

**Selenoprotein-codierende mRNAs aus *Eubacterium acidaminophilum*:  
Erkennung durch den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB und  
Translation in *Escherichia coli***

**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

Torsten Gursinsky

geb. am 29. Juni 1971

in Meißen

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. A. Böck
3. Prof. Dr. P. Dürre

Datum der Verteidigung: 18. 10. 2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000004252**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004252>]

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Stämme und Plasmide .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Kultivierung von Bakterien .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Vollmedien für <i>E. coli</i> .....	12
2.2.2. Nährmedium für <i>E. acidaminophilum</i> .....	12
2.2.3. Medienzusätze .....	14
2.2.4. Zellanzucht .....	14
2.2.5. Messung des Bakterienwachstums .....	14
2.2.6. Lagerung von Bakterienkulturen .....	15
<b>2.3. In-vivo-Markierung mit [<sup>75</sup>Se]-Selenit.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Isolierung von Nukleinsäuren.....</b>	<b>16</b>
2.4.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>E. acidaminophilum</i> (SAITO und MIURA, 1963, mod.) .....	16
2.4.2. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i> .....	16
2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA .....	16
2.4.3.1. Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (BIRNBOIM und DOLY, 1979).....	17
2.4.3.2. Plasmidisolation mit dem 'E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I' (Peqlab, Erlangen) .....	17
2.4.3.3. Midipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	17
2.4.4. Isolierung von RNA.....	17
<b>2.5. In-vitro-Synthese von RNA (WYATT <i>et al.</i>, 1991).....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. Standard-Techniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren .....</b>	<b>18</b>
2.6.1. Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren.....	19
2.6.2. Auftrennung von Nukleinsäuren.....	19
2.6.2.1. Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	19
2.6.2.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA .....	19
2.6.2.3. Elektrophorese von RNA in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen.....	20
2.6.3. Größenbestimmung von Nukleinsäuren .....	20
2.6.4. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	21
2.6.5. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	21
2.6.6. Reinigung von PCR-Produkten .....	21
2.6.7. Spaltung von DNA .....	21

2.6.8. Dephosphorylierung von DNA .....	21
2.6.9. Ligation.....	22
2.6.10. Radioaktive Markierung von RNA.....	22
<b>2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>22</b>
<b>2.8. Zielgerichtete Mutagenese .....</b>	<b>24</b>
<b>2.9. Übertragung von DNA in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>24</b>
2.9.1. Herstellung kompetenter Zellen.....	24
2.9.2. Elektroporation .....	25
<b>2.10. Hybridisierung von Nukleinsäuren.....</b>	<b>25</b>
2.10.1. Herstellung DIG-markierter Sonden.....	25
2.10.2. DNA-Hybridisierung nach SOUTHERN (1975) .....	25
2.10.3. Northern-Hybridisierung .....	26
2.10.4. Koloniehybridisierung .....	26
<b>2.11. Methoden zur DNA-Analyse.....</b>	<b>27</b>
2.11.1. DNA-Sequenzierung am A.L.F. <sup>TM</sup> -Sequencer .....	27
2.11.2. DNA-Sequenzierung am ABI-Sequencer 377 .....	27
2.11.3. Auswertung von Sequenzdaten.....	27
<b>2.12. Methoden zur RNA-Analyse.....</b>	<b>28</b>
2.12.1. Bestimmung des Startpunktes der Transkription mittels <i>primer extension</i> .....	28
2.12.2. Reverse Transkription (RT-PCR) .....	28
<b>2.13. Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.13.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (BRADFORD, 1976) .....	28
2.13.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
2.13.3. Coomassie-Färbung von Proteinen.....	29
2.13.4. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen.....	29
2.13.5. Einengen und Umpuffern von Proteinlösungen.....	30
2.13.6. Transfer von Proteinen auf Membranen .....	30
2.13.7. Antikörpernachweis von Proteinen.....	30
2.13.7.1. <i>Strep-tag</i> II-Fusionsproteine .....	30
2.13.7.2. Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine.....	31
<b>2.14. Heterologe Expression von Proteinen .....</b>	<b>31</b>
2.14.1. His- <i>tag</i> -Fusionsproteine .....	31
2.14.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte.....	31
2.14.1.2. <i>rapid screening</i> von Expressionskulturen .....	32
2.14.1.3. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt im präparativen Maßstab .....	32
2.14.1.4. Native Reinigung.....	32
2.14.2. <i>Strep-tag</i> II-Fusionsproteine .....	33
2.14.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte.....	33

2.14.2.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt.....	33
2.14.2.3. Native Reinigung.....	34
2.14.2.4. Entfernung des <i>Strep-tag</i> II .....	34
<b>2.15. Bestimmung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten .....</b>	<b>34</b>
2.15.1 Herstellung von Rohextrakten .....	34
2.15.2. Aktivitätsbestimmung.....	35
<b>2.16. Bestimmung der b-Galactosidase-Aktivität .....</b>	<b>36</b>
2.16.1. Zellanzucht .....	36
2.16.2. Aktivitäts-Bestimmung (MILLER, 1992, mod.) .....	36
<b>2.17. Gelretardations-Experimente mit SelB bzw. SelB-Domänen aus <i>E. acidaminophilum</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>2.18. Oligonukleotide .....</b>	<b>38</b>
<b>2.19. Geräte und Chemikalien .....</b>	<b>41</b>
<b>3. Experimente und Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Putative Sekundärstrukturen der Selenoprotein-mRNAs aus <i>E. acidaminophilum</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2. Klonierung von <i>selA</i> aus <i>E. acidaminophilum</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3. Untersuchungen zur Transkription der <i>sel</i>-Gene.....</b>	<b>47</b>
3.3.1. Analyse der DNA-Sequenz nach Transkriptions- und Translations-Signalen.....	47
3.3.2. Northern-Hybridisierungen.....	48
3.3.3. Nachweis eines gemeinsamen Transkripts durch RT-PCR .....	49
3.3.4. Bestimmung von Transkriptions-Startpunkten mittels <i>primer extension</i> .....	50
<b>3.4. Komplementation von <i>E. coli</i>-Mutanten.....</b>	<b>52</b>
3.4.1. Konstruktion von Plasmiden für Komplementations-Experimente.....	53
3.4.2. Bestimmung der Aktivität der Formiat-Dehydrogenase H.....	54
<b>3.5. Expression von SelB und SelB-Domänen von <i>E. acidaminophilum</i> in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>56</b>
3.5.1. Expression als His-tag-Fusionsproteine .....	56
3.5.1.1. Klonierung in die Expressionsvektoren pQE30 und pT7-7.....	57
3.5.1.2. Expression und Reinigung.....	59
3.5.2. Expression als <i>Strep-tag</i> II-Fusionsproteine.....	61
3.5.2.1. Klonierung in die Expressionsvektoren pASK-IBA5 und pASK-IBA7.....	61
3.5.2.2. Expression und Reinigung.....	63
<b>3.6. Gelretardations-Experimente mit SelB und SelB-Domänen aus <i>E. acidaminophilum</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>3.7. Synthese von <i>E. acidaminophilum</i>-Selenoproteinen in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>69</b>
3.7.1. Heterologe Expression der Gene <i>grdB1</i> , <i>prxU</i> und <i>selD1</i> in <i>E. coli</i> .....	69
3.7.2. Konstruktion von Plasmiden zur Coexpression von <i>selB</i> und <i>selC</i> .....	72
3.7.3. Heterologe Expression von <i>grdB1</i> , <i>prxU</i> und <i>selD1</i> in Gegenwart von <i>selB</i> und <i>selC</i> aus <i>E. acidaminophilum</i> .....	76

