pers. Mitteilung). Im untranslatierten Bereich zwischen *prdX* und *prdR* wurde keine Promotorstruktur identifiziert, jedoch vor *prdX*. Außerdem weist die Sequenz in diesem Promotorbereich eine "inverted repeat"-Struktur auf, so daß es sich bei PrdX (accession no. AJ130879) um einen Repressor handeln könnte, der durch Bindung an die "inverted repeat"-Struktur die Transkriptmenge von *prdX* und *prdR* kontrolliert (A. PICH, pers. Mitteilung). Ähnlichkeiten des Proteins PrdX zum Protein GrdX des Glycin-Reduktase-Operons aus *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER *et al.*, 2001) konnten nicht identifiziert werden.

Weiter stromaufwärts liegen die Gene *proRS* für die Prolyl-tRNA-Synthetase, eines noch unbekanntes *orf* sowie die Gene für die Cystein-Biosynthese *cysRS* (Cysteinyl-tRNA-Synthase I), *cysE* (Serin-Acetyltransferase) und *cysK* (Cystein-Synthase) (A. PICH, pers. Mitteilung; Abb. 5.8).

In 3'-Richtung von *prdE* wurden ein weiteres Gen *prdF* und ein noch unvollständiger offener Leserahmen, der mit *prdG* bezeichnet wurde, identifiziert (LIEBMANN, 1999; A. PICH, pers. Mitteilung). Das Gen *prdF* kodiert die Prolin-Racemase aus *C. sticklandii* (YAGASAKI & OZAKI, 1998; accession no. E10199; Abb. 5.8).

Für *prdG* konnten keine Homologien zu anderen Proteinen gefunden werden. Bei Proteinsequenz-Analysen wurden 6 Regionen identifiziert, die potentielle Membrandurchgänge darstellen. PrdG könnte demnach für die Aufnahme von Prolin oder die Abgabe von δ -Aminovalerat verantwortlich sein (A. PICH, pers. Mitteilung).

5.4. Transkription des D-Prolin-Reduktase-Operons

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Strukturgene *prdA* und *prdB* der D-Prolin-Reduktase sowie die drei offenen Leserahmen *prdC*, *prdD* und *prdE* kloniert und analysiert (Abb. 4.19; s. Anhang I). Stromaufwärts des Gens *prdB* wurden die Konsensus-Sequenzen eines σ^{54} -Promotors und eines σ^{70} -Promotors identifiziert. In der 3'-untranslatierten Region von *prdB* wurde ein *rho*-unabhängiger Translations-Terminator nachgewiesen (Abb. 4.19; s. Anhang I). In der Intergen-Region zwischen *prdC* und *prdA* konnten ebenso wie zwischen *prdD* und *prdE* weder Promotorstrukturen noch Terminationssignale identifiziert werden (s. Anhang I).

Durch Northern-Blot-Analysen wurden für das D-Prolin-Reduktase-Operon zwei mRNA-Transkripte von 4,5 kb und 0,8 kb detektiert (Abb. 4.21). Das 4,5 kb-Transkript umfaßt die beiden Gene der D-Prolin-Reduktase *prdA* und *prdB* vermutlich bis zum Terminator stromabwärts von *prdB* sowie wahrscheinlich das *prdC*-Gen stromaufwärts von *prdA*, von dem jedoch nur der C-terminale Teil der Sequenz im Plasmid pUK1 enthalten ist. Das kleine Transkript von 0,8 kb umfaßt lediglich das Gen *prdB*. Es handelt sich um ein zusätzliches Transkript für das Selenoprotein PrdB, was vermutlich in der Besonderheit des Selenocystein-Einbaus begründet sein könnte (Abb. 4.22; Abb. 5.8).

Die Expression der Gene erfolgte nur bei Anzucht von *C. sticklandii* in Minimalmedium mit 20 mM Prolin. Bei Anzucht in Komplexmedium oder Minimalmedium mit der essentiellen Prolinkonzentration von 0,5 mM konnte keine der mRNA-Spezies nachgewiesen werden. Dies kann als Hinweis auf eine substratabhängige Induktion des D-Prolin-Reduktase-Operons gewertet werden.

LIEBMANN (1999) wies in Northern-Blot-Analysen für das D-Prolin-Reduktase-Operon neben den 4,5 kb und 0,8 kb-Transkripten eine weitere 7,5 kb große mRNA nach. "Primer-Extension"-Experimente zeigten, daß die 7,5 kb und 4,5 kb-Transkripte an dem σ^{54} -abhängigen Promotor an einem "Adenin" 24 bp vor dem ATG-Startcodon des *prdC*-Gens beginnen. Die 4,5 kb-mRNA umfaßt demzufolge die Region von *prdC* bis einschließlich *prdB*. Die 7,5 kb-mRNA reicht bis hinter *prdF* hinaus und könnte auch *prdG* umfassen (LIEBMANN, 1999; A. PICH, pers. Mitteilung; Abb. 5.8).

Im Bereich des σ^{70} -abhängigen Promotors konnte kein Transkriptionsstartpunkt ermittelt werden, so daß die Expression der Gene unter den untersuchten Bedingungen wahrscheinlich über den σ^{54} -abhängigen Promotor reguliert wird (LIEBMANN, 1999).

Das Vorkommen eines σ^{70} -abhängigen Promotors und eines σ^{54} -abhängigen Promotors stromaufwärts von *prdC* könnte auf eine konstitutive Genexpression durch die σ^{70} -RNA-Polymerase neben einer induzierbaren, regulierten Expression durch die σ^{54} -RNA-Polymerase hinweisen.

Für das 0,8 kb-Transkript wurden ebenfalls ein σ^{70} -abhängiger und ein σ^{54} -abhängiger Promotor stromaufwärts von *prdB* identifiziert (s. Anhang). Es wurden in dieser Region keine "Primer-Extension"-Signale nachgewiesen (LIEBMANN, 1999). Ebenso wurden im Bereich vor *prdB* keine regulatorischen Sequenzen wie vor *prdC* gefunden, so daß eine Aktivierung der σ^{54} -RNA-Polymerase über DNA-gebundene Regulatorproteine unwahrscheinlich ist. Die Transkription der 0,8 kb mRNA könnte über eine direkte Bindung des Aktivators an die σ^{54} -RNA-Polymerase ohne Beteiligung von Enhancer-Sequenzen erfolgen, was von BERGER *et al.* (1994) für NifA aus *K. pneumoniae* gezeigt wurde. Gleichzeitig kann aber auch eine konstitutive Expression über den σ^{70} -abhängigen Promotor in Betracht gezogen werden.

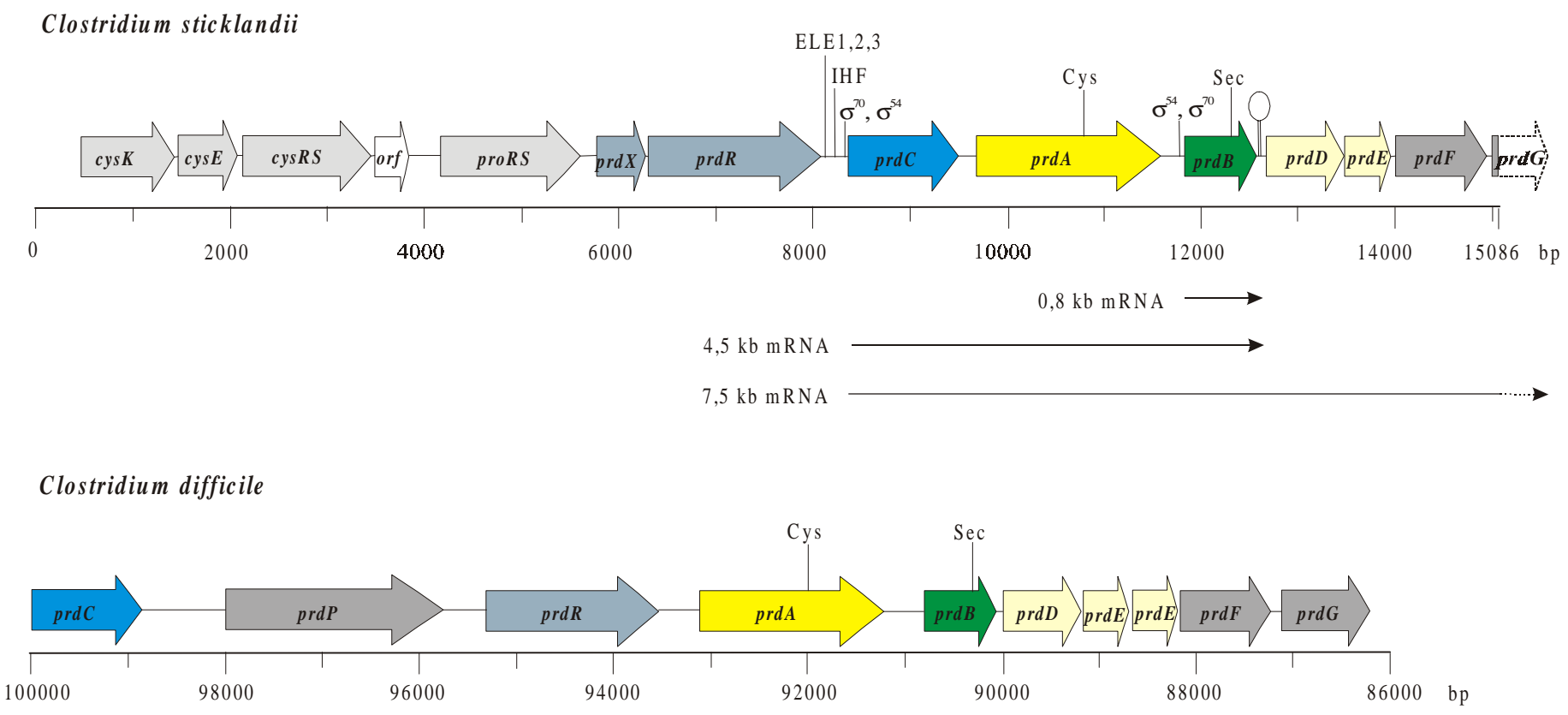


Abb. 5.8: Schematische Darstellung der D-Prolin-Reduktase-Operone aus *C. sticklandii* und *C. difficile*. Cys: Vorläufer der durch die Spaltung des Proproteins gebildeten aminoterminalen Carbonylgruppe; Sec: Selenocystein; σ^{54} : σ^{54} -abhängiger Promotor; σ^{70} : σ^{70} -abhängiger Promotor; ELE1,2,3: Binderegion der enhancer like elements; IHF: Bindestelle des integration host factor.

5.5. Vergleich der Proteine des Prolin-Reduktase-Operons

Ein weiteres Prolin-Reduktase-Operon konnte im Rahmen der derzeit erfolgenden Genomsequenzierung des pathogenen Bakteriums *C. difficile* am Sanger-Center identifiziert werden. Es liegt jedoch in entgegengesetzter Orientierung vor. Die Gene für die Prolin-Reduktase aus *C. difficile* zeigen hinsichtlich der Sequenz der kodierten Proteine (s. Anhang), aber auch der Operonstruktur signifikante Homologien zur D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (Abb. 5.8). Das PrdA-Protein in *C. difficile* wird vermutlich ebenfalls als Proprotein translatiert und besitzt an der möglichen Spaltstelle einen entsprechenden Cysteinrest (Abb. 5.1). Das Protein PrdB in *C. difficile* weist an der dem Selenocysteins in *C. sticklandii* entsprechenden Position eine Lücke auf (Abb. 5.2). Auf DNA-Ebenen konnte an dieser Stelle wie in *C. sticklandii* ein TGA-Codon identifiziert werden, so daß es sich bei dem Protein PrdB in *C. difficile* ebenfalls um ein Selenocystein handeln könnte (s. Anhang II). Diese Annahme müßte jedoch auf Proteinebene durch Peptidsequenzierung noch bestätigt werden.

Die Proteine PrdD und PrdE in *C. difficile* zeigen ebenfalls relativ hohe Homologien zum Proprotein PrdA aus *C. sticklandii* (Abb. 5.6). Die zusammengesetzten Proteine PrdDE enthalten an der Spaltstelle des Proproteins A wie die Proteine PrdDE aus *C. sticklandii* keinen Cysteinrest. Ein dem Protein PrdE sehr ähnliches Protein ist in *C. difficile* direkt stromabwärts von PrdE vorhanden, allerdings in einem anderen Leserahmen (s. Anhang II, Abb. 5.8). Stromabwärts von PrdE befindet sich wie in *C. sticklandii* ein Protein PrdG (Abb. 5.8), dessen Funktion noch nicht genau definiert ist (A. Pich, pers. Mitteilung).

Die Proteine PrdC und PrdR in *C. difficile* sind in umgekehrter Reihenfolge angeordnet. Zwischen diesen beiden Proteinen liegt ein 740 Aminosäuren großes Protein PrdP, welches Homologien zu prolinreichen Proteinen zeigt (Abb. 5.8) (A. Pich, pers. Mitteilung) und in *C. sticklandii* nicht identifiziert wurde. Das Protein PrdX zeigte ebenfalls Homologien zu einem Protein in *C. difficile*. Dieses Protein ist jedoch über 60 000 bp stromaufwärts des Prolin-Reduktase-Operons lokalisiert. Eine Funktion im Rahmen der Regulation der Prolin-Reduktase in diesem Organismus erscheint somit unwahrscheinlich.

Weiterhin konnten relativ hohe Homologien zu Proteinen des anaeroben Eubakteriums *T. denticola* gefunden werden, dessen Genom derzeit am "Institut for Genomic Research"

sequenziert wird (s. Anhang III). Auch hier weist das zum Proprotein PrdA aus *C. sticklandii* ähnliche Protein PotP einen konservierten Cysteinrest an der Spaltstelle auf (Abb. 5.1). Das Selenoprotein PrdB zeigte ebenfalls Homologien zu einem Protein aus *T. denticola*, welches hier mit PotS bezeichnet wird. In der kodierenden DNA-Sequenz, konnte ebenfalls ein TGA-Codon identifiziert werden, so daß es sich bei dem Protein PotS aus *T. denticola* vermutlich auch um ein Selenoprotein handelt.