3.7.4. Nachweis einer Inkorporation von Selenocystein durch <i>in-vivo</i> -Markierung mit <sup>75</sup> Se .....	77
<b>3.8. Einfluss von Mutationen der putativen SECIS-Elemente auf die heterologe Selenoprotein-Synthese.....</b>	<b>79</b>
3.8.1. Einführung von Mutationen in die postulierten mRNA-Sekundärstrukturen.....	79
3.8.2. Inkorporation von Selenocystein in die Produkte der mutierten Gene .....	80
<b>3.9. Die Effizienz der Inkorporation von Selenocystein in die Genprodukte von <i>grdBI</i>, <i>prxU</i> und <i>selDI</i>.....</b>	<b>82</b>
3.9.1. Konstruktion der <i>lacZ</i> -Fusionen .....	83
3.9.2. β-Galactosidase-Aktivitäten der Fusions-Konstrukte.....	83
3.9.3. Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine.....	85
<b>3.10. Nachweis einer Selen-modifizierten tRNA in <i>E. acidaminophilum</i> .....</b>	<b>87</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>89</b>
4.1. Organisation und Transkription der <i>sel</i> -Gene aus <i>E. acidaminophilum</i> .....	89
4.2. Charakterisierung der Genprodukte von <i>selA</i> , <i>selB</i> und <i>selC</i> aus <i>E. acidaminophilum</i> .....	92
4.2.1. Selenocystein-Synthase (SelA).....	92
4.2.2. Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor (SelB).....	96
4.2.3. Selenocystein-spezifische tRNA.....	103
4.3. Funktionalität der <i>sel</i> -Genprodukte aus <i>E. acidaminophilum</i> in <i>E. coli</i> .....	104
4.4. SECIS-Elemente in Selenoprotein-mRNAs aus <i>E. acidaminophilum</i> .....	109
4.5. Heterologe Expression von Selenoproteinen in <i>E. coli</i> .....	119
4.6. Selen-modifizierte tRNA(s) in <i>E. acidaminophilum</i> .....	125
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>127</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>150</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
<i>A. aeolicus, Aa</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
<i>C. difficile, Cd</i>	<i>Clostridium difficile</i>
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
<i>C. jejuni, Cj</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
cm	Zentimeter
<i>C. perfringens, Cp</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
<i>C. sticklandii</i>	<i>Clostridium sticklandii</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Cy5	5-N-N'-Diethyltetramethylindodicarbocyanin
d	Schichtdicke [cm]
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
<i>D. baculatum, Db</i>	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat

<b>e</b>	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. acidaminophilum, Ea</i>	<i>Eubacterium acidaminophilum</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli, Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
EF-1 $\alpha$	eukaryotischer Elongationsfaktor 1 $\alpha$
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (schnelle Flüssigchromatographie von Proteinen)
<b>G</b>	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HABA	4'-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino-1-ethansulfonsäure
<i>H. influenzae, Hi</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
I	Inosin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	<i>matrix-assisted laser-desorption ionization</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation)
$\mu$ Ci	Mikrocurie
mCi	Millicurie
mcs	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
$\mu$ F	Mikrofarad
$\mu$ g	Mikrogramm

MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute(n)
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
nm <sup>5</sup> Se <sup>2</sup> U	5-Methylaminomethyl-2-selenouridin
nm <sup>5</sup> S <sup>2</sup> U	5-Methylaminomethyl-2-thiouridin
mod.	modifiziert
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
<i>M. vanniellii</i>	<i>Methanococcus vanniellii</i>
<i>M. thermoacetica, Mt</i>	<i>Moorella thermoacetica</i>
N	beliebiges Nukleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galactosid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
<i>P. aeruginosa, Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pmol	Picomol
<i>P. multocida, Pm</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	<i>pounds per sqare inch</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
RF 2	<i>release factor 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (25 °C)
RT	Reverse Transkription

s	Sekunde(n)
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SLA	Spurenelementlösung A
<i>S. meliloti, Sm</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SSC	Standard-Saline-Citrat
<i>S. typhimurium, St</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tet <sup>r</sup>	Tetracyclin-Resistenz
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
<i>T. tengcongensis, Tt</i>	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uridin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galactopyranosid
<i>Y. pestis, Yp</i>	<i>Yersinia pestis</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

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

## 1. Einleitung

Als in der zweiten Hälfte der 60er Jahre, hauptsächlich durch die Experimente von NIERENBERG und KHORANA, der genetische Code vollständig entschlüsselt war (WOESE, 1967), schien dieser absolut universell, d. h. für alle Organismen gleichermaßen gültig zu sein. Ein reichliches Jahrzehnt später wurden jedoch in Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erstmals Abweichungen von diesem Prinzip entdeckt: die Sequenz der Gene einer Cytochrom-Oxidase-Untereinheit, einer ATPase-Untereinheit und des Cytochrom b ließ darauf schließen, dass das Triplett UGA hier nicht als Terminations-Signal genutzt wird, sondern für Tryptophan steht (MACINO *et al.*, 1979). Im gleichen Jahr wurde auch für menschliche Mitochondrien die Verwendung von UGA als Tryptophan-Codon im Gen der entsprechenden Cytochrom-Oxidase-Untereinheit beschrieben, außerdem codierte AUA nicht Isoleucin sondern Methionin (BARRELL *et al.*, 1979).

Heute ist davon auszugehen, dass nur die Mitochondrien von Landpflanzen und zum Teil auch Algen-Mitochondrien den universellen genetischen Code verwenden (OSAWA *et al.*, 1992; KNIGHT *et al.*, 2001). Im mitochondrialen Genom der meisten eukaryotischen Organismen ist dagegen mindestens einem Codon eine andere Bedeutung zugeordnet als im universellen genetischen Code. Mit Abstand am weitesten verbreitet ist die Nutzung von UGA für Tryptophan, nachgewiesen in Tieren, Pilzen, Flagellaten, Ciliaten sowie einigen Algen (INAGAKI *et al.*, 1998). Neben dieser Abweichung vom universellen Code und der bereits erwähnten, ebenfalls oft vorkommenden Verwendung des Isoleucin-Codons AUA für Methionin können in Mitochondrien auch folgende Veränderungen auftreten: AGA und AGG (Arginin im universellen genetischen Code) codieren Serin oder Glycin bzw. werden als Terminations-Signal genutzt, AAA (Lysin im Standard-Code) steht für Asparagin, CUN (Leucin) für Threonin, UAA (Stopp) für Tyrosin, UAG (Stopp) für Alanin oder Leucin, und UCA (Serin) kann als Stopp-Codon auftreten (OSAWA *et al.*, 1992; WOLSTENHOLME, 1992; KNIGHT *et al.*, 2001). Zum Teil werden auch Codons wie z. B. CGN (Arginin) oder AGA und AGG (Arginin) weder einer bestimmten Aminosäure zugeordnet noch als Terminations-Signal verwendet, diese Triplets sind in offenen Leserahmen nicht anzutreffen. Einige der erwähnten Varianten sind nur vereinzelt anzutreffen: die Umwandlung von UAA (Stopp) in ein Tyrosin-Codon ist möglicherweise auf wenige oder sogar nur eine einzige *Plathelminthes*-Spezies beschränkt (BESSHO *et al.*, 1992; TELFORD *et al.*, 2000) und auch die Verwendung des Serin-Codons UCA als Terminations-Signal wurde bisher nur für eine Grünalgen-Art beschrieben (KÜCK *et al.*, 2000).

Abwandlungen des universellen genetischen Codes sind jedoch nicht nur im stark reduzierten Mitochondrien-Genom, sondern auch im nukleären System einiger Organismen zu finden. Besonders hervorzuheben ist in dieser Hinsicht die Gruppe der Ciliaten: UGA (Stopp) kann hier Cystein oder Tryptophan codieren, die beiden anderen Terminations-Signale im universellen Code, UAG und UAA, dagegen Glutamin (LOZUPONE *et al.*, 2001). Letztere Zuordnung tritt auch in den meisten Diplomonaden (KEELING und DOOLITTLE, 1997) und in einigen Grünalgen (SCHNEIDER und DE GROOT, 1991) auf.

Zahlreiche *Candida*- und *Ascomycetes*-Spezies nutzen CUG (Leucin) für Serin (SUGITA und NAKASE, 1999).

Innerhalb der Prokaryoten sind dagegen bisher nur wenige Beispiele für Varianten des universellen genetischen Codes bekannt. Die Verwendung von UGA (Stopp) als Tryptophan-Codon (wie in nicht-pflanzlichen Mitochondrien) wurde zuerst für *Mycoplasma capricolum* beschrieben (YAMAO *et al.*, 1985) und ist auch in den Gattungen *Spiroplasma*, *Ureaplasma* und *Mesoplasma* zu finden (RAZIN *et al.*, 1998). In *M. capricolum* ist dem Codon CGG (Arginin) keine Funktion zugeordnet (OBA *et al.*, 1991), das Gleiche gilt für AGA (Arginin) und AUA (Isoleucin) in *Micrococcus luteus* (KANO *et al.*, 1993). In methanogenen Archaea und möglicherweise auch in einigen Gram-positiven Bakterien (z. B. *Desulfotobacterium hafniense*) kann das Stopp-Codon UAG Pyrrolysin codieren, ein Lysin-Derivat, bei dem der  $\epsilon$ -Stickstoff dieser Aminosäure durch eine Amid-Bindung mit einem C4-substituierten Pyrrolin-5'-carboxylat verknüpft ist (HAO *et al.*, 2002; SRINIVASAN *et al.*, 2002).

Obwohl bestimmte Varianten als Relikte eines primitiven Codes diskutiert wurden (GRIVELL, 1986), existieren Modelle, welche plausibel erklären, wie die erwähnten Abweichungen durch Wechsel der Bedeutung bestimmter Codons (*reassignment*) aus dem universellen genetischen Code hervorgegangen sein könnten (OSAWA und JUKES, 1989; ANDERSSON und KURLAND, 1995; SCHULTZ und YARUS, 1996).

Eine Vielzahl von Varianten des genetischen Codes ist wie erwähnt mit der Nutzung von Stopp-Codons für Aminosäuren verbunden, sehr weit verbreitet (sowohl in Mitochondrien als auch in nukleären Systemen) ist die Codierung von Tryptophan durch UGA. Abgesehen davon und von der Verwendung für Cystein in *Euplotes* (MEYER *et al.*, 1991) besitzt dieses Codon jedoch noch eine weitere Bedeutung: die Codierung der seltenen Aminosäure Selenocystein (das Selen-Analogon des Cysteins). Als Bestandteil eines Polypeptids wurde diese erstmals 1976 im Protein A der Glycin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii* nachgewiesen (CONE *et al.*, 1976). Ein Jahrzehnt später wurde in den Genen von zwei Selenocystein-enthaltenden Enzymen, der Glutathion-Peroxidase der Maus (CHAMBERS *et al.*, 1986) sowie der Formiat-Dehydrogenase H aus *E. coli* (ZINONI *et al.*, 1986) inmitten des offenen Leserahmens ein UGA-Codon nachgewiesen, welches offensichtlich den cotranslationalen Einbau von Selenocystein bewirkt (ZINONI *et al.*, 1987; BÖCK und STADTMANN, 1988).

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Selenoproteinen aus allen drei Domänen (Bacteria, Archaea und Eukarya) bekannt. In fast allen Fällen handelt es sich um Oxidoreduktasen, die einen Selenocystein-Rest im aktiven Zentrum aufweisen, wobei die im Vergleich zur Thiolgruppe ( $pK_a \geq 8$ ) höhere Reaktivität der unter physiologischen Bedingungen dissoziiert vorliegenden Selenolgruppe ( $pK_a = 5,2$ ) genutzt wird (STADTMANN, 1996).

Eukaryotische Selenoproteine sind hauptsächlich in Wirbeltieren anzutreffen (BURK und HILL, 1999; GLADYSHEV und KRYUKOV, 2001), an Hand von Markierungsexperimenten mit  $^{75}\text{Selen}$  wurde ihre Anzahl in Säugern auf 30-50 geschätzt (BEHNE *et al.*, 1996). Die bekanntesten Vertreter gehören zur

Klasse der Glutathion-Peroxidasen (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999), der Iodothyronin-Deiodinasen (KÖHRLE, 2000) sowie der Thioredoxin-Reduktasen (SUN *et al.*, 1999). Daneben wurde eine Reihe weiterer Selenoproteine identifiziert, deren Funktion noch nicht eindeutig geklärt bzw. völlig unbekannt ist (VENDELAND *et al.*, 1995; GLADYSHEV *et al.*, 1998; KRYUKOV *et al.*, 1999; LESCURE *et al.*, 1999; CASTELLANO *et al.*, 2001; MARTIN-ROMERO *et al.*, 2001; KOROTKOV *et al.*, 2002; KYRIAKOPOULOS *et al.*, 2002). Besonders erwähnenswert unter diesen ist dabei Selenoprotein P, welches mehr als einen Selenocystein-Rest enthält: je nach Spezies sind es 10-17 (HILL *et al.*, 1991; SAIJOH *et al.*, 1995; KRYUKOV und GLADYSHEV, 2000). Ein weiteres in Eukaryoten nachgewiesenes Selenoenzym, die Selenophosphat-Synthetase, tritt auch in Bakterien und Archaea auf, enthält allerdings in einigen prokaryotischen Spezies ein Cystein an Stelle des Selenocysteins (GUIMARÃES *et al.*, 1996; LACOURCIERE und STADTMAN, 1999).