Die Proteine PrdD und PrdE sind in diesem Organismus nicht enthalten. Die gefundenen Sequenzhomologien zum Protein PrdE sind in der Position äquivalent zum C-Terminus des Proteins PrdA in diesem Organismus. Homologe Bereiche zu den Proteinen PrdC und PrdR wurden zwar identifiziert, können jedoch bisher nicht mit den Proteinen der Prolin-Reduktase in Zusammenhang gebracht werden, da sie in anderen Bereichen des Genomes liegen. Zu den Proteinen PrdD, PrdF, PrdG und PrdX aus *C. sticklandii* wurden in *T. denticola* keine Aminosäuresequenz-Homologien gefunden.

Geringe Ähnlichkeiten zum C-terminalen Bereich im Anschluß an die Spaltstelle des Proproteins PrdA wurden weiterhin in dem pathogenen Gram-positiven, stäbchenförmigen Bakterium *Corynebacterium diphtheriae* (gnl|Sanger_1717| cdiph_Contig249) gefunden.

Das Protein PrdB zeigte über den gesamten Sequenzbereich leichte Sequenz-Homologien zu Proteinsequenzen der aeroben, Gram-negativen, pathogenen Organismen *Bordetella parapertussis* (gnl|Sanger_519| bparaper_Contig669) und *Bordetella bronchiseptica* (gnl|Sanger_518|bbronchi_Contig1198). Hinweise auf ein Selenocystein in Form eines "in frame"-TGA-Codons konnten jedoch nicht gefunden werden. In *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit (gnl|TIGR_5691|T. brucei_72H5.TF), *Thiobacillus ferrooxidans*, einem aeroben, Gram-negativen, chemolithotrophen Bakterium (gnl|TIGR|t_ferrooxidans_6139) und *Caulobacter crescentus* (gnl|TIGR|C.crescentus_12574) wurden geringe Ähnlichkeiten zum C-Terminus von PrdB identifiziert.

Schwache Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten zum C-Terminus des Proteins PrdD wurden im bisher sequenzierten Genom des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* (gnl|pf4|Sanger_MAL4_000007 234147 bp, 9238 reads Plasmodium falciparum 3D7) gefunden.

Zum mittleren Proteinsequenzbereich des Proteins PrdE zeigten Aminosäure-Sequenzen aus *Trypanosoma brucei* (gnl|TIGR_5691|T.brucei_15A1.TV T7) und *Pseudomonas syringae*, eines Gram-negativen, phytopathogenen Bakteriums (gnl|TIGR_323|psyring_3960 *Pseudomonas syringae* pv tomato) geringe Homologien.

Somit sind derzeit lediglich zwei Prolin-Reduktase-Operone in *C. sticklandii* und *C. difficile* bekannt. Die in *T. denticola* identifizierten Proteine PotP und PotS gehören wahrscheinlich nicht zu einem Prolin-Reduktase-System, da sie sehr viel höhere Sequenzähnlichkeiten zu den Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktasen aufweisen.

5.6. Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons

Der genaue Regulationsmechanismus für das D-Prolin-Reduktase-Operon in *C. sticklandii* konnte während der bisherigen Untersuchungen noch nicht geklärt werden. LIEBMANN (1999) stellte anhand der bisher gewonnenen Erkenntnisse folgende Hypothese auf:

Das Eingangssignal in Form von Prolin oder einer Änderung des Redoxpotentials der Zelle könnte über eine Signal-Transduktions-Kaskade die Aktivierung von PrdR bewirken, was im Zweikomponenten-Regulationssystem durch Phosphorylierung durch die Sensor-Kinase, im Einkomponentensystem durch Konformationsänderung oder Dimerisierung bzw. Autophosphorylierung (ZHULIN *et al.*, 1997) erfolgen könnte. PrdR bindet an die ELE-Elemente und eine IHF-induzierte Konformationsänderung der DNA ermöglicht die Bindung von PrdR auch an die σ^{54} -RNA-Polymerase. Die Hydrolyse eines Nukleosid-Triphosphates würde die Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen Promotorkomplex und die Transkription der nachfolgenden Gene des D-Prolin-Reduktase-Operons ermöglichen (Abb. 5.9).

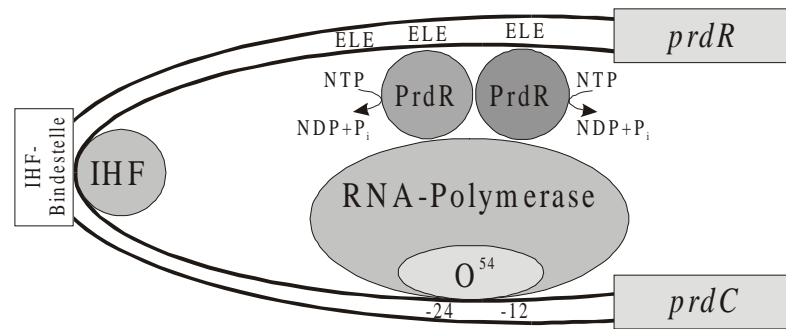


Abb. 5.9: Schematische Darstellung des postulierten Regulationsmechanismus für das D-Prolin-Reduktase-Operon aus *C. sticklandii* (LIEBMANN, 1999). IHF: integration host factor, ELE: enhancer like element, (-24 -12): konservierte σ^{54} -Promotor-Region, PrdR: Regulator-Protein, *prdR*: Gen des Regulator-Proteins; *prdC*: Gen des potentiellen elektronenübertragenden Proteins, NTP: Nukleosid-Triphosphat, NDP: Nukleosid-Diphosphat, P_i : anorganisches Phosphat.

5.7. Hypothese für einen Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Reduktase

Die D-Prolin-Reduktase ist ein 870 kDa großes heterodekames Enzym, wobei das Protomer aus drei Untereinheiten mit molekularen Massen von 45, 26 und 23 kDa besteht (Abb. 4.10). Die 45- und 23 kDa-Untereinheiten gehen aus dem 68 kDa großen Proprotein PrdA hervor, wobei die 23 kDa-Untereinheit nach der Spaltung des Proenzym eine aminoterminal Pyruvylgruppe trägt (Kap. 5.2.1.). Die Bindung des Substrates D-Prolin an die 23 kDa Untereinheit konnte im Verlauf dieser Arbeit experimentell bewiesen werden (Abb. 4.14). Die von dem Gen *prdB* kodierte 26 kDa-Untereinheit enthält ein Selenocystein (Kap. 5.2.2.).

Mit den im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Daten wird basierend auf den von SETO (1980) vorgeschlagenen zwei Katalysemechanismen ein modifizierter Reaktionsmechanismus für die Umsetzung von D-Prolin zu δ -Aminovalerat durch die D-Prolin-Reduktase postuliert:

Nach der Isomerisierung des natürlich vorkommenden L-Prolins durch die Prolin-Racemase (RUDNICK & ABELES, 1975) in D-Prolin könnte es zuerst zu einer Bindung des D-Prolins an die Pyruvylgruppe der 23 kDa-Untereinheit möglicherweise unter Bildung einer Schiff'schen Base kommen (Abb. 5.10, I). Die Bildung einer Schiff'schen Base konnte jedoch bisher nicht bewiesen werden (ARKOWITZ *et al.*, 1994). Die C-N-Bindung des Prolins wird dabei polarisiert. Anschließend könnte das in PrdB in Form von Selenocystein enthaltene Selenid-Anion das α -C-Atom des Prolins

nukleophil angreifen und die C-N-Bindung des Prolinringes unter Ausbildung eines Selenoethers reaktiv spalten (Abb. 5.10, II), ähnlich der Spaltung von Glycin durch GrdB der Glycin-Reduktase (Abb. 1.1). Die Bindung des Selenols des Proteins PrdB zum α -C-Atom des Prolins kann anschließend durch ein Cystein-Anion unter Oxidation zur gemischten Selenid-Sulfid-Gruppe an PrdB gespalten werden. Dabei wird das α -C-Atom des Prolins protoniert (Abb. 5.10 III). Durch Hydrolyse wird das Endprodukt δ -Aminovalerat von der 23 kDa-Untereinheit freigesetzt (Abb. 5.10, IV). Die oxidierte Selenid-Sulfid-Gruppe muß anschließend wieder reduziert werden, was *in vitro* durch DTT, welches die D-Prolin-Reduktase direkt reduzieren kann (SCHWARTZ & MÜLLER, 1979), geschieht (Abb. 5.10, V.). *In vivo* werden die Elektronen durch NADH, vermutlich über das Protein PrdC (Kap. 5.2.3.) und eventuell weitere Proteinkomponenten (STADTMAN, 1965; SCHWARTZ & MÜLLER, 1979; SETO, 1980a), auf die D-Prolin-Reduktase übertragen (Abb. 5.10, V.). Im Gegensatz dazu erfolgt in der Glycin-Reduktase die Elektronenübertragung über das NADPH-abhängige Thioredoxin-System und das Selenoprotein A.

Der in Abbildung 5.10 dargestellte Reaktionsmechanismus der D-Prolinreduktion zeigt trotz der strukturellen Ähnlichkeiten der Proteinkomponenten von Glycin- und D-Prolin-Reduktase (Kap. 5.2.1., 5.2.2.) nicht nur hinsichtlich der Elektronenübertragung Unterschiede zu dem von WAGNER (1997) und WAGNER *et al.* (1999) beschriebenen Reaktionsmechanismus der Glycinreduktion.

In dem strikt anaeroben Bakterium *E. acidaminophilum* konnte ein Protein identifiziert werden, welches in die Familie der Peroxiredoxine eingeordnet werden kann und die Reduktion von Peroxiden in einer Thiol-abhängigen Reaktion katalysiert. Es enthält einen Selenocystein-Rest anstelle des sonst katalytisch essentiellen Cystein-Restes (<http://www.verwaltung.uni-halle.de/dez5/fobi98/FB607/F60703j.htm>). Das Vorkommen eines solchen Proteines erscheint im Hinblick auf die toxische Wirkung des Sauerstoffes und seiner reaktiven Verbindungen für diesen strikt anaeroben Mikroorganismus von großer Bedeutung.

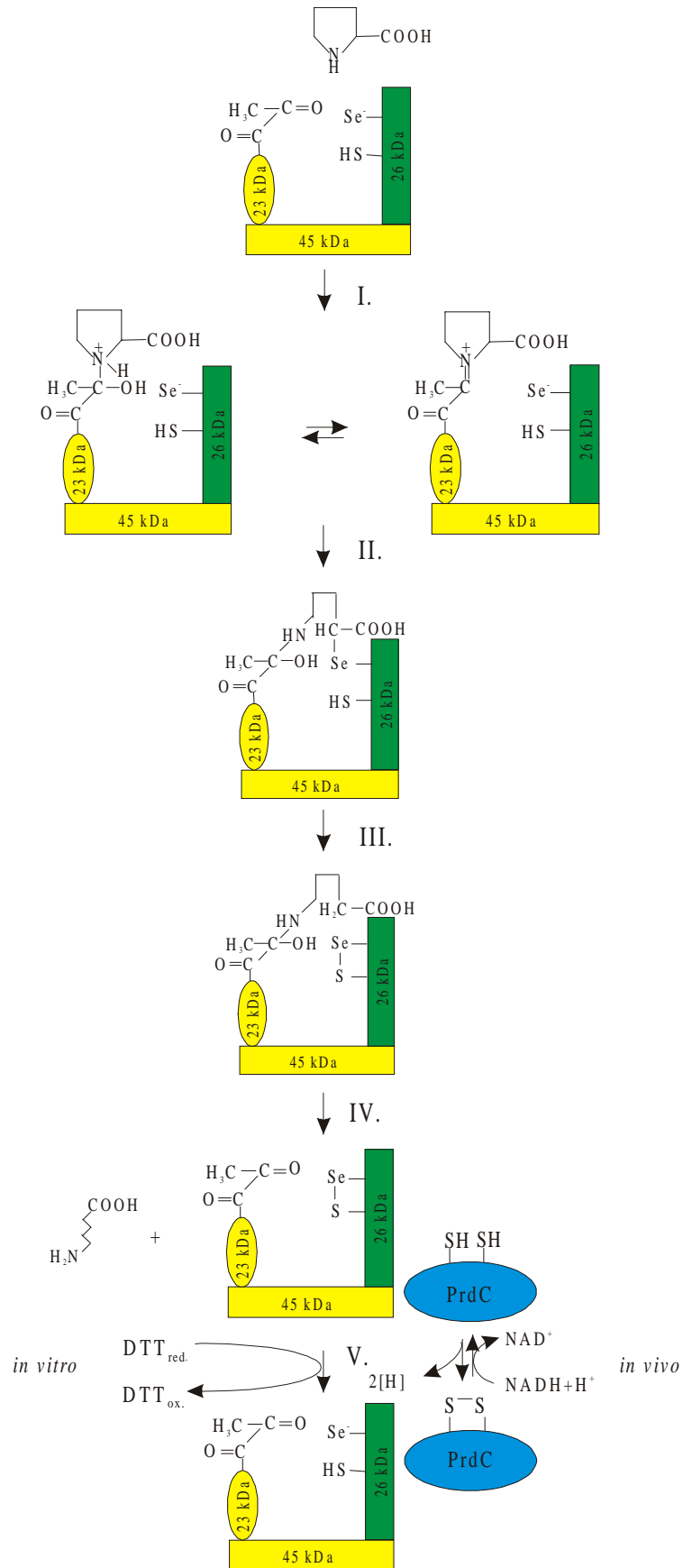


Abb. 5.10: Postulierter Reaktionsmechanismus der reduktiven Spaltung von D-Prolin durch die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii*.

Für das ebenfalls obligat anaerob lebende Bakterium *C. sticklandii* gibt es bislang noch keine Hinweise auf das Vorkommen eines derartigen Peroxidase-Systems. Eine Beteiligung des Proteins PrdB der D-Prolin-Reduktase beim Schutz vor Sauerstoffkontakt ist noch nicht untersucht worden. Das Selenocystein-Motiv -U-X-X-C- in PrdB könnte im Gegensatz zum Selenocystein in GrdB jedoch durchaus redoxaktive Funktion besitzen. In GrdB ist für die eigentliche Reaktion des Proteins B nur das freie Selenol-Anion nötig (WAGNER, 1997). In der Glycin-Reduktase stellt das Selenocystein-Motiv -C-X-X-U- in Protein A das redoxaktive Zentrum des Proteins dar, welches den Carboxymethyl-Rest von GrdB übernimmt und auf die Proteine C überträgt (ARKOWITZ & ABELES, 1990, 1991). Die dabei entstehende Selenid-Sulfid-Brücke wird durch das Thioredoxin-System reduziert (DIETRICH *et al.*, 1991) (Abb. 1.1).