Entgegen der bisher vorherrschenden Meinung, dass Pflanzen ebenso wie Hefen keine Selenoproteine synthetisieren (LESCURE *et al.*, 2002), konnte vor kurzem Selenocystein in einer Glutathion-Peroxidase der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden (FU *et al.*, 2002). Selenoproteine mit Homologien zu Glutathion-Peroxidasen werden offensichtlich auch von verschiedenen Viren codiert (SHISLER *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2000).

Beispiele für bakterielle Selenoenzyme sind die bereits erwähnte Formiat-Dehydrogenase H aus *E. coli*, die Selenophosphat-Synthetase aus *Haemophilus influenzae* (GUIMARÃES *et al.*, 1996), die [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Desulfomicrobium baculatum* (EIDSNES *et al.*, 1989), ein Peroxiredoxin aus *E. acidaminophilum* (SÖHLING *et al.*, 2001), die Proteine A und B der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase aus diesem Organismus (ANDREESEN *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 1999) sowie die Prolin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii* (KABISCH *et al.*, 1999). Bakterielle Selenoproteine mit mehr als einem Selenocystein-Rest sind bisher nicht bekannt.

Selenocystein-enthaltende Formiat-Dehydrogenasen und Hydrogenasen wurden auch in Archaea identifiziert, als Beispiele seien hier die Formiat-Dehydrogenase aus *Methanococcus vannilii* (JONES *et al.*, 1979) sowie die F<sub>420</sub>-reduzierende und die F<sub>420</sub>-nicht-reduzierende [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Methanococcus voltae* (HALBOTH und KLEIN, 1992) genannt. Weitere in Archaea nachgewiesene Selenoproteine sind die Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase aus *Methanopyrus kandleri* (VORHOLT *et al.*, 1997) und die Heterodisulfid-Reduktase aus *Methanococcus jannaschii* (WILTING *et al.*, 1997). Letzterer exprimiert neben weiteren Selenoproteinen auch eine F<sub>420</sub>-nicht-reduzierende Hydrogenase, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zwei Selenocystein-Reste enthält (ROTHER *et al.*, 2001) und somit neben dem eukaryotischen Selenoprotein P das einzige bisher bekannte Beispiel dafür ist, dass diese Aminosäure auch mehrfach in einem Polypeptid auftreten kann.

In allen bisher bekannten Selenoprotein-Genen wird Selenocystein durch UGA codiert. Dieses Triplet kann somit sogar innerhalb ein und desselben Genoms zwei verschiedene Funktionen ausüben: Termination der Translation oder Inkorporation von Selenocystein. Für das Gen der Formiat-

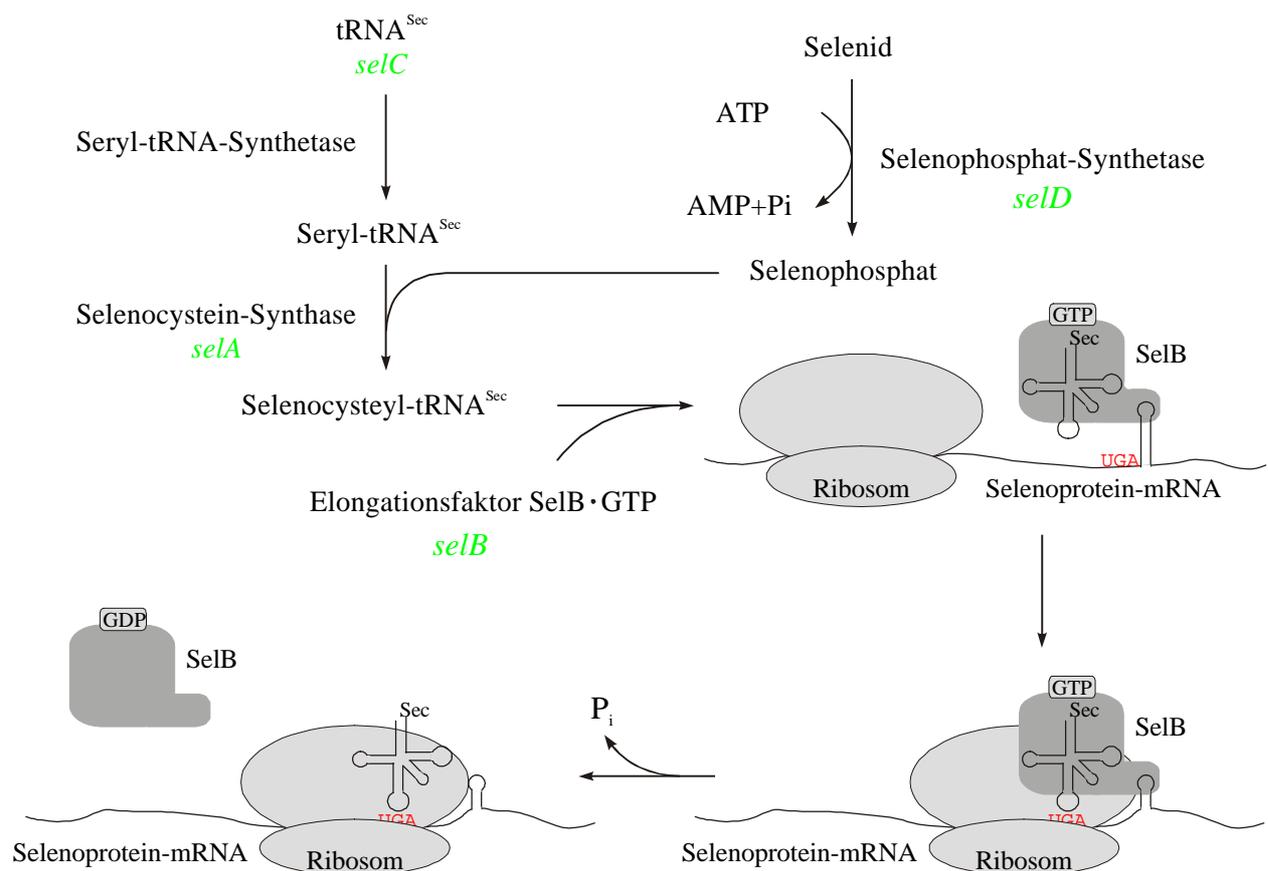
Dehydrogenase H (*fdhF*) konnte gezeigt werden, dass eine ca. 40 Nukleotide umfassende Sequenz unmittelbar stromabwärts vom UGA, welche sich zu einer mRNA-Sekundärstruktur falten kann, dafür verantwortlich ist, dass dieses Triplett während der Translation nicht als Terminations-Signal sondern als Selenocystein-Codon interpretiert wird (ZINONI *et al.*, 1990; HEIDER *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Abweichungen vom universellen genetischen Code, die in der Regel alle Triplets innerhalb eines Genoms betreffen, führt hier ein spezifisches Signal auf mRNA-Ebene im Einzelfall zu einer Änderung der Decodierungs-Regeln, ein Prozess, der auch als *recoding* bezeichnet wird (GESTELAND und ATKINS, 1996).

Durch die Analyse von *E. coli*-Mutanten mit fehlender FDH-Aktivität konnten vier Gene identifiziert werden, welche für den Einbau von Selenocystein essentiell sind, diese wurden mit *selA*, *selB*, *selC* und *selD* bezeichnet (LEINFELDER *et al.*, 1988a). Auf dieser Grundlage wurde für *E. coli* der Mechanismus der Synthese und der cotranslationalen Inkorporation dieser Aminosäure aufgeklärt (Abb. 1).

Das Gen *selC* codiert für eine tRNA mit dem Anti-Codon UCA, welches komplementär zum UGA-Codon der Selenoprotein-mRNA ist (LEINFELDER *et al.*, 1988b). Diese Selenocystein-spezifische tRNA zeigt eine Reihe einzigartiger Merkmale, die sie von den übrigen Elongator-tRNAs in *E. coli* unterscheidet (BARON *et al.*, 1993a). Als auffälligste Eigenschaft sei hier die Länge des Akzeptor-Stammes genannt, dieser weist acht statt der üblichen sieben Basenpaare auf. Der Ausgangspunkt für die cotranslationale Selenocystein-Inkorporation ist die Aminoacylierung der Selenocystein-spezifischen tRNA, diese wird durch die Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen (LEINFELDER *et al.*, 1988b). Die tRNA-gebundene Aminosäure wird anschließend durch das Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym Selenocystein-Synthase (das Produkt des *selA*-Gens) in einen Selenocysteyl-Rest umgewandelt (FORCHHAMMER und BÖCK, 1991; TORMAY *et al.*, 1998). Die prosthetische Gruppe des Enzyms bildet eine Schiff'sche Base mit der Aminogruppe des Seryl-Restes, nach Eliminierung von Wasser entsteht Aminoacrylyl-tRNA<sup>Sec</sup>. Durch die formale Addition von HSe<sup>-</sup> an die Doppelbindung dieses Intermediates wird Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> gebildet. Die Reaktion erfordert Selenophosphat als Selendonator (GLASS *et al.*, 1993), dieses wird durch die Selenophosphat-Synthetase, das Produkt des *selD*-Gens, in einer ATP-abhängigen Reaktion gebildet (LEINFELDER *et al.*, 1990; EHRENREICH *et al.*, 1992; VERES *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zu allen anderen aminoacylierten Elongator-tRNAs wird tRNA<sup>Sec</sup> nicht von EF-Tu erkannt (FÖRSTER *et al.*, 1990). Statt dessen existiert ein spezieller Elongationsfaktor, der vom *selB*-Gen codiert wird und Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> bindet, jedoch keine Interaktion mit Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> eingeht (FORCHHAMMER *et al.*, 1989). SelB ist mit 614 Aminosäuren bzw. 68 kDa wesentlich größer als EF-Tu (393 Aminosäuren, 43 kDa), zeigt jedoch im N-terminalen Bereich deutliche Homologien zu diesem (HILGENFELD *et al.*, 1996). Die drei Domänen von EF-Tu (BERCHTOLD *et al.*, 1993) sind auch in dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor konserviert. Dieser weist allerdings noch eine zusätzliche vierte Domäne auf, zu der es keine Entsprechung in EF-Tu gibt (KROMAYER *et al.*, 1996). Dieser Bereich des Proteins, der reich an Arginin- und Lysin-Resten ist, bindet an die bereits erwähnte Sekundärstruktur

der *fdhF*-mRNA (BARON *et al.*, 1993b; KROMAYER *et al.*, 1996), während die anderen drei Domänen, analog zu EF-Tu, für die Bindung von GTP und Aminoacyl-tRNA verantwortlich sind. Die Interaktion des quaternären Komplexes aus SelB, GTP, Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und mRNA mit einem translatierenden Ribosom führt zur Inkorporation von Selenocystein in die wachsende Polypeptid-Kette. Die Funktion der auch als SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) bezeichneten mRNA-Sekundärstruktur besteht dabei nicht nur in einer Erhöhung der lokalen Konzentration von Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> in der Nähe des entsprechenden UGA-Codons, sondern vor allem in der Auslösung einer Konformationsänderung in SelB. Dadurch wird die korrekte Wechselwirkung des Elongationsfaktors mit dem Ribosom, welche zur Hydrolyse von GTP und zum Transfer der beladenen tRNA in die ribosomale A-site führt, gewährleistet (HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998b; THANBICHLER *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus verhindert offensichtlich, dass ein UGA-Terminations-Signal als Selenocystein-Codon interpretiert wird, da in diesem Fall die entsprechende mRNA-Struktur nicht vorhanden ist. Abb. 1 zeigt schematisch die Synthese und cotranslationale Inkorporation von Selenocystein in *E. coli*.



**Abb. 1: Biosynthese von Selenocystein und cotranslationaler Einbau in Proteine von *E. coli*.** Unterhalb der Faktoren, die am Selenocystein-Stoffwechsel beteiligt sind, ist die Bezeichnung des entsprechenden Gens angegeben und farbig hervorgehoben.

In Eukaryoten wird Selenocystein nach ähnlichen Prinzipien in Proteine eingebaut. Die Bildung der Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> erfolgt analog zu *E. coli* aus Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> (LEE *et al.*, 1989; MIZUTANI *et al.*, 1992; LOW *et al.*, 1995; AMBERG *et al.*, 1996). Ein wesentlicher Unterschied zum bakteriellen System besteht darin, dass die für die Diskriminierung zwischen einem Selenocystein-spezifischen UGA-Triplett und dem Stopp-Codon UGA verantwortlichen mRNA-Sekundärstrukturen in der 3'-nicht-translatierten Region zu finden sind (BERRY *et al.*, 1991; LOW und BERRY, 1996; GRUNDNER-CULEMANN *et al.*, 1999). Die Funktion von SelB wird von zwei verschiedenen Polypeptiden übernommen. Als Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor fungiert EFsec (mSelB), welches analog zum *E. coli*-Enzym Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> bindet, nicht jedoch den mit Serin beladenen Precursor (FAGEGALTIER *et al.*, 2000; TUJEBAJEVA *et al.*, 2000). Das Protein weist deutliche Homologien zum Standard-Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$  auf, besitzt jedoch eine zusätzliche C-terminale Domäne. Über diese Region interagiert EFsec mit einem zweiten Faktor, SBP2 (*SECIS-binding protein 2*), welcher wiederum spezifisch an die erwähnten mRNA-Sekundärstrukturen bindet (COPELAND *et al.*, 2000; FLETCHER *et al.*, 2001).