Für das D-Prolin-Reduktase-System wurden in den bisherigen Untersuchungen keine Hinweise auf das Vorkommen einer dem Protein A ähnlichen Komponente gefunden. Auch Proteine analog den Proteinen C der Glycin-Reduktase sind vermutlich nicht vorhanden. Weiterhin konnte für die Prolinreduktion im Rahmen dieser Arbeit sowie in nachfolgenden Untersuchungen keine Energiekonservierung im Zuge einer für die Glycin-Reduktase beschriebenen Substratkettenphosphorylierung unter Bildung von ATP (ARKOWITZ & ABELES, 1989; 1990; 1991; STADTMAN & DAVIS, 1991; SCHRÄDER & ANDREESSEN, 1992) nachgewiesen werden. Damit scheint die D-Prolinreduktion nur eine Elektronen verbrauchende Funktion auszuüben, wie schon von SETO (1980a) postuliert wurde.

5.8. Zur Rolle von Prolin in *C. sticklandii*

In *Clostridium sporogenes* ist die Prolinreduktion mit der Erzeugung eines pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran verbunden, der möglicherweise zur Energiekonservierung genutzt werden kann (LOVITT *et al.*, 1986). Da für die Prolinreduktion in *C. sticklandii* keine Energiekonservierung in Form einer ATP-Synthese nachgewiesen wurde, könnte die Funktion der D-Prolin-Reduktase jedoch in einer Beteiligung an der Osmoregulation des Stoffwechsels von *C. sticklandii* zu suchen sein. Hintergrund für diese Überlegung ist, daß *C. sticklandii* aus einem salzhaltigen Meerwassersediment der San Francisco Bay isoliert wurde (STADTMAN & MC CLUNG, 1957).

Für die Anpassung an osmotischen Streß werden zwei Strategien beschrieben, zum einen die Akkumulation sehr hoher Ionenkonzentrationen, zum anderen die Akkumulation sogenannter kompatibler Solute, osmotisch aktiver Substanzen (KEMPF & BREMER, 1998).

L-Prolin und Prolinderivate (z.B. Prolin-Betain) gelten wie eine Reihe anderer Aminosäurederivate (z.B. Glycin-Betain, Cholin, Carnithin), aber auch Zucker (z.B. Trehalose), Polyole (z.B. Glycerol) und kleine Peptide (z.B. N-Acetylglutaminylglutamin-Amid) als kompatible Solute bzw. Osmoprotektanten (LE RUDULIER *et al.*, 1984; CSONKA & HANSON, 1991; KEMPF & BREMER, 1998) bei Salzstreß. Als stark osmoprotektive Substanzen werden Prolin-Betain, Glycin-Betain und Cholin beschrieben, während für L-Prolin eine Funktion als kompatibles Solut unter niedrigem Salzstreß vermutet wird (LE RUDULIER *et al.*, 1984).

Prolin-Betain und andere Betaine werden in pflanzlichen Zellen als Sekundärmetabolite synthetisiert und unter osmotischem Streß im Cytoplasma akkumuliert. Sie sorgen so für eine Anpassung des osmotischen Zellstatus an die Umweltbedingungen (LE RUDULIER *et al.*, 1984). Diesen Verbindungen kommt auch eine wichtige Bedeutung in der Symbiose von stickstoff-fixierenden Rhizobien und Leguminosen (z.B. *Rhizobium meliloti* und *Medicago sativa*) zu, wo sie gleichzeitig auch als Induktor der Nodulations-Gene in den Bakterien und als Kohlen- und Stickstoffquelle dienen (GOLDMANN *et al.*, 1991). *R. meliloti* ist in der Lage, in Abwesenheit von Salzstreß Prolin-Betain und Trigonellin zu katabolisieren und sich damit vermutlich einen Überlebensvorteil gegenüber Umweltschwankungen zu schaffen (LE RUDULIER *et al.*, 1984). Die für den Katabolismus verantwortlichen Gene sind auf einem pSym-Plasmid organisiert und kodieren auch für die für den Symbioseprozeß wichtigen *nif*-Gene (GOLDMANN *et al.*, 1991).

Auch für freilebende stickstoff-fixierenden Bakterien wie *K. pneumoniae* wurde ein Schutz vor osmotischem Streß durch Prolin, Prolin-Betain und Glycin-Betain diskutiert (LE RUDULIER *et al.*, 1984). Eine Rolle dieser Substanzen bei der Osmoregulation wurde auch für *E. coli* und *Salmonella typhimorium* nachgewiesen, für die zwei osmoregulatorische Transportsysteme ProP und ProU beschrieben wurden (DUNLAP & CSONKA, 1985; CSONKA & HANSON, 1991; CULHAM *et al.*, 1993; KEMPF &

BREMER, 1998). Auch für *Staphylococcus aureus* werden Cholin, Glycin-Betain, Prolin und Taurin als Osmolytika beschrieben (GRAHAM & WILKINSON, 1992).

Uropathogenen *E. coli*-Stämme z.B. können aufgrund dieser osmoprotektiven Eigenschaften den Urogenitaltrakt besiedeln, weil im menschlichen Urin Glycin-Betain und Prolin-Betain enthalten sind. Eine Katabolisierung dieser Substanzen erfolgt bei diesen Organismen jedoch nicht.

Von LIEBMANN (1999) wurde bei *C. sticklandii* der osmoprotektive Einfluß von Prolin-Betain und anderen Prolinderivaten unter Salzstreß untersucht. Es wurden Wachstumsversuche mit bis zu 1 M NaCl durchgeführt. Diese Salzkonzentration wurde als wachstumshemmend bestimmt. Eine weitere wachstumsfördernde Wirkung der 1 mM eingesetzten osmotisch aktiven Substanzen wurde jedoch nicht mehr beobachtet (LIEBMANN, 1999), obwohl in der natürlichen Umgebung von *C. sticklandii* eine Osmoregulation durchaus sinnvoll erscheint. Es wäre möglich, daß *C. sticklandii* im Zuge osmotischer Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen Prolin nach Isomerisierung zu D-Prolin reduktiv über die D-Prolin-Reduktase abbaut. Prolin könnte dabei bei Erreichen einer bestimmten Konzentration als Sensor ähnlich wie cAMP an das Regulatorprotein PrdR (Kap. 5.3.) binden und die Expression des D-Prolin-Reduktase-Operons auslösen. Die Möglichkeit einer von der Prolinkonzentration in der Zelle abhängigen Induktion des D-Prolin-Reduktase-Operons ist gegeben, da die Expression der Gene nur bei Anzucht von *C. sticklandii* in Minimalmedium mit 20 mM Prolin erfolgte. Die Identifizierung zweier σ^{54} -abhängiger Promotorregionen neben σ^{70} -abhängigen Promotorstrukturen weist auf eine möglicherweise induzierbare, regulierte Expression durch die σ^{54} -RNA-Polymerase in Folge sich ändernder Umwelteinflüsse hin. Andererseits könnte es sein, daß *C. sticklandii* aufgrund seiner Salztoleranz (LIEBMANN, 1999) Prolin nicht als kompatibles Solut zur Osmoregulation benötigt. Dem D-Prolin-Reduktase-Operon könnte somit auch eine andere Bedeutung, wie die Messung des Redoxpotentials der Zelle und der Verbrauch von Reduktionsäquivalenten zukommen. Eine Elektronen verbrauchende Funktion erscheint auch in Anlehnung an die von SETO (1980a) bereits postulierte Hypothese als durchaus möglich.

6. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde als cytoplasmatisches Protein identifiziert. Die bislang postulierte Membranständigkeit des Enzyms konnte somit widerlegt werden.
- 2) Die D-Prolin-Reduktase wurde mit einer Ausbeute von 1,1 % zur Homogenität gereinigt. Es handelt sich im Gegensatz zu bisher publizierten Daten um ein heterodekames Protein mit einer molekularen Masse von 870 kDa und einer Untereinheitsstruktur $(\alpha\beta)_{10}\gamma_{10}$. Die drei Untereinheiten weisen Molekülmassen von 45, 26 und 23 kDa auf. Die 23 kDa-Untereinheit ist aminoterminal durch eine Pyruvylgruppe blockiert und bindet das Substrat D-Prolin. Sie ist dem Edman-Abbau erst durch Modifikation mit o-Phenylendiamin zugänglich.
- 3) Die aminoterminalen Sequenzen der Untereinheiten wurden mittels Edman-Abbau analysiert und für die Ableitung degenerierter Oligonukleotide eingesetzt. Durch PCR, anschließende Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente in das pGEM[®]-T-Vektor-System und Sequenzierung wurden zwei Plasmide pPRO1 und pPRO2 erhalten, die DNA-Fragmente der D-Prolin-Reduktase enthielten.
- 4) Durch den Einsatz der amplifizierten DNA-Fragmente der Plasmide pPRO1 und pPRO2 als Sonden zur Hybridisierung gegen die partielle Genbank von *C. sticklandii* konnte ein 4,85 kb großer Klon pUK1 isoliert und vollständig in beiden Richtungen sequenziert werden. Der Klon pUK1 enthält neben den Strukturgenen *prdA* und *prdB* der D-Prolin-Reduktase stromaufwärts den unvollständigen Orf *prdC* und stromabwärts den Orf *prdD* und den ebenfalls unvollständigen Orf *prdE*.
- 5) Das Gen *prdA* kodiert für ein PrdA-Protein mit einer molekularen Masse von 68 kDa, welches posttranslational in die 45 kDa- und die 23 kDa-Untereinheiten gespalten wird. Die Spaltung des Proproteins erfolgt im Gegensatz zu den bekannten pyruvylhaltigen Decarboxylasen nicht an einem Serinrest, sondern an einem Cysteinrest, welcher in die Pyruvylgruppe umgewandelt wird. Die D-Prolin-Reduktase kann daher in eine zweite Klasse der Pyruvylenzyme, die pyruvylhaltigen Reduktasen, eingeordnet werden.
- 6) Das Gen *prdB* kodiert für die 26 kDa-Untereinheit und wurde als Selenoprotein identifiziert. Es enthält ein Selen in Form von Selenocystein. In der *prdB*-Sequenz ist ein "in frame"-TGA-Codon enthalten, welches für den Einbau von Selenocystein in die Aminosäure-Sequenz kodiert. Das Selenocystein ist in ein

vermutlich redoxaktives Motiv -U-X-X-C- eingebunden, welches im postulierten Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Reduktase von entscheidender Bedeutung ist. Im 3'-untranslatierten Bereich von *prdB* wurde ein *rho*-unabhängiger Terminator identifiziert.

- 7) Der unvollständige Orf PrdC zeigt Homologien zum RnfC-Protein aus *R. capsulatus*, welches dem Rnf-Membranprotein-Komplex angehört, der die Elektronen-übertragung auf die Nitrogenase realisiert. Die vollständige Sequenzierung des *prdC* in einer weiterführenden Diplomarbeit identifizierte das Genprodukt als eine potentielle elektronenübertragende Komponente der D-Prolin-Reduktase.
- 8) Der Orf PrdD zeigte wie der noch unvollständige Orf PrdE Homologien zum Proprotein PrdA. PrdE konnte in einer weiterführenden Diplomarbeit ebenfalls komplett sequenziert werden. Die genaue Funktion dieser Proteine bleibt noch zu klären.
- 9) In weiterführenden Studien wurden weitere Gene zu beiden Seiten des Plasmides pUK1 identifiziert. Stromaufwärts von *prdC* handelt es sich dabei um ein potentielles Regulatorprotein PrdR, welches hohe Homologien zu regulatorischen Proteinen der EBP-Familie vom NifA-Typ zeigt. Weiterhin wurden in 5'-Richtung die Gene *prdX* für ein mögliches Repressor-Protein, *proRS* für die Prolyl-tRNA-Synthetase, sowie die Gene für die Proteine der Cystein-Biosynthese *cysRS*, *cysE* und *cysK* identifiziert. Stromabwärts von *prdB* folgen das Gen *prdF*, welches für die Prolin-Racemase kodiert und das unvollständige Gen *prdG*, dessen Genprodukt ein Transporter für Prolin oder δ -Aminovalerat sein könnte.
- 10) In Northern-Hybridisierungs-Experimenten wurden zwei Transkripte von 4,5 kb und 0,8 kb nachgewiesen. Aufgrund des Fehlens von Promotorstrukturen stromaufwärts von *prdA* und der Bestimmung des Transkriptionsstarts an einem Adenin des σ^{54} -abhängigen Promotors im 5'-untranslatierten Bereich vor PrdC im Rahmen einer sich anschließenden Diplomarbeit umfaßt das 4,5 kb-Transkript die kodierenden Gene für die Proteine PrdC, PrdA und PrdB. Stromaufwärts von *prdB* wurden sowohl eine σ^{70} -abhängige und ein σ^{54} -abhängige Promotorstruktur identifiziert, so daß das 0,8 kb-Transkript eine zusätzliche mRNA nur für das Selenoprotein PrdB darstellt.

- 11) Es konnte ein modifizierter Reaktionsmechanismus für die reduktive Spaltung des D-Prolins postuliert werden, wonach das D-Prolin an die Pyruvylgruppe der 23 kDa-Untereinheit bindet und die C-N-Bindung durch einen nukleophilen Angriff des Selenolats der 26 kDa-Untereinheit gespalten wird.
- 12) Die Funktion der D-Prolin-Reduktase im Stoffwechsel von *C. sticklandii* wurde anhand der Bedeutung von Prolin als kompatibles Solut diskutiert. Es bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, die Funktion des Enzymes endgültig zu klären.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ALBERT, A., DHANARAJ, V., GENSCHEL, U., KHAN, G., RAMJEE, M.K., PULIDO, R., SIBANDA, B.L., VON DELFT, F., WITTY, M., BLUNDELL, T.L., SMITH, A.G. & ABELL, C. (1998): Crystal structure of aspartate decarboxylase at 2.2 Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 289-293.

ANDREESEN, J.R., BAHL, H. & GOTTSCHALK, G. (1989): Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: *Biotechnology Handbook "Clostridia"*, 27-62. Hrsg: MINTON, N.P. & CLARKE, D.P., New York: Plenum

ANDREESEN, J.R. (1994): Glycine metabolism in anaerobes. *Ant. v. Leeuwenhoek* **66**, 223-237.

ARKOWITZ, R.A. & ABELES, R.H. (1989): Identification of acetyl phosphate as the product of clostridial glycine reductase: evidence for an acyl enzyme intermediate. *Biochemistry* **28**: 4639-4644.

ARKOWITZ, R.A. & ABELES, R.H. (1990): Isolation and characterization of a covalent selenocysteine intermediate in the glycine reductase system. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 870-872.

ARKOWITZ, R.A. & ABELES, R.H. (1991): Mechanism of action of clostridial glycine reductase: Isolation and characterization of a covalent acetyl enzyme intermediate. *Biochemistry* **30**: 4090-4097.

ARKOWITZ, R.A., DHE-PAGANON, S. & ABELES, R.H. (1994): The fate of the carboxyl oxygens during D-proline reduction by clostridial proline reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**: 457-459.

BAENA, S., FARDEAU, M.L., WOO, T.H., OLLIVIER, B., LABAT, M. & PATEL, B.K. (1999): Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, *Selenomonas acidaminophila* and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. Int J Syst Bacteriol **49**: 969-974.

BARKER, H.A., D'ARI, L. & KAHN, J. (1987): Enzymatic reactions in the degradation of 5-aminovalerate by *Clostridium aminovalericum*. J. Biol. Chem. **262**: 8994-9003.

BARNARD, G.F. & AKHTAR, M. (1979): Mechanistic and stereochemical studies on the glycine reductase of *Clostridium sticklandii*. Eur. J. Biochem. **99**: 593-603.

BAUMANN, J.G.J., WIEGANT, J. & van DUIJN, P. (1981): Cytochemical hybridization with fluorochrome labeled RNA. I. Development of a method using nucleic acids bound to agarose beads as a model. J. Histochem. Cytochem. **29**: 227-237.

BEDNARSKI, B. (1999): Molekulare Analyse der Pyruvyl-bindenden Proenzyme GrdE und PrdA der Glycin- und D-Prolin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle

BEDNARSKI, B., ANDREESEN, J.R. & PICH, A. (2001): *In vitro* processing of the proproteins GrdE of protein B of glycine reductase and PrdA of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii*. Formation of a pyruvoyl group from a cysteine residue. Eur. J. Biochem. **268**: 1-8.

BERGER, D.K., NARBERHAUS, F. & KUSTU, S. (1994): The isolated catalytic domain of NIFA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription *in vitro*: Activation is inhibited by NIFL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 103-107.

BERTRAM, J. & DÜRRE, P. (1989): Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. Arch. Microbiol. **152**, 551-557.

BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

BÖCK, A., FORCHHAMMER, K., HEIDER, J., LEINFELDER, W., SAWERS, G., VEPREK, B. & ZINONI, F. (1991): Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* **5**: 515-520.

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

BUCKEL, W., JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., EIKMANN, U., MESSNER, P., SLEYTR, U. & LIESACK, W. (1994): *Clostridium viride* sp. nov., a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum*. *Arch. Microbiol.* **162**: 387-394.

COLLINS, M.D., LAWSON, P.A., WILLEMS, A., CORDOBA, J.J., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J., GARCIA, P., CAI, P., HIPPE, H. & FARROW, J.A.E. (1994): The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. System. Bacteriol.* **44**: 812-826.

CSONKA, L.N. & HANSON, A.D. (1991): Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

CULHAM, D.E., LASBY, B., MARANGONI, A.G., MILNER, J.L., STEER, B.A., van NUES, R.W. & WOOD, J.M. (1993): Isolation and Sequencing of *Escherichia coli* Gene *proP* Reveals Unusual Structural Features of the Osmoregulatory Proline/Betaine Transporter, ProP. *J. Mol. Biol.* **229**: 268-276.

DIETRICH, D., MEYER, M., RIETH, M. & ANDREESEN, J.R. (1991): Interaction of selenoprotein P_A and the thioredoxin system, components of the NADPH-dependent reduction of glycine in *Eubacterium acidaminophilum*. J. Bacteriol. **173**: 5983-5991.

DIXON, H.B.F. & FIELDS, R. (1972): Specific modification of NH₂-terminal residues by transamination. Methods Enzymol. **25**: 409-419.

DUGAICZYK, A.; BOYER, H.W.; GOODMAN, H.H. (1975): Ligation of *EcoRI* endonuklease generated DNA fragments into linear structures. J. Mol. Biol. **162**: 775-793.

DUNLAP, V.J. & CSONKA, L.N. (1985): Osmotic Regulation of L-Proline Transport in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **163**: 296-304.

DYER, J.K. & COSTILOW, R.M. (1968): Fermentation of ornithine by *Clostridium sticklandii*. J. Bacteriol. **96**: 1617-1622.

EIKMANN, U. & BUCKEL, W. (1991): Crystalline green 5-hydroxyvaleryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminovalericum*. Eur. J. Biochem. **197**: 661-668.

EKSTROM, J.L., MATHEWS, I.I., ATANLEY, B.A., PEGG, A. & EALICK, S.E. (1999): The crystal structure of human S-adenosylmethionine decarboxylase at 2.25 Å resolution reveals a novel fold. Structure **7**: 583-595.

FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**: 6-13.

FENDRICH, C., HIPPE, H. & GOTTSCHALK, G. (1990): *Clostridium halophilum* sp. nov. and *Clostridium litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. Arch. Microbiol. **154**: 127-132.

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 selenocystein is encoded by UGA. J. Bacteriol. **173**: 2093-2098.

GARCIA, G.E. & STADTMAN, T.C., (1992): *Clostridium sticklandii* glycine reductase selenoprotein A gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**: 7080-7089.

GENTHNER, B.R.S., DAVIS, C.C. & BRYANT, M.P. (1981): Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. Appl. Environ. Microbiol. **42**: 12-19.

GOLDMANN, A., BOIVIN, C., FLEURY, V., MESSAGE, B., LECOEUR, L., MAILLE, M. & TEPFER, D. (1991): Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnithine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. Molecular Plant-Microbe Interactions **4**: 571-578.

GRAHAM, J.E. & WILKINSON, B.J. (1992): *Staphylococcus aureus* Osmoregulation: Roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. J. Bacteriol. **174**: 2711-2716.

GRÄNTZDÖRFFER, A. (2000): Formiatstoffwechsel in *Eubacterium acidaminophilum*: Molekulare und biochemische Charakterisierung der Wolfram-und Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen sowie einer Eisen-Hydrogenase. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

GRÄNTZDÖRFFER, A., PICH, A. & ANDREESEN, J.R. (2001): Molecular analysis of the *grd* operon coding for genes of the glycine reductase and of the thioredoxin system from *Clostridium sticklandii*. Arch. Microbiol. **175**: 8-18.

GURSINSKY, T., JÄGER, J., ANDREESEN, J.R. & SÖHLING, B. (2000): A selDABC cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. Arch. Microbiol. **174**: 200-212.

HACKERT, M.L. & PEGG, A.E. (1998) Pyruvoyl-dependent enzymes. In: Comprehensive Biological Catalysis: 201-216.

Hrsg: SINNOTT, M.J., Academic Press, New York

HANAHAHAN, D. (1983): Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**: 557-580.

HARDMAN, J.K. & STADTMAN, T.C. (1960): Metabolism of ω -amino acids. II: fermentation of δ -aminovaleric acid by *Clostridium aminovalericum* n. sp.. J. Bacteriol. **79**: 549-552.

HARMS, C., SCHLEICHER, A., COLLINS, M.D. & ANDREESEN, J.R. (1998a): *Tissierella creatinophila* sp. nov., a Gram-positive, anaerobic, non-spore-forming, creatinine-fermenting organism. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 983-993.

HARMS, C., LUDWIG, U. & ANDREESEN, J.R. (1998b): Sarcosine reductase of *Tissierella creatinophila*: purification and characterization of its components. Arch. Microbiol. **170**: 442-450.

HARRIS, E.L.V. & ANGEL, S. (Hrsg.) (1989): Protein purification methods - a practical approach. IRL Press, Oxford

HIPPE, H., ANDREESEN, J.R. & GOTTSCHALK, G. (1991): The genus clostridium-nonmedical. In: The procaryots. 1800-1866.

Hrsg.: BALOWS, A., TRÜPER, H.G., DWARKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K.H., Springer Verlag, New York

HODGINS, D. & ABELES, R.H. (1967): The presence of covalently bound pyruvate in D-proline reductase and its participation in the catalytic process. J. Biol. Chem. **242**: 5158-5159.

HODGINS, D. & ABELES, R.H. (1969): Studies of the mechanism of action of D-proline reductase: the presence on covalently bound pyruvate and its role in the catalytic process. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**: 274-285.

HOLMGREN, A. & BJÖRNSTEDT, M. (1995): Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* **252**: 199-208.

HORMANN, K. & ANDREESEN, J.R. (1989): Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Arch. Microbiol.* **153**: 50-59.

HOROWITZ, J.P., CHUA, J., CURBY, R.J., THOMSON, A.J., DA ROOGE, M.A., FISCHER, B.E., MAURICIO, L. & KLUNDT, I. (1964): Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**: 547-548.

HUNGATE, R.E. (1969): A role tube method for cultivation of strict anaerobier. *Methods in Microbiology* **36**: 117-132.

Hrsg.: MORRIS, J.R. & RIBBONS, P.W. Academic Press, New York, London.

HÜTTENHOFER, A., WESTHOF, E. & BÖCK, A. (1996): Solution structure of mRNA hairpins promoting selenocysteine incorporation in *Escherichia coli* and their base-specific interaction with special elongation factor SELB. *RNA* **2**: 354-366.

HÜTTENHOFER, A. & BÖCK, A. (1998a): Selenocysteine inserting RNA elements modulate GTP hydrolysis of elongation factor SelB. *Biochemistry* **37**: 885-890.

HÜTTENHOFER, A. & BÖCK, A. (1998b): RNA structures involved in selenoprotein synthesis. In: *RNA Structure and Function*: 603-639. Hrsg. SIMONS, R.W. & GRUNBERG-MANAGO, M., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

JOHNSON, J.L. & FRANCIS, B.S. (1975): Taxonomy of clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 229-244.

KEMPF, B. & BREMER, E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.

KENKLIES, J., ZIEHN, R., FRITSCHKE, K., PICH, A. & ANDREESEN, J.R. (1999): Proline biosynthesis from L-ornithine in *Clostridium sticklandii*: purification of Δ^1 -pyrroline-5-Carboxylate reductase and sequence and expression of the encoding gene, *proC*. *Microbiology* **145**: 819-826.

KREIMER, S. (1995): Molekularbiologische Analyse von Genen des Thioredoxin-Systems und der Glycin-Reduktase aus *Clostridium litorale*. Dissertation, Göttingen.

KREIMER, S. & ANDREESEN, J.R. (1995): Glycine reductase of *Clostridium litorale*-cloning, sequencing and molecular analysis of the *grdAB* operon that contains two in frame TGA codons for selenium incorporation. *Eur. J. Biochem.* **234**: 192-199.

KREIMER, S., SÖHLING, B. & ANDREESEN, J.R. (1997): Two closely linked genes encoding thioredoxin and thioredoxin reductase in *Clostridium litorale*. *Arch. Microbiol.* **168**: 328-337.

KOHLSTOCK, U.M. (2001): Protein C von *Eubacterium acidaminophilum*: Sequenzanalyse und Funktion der Thiole von GrdD für die Freisetzung von Acetylphosphat. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

KUMAGAI, H., FUJIWARA, T., MATSUBARA, H. & SAEKI, K. (1997): Membrane Localization, Topology, and Mutual Stabilization of the *mfABC* Gene Products in *Rhodobacter capsulatus* and Implications for a New Family of Energy-Coupling NADH Oxidoreductases. *Biochemistry* **36**: 5509-5521.

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LE RUDULIER, D., STROM, A.R., DANDEKAR, A.M., SMITH, L.T. & VALENTINE, R.C. (1984): Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.

LIEBMANN, B. (1999): Molekularbiologische Analyse von Genen der D-Prolinreduktase aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle

LOVITT, R.W., KELL, D.B. & MORRIS, J.G. (1986): Proline reduction by *Clostridium sporogenes* is coupled to vectorial proton ejection. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 269-273.

LOW, S.C. & BERRY, M.J. (1996): Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *TIBS* **21**: 203-208.

LÜBBERS, M. & ANDREESEN, J.R. (1993): Components of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Cloning, sequencing and identification of the genes for thioredoxin reductase, thioredoxin and selenoprotein P_A. *Eur. J. Biochem.* **217**: 791-798.

MC CLURE, W.R. (1985): Mechanism and control of transcriptional initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 171-204.

MEYER, M., GRANDERATH, K. & ANDREESEN, J.R. (1995): Purification and characterization of protein P_B of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* **234**: 184-191.

MORETT, E. & SEGOVIA, L. (1993): The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**: 6067-6074.

NORTH, A., KLOSE, K.E., STEDMAN, K.M. & KUSTU, S. (1993): Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein. *J. Bacteriol.* **175**: 4267-4273.

PERLER, F.B. (1998) Breaking up is easy with esters. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 249-252.

RAMJEE, M.K., GENSCHEL, U., ABELL, C. & SMITH, A.G. (1997): *E. coli* L-aspartate- α -decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry. *Biochem. J.* **323**: 661-669.

REIZER, J., SCHNEIDER, B., REIZER, A. & SAIER, M.H. (1999): A hybrid response regulator possessing a PEP-dependent phosphorylation domain. *Microbiology* **145**: 987-989.

RUDNICK, G. & ABELES, R.H. (1975): Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase. *Biochem.* **14**: 4515-4522.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

SANGER, F., NICKLER, S. & COULSEN, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

SCANDURRA, R., POLITI, L., SANTORO, L. & CONSALVI, V. (1987): Covalently bound pyruvate in phosphopantothencysteine decarboxylase from horse liver. *FEBS Lett.* **212**: 79-82.