In Archaea erfolgt die Inkorporation von Selenocystein vermutlich analog zum eukaryotischen System. Im Genom von *M. jannaschii* konnte das Gen einer tRNA<sup>Sec</sup> nachgewiesen werden (BULT *et al.*, 1996), diese besitzt eine ähnliche Struktur wie das eukaryotische Pendant (IOUDOVITCH und STEINBERG, 1999). Obwohl bisher noch keine Selenocystein-Synthase (bzw. das entsprechende Gen) identifiziert wurde, erfolgt die Biosynthese von Selenocystein vermutlich wie in Bakterien und Eukaryoten (ROTHER *et al.*, 2000). Das SECIS-Element ist in der 3'- oder, seltener, in der 5'-nicht-translatierten Region der Selenoprotein-mRNA lokalisiert (WILTING *et al.*, 1997; ROTHER *et al.*, 2001). Ebenfalls in *M. jannaschii* konnte ein SelB-homologes Protein identifiziert werden, welches spezifisch Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> bindet, jedoch keine Interaktion mit der mRNA-Sekundärstruktur eingeht (ROTHER *et al.*, 2000). Wahrscheinlich existiert analog zur Situation in Eukaryoten ein weiterer Faktor, der das SECIS-Element bindet und mit dem Elongationsfaktor kooperiert.

Die Lokalisation der SECIS-Elemente in der nicht-translatierten Region eukaryotischer und archaealer Selenoprotein-mRNAs erlaubt die Inkorporation von Selenocystein, ohne dass die Aminosäure-Sequenz des Proteins dadurch Einschränkungen unterliegt. Die Synthese einer Vielzahl unterschiedlichster Selenoproteine ist auf diese Weise möglich. Anders stellt sich die Situation dar, wenn das SECIS-Element wie in *E. coli* unmittelbar stromabwärts vom UGA liegt, in der Regel also innerhalb der codierenden Region der mRNA. Die Nukleotidsequenz in diesem Bereich muss sowohl eine für die Funktion des Proteins hinreichende Aminosäurefolge codieren als auch eine Sekundärstruktur ausbilden, die vom Elongationsfaktor SelB erkannt wird. Das schränkt im Vergleich zu Eukaryoten und Archaea die Anzahl unterschiedlicher Selenoproteine in einem bakteriellen Organismus möglicherweise deutlich ein. Während in Wirbeltieren bereits eine Vielzahl verschiedener Selenoproteine nachgewiesen wurden

(BEHNE *et al.*, 1996; GLADYSHEV und KRYUKOV, 2001), besitzt *E. coli* lediglich drei Selenocystein-enthaltende Formiat-Dehydrogenasen:  $FDH_H$  (COX *et al.* 1981; ZINONI *et al.*, 1986),  $FDH_N$  (COX *et al.*, 1981; BERG *et al.*, 1991) und  $FDH_O$  (SAWERS *et al.*, 1991; ABAIBOU *et al.*, 1995). Diese Proteine zeigen zudem allein auf Grund ihrer ähnlichen Funktion deutliche Sequenzhomologien im Bereich des Selenocysteins (BLATTNER *et al.*, 1997).

Im Vergleich zu *E. coli* weisen verschiedene Gram-positive, Aminosäure-verwertende Organismen eine deutlich größere Anzahl an Selenoproteinen auf (ANDREESEN *et al.*, 1999). Intensiv untersucht wurde in dieser Hinsicht *E. acidaminophilum*, ein obligat anaerober Organismus (ZINDEL *et al.*, 1988), der in Cluster XI der Clostridien einzuordnen ist (BAENA *et al.*, 1999). *E. acidaminophilum* ist in der Lage, Glycin in einer Stickland-Reaktion sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor zu nutzen, die Glycin-Derivate Sarcosin (N-Methylglycin) und Betain (N,N,N-Trimethylglycin) können hingegen nur als Elektronenakzeptoren dienen (ZINDEL *et al.*, 1988). Das Wachstum auf diesen Substraten erfordert den Zusatz von Selenit ( $\geq 0,1 \mu\text{M}$ ) zum Medium. Bisher wurden acht verschiedene Selenoproteine bzw. Selenoprotein-Gene in *E. acidaminophilum* nachgewiesen (Tab. 1), vermutlich existieren aber noch weitere (G. OANCEA, persönliche Mitteilung).

**Tab. 1: Selenoproteine in *E. acidaminophilum***

Protein	Größe [kDa]	Gen(e)	Referenz
Formiat-Dehydrogenase	98	<i>fdhA1,2</i>	ANDREESEN <i>et al.</i> (1999)
Selenoprotein B, Glycin-Reduktase	47	<i>grdB1,2</i>	WAGNER <i>et al.</i> (1999)
Selenoprotein B, Sarcosin-Reduktase	47	<i>grdF</i>	ANDREESEN <i>et al.</i> (1999)
Selenoprotein B, Betain-Reduktase	45	<i>grdH</i>	ANDREESEN <i>et al.</i> (1999)
Selenophosphat-Synthetase	37, 40	<i>selD1,2</i>	GURSINSKY <i>et al.</i> (2000)
Peroxiredoxin	22	<i>prxU</i>	SÖHLING <i>et al.</i> (2001)
Selenoprotein A, Glycin-, Sarcosin-, Betain-Reduktase	17	<i>grdA1,2,3</i>	ANDREESEN <i>et al.</i> (1999)
10-kDa-Selenoprotein	11	<i>prpU</i>	ANDREESEN <i>et al.</i> (1999)

Für einige dieser Gene wurden mRNA-Sekundärstrukturen unmittelbar stromabwärts des UGA-Codons postuliert (SONNTAG, 1998; GRÄNTZDÖRFFER, 2000; GURSINSKY *et al.*, 2000), diese lassen jedoch kaum konservierte Elemente erkennen. Für die 3'-nicht-translatierte Region des *grdB*-Gens aus dem mit *E. acidaminophilum* eng verwandten Organismus *Clostridium litorale* wurde dagegen eine mRNA-Struktur mit Homologien zu eukaryotischen SECIS-Elementen beschrieben (KREIMER und ANDREESEN, 1995).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geklärt werden, inwiefern die Inkorporation von Selenocystein in Proteine von *E. acidaminophilum* nach dem für *E. coli* beschriebenen Modell abläuft bzw. welche mRNA-Strukturen für die Spezifizierung eines UGA-Tripletts als Selenocystein-Codon

verantwortlich sind. Mit Hilfe dieser Kenntnis sollte außerdem eine Möglichkeit gefunden werden, Selenoprotein-Gene aus dem Gram-positiven Organismus heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Als Voraussetzung für Untersuchungen zum Mechanismus der Selenocystein-Inkorporation in *E. acidaminophilum* waren in vorangegangenen Arbeiten bereits die Gene *selB* und *selC* sowie der überwiegende Teil von *selA* aus diesem Organismus kloniert worden (GURSINSKY, 1996)