SCANDURRA, R., CONSALVI, V., POLITI, L. & GALLINA, C. (1988): Functional residues at the active site of horse liver phosphopantothencysteine decarboxylase. *FEBS Lett.* **231**: 192-196.

SCHMEHL, M., JAHN, A., MEYER ZU VILSENDORF, A., HENNECKE, S., MASEPOHL, B., SCHUPPLER, M., MARXER, M., OELZE, J. & KLIPP, W. (1993): Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*; a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 602-615.

SCHRÄDER, T. & ANDREESEN, J.R. (1992): Purification and characterization of Protein P_C, a component of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* **238**: 341-345.

SCHWARTZ, A.C. & MÜLLER, W. (1979): NADH-dependent reduction of D-proline in *Clostridium sticklandii*. Reconstitution from three fractions containing NADH-dehydrogenase, D-proline reductase, and a third protein factor. *Arch. Microbiol.* **123**: 203-208.

SETO, B. & STADTMAN, T.C. (1976): Purification and properties of proline reductase from *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* **251**: 3435-2439.

SETO, B. (1978): A pyruvate-containing peptide of proline-reductase in *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* **253**: 4525-4529.

SETO, B. (1979): Proline reductase: A sensitive fluorometric assay with o-Phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* **95**: 44-47.

SETO, B. (1980 a): The stickland reaction. In: Diversity of bacterial respiratory systems Volume II: 49-64.

Hrsg.: KNOWLES, C.J., CRC Press, Boca Raton

SETO, B. (1980 b): Chemical Characterization of an alkali-labile bond in the polypeptide of proline reductase from *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* **255**: 5004-5006.

SHINE, J., DALGARNO, L. (1974): The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome-binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**: 1342-1346.

SONNTAG, D. (1998): Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Organisation und Transkription der Glycin-, Sarkosin-, und Betainspezifischen Gensätze. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle

SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.

STADTMAN, T.C. (1965): Electron transport proteins of *Clostridium sticklandii*. In: Non-heme-iron proteins: role in energy conversion: 439-445.

Hrsg.: San Pietro, A., Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, USA

STADTMAN, T.C. (1966): Glycine reduction to acetate and ammonia: identification of ferredoxin and other low molecular weight acidic proteins as components of the reductase system. Arch. Biochem. Biophys. **113**: 9-19.

STADTMAN, T.C. (1978): Selenium-dependent clostridial glycine reductase. Methods Enzymol. **53**: 373-382.

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. USA **86**: 7853-7856.

STADTMAN, T.C. & DAVIS, J.N. (1991): Glycine reductase protein C - properties and characterization of its role in the reductive cleavage of Se-carboxymethyl-selenoprotein A. J. Biol. Chem. **266**: 22147-22153.

STADTMAN, T.C. & ELLIOTT, P. (1956): A new ATP-forming reaction: the reductive deamination of glycine. J. Am. Chem. Soc. **78**: 2020-2021.

STADTMAN, T.C. & MC CLUNG, L.S. (1957): *Clostridium sticklandii* nov. spec. J. Bacteriol. **73**: 218-219.

STICKLAND, L.H. (1934): Studies on the metabolism of strict anaerobes (genus *Clostridium*) I. The chemical reactions by which *Clostridium sporogenes* obtains its energy. Biochem. J. **28**: 1746-1759.

STRAUSS, E., KINSLAND, C., GE, Y., MC LAFFERTY, F.W. & BEGLEY, T.P. (2001): Phosphopantothenoylcysteine-synthetase from *Escherichia coli*. Identification and characterization of the last unidentified coenzyme A biosynthetic enzyme in bacteria. J. Biol. Chem. **276**: 13513-13516.

TANAKA, H. & STADTMAN, T.C. (1979): Selenium-dependent clostridial glycine reductase. J. Biol. Chem. **254**: 447-452.

TAYLOR, B.L. & ZHULIN, I.B. (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiol. Molec. Rev. **63**: 479-506.

TURNER, D.C. & STADTMAN, T.C. (1973): Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. Arch. Biochem. Biophys. **154**: 366-381.

UHDE, A. (1990): Wachstumsphysiologische Untersuchungen zum Abbau von Aminosäuren und mögliche Funktion eines elektronentransferierenden Flavoproteins bei *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Universität Göttingen

VOELKER, D.R. (1997): Phosphatidylserine decarboxylase. Biochim. et Biophys. Acta **1348**: 236-244.

WAGNER, M. & ANDREESEN, J.R. (1995): Purification and characterization of threonine dehydrogenase from *Clostridium sticklandii*. Arch. Microbiol. **163**: 286-290.

WAGNER, M. (1997): Untersuchungen zu Proteinkomponenten der substratspezifischen Untereinheiten der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle

WAGNER, M., SONNTAG, D., GRIMM, R., PICH, A., ECKERSHORN, C., SÖHLING, B. & ANDREESSEN, J.R. (1999): Substrat-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Eur. J. Biochem. **260**: 38-49.

WEBER, K. & OSBORN, M. (1969): The reliability of the molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **244**: 4406-4412.

WESSEL, D. & FLÜGGE, V.J. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solutions in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. **138**: 141-143.

WIERENGA, R.K., TERPSTRA, P. & HOL, W.G.J. (1985): Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. J. Mol. Biol. **187**: 101-107.

WILTING, R., SCHORLING, S., PERSSON, B.C. & BÖCK, A. (1997): Selenoprotein synthesis in Archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. J. Mol. Biol. **266**: 637-641.

WOOD, W.J. (1976): Tables for the preparation of ammonium sulfate solutions. Anal. Biochem. **73**: 250-257.

XIONG, H., STANLEY, B.A., TEKWANI, B.L. & PEGG, A.E. (1997): Processing of Mammalian and Plant S-Adenosylmethionine Decarboxylase Proenzymes. J. Biol. Chem. **272**: 28342-28348.

YAGASAKI, M. & OZAKI, A. (1998): Industrial biotransformations for the production of D-amino acids. J. Mol. Catalys. B: Enzymatic **4**: 1-11.

YANG, H. & ABELES, R.H. (1987): Purification and properties of *Escherichia coli* 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylase: presence of covalently bound pyruvate. *Biochemistry* **26**: 4076-4081.

YOUNG, M., MINTON, N.P., STAUDENBAUER, W.L. (1989): Recent advances in the genetics of clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 301-326.

ZHULIN, I.B., TAYLOR, B.L. & DIXON, R. (1997): PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 331-333.

ZINDEL, U., FREUDENBERG, W., RIETH, M., ANDREESSEN, J.R., SCHNELL, J. & WIDDEL, F. (1988): *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. *Arch. Microbiol.* **150**: 254-266.

ZINONI, F., HEIDER, J. & BÖCK, A. (1990): Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4660-4664.

EcoRI prdC 60 120
5' **GAATTC**TAAAACAGCTTGCAGCTTGAGCCTGATATAGAAGTTAAGATTCTTCCAGATATGTATCCTGCTGGAGATGAAAGAGCAATAGTAAGAGATATCTTAGGAGTTCTTCTAGAGC
I L K T A C E L E P D I E V K I L P D M Y P A G D E R A I V R D I L G V L L E P

. 180 240
CAGGACAGTTACCAAAGGCTGCCAATGCTGTTATTCAAATGTAGAGACTTTAAAGCATATTGTAAATGCAATAGAACTTAGAAAAGCCATATATCACAAAAGATATAACTGTTGCTGGAA
G Q L P K A A N A V I Q N V E T L K H I V N A I E L R K P Y I T K D I T V A G R

. 300 360
GAGTAATGGATGCTACTGATGGAAAAGTATTTATGGATGTACCTGTAGGCGAGAGTGTAAAAAATATATTGATCTTTGTGGTGGATATATGAATCCTCACGGCGAAATTGTTATGGGAG
V M D A T D G K V F M D V P V G E S V K K Y I D L C G G Y M N P H G E I V M G G

. 420 480
GACCTTTTACTGGAAGACATGTAGAAGAAGATGCTCCGATAACAAAAACAACAGGTGGAATGTTAGTAGCTATGCCTTTTGTACATGACGAGAGAAAAGTTGGTCTACTGGCTTGCGAAT
P F T G R H V E E D A P I T K T T G G M L V A M P F V H D E R K V G L L A C E C

. 540 600
GCGGAGCCCAAGAAGACAGACTAAGAGAAATCGCTAAAGAAATGGGTGCAGAGTTGTAGCTGTAGAGAAATGTAAGAGAATGGTAGAGGTAGATGGAAGATACCGCTGCGATAACCCAG
G A Q E D R L R E I A K E M G A E V V A V E K C K R M V E V D G R Y R C D N P G

. 660 720
GAATATGCCCTGGTCAAGCTGAAAAAGTAATCAGCATGAAGAAAAAGGTATACAAAATCTTTTTGACAGGTACTTGCGGAGACTGAACGAATACCGTTATGGGAGTAGCTCCT**AGG**TTA
I C P G Q A E K V I S M K K K G I Q N L F D R Y L R R L N E Y R Y G S S S *

. 780 **SD** **prdA** 840
GGAGTTCCAACATATCACAGTACAGACCATGTACTTAGAGCAGCAGGACAAAGACTTGTTAGAAGAACTGATAAATAAAAAAATTATAATTTAGATAAGGAGGAGGCTT**GTG**TCATAAA
. V S I T

45 kDa-UE 900 960
CTTTAGAAAAGTGCGAAAGAGCATGCTAATGATTTAGCCGTTTTATGTTGTCGTCGAGAAGAGGGTACAGTAATTGGACCTAGTAATTTAGAAGATCCAGCTATATTTGGTGACTTGGAGG
L E S A K E H A N D L A V L C C R A E E G T V I G P S N L E D P A I F G D L E D

. 1020 1080
ATTCAAGTTTATTAACTATTCCTGCTAACTGCCTTAAATAGGAGAGGTTTTAGGAGCGAAATTAGTTAAAAACAGCTGATTCACTTACTCCACTTACTCCAGAATTACTTGAGGGAGTAA
S G L L T I P A N C L K I G E V L G A K L V K T A D S L T P L T P E L L E G V N

. 1140 1200
ATTCTATAAGCGAAGAAGCACCTAAGCAAGAAGCTTCAGCACCAGTAGAAGCTCCTGTACAGAGGTAGCACCAGCTGCTATGCCAGTAGCAAATGTGACTGGTTCAATGCTTAAGATTC
S I S E E A P K Q E A S A P V E A P V A E V A P A A M P V A N V T G S M L K I H

. 1260 1320
ATATTGGAGAAGGAAAAGATATCAATCTTGAATCCCTTTAACAATTGCAGGACAAATGGGAGTAGTTGCTCCAACAGCTGCAGCACCAGCAGGAGTAGCTATGCCAGTAGCATCAGCTA
I G E G K D I N L E I P L T I A G Q M G V V A P T A A A P A G V A M P V A S A T

```

                1380                                1440
CAGAGCAAGTAGTAGCACCAGCAGGAGAGCCAAAGCTTGTAAAGAACTTCAAAGAAGCATTTCAAAATTTGAGGAAGGTAGAATTTGGACCTGAGACAAAAATTGAAAATAACACTA
E Q V V A P A G E P K L V R T L Q K K H F Q N L R K V E F G P E T K I E N N T I

                1500                                1560
TTTACATTAGAGAAAATATCTGCGAAGATGCTGTAAAAGTAAGCAACCTAGTTACAGATATCAAAGTAGAAATCATTACTCCAGCTGATTACGGCAAGTACAGCGAACTATTATGGACG
Y I R E N I C E D A V K V S N L V T D I K V E I I T P A D Y G K Y S E T I M D V

                1620                                1680
TTCAGCCTATAGCTACTAAAGAAGGCGACGGAAAAATAGGACAAGGTGTTACTCGTGTATCGATGGAGCTATAAATTATGGTTACAGGGACTGACGAAGATGGAGTTCAAATCGGTGAGT
Q P I A T K E G D G K I G Q G V T R V I D G A I I M V T G T D E D G V Q I G E F

                1740                                1800
TTGGTTCATCTGAAGGTGAACTTGATGCAAACATCATGTGGGGAAGACCTGGAGCTCCTGATAAAGGAGAAATCCTTATCAAGACTCAAGTTACTATAAAAGCTGGTACTAACATGGAAA
G S S E G E L D A N I M W G R P G A P D K G E I L I K T Q V T I K A G T N M E R

                1860                                1920
GACCAGGACCACTTGCTGCTCATAAAGCAACTGATTTTCATCACTCAAGAAATCAGAGAAGCTCTTAAGAAGCTTGATGATCTGAAGTAGTTGAAACTGAAGAGTTAGCTCAGTACAGAA
P G P L A A H K A T D F I T Q E I R E A L K K L D D S E V V E T E E L A Q Y R R

                1980                                2040
GACCTGGCAAGAAGAAAGTTGTAATCATCAAAGAAATCATGGGACAAGGCGCAATGCATGATAACCTAATCCTTCCTGTAGAGCCAGTAGGAGTAATAGGTGCAAAGCCAAACGTTGACC
P G K K K V V I I K E I M G Q G A M H D N L I L P V E P V G V I G A K P N V D L

                2100                                2160
TTGGAACGTTCCAGTTGTTCTTTACCTCTTGAGGTACTTGATGGAGGAATCCATGCACCTACTCys426 23 kDa-UE TGTATAGGACCTGCATCAAAGAGAACTCTAGACATTACTGGAGAGAGCCTCTAG
G N V P V V L S P L E V L D G G I H A L T C I G P A S K E N S R H Y W R E P L V

                2220                                2280
TAATTGAAGTTATGAATGACGAAGAATTTGACTTAGCAGGTGTTGTATTTGTTGGTTCTCCTCAGGTTAACGCTGAGAAGTTCTACGTATCAGAAAGACTAGGTATGTTAGTTGAAACTA
I E V M N D E E F D L A G V V F V G S P Q V N A E K F Y V S E R L G M L V E T M

                2340                                2400
TGATGTAGAGGGAGCTTTCATCACAACCTGAAGGTTTCGGAAACAACCATATAGACTTTGCTAGCCACCATGAGCAAGTTGGTATGAGAGEcoRI GAATTCAGTTGTTGGAATGTCATTCTGTG
D V E G A F I T T E G F G N N H I D F A S H H E Q V G M R G I P V V G M S F C A

                2460                                2520
CTGTTACAGGAGCTCTAGTTGTTGGAACAAATACATGAAATACATGGTAGATAACAATAAATCTGAGCAAGGTATAGAAAATGAAATTCTTTCTAACAACACTCTTTGCCAGAAAGATG
V Q G A L V V G N K Y M K Y M V D N N K S E Q G I E N E I L S N N T L C P E D A

                2580                                2640
CTATAAGAGCAGTTGCTATGCTTAAAGCAGCAATAGCTGAAGAAGAAGTAAAAGTTGCTGAGAGAAAATTCAGCAAAAACGTTAAAGAAAACAACGTGGATTTAATCGAAGAGCAAGCAG
I R A V A M L K A A I A E E E V K V A E R K F S K N V K E N N V D L I E E Q A G

```

2700
 GAAAAGAAATTACTCTACTTCCAATGAGCAAGTTCTACCAATGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAATCTATGAGGCAGATAAA**TAA**ACCGTTCCTTTAAAATGAAAAGGTGATTATATGAAAT
K E I T L L P N E Q V L P M S K R E K E I Y E A D K *

2820
 ATGGAGACAAAATCATATATATGGAAGGAATCATTGTAGATTTTGATGATTGTTCTGTATCGGTAGATTTTAAAGGAAGGTTAGGCTTTCTGAAAAGTCCCTAAAAGAATGCTCATTACTG

2940
 ACTATCCTCTTGAAATTGGTCTAGAGGTTGCTATGAACATGAGTTTTATAGAAGTATTAAGTGATGAAGTTAATGAAAAATATTTGAGTAATATCCAAAAGAATAAAGATAAAAGGAGGA
 -24 -12 -35 -10 SD3000

3060
 AGATGA**ATG**TCTGATTTGACTGTAGTAAAAGGATTACAATCTGAAATTTATGTACCTATTACACCACCACCAGTGTGGACACCAGTAACAAAAGAATTAAGACATGACTGTTGCGCTT
M S D L T V V K G L Q S E I Y V P I T P P P V W T P V T K E L K D M T V A L

3180
 GTTACAGCAGCAGGAGTTCATATGAAAGCTGACAAGAGATTTAACCTAGCAGGAGACTTTTCTTTCCAGAGTTATTCCAGGAGATGCATCTGTAAATGATATGATGGTATCTCACGGAGGT
V T A A G V H M K A D K R F N L A G D F S F R V I P G D A S V N D M M V S H G G

3300
 TATGATAATGGAGATGTAACAAAGACATCAACTGTATGTTCCAATAGATCCAATGAGAACATTAGCTAAAGAAGGATTCATTAAAGCTCTAGCTCCTATAAACATAGGATTCATGGGT
Y D N G D V N K D I N C M F P I D P M R T L A K E G F I K A L A P I N I G F M G

3420
 GGTGGTGGAGACAAAAGAAATTTCTCAGAAGAACTGGTCTGAGATAGCTAGACAACCTAAAGAAGAAGGCGTAGATGCAGTTCTTCTAACAGCTGGCT**AG**GGTACCTGCCATCGTTCT
 G G G D Q K K F S E E T G P E I A R Q L K E E G V D A V L L T A G U G T C H R S Sec¹⁵²

3540
 GCAGTTATAGTGCAGAGAGCGATTGAGGAATCGGGTATTCCTACAATAATTATAGCAGCATTACCACCAGTTGTAAGACAAAATGGAACCTCAAAGACTGTTGCTCCACTAGTACCTATG
A V I V Q R A I E E S G I P T I I I A A L P P V V R Q N G T P R A V A P L V P M

3660
 GGTGCTAATGCTGGAGAGCCTAATAATCCAGAAATGCAAAAAGCTATTTGTACAGATTCTCTAAAGCAATTAGTTGAGATTCTTAGTGCAGGAAAAATAGTACCACTACCTTACGAGTAC
G A N A G E P N N P E M Q K A I C T D S L K Q L V E I P S A G K I V P L P Y E Y

3780 Terminator SD prdD 3840
 GTAGCAAAGGTT**TAA**TGGATTATATTTCTAAACAAAGGGCATATGCCCTTTGTTTGAATAAAAATGAAGGTGAATAAT**ATG**CTGACAAACGAAATTGATTTTAGAAAACCTTGTCATTAG
V A K V * M L T N E I D L R K L V I R

3900
 ATCTTATCATGTAGATAAAGTAGAATTTGCAGAAAAAGCAAAAATTAATGACAGTTGCTTAAAGTTTTCTTTATCCAAGATTGACAATATTATAACTAAATATCCATCGATAAAAGAAAT
S Y H V D K V E F A E K A K I N D S C L S F S L S K I D N I I T K Y P S I K E I

4020
 TTCAGTAAAAATAATTAAGCCTAGGGAACATAATATTTGGACTAACAGTATTATGGATATTCTACCTATATCTGTAAAGGTAAGTTGAAATTTAGGAGAAGGTATCACCCACACTATTAC
S V K I I K P R E H N I W T N S I M D I L P I S V K V L G N L G E G I T H T I T

```

                                4140                                4200
TGGGGCTTATGTTATGATAACTGGAGCAGATGAGGAAGGTACTCAAGTTGCTGAGTTTGGTTTCGTCTGAAGGAATTTTAGCTGAAAGGCTAAAAGTACTAGGTAGACCAGGTACTCCTTCTGA
G A Y V M I T G A D E E G T Q V A E F G S S E G I L A E R L K L G R P G T P S E

                                4260                                4320
AAACGATTACATTATTTCTTTTCGATTTAGTTTTATATAAGGGAAAAGGCGTAGTTAGAGAAGCAATTATAGAGTGTCTATAAAGCTTGTGATGATTTTTTTAGAGGATGTAAGACTGTACCT
N D Y I I S F D L V L Y K G K G V V R E A I I E C H K A C D D F L E D V R L Y L

                                4380                                4440
AAAGGCTATGGACTCCAAATATGTACAGAAAAGTACAAATTTTACGACAAAATAAGAAAAATGGCTATAAGGTGGCAATAGTTAAGCAAGTTGCAGGCCAAGGAGCTATGTATGACAA
K A M D S K L C T E K Y K F Y D K I R K N G Y K V A I V K Q V A G Q G A M Y D N

                                4500                                4560
TTTTATTTTGCCAAATAGTTCAAGCTCTGTAGCCGGAGGTAGAAGTATTATAGATATGGGCAATATGCCAATCATTTTAAGTCCTAATGAATACAGAGATGGTGCTATTAGGGCTATGAC
F I L P N S S S S V A G G R S I I D M G N M P I I L S P N E Y R D G A I R A M T

SD      prdE                                4620                                4680
TTAAAGAGGTGAATGATAATGGGGTGTAGGACCATCTACAAAAGAGACTACTTTGCACCATTTTAGAGATCCGCTTTTAGATGTAGTATCGAATGATCAAGATATTGATTTAATGGGAAT
*      M G V G P S T K E T T L H H F R D P L L D V V S N D Q D I D L M G I

                                4740                                4800
CATAGTCGTTGGAACCTCCTCAAAGCAACGAAGAAAAAGAATACGTCGGCAAGAGAGTAGCTGTATGGCTAGAATCTATGCGAGCAGATGGAACCTATTATTTTCAGTTGACGGATGGGGAAA
I V V G T P Q S N E E K E Y V G K R V A V W L E S M R A D G T I I S V D G W G N

                                EcoRI
CAGCCATGTTGATTATGCAAACACTATTGAAGAAATTGGTATCAGAGGAATTC 3'
S H V D Y A N T I E E I G I R G I

```

Abb. A.I: Darstellung der DNA-Sequenz und der abgeleiteten Proteinsequenz des Inserts des Klons pUK1. Im Edman-Abbau sequenzierte Proteinsequenzen sind unterstrichen. Promotorsequenzen sind doppelt, Shine-Dalgarno-Sequenzen einfach und Terminatorstrukturen gestrichelt unterstrichen. Start- und Stoppcodons, *Eco* RI-Schnittstellen sowie die Bezeichnungen der offenen Leserahmen sind hervorgehoben. SD: Shine-Dalgarno-Sequenz; Cys⁴²⁶: Vorläufer der aminoterminalen Carbonylgruppe der 23 kDa-Untereinheit; Sec¹⁵²: Selenocystein.

1) Substratbindendes Proprotein PrdA

<i>C. s.</i>	PrdA	MSITLESAAKEHANDLAVLCCRAEEGTVIGPSNLEDPAlFGDLEDSGLLTIPANCLKIGE	60
		MSITLE+A+ HAND AV CCR E GT+I P NLEDPAIF DLEDSGLLTIP N L IG+V	
<i>C. d.</i>	PrdA	MSITLETAQAHANDPAVCCCRFEAGTIIAPENLEDPAlFADLEDSGLLTIPENGLTIGQV	60
<i>C. s.</i>	PrdA	LGAKLVKTADSLTPLTPELLEGVNSISEEAPKQEASAPVEAPVAEVAPAAMPVANVTGSM	120
		LGAKL +T D+L+P+T + +EG + E + EA A V G	
<i>C. d.</i>	PrdA	LGAKLKETLDALSPMTTDNVEGYKA-GEAKEEVVEETVVEEAAPVSEAAVVPVSTGVAGET	119
<i>C. s.</i>	PrdA	LKIHIGEGKDINLEIPLTIAGQMGGVAPTAAAPAGVAMPVASATEQVVAPAGEPKLVRTL	180
		+KIHIGEGK+I+LEIPL++AGQ GV AP A A VA A +V E KL+R+L	
<i>C. d.</i>	PrdA	VKIHIGEGKNISLEIPLSVAGQAGVAAPVANVAAPVASAAA----EVAPKVEEKLLRSL	175
<i>C. s.</i>	PrdA	QKKHFQNLRKVEFGPETKIENNTIYIR--ENICEDAVKVSNLVTDIKVEIITPADYGYKYS	238
		KKHF+ + KVEF ETKIE T+YIR E IC++A + LV D+K+EIITP Y YS	
<i>C. d.</i>	PrdA	TKKHFQ-IDKVEFADETKIEGTTLYIRNAEEICKEANETQELVVDMLKLEIITPDKYETYS	234
<i>C. s.</i>	PrdA	ETIMDVQPIATKEGDGKIGQGVTRVIDGAIIMVTGTDEDGVQIGEFGSSEGELDANIMWG	298
		E ++D+QPIATKE +G++G G+TRVIDG++++TGTDEDGVQIGEFGSSEGEL+ IMWG	
<i>C. d.</i>	PrdA	EAVLDIQPIATKE-EGELGSGITRVIDGAVMVLGTDEDGVQIGEFGSSEGELNTTIMWG	294
<i>C. s.</i>	PrdA	RPGAPDKGEILIKTQVTIKAGTNMERPGPLAAHKATDFITQEIREALKKLDSEVVETEE	358
		RPGA DKGEI IK QVTIKAGTNMERPGPLAAH+A D++TQEIREALKK+D+S VV+ E	
<i>C. d.</i>	PrdA	RPGAADKGEIFIKQVTIKAGTNMERPGPLAAHRAFVVTQEIREALKKVDNSLVVDEEV	354
<i>C. s.</i>	PrdA	LAQYRRPGKKKVVIIKEIMGQAMHDNLILPVEPVGVIGAKPNVDLGNPVLVSPLEVLD	418
		+ QYRR GKKKVV+IKEIMGQAMHDNLILPVEPVG +GA+PNVDLGN+PVLVSPLEVLD	
<i>C. d.</i>	PrdA	IEQYRREGKKKVVVIKEIMGQAMHDNLILPVEPVGTLGAQPNVDLGNPVLVSPLEVLD	414
Spaltstelle			
↓			
<i>C. s.</i>	PrdA	GGIHALTCIGPASKENSRYHWREPLVIEVMNDEEFDLAGVVFVVGSPQVNAEKFYVSRERG	478
		GGIHALTCIGPASKE SRHWREPLVI M DEE DL GVVVFVVGSPQVNAEKFYVS+RLG	
<i>C. d.</i>	PrdA	GGIHALTCIGPASKEMSRHWREPLVIRAMEDEEIDLGVVFVVGSPQVNAEKFYVSKRLG	474
<i>C. s.</i>	PrdA	MLVETMDVEGAFITTEGFGNNHIDFASHHEQVGMRGIPVVGMSFCAVQGalVVGnkYmKY	538
		MLVE M+V+GA +TTEGFGNNHIDFASH EQ+GMRGIPVVG+SF AVQGalVVGnkYM +	
<i>C. d.</i>	PrdA	MLVEAMEVDGAVVTTEGFGNNHIDFASHIEQIGMRGIPVVGVSFSAVQGalVVGnkYmTH	534
<i>C. s.</i>	PrdA	MVDNNKSEQGIENEILSNNTLCPEDAIRAVAMLKAAIAEEEVKVAERKFSKNVKENNVDL	598
		MVDNNKS+QGIENEILSNNTL PEDA+R +AMLK AI EVK ERK++ NVK NN++	
<i>C. d.</i>	PrdA	MVDNNKSKQGIENEILSNNTLAPEDAVRIMAMLKNAIEGVEVKAPERKWNPNVKLNNIEA	594
<i>C. s.</i>	PrdA	IEEQAGKEITLLPNEQVLPMSKREKEIYEADK	630
		IE+ G++I L NEQ LPMSK+ +EIYE D+	
<i>C. d.</i>	PrdA	IEKVTGEKIVLEENEQSLPMSKRRREIYEKDE	626