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Stämme und Plasmide

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme sind in Tab. 2 aufgeführt, die benutzten Vektoren und hergestellten Hybridplasmide wurden in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tab. 2 : Übersicht über verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
<i>Eubacterium acidaminophilum</i> DSM 3953 <sup>T</sup>	Wildtyp	ZINDEL <i>et al.</i> (1988)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF <sup>-</sup>	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1$ $lac [F^+ proAB lacI^q \Delta M15 Tn10(Tet^r)]$	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> M15	$nal^S str^S rif^S lac^- ara^- gal^- mtl^- F^- recA^+$ $uvr^+$	Qiagen, Hilden
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> $dcm ompT hsdS(r_B^- m_B^-)$ gal $\lambda$ (DE3)	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> $ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+$ $Tet^r gal \lambda$ (DE3) $endA Hte [argU ileY$ $leuW Cam^r]$	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> FM433	F <sup>-</sup> $araD139 \Delta(argF-lac)U169 ptsF25$ $deoC1 relA1 flbB5301 rpsE13 \Delta(srl-$ $recA)306::Tn10$	ZINONI <i>et al.</i> (1990)
<i>Escherichia coli</i> AH819	FM433, $\Delta selA(400-1266)$	KROMAYER <i>et al.</i> (1996)
<i>Escherichia coli</i> WL81300	FM433, $\Delta selB300::kan$	TORMAY <i>et al.</i> (1996)
<i>Escherichia coli</i> MN1	F <sup>-</sup> $proC23 trp-30 his-51 lac-28 rpsL101$ $I^- selC163 \Delta(srl- recA)306::Tn10$	TORMAY <i>et al.</i> (1994)

**Tab. 3 : Übersicht über verwendete Plasmide**

Plasmid	relevante Merkmale <sup>1</sup>	Referenz, Quelle
pUC18	Amp <sup>r</sup> , $lacPoz^+$	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> (1985)
pACYC184	Cam <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	CHANG und COHEN (1978)
pQE30	Amp <sup>r</sup> , Vektor zur Expression von Proteinen mit N-terminalem His-tag	Qiagen, Hilden
pT7-7	Amp <sup>r</sup> , Expressionsvektor mit T7-Promotor	TABOR and RICHARDSON (1985)
pREP4	Kan <sup>r</sup> , $lacI$	Qiagen, Hilden
pUBS520	Kan <sup>r</sup> , $lacI, dnaY$	BRINKMANN <i>et al.</i> (1989)

Fortsetzung Tab. 3

pASK-IBA3	Amp <sup>r</sup> , <i>tet</i> -Repressorgen, Vektor zur Expression von Proteinen mit C-terminalem <i>Strep-tag</i> II-Peptid	IBA, Göttingen
pASK-IBA5	Amp <sup>r</sup> , <i>tet</i> -Repressorgen, Vektor zur Expression von Proteinen mit N-terminalem <i>Strep-tag</i> II-Peptid	IBA, Göttingen
pASK-IBA7	Amp <sup>r</sup> , <i>tet</i> -Repressorgen, Vektor zur Expression von Proteinen mit abspaltbarem, N-terminalen <i>Strep-tag</i> II-Peptid	IBA, Göttingen
pSKAGS	Amp <sup>r</sup> , <i>Plac-gst'</i> - <i>'lacZ</i> -Fusion	WILLS <i>et al.</i> (1997)
pTN1	pUC18-Derivat; ' <i>selA, selB, selC, ackA</i> '	GURSINSKY (1996)
pTN2	pUC18-Derivat; ' <i>selA, selB, selC, ackA</i> '	GURSINSKY (1996)
pTN3	pUC18-Derivat; ' <i>selA, selB</i> '	GURSINSKY (1996)
pME11	pUC18-Derivat; ' <i>selD1, selA, selB</i> '	diese Arbeit
pSD15	pUC18-Derivat; <i>selD2</i>	GURSINSKY <i>et al.</i> (2000)
pTN2P	pUC18-Derivat; <i>selC, ackA</i> '	diese Arbeit
pTN2K	pUC18-Derivat; ' <i>selA, selB, selC</i> '	diese Arbeit
pTKSC13	pUC18-Derivat; ' <i>selA, selB, selC</i> ', <i>selC<sub>Ec</sub></i>	diese Arbeit
pSBE1	pQE30-Derivat; <i>selB</i>	
pSBE359	pQE30-Derivat; <i>selB</i> (AS 359-627)	diese Arbeit
pSBE494	pQE30-Derivat; <i>selB</i> (AS 494-627)	diese Arbeit
pSBSCE1	pQE30-Derivat; <i>selB, selC</i>	diese Arbeit
pT7SBE3	pT7-7-Derivat; <i>selB</i>	diese Arbeit
pSBST5-1	pASK-IBA5-Derivat; <i>selB</i>	diese Arbeit
pSBD4-3	pASK-IBA5-Derivat; <i>selB</i> (AS 358-627)	diese Arbeit
pSBDB4-6	pASK-IBA5-Derivat; <i>selB</i> (AS 494-627)	diese Arbeit
pSBST7-3	pASK-IBA7-Derivat; <i>selB</i>	diese Arbeit
pIBA3B	pASK-IBA3-Derivat; <i>grdB1</i>	REUTER (2000)
pIBA3MBU	pASK-IBA3-Derivat; <i>grdB1</i> , Sec(350) → Cys	REUTER (2000)
pPRXU	pASK-IBA3-Derivat; <i>prxU</i>	SÖHLING <i>et al.</i> (2001)
pPRXU47C	pASK-IBA3-Derivat; <i>prxU</i> , Sec(48) → Cys	SÖHLING <i>et al.</i> (2001)
pSD1N	pASK-IBA5-Derivat; <i>selD1</i>	J. JÄGER, persönliche Mitteilung
pMUD15	pASK-IBA5-Derivat; <i>selD1</i> , Sec(18) → Cys	J. JÄGER, persönliche Mitteilung
pASBC4	pACYC184-Derivat; <i>selB, selC</i> ,	diese Arbeit
pATSC53	pACYC184-Derivat; ' <i>selA, selB, selC, ackA</i> '	diese Arbeit
pATSS25	pACYC184-Derivat; ' <i>selA, selB, selC, ackA</i> '	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3

pFRGCM1	pACYC184-Derivat; Hybridgen <i>selB<sub>Ec</sub></i> (AS 1-254)- <i>selB<sub>Ea</sub></i> (AS 259-627), <i>selC</i>	diese Arbeit
pFNPCM1	pACYC184-Derivat; Hybridgen <i>selB<sub>Ec</sub></i> (AS 1-343)- <i>selB<sub>Ea</sub></i> (AS 359-627), <i>selC</i>	diese Arbeit
pFLRCM2	pACYC184-Derivat; Hybridgen <i>selB<sub>Ec</sub></i> (AS 1-446)- <i>selB<sub>Ea</sub></i> (AS 469-627), <i>selC</i>	diese Arbeit
pFFSCM9	pACYC184-Derivat; Hybridgen <i>selB<sub>Ec</sub></i> (AS 1-488)- <i>selB<sub>Ea</sub></i> (AS 511-627), <i>selC</i>	diese Arbeit
pGBMS11	pIBA3B-Derivat; nt U <sub>1075</sub> →A, C <sub>1076</sub> →G, U <sub>1077</sub> →C in <i>grdB1</i>	diese Arbeit
pGBML2	pIBA3B-Derivat; nt G <sub>1070</sub> →C, U <sub>1071</sub> →A in <i>grdB1</i>	diese Arbeit
pGBMR3	pIBA3B-Derivat; nt U <sub>1075</sub> →A, C <sub>1076</sub> →G, U <sub>1077</sub> →C, A <sub>1063</sub> →G, G <sub>1064</sub> →C, A <sub>1065</sub> →U in <i>grdB1</i>	diese Arbeit
pPUMS1	pPRXU-Derivat; nt U <sub>157</sub> →A, C <sub>158</sub> →G, A <sub>159</sub> →C in <i>prxU</i>	diese Arbeit
pPUML2	pPRXU-Derivat; nt A <sub>162</sub> →C, G <sub>163</sub> →C in <i>prxU</i>	diese Arbeit
pPUMR3	pPRXU-Derivat; nt U <sub>157</sub> →A, C <sub>158</sub> →G, A <sub>159</sub> →C, U <sub>168</sub> →G, G <sub>169</sub> →C, A <sub>170</sub> →U in <i>prxU</i>	diese Arbeit
pSDMS11	pSD1N-Derivat; nt G <sub>69</sub> →C, C <sub>70</sub> →G, C <sub>71</sub> →G in <i>selD1</i>	diese Arbeit
pSDML2	pSD1N-Derivat; nt G <sub>75</sub> →A, G <sub>76</sub> →A in <i>selD1</i>	diese Arbeit
pSDMR1	pSD1N-Derivat; nt G <sub>69</sub> →C, C <sub>70</sub> →G, C <sub>71</sub> →G, G <sub>81</sub> →C, G <sub>82</sub> →C, C <sub>83</sub> →G in <i>selD1</i>	diese Arbeit
pGBWT11	pSKAGS-Derivat; <i>Plac-gst'</i> - ' <i>grdB1</i> ' - ' <i>lacZ</i> -Fusion, 63 bp <i>grdB1</i> -Fragment	diese Arbeit
pGBMC2	pSKAGS-Derivat; <i>Plac-gst'</i> - ' <i>grdB1</i> ' - ' <i>lacZ</i> -Fusion, 63 bp <i>grdB1</i> -Fragment, nt A <sub>13</sub> → C (Sec → Cys)	diese Arbeit
pPUWT1	pSKAGS-Derivat; <i>Plac-gst'</i> - ' <i>prxU</i> ' - ' <i>lacZ</i> -Fusion, 63 bp <i>prxU</i> -Fragment	diese Arbeit
pPUMC4	pSKAGS-Derivat; <i>Plac-gst'</i> - ' <i>prxU</i> ' - ' <i>lacZ</i> -Fusion, 60 bp <i>prxU</i> -Fragment, nt A <sub>13</sub> → C (Sec → Cys)	diese Arbeit
pSDWT24	pSKAGS-Derivat; <i>Plac-gst'</i> - ' <i>selD1</i> ' - ' <i>lacZ</i> -Fusion, 60 bp <i>selD1</i> -Fragment	diese Arbeit
pSDMC2	pSKAGS-Derivat; <i>Plac-gst'</i> - ' <i>selD1</i> ' - ' <i>lacZ</i> -Fusion, 60 bp <i>selD1</i> -Fragment, nt A <sub>13</sub> → C (Sec → Cys)	diese Arbeit

<sup>1</sup> Abgesehen von den Vektoren pUC18, pREP4, pUBS520, pASK-IBA3/5/7 und pSKAGS stammen die angeführten Gene, sofern nicht durch ein entsprechendes Suffix extra gekennzeichnet, aus *E. acidaminophilum*.

## 2.2. Kultivierung von Bakterien

### 2.2.1. Vollmedien für *E. coli*

LB-Medium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989):	Trypton	1	%
	Hefeextrakt	0,5	%
	NaCl	1	%
LB-Agar	LB-Medium		
	Agar	1,5	%
TGYEP-Medium (BEGG <i>et al.</i> , 1977):	Trypton	1	%
	Glucose	0,4	%
	Hefeextrakt	0,5	%
	K-Phosphat, pH 6,5	100	mM
TP-Medium (SUPPMANN <i>et al.</i> , 1999):	Trypton	1	%
	Glycerin	0,5	%
	K-Phosphat, pH 6,5	100	mM
	MgSO <sub>4</sub>	1	mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,1	mM
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1	μM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4	μM
	CoCl <sub>2</sub>	30	nM
	CuSO <sub>4</sub>	10	nM
	ZnSO <sub>4</sub>	10	nM
	MnCl <sub>2</sub>	80	nM
FeCl <sub>3</sub>	10	μM	

### 2.2.2. Nährmedium für *E. acidaminophilum*

Das nachfolgend aufgeführte Medium wurde vor Zusatz von NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S und Biotin 20 min mit Inertal (80 % N<sub>2</sub> / 20 % CO<sub>2</sub>) begast. Unter weiterer Begasung erfolgte die Zugabe von festem NaHCO<sub>3</sub>, bis das Medium einen pH-Wert von 7,2-7,4 erreichte. Nach 20 min Autoklavieren bei 121 °C wurde Biotin zugegeben und das Reduktionsmittel Na<sub>2</sub>S bis zur vollständige Reduktion (Entfärbung) des Mediums zugesetzt.

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

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	g	1,5	mM
NaCl	1,0	g	17	mM
KCl	0,5	g	6,7	mM
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,5	g	2	mM
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,15	g	1	mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,25	g	3,5	mM
SLA <sup>1</sup>	1	ml		
Resazurin (1 mg/ml)	1	ml	1	mg/l
D-(+)-Biotin (1 mg/l)	0,1	ml	0,1	mg/l
Na <sub>2</sub> S × 9 H <sub>2</sub> O (60 mg/ml)	10	ml	2,5	mM
Glycin	3,76	g	50	mM
NaHCO <sub>3</sub>	auf pH 7,4			
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1 l			

<sup>1</sup>Spurenelementelösung A (HORMANN und ANDREESEN, 1989), mod.:

HCl (25 %)	10	ml		
FeCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	1,5	g	7,5 × 10 <sup>-6</sup>	M
ZnCl <sub>2</sub>	0,07	g	5,1 × 10 <sup>-7</sup>	M
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,1	g	5,1 × 10 <sup>-7</sup>	M
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,006	g	9,7 × 10 <sup>-8</sup>	M
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,19	g	8,0 × 10 <sup>-7</sup>	M
CuCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,002	g	1,2 × 10 <sup>-8</sup>	M
NiCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,024	g	1,0 × 10 <sup>-7</