2) Selenoprotein PrdB

<i>C. s.</i>	PrdB	LTVVKGLQSEIYVPITPPPVWTPVTKEKDMTVALVTAAGVHMKADKRFNLAGDFSFRVI	63
		LT V+GLQSEI+VPITPPPVWTPVTKEKDMT+AL TAAGVH+K+DKRFNLAGD +FR I	
<i>C. d.</i>	PrdB	LTTVQGLQSEIFVPITPPPVWTPVTKEKDMTIALATAAGVHLKSDKRFNLAGDTTFRAI	63
<i>C. s.</i>	PrdB	PGDASVNDMMVSHGGYDNGDVNKDINCMFPIDPMRTLAKKEGFIKALAPINIGFMGGGGDQ	123
		P A+V++MMVSHGGYDNGDVNKDINCMFPID + LA EGFIK +AP++ FMGGGG+Q	
<i>C. d.</i>	PrdB	PNTATVDEMMVSHGGYDNGDVNKDINCMFPIDRLHELAAEGFIKGVAPMHYAFMGGGGNQ	123
Selenocystein			
↓			
<i>C. s.</i>	PrdB	KKFSEETGPEIARQLKEEGVDAVLLTAGUGTCHRSVAVIVQRAIEESGIPTIIIAALPPV	182
		F+EETGP IA +LKEEGVD V++TAG GTCHR+AVIVQRAIEE+GIPTIIIAALPPV	
<i>C. d.</i>	PrdB	HVFTEETGPAIAAKLKEEGVDGVVMTAG*GTCHRTAVIVQRAIEEAGIPTIIIAALPPV	182
<i>C. s.</i>	PrdB	VRQNGTPRAVAPLVPMGANAGEPNNPEMQKAICTDSLKQLVEIPSAGKIVPLPYEYVAKV	242
		VRQNGTPRAVAPLVPMGANAGEP+N EMQ I D+L+QLV IPSAGKIVPLPYEY A V	
<i>C. d.</i>	PrdB	VRQNGTPRAVAPLVPMGANAGEPHNIEMQTHILRDTLEQLVAIPSAKIVPLPYEYKAHV	242

DNA-Sequenz des PrdB enthaltenden DNA-Bereiches in *C. difficile*

(gnl|Sanger_1496|cdifficile_Contig976)

	ATGAGCCTTACAACAGTACAAGGACT
	M S L T T V Q G L
1021	- TCAATCTGAAATATTCGTTCCAATAACACCTCCTCCAGTTTGGACTCCTGTAACATAAAGA
	- Q S E I F V P I T P P P V W T P V T K E
1081	- ATTAAAAGATATGACTATAGCTTTAGCTACAGCAGCTGGTGTTCATTTAAAATCTGACAA
	- L K D M T I A L A T A A G V H L K S D K
1141	- GAGATTTAATCTAGCAGGAGATACTACATTTAGAGCTATACCTAATACAGCTACAGTTGA
	- R F N L A G D T T F R A I P N T A T V D
1201	- TGAAATGATGGTATCACATGGTGGATATGACAATGGAGATGTAAACAAAGATATAAACTG
	- E M M V S H G G Y D N G D V N K D I N C
1261	- TATGTTCCCTATAGATAGATTACATGAATTAGCTGCAGAAGGATTTATCAAAGGAGTAGC
	- M F P I D R L H E L A A E G F I K G V A
1321	- TCCTATGCACTATGCATTCATGGTGGTGGAGGAAACCAACATGTCTTCACTGAAGAAAC
	- P M H Y A F M G G G G N Q H V F T E E T
1381	- TGGTCCTGCTATCGCTGCTAAACTTAAGGAAGAGGGAGTAGACGGTGTAGTTATGACAGC
	- G P A I A A K L K E E G V D G V V M T A
1441	- TGGCTGAGGTTACTTGCATAGAAGTGCCTGATCGTGCAGAGAGCAATAGAGGAAGCTGG
	- G U G T C H R T A V I V Q R A I E E A G
1501	- AATACCTACAATAATAATAGCAGCTCTTCCCTCCAGTAGTTAGACAAAACGGAAGCTCCTAG
	- I P T I I I A A L P P V V R Q N G T P R
1561	- AGCAGTTGCTCCATTAGTTCCAATGGGTGCTAATGCTGGTGAACCACATAATATAGAAAT
	- A V A P L V P M G A N A G E P H N I E M
1621	- GCAAACACATATATTAAGAGATACATTAGAGCAATTAGTTGCAATACCATCTGCTGGTAA
	- Q T H I L R D T L E Q L V A I P S A G K
1681	- GATAGTTCCATTACCATACGAATATAAAGCTCACGTTTAAATGTAATTTATATTTGAAA
	I V P L P Y E Y K A H V *

3. potenciales Elektronentransportprotein PrdC

<i>C. s.</i>	PrdC	LLLKQHVAGPCQSIVEAGQKVQKGEIAPNGLGANLHSSVYGVVKAUNETAIIEADEN	65
		+LLKQHV G P + +V G V+KG LIA+P GLGAN+++SV G + +N+ AI+IEADE	
<i>C. d.</i>	PrdC	ILLKQHVGGPDKPVVSVGDVVKKGLTIAEPTGLGANIYASVSGKISEINDQAIIVIEADEV	65
<i>C. s.</i>	PrdC	QPDEFVKIKDTNTHIEAIQEAGIVGSGGAGFPPTHVKLVNLEGGYVIANGAECEPVLGHN	125
		Q D F +K ++ I+EAG+VG GGAGFPPTHVKLN++L GG ++AN AECEP+L HN	
<i>C. d.</i>	PrdC	QEDTFEPLKGEGL-LDLIKEAGVVMGGAGFPPTHVKLVNIDLNNGGTILANAAECEPELLAHN	124
<i>C. s.</i>	PrdC	IKLMEEDPQLIIRGLKYVKEITNASKAYIAMKAKHRKALRILKTACELEPDIEVKILPDM	185
		IK +EE P+++ +G+KY E+TNA K +A+K+KH KA+ K + +IEV L DM	
<i>C. d.</i>	PrdC	IKEIEERPEIVYQGIKYAMEVTNAGKGLAIKSKHPKAIEAFKKVIKPGDNIEVAELVDM	184
<i>C. s.</i>	PrdC	YPAGDERAIVRDILGVLLPEPQLPKAANAVIQNVETLKHIVNAIELRKPYPITKIDITVAGR	245
		YP G+ERAIVRD+LG LLEP QLP ANAV+ NVETL IV A+E ++P I+K+ITV G+	
<i>C. d.</i>	PrdC	YPMGEERAIVRDVGLKLEPTQLPSEANAVVINVETLTRIVEAVEQKRPVISKNITVVQG	244
<i>C. s.</i>	PrdC	VMDATDGKVFMDVPVGESVKYIDLCGGYMNPHGEIVMGGPFTGRHVEEDAPITKTTGGM	305
		+ + VF DVP+G +V + I+ GG +GEI++GGPFTG+ DAPITKT+GG+	
<i>C. d.</i>	PrdC	LNSGKESIVFEDVPIGTTVGEIIRAGGIKGEYGEIILGGPFTGKATTLDAPITKTSGGI	304
<i>C. s.</i>	PrdC	LVAMPFVHDERKVGLLACECGAQEDRLREIAKEMG-AEVVAVEKCKRMVEVDGRYRCNDP	364
		+V MPFV+++RK+GLL C CG E+R+R+IA +MG ++V+V+KCK+ E+ G +C+NP	
<i>C. d.</i>	PrdC	IVTMPFVNEKRKMGLLVCACGPNEERMRIATKMGVTDIVSVQKCKQAQEIKGALKCENP	364
<i>C. s.</i>	PrdC	GICPGQAEKVISMKKKGIQ 383	
		G CPGA+K I KK G +	
<i>C. d.</i>	PrdC	GHCPGQAQKCIIEFKKAGAE 383	

4.) Protein PrdD homolog zur mittleren Teilsequenz von PrdA

<i>C. s.</i>	PrdD	LRKLVIRSYHVDKVEFAEKAKINDSCLSFSLSKIDNIITKYPSEIKESVVKIIPREHNIW	67
		+R+LVI+ +H+++V F K I L+ LS ID I + I +I V IIKP +++	
<i>C. d.</i>	PrdD	MRRLVIKPFHMNEVNFSGSKTSIKKDVLTIDLSSIDEIKEREELITDIKVDIIPGDDYDRE	60
<i>C. s.</i>	PrdD	TNSIMDILPISVKVLGNLGEIHTITGAYVMITGADEEGTQVAEFGSSEGILAEERLKL	127
		N+IMDI+PIS KVLG LGEIHTIT+TG YVM+TGADE+G Q+ EFGSSEGIL +++ G	
<i>C. d.</i>	PrdD	INTIMDIPISTKVLGRLGEGITHTLTGYYVMLTGADEDGNMHEFGSSEGILKQDMVFG	120
<i>C. s.</i>	PrdD	RPGTPSENDYIISFDLVLYKKGVVREAIIECHKACDDFLEDVRLYLKAMDSKLCTEKYK	187
		R GTPS DYII D+ L G R + +ACDDF++++R LK D + T+ +	
<i>C. d.</i>	PrdD	RYGTPSVEDYIIHVDVTLKGLPFERTLPLAAFRACDDFIQEIRASLKMEDGRNATQVRE	180
<i>C. s.</i>	PrdD	FYDKIRKNGYKVAIVKQVAGQGAMYDNFILPNSSSSVAGGRSIIIDMGNPPIILSPNEYRD	247
		++DKIR N KV IVKQ+AGQGAMYDN + S GG SIIDMGN+P+I+SPNEYRD	
<i>C. d.</i>	PrdD	YFDKIRPNAKKVVIVKQIAGQGAMYDNQLFSKEPSGFEFGGTSIIDMGNVPMIISPNEYRD	240
<i>C. s.</i>	PrdD	GAIRAMT 254	
		GA+RAMT	
<i>C. d.</i>	PrdD	GALRAMT 247	

5) Protein PrdE homolog zum C-Terminus von PrdA

<i>C. s.</i>	PrdE	MGVGPSTKETTLHHFRDPLLDVVSNDQDIDLMGIIVVGTPQSNEEKEYVGKRVAVWLESM	60
		MG+GPSTKET+LHHFRDPLLD+V +D+D+DL+G+IVVGTP NE K +VG+R A WLE+M	
<i>C. d.</i>	PrdE	MGIGPSTKETSLLHHFRDPLLDIVESDKDVLGVIIVVGTPDGNENKTFVQRTAAWLEAM	60
<i>C. s.</i>	PrdE	RADGTIISVDGWGNSHVDYANTIEEIGIRGIPVVGLSFIGTQAKFVVENQYMDTIVDFNK	120
		R DG I+S DGWGNSHVDYANT EEIG R IPVVG++F GTQAKFVV NQYMDTIVD NK	
<i>C. d.</i>	PrdE	RVDGAIVSSDGWGNSHVDYANTFEEIGKRDIIPVVGVTFNGTQAKFVVSQYMDTIVDMNK	120
<i>C. s.</i>	PrdE	SKAGIETQTVGEN 133	
		SK GIET+ VGEN	
<i>C. d.</i>	PrdE	SKEGIETEVEVGEN 133	

6) Prolin-Racemase PrdF

<i>C. s.</i>	PrdF	MADKKKYLEDNLDYVRTALMHEPRGHNDMFGSIIITSSNNKEADFGIIFMDGGGYLNMCGH	60
		M +KK+YLE+NLDY+RTA+M EPRGHNDMFGS++T +ADFGIIFMDGGGYLNMCGH	
<i>C. d.</i>	PrdF	MPEKKEYLEENLDYLRTAIMLEPRGHNDMFGSVMTQPCCPDADFGIIFMDGGGYLNMCGH	60
<i>C. s.</i>	PrdF	GSIGAATVAVETGMVEMVEPVTNINMEAPAGLXXXXXXXXXXXXXXXXXSIITNVPFLYMED	120
		G+IGA T A+ETG+V VEPVT++ MEAPAG+I S NVP+FLY E	
<i>C. d.</i>	PrdF	GTIGAMTAAIETGVVPAVEPVTHVMEAPAGIIRGDVTVVDGKAKEVSFLNVPFLYKEG	120
<i>C. s.</i>	PrdF	AKLEVPSLNKTITFDISFGGSFFAIHAKELGVKVETSQVDVLKKGIEIRDLINIKIKV	180
		++++P + T+ FDISFGGSFFAIHA +LG+K+E L +L +++RD+INEKI++	
<i>C. d.</i>	PrdF	VEVDLPGVG-TVKFDISFGGSFFAIHASQLGLKIEPQNAGKLTTELAMKLRDIINEKIEI	180
<i>C. s.</i>	PrdF	QHPELEHIKTVDLVEIYDEPSNPEATYKNVVIFGQGQVDRSPCGTGTSAKLATLYKKGHL	240
		QHP L HIKTVDLVEIYDEP++PEATYKNVVIFGQGQVDRSPCGTGTSAKLATL+ KG L	
<i>C. d.</i>	PrdF	QHPTLAHIKTVDLVEIYDEPHTPEATYKNVVIFGQGQVDRSPCGTGTSAKLATLHAKGEL	240
<i>C. s.</i>	PrdF	KIDEKFVYESITGTMFKGRVLEETKVGEFDAIPEITGGAYITGFNFHVI---DPLKYGF	297
		K+ EKVFVYESI GT+FKG ++EETKV +F+A++P+ITG AYITGFNFHVI DPLK+GF	
<i>C. d.</i>	PrdF	KVGEKFVYESILGTLFKGEIVEETKVADFNNAVVPKITGSAYITGFNFHVIDEEDPLKHGF	300

7) potentielles Regulatorprotein PrdR

<i>C. s.</i>	PrdR	KVKEIMSKDFIVFSDISLRRCVEHIALNNLKEV-IVRHHEKLTGYIKFDDIIKI-SLSQ	68
		KV+E+M F D D + ++ + +N K + ++ ++L G I DI + + +	
<i>C. d.</i>	PrdR	KVEEVMDTKFTTIDEDTRIEDAIKEMIKSNTKTLMVIDSSDQLKGIISMTDIHNLYEMHK	
<i>C. s.</i>	PrdR	SFSEKKLFDIRANKPFYLNVEDTVLMAKDIMRENQVDRVFLDDEKLVGVLRTQDIVYKL	128
		+ + + I Y+N T+ +DIM + + VL D K++GVL+ + I L	
<i>C. d.</i>	PrdR	KYEGQPVKLIMKKDVIYVNEGLTLDECRDIMILKNIGILPVLDRDKIIGVLKQEHIRDYL	94936
<i>C. s.</i>	PrdR	YPKIQANEDLYELLWDNVHEGICIIDNKGMCVIWGRGSEKLYGIKKSEIIGKKLEEFFPT	188
		Y ++ + + + EGIC I+N+G+V +W + E+ Y IK +I+G+ + EF	
<i>C. d.</i>	PrdR	YMHLEDYGLTLKYIIGQIKEGICAINNEGVVILWNKFMEERYDIKSEDIVGRPMNEFLEN	94756
<i>C. s.</i>	PrdR	ALLLDVLKSKEPVENIIHSPRK-NTYVNISALPLIKNGKLIGVVSTERDVSEITNLSREL	247
		+ VL SK + ++ + +K N Y + A P+ + IGVV TE DV+E L+ EL	
<i>C. d.</i>	PrdR	TISEKVLNSKVGMSDLYFTDKKENMYALVHANPIFYKEEFIGVVCTEVDVTEAKILALEL	94576
<i>C. s.</i>	PrdR	EFTKEKLDYLQVEVRKMNEKDFSGNIVGKSKIMTHTIDRAYQVASTTSSVLISGESGTG	307
		E + L YL+ EV+ ++ K SF I+GKS + + A QVA T SS+ I GESGTG	
<i>C. d.</i>	PrdR	EKVNDTLKYLKNEVKNLS--KGSFDKILGKSYKLEKSKAIKQVARTNSSIFIWGESGTG	94402
<i>C. s.</i>	PrdR	KEVFARAIHQSSGREGAFVAINCSAIPESLFESFMFGYESGAFTGALSKGKIGKIEIANG	367
		KEVFARAIH S R+G F+ +NCSAIP LFESE FGYESGAFTGA KG+IG E+A	
<i>C. d.</i>	PrdR	KEVFARAIHDYSERKGFIPVNCSAIPNELFESEFFGYESGAFTGASKKGRIGIFELAKD	94222
<i>C. s.</i>	PrdR	GTFLFLDEIGDMPHMQAKLLRVLQERQLMRVGGDKSISLDVRVISATHRNLEDMVKSGTF	427
		GT+FLDEI D+PL MQAKLLRVLQE+++ RVGGD +I ++ R+ISAT+++L MVK+ F	
<i>C. d.</i>	PrdR	GTVFLDEIADLPLSMQAKLLRVLQEKEIRRVGGDTTIKINPRIISATNKDLSKMKVKAKEF	94042
<i>C. s.</i>	PrdR	REDLYRNLNVNIKLPSLSDRIEDVPLFVKLFIEEFCRENHMKVPNISPEILNMLMNYSW	487
		REDLYRNLNVV IK+P L +R ED+ L V F+EE C++N+ V IS +++++ NY W	
<i>C. d.</i>	PrdR	REDLYRNLNVVEIKIPPLRERKEDIGLLVHSFLEEICKQNNKPVLTISKDVIDIFQNYRW	93862
<i>C. s.</i>	PrdR	PGNIRELKNMVEHLVVFSKNNEIQIDTLPEYINNKEKDTINIKNEK----SLTDLIRKTE	543
		GNIRELKN +E++VV S+N++I +D +P Y+ D T N E+ LT +K E	
<i>C. d.</i>	PrdR	KGNIRELKNNTIENIVVLSQNSKIDVDDVPSYM---MDSTNNSTEEEEYPLDLTKATQKIE	93691
<i>C. s.</i>	PrdR	IKAIHDAMKECGNKKQAAKLLDIPRSTLYYKIKFYDLN	582
		IK I A+K NK +AAK+L+IPR+TLYYKI Y ++	
<i>C. d.</i>	PrdR	IKNITKALKMSNGNKAKAAKILNIPRTTLYYKIDQYKID	93574

Abb. A.II: Sequenzvergleiche der Proteine der Prolin-Reduktase-Operone aus *C. sticklandii* (*C.s.*) und *C. difficile* (*C.d.*). PrdA: substratbindendes Proprotein, PrdB: Selenoprotein, PrdC: Elektronentransport-Protein, PrdD: Protein homolog zur mittleren Teilsequenz von PrdA, PrdE: Protein homolog zum C-Terminus von PrdA, PrdF: Prolin-Racemase, PrdR: Regulatorprotein. Der pyruvylbildende Cysteinrest in PrdA sowie das Selenocystein in PrdB sind hervorgehoben.. Das TGA-Codon ist farbig dargestellt. (+): ähnliche Aminosäuren, (-): eingefügte Lücken.

Die Translation der DNA-Sequenz in die Proteinsequenz erfolgte mit dem Programm „MBS Translator“ (www.mbshortcuts.com/cgi-bin/translator).

1) Substratbindendes Proprotein PrdA

C. s. PrdA LRKVEFGPETKIENNTIYIRENICEDAVKVSNLVTDIKVEIITPADYGYSETIMDVQPI 247
 + ++FG +T + + + + E +K LVT +++ I P D + ++P
T. d. PotP INDMKFGNKTAVNGTCLVFNKAELEALIKEDPLVTGVELHIAKPGDNTRIIPVKDVLLEPR 85769

C. s. PrdA ATKEGDG-----KIGQGVTRVIDGAIIMVTGTDEDGVQIGEFGSSEGELDANI 295
 EG G +G G T V+ GA ++ TGT G EG +D +
T. d. PotP CKVEGSGVCFPGFFFTGEEAVVGAGKTHVLKGAADVTTGT-----VVGFGQEGIIDMS- 85922

C. s. PrdA MWGRPGAP-DKGEILIKTQVTIKAGTNMERPGPLAAHKATDFIT-QEIREALKKLDDS-- 351
 PGA + V K ++ R A + T + + EA K + +
T. d. PotP ---GPGAETPFSKTVNLVVDCKIQDDVTRAIKEKALRLMGLKTARYLGEAAKNVKPASV 86093

C. s. PrdA EVVET----EELAQYRRPGKKKVVIKEIMGQAMHDNLILPVEPVGVIGAKPNVDLGNV 407
 E ET E+ QY P KV + + QG +HD V+ ++
T. d. PotP ETYETLFPVEQAKQY--PNLPKVGYYVYMLQSQGLLHDTYYYYGVDVKQIL----- 86234

Spaltstelle
 ↓

C. s. PrdA PVVLSPLEVLDGGIHALTCIGPASKENSRYWREPLVIEV--MNDEEFDLAGVVFVGGSPQ 465
 P ++ P EV+DG I + C+ K + + P++ E+ + ++ + GV+
T. d. PotP PTMMYPTFVMDGAIIVSGNCSACDKNPTYVHQNSPIIHELYKRHGKIDINFMGVIVTNEV 86414

C. s. PrdA VNAEKFYVSERLGMVETMDVEGAFITTEGFGNNHIDFASHHEQVGMRGIPVV 518
 A+K S L + + + ++ EFGN D + ++ GI V
T. d. PotP TLADKERSSNLSAKLAQMLGCDVAVVSEEGFGNPDADLIMNCRKIEEMGIKTV 86573

2) Selenoproteine PrdB

C. s. PrdB KELKDMTVALVTAAGV-----HMKADKRFNLAGDFSFRVIPGDASVN--DMMVSHGGY 79
 K++ +ALVT+ GV H++A + G++S I G A+++ D +HGGY
T. d. SelP KDITKAKIALVTSGGVVPGKGNPDHIEASNASHY-GEYS---IAGMAALSSKDSETHAGGY 85

C. s. PrdB DNGDVNKDINCMFPIDPMRTLAKKEGFIKALAPINIGFMGGGDQKKFSEETGPEIARQLK 139
 D N + N + P+D +R L KEG I L +G G K+ +++ EI ++L
T. d. SelP DPTYCNANPNRVLPVDVLRDLEKEGKIGKLDKYYTTVGNGTAVKR-AKKFAEEIVQKLV 144

Selenocystein
 ↓

C. s. PrdB EEGVDAVLLTAGUGTCHRSVIVQRAIEESGIPTIIIAALPPVVRQNGTPRAVAPLVP 197
 ++GV AV+LT+ GTC R + + IE +P + IA + P+ + G R + P V
T. d. SelP KDGVAVILTST*GTC*TRCGATMVKEIERF-LPVVHIATVVPISKTVGANR-IVPAVA 201

C. s. PrdB MGANAGEP-----NNPEMQKAICTDSLKQL 222
 + G+P + +++++ +LK L
T. d. SelP IPHPLGDPKMNDAADEKKLRRSLVEKALKAL 231

DNA-Sequenz des SelP enthaltenden DNA-Bereiches in *T. denticola*

(gnl|TIGR_158|tdent_7260)

```

AAGGATATCACCAAGGCAAA
K D I T K A K

1021 - GATTGCATTGGTAACCTCAGGCGGTGTTGTACCCAAGGGTAACCCCGACCACATTGAAGC
- I A L V T S G G V V P K G N P D H I E A

1081 - TTCAAATGCTTCACACTACGGCGAATATTCAATCGCAGGTATGGCCGCTCTTTCATCAAAA
- S N A S H Y G E Y S I A G M A A L S S K

1141 - AGACAGCGAAACAGCTCACGGCGGATATGACCCGACCTATTGTAACGCAAACCCCAACCG
- D S E T A H G G Y D P T Y C N A N P N R

1201 - AGTTCTTCCGGTAGATGTTTTGCGTGATCTCGAAAAAGAGGGAAAGATCGGAAAAGCTTCA
- V L P V D V L R D L E K E G K I G K L H

1261 - TGACAAGTACTATACAACGGTAGGAAACGGTACCGCTGTAAAGCGTGCAAAGAAATTTGC
- D K Y Y T T V G N G T A V K R A K K F A

1321 - CGAAGAAATTGTTCAAAAACCTGTAAAAGATGGAGTGCAGGCTGTAATTCTTACCTCTAC
- E E I V Q K L V K D G V Q A V I L T S T

1381 - GTGAGGCACATGTACTCGTTGCGGTGCAACGATGGTTAAAGAAATCGAGAGATTCTCTCC
- U G T C T R C G A T M V K E I E R F L P

1441 - GGTAGTACATATTGCAACTGTTGTTCTCTATCTCAAAGACTGTTGGTGCTAACAGAATTGT
- V V H I A T V V P I S K T V G A N R I V

1501 - TCCGGCTGTAGCTATTTCCTCACCCGCTCGGTGATCCTAAAATGAACGACGCAGATGAGAA
- P A V A I P H P L G D P K M N D A D E K

1561 - AAAACTCCGCCGATCACTTGTGAAAAAGCATTAAAAGCTCTTGAAACACCTATTTTCAGA
- K L R R S L V E K A L K A L E T P I S E

1621 - GCAAACCGTTTTTTTAATTTAGCTTTTTAAACTAAAGCCCCAAGCCTCTAAGGCAAGGGG
- Q T V F *

```

Abb. A.III: Sequenzvergleiche der Proteine der Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (*C.s.*) und *T. denticola* (*T.d.*). PrdA: substratbindendes Proprotein in *C. sticklandii*, PrdB: Selenoprotein in *C. sticklandii*, PotP: potentiell Proprotein in *T. denticola*, SelP: potentiell Selenoprotein in *T. denticola*. Der pyruvylbildende Cysteinrest in PrdA und PotP und das Selenocystein in PrdB und SelP sind hervorgehoben. Das TGA-Codon in SelP ist farbig dargestellt. (+): ähnliche Aminosäuren, (-): eingefügte Lücken.

Die Translation der DNA-Sequenz in die Proteinsequenz erfolgte mit dem Programm „MBS Translator“ (www.mbshortcuts.com/cgi-bin/translator).

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.R. Andreesen für die Überlassung des interessanten Themas, für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. A. Pich danke ich besonders für die gute wissenschaftliche Betreuung und Zusammenarbeit, kritische Diskussionen sowie das Lesen des Manuskriptes. Außerdem bedanke ich mich an dieser Stelle für die Bestimmung der substratbindenden Untereinheit und des Selengehaltes.

Bei Herrn Dr. P. Rücknagel und Frau Dr. A. Schierhorn von der Forschungsstelle „Enzymologie der Peptidbindung“, der Max-Planck-Gesellschaft Halle möchte ich mich für die zahlreichen Peptidsequenzierungen und MALDI-MS-Analysen bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit bei der DNA-Sequenzierung bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Grit Becker und Frau Ute Lindenstrauß.

Andrea Gräntzdörffer danke ich für die Unterstützung bei den Northern-Blot-Analysen.

Matthias Wagner möchte ich ganz besonders für die vielen konstruktiven fachlichen Diskussionen, aber auch für das mir entgegengebrachte freundschaftliche Vertrauen außerhalb der Arbeit danken.

Mein ganz herzlicher Dank gebührt Martina für die vielen aufbauenden Gespräche und praktischen Tips und ihre treue Freundschaft über all die Jahre hinweg.

Kathrin, Melanie und den anderen Mitstreitern der Labore 311 und 308 sei an dieser Stelle herzlich für die gute Zusammenarbeit und nette Arbeitsatmosphäre gedankt.

Bei allen Mitgliedern des Institutes, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, bedanke ich mich recht herzlich.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mir jederzeit hilfreich zur Seite stand und somit maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle (Saale), den 20.08.01

(Ute Kabisch)

Lebenslauf

Name: Ute Christiane Kabisch
Geburtsdatum: 10. Oktober 1968
Geburtsort: Merseburg
Familienstand: ledig, 1 Kind

Schulausbildung:

1975 bis 1985 Polytechnische Oberschule in Halle
1988 bis 1989 Arbeiter- und Bauern-Fakultät der Bergakademie Freiberg
Abschluß: Abitur

Berufsausbildung:

1985 bis 1987 Betriebsberufsschule Leuna-Werke
Abschluß: Chemielaborantin

Studium:

1989 bis 1994 Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiochemie zum Thema:
„Untersuchungen zur Etablierung der Lärchenmykorrhiza und ihrer Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-Aktivität“
Abschluß: Diplom-Biochemikerin

Berufliche Tätigkeit:

1987 bis 1988 Leuna-Werke, Chemielaborantin im Bereich Forschung
Spezialisierungsrichtung: Analytik
1995 bis 1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Experimentelle Arbeiten zur Promotion
1999 bis 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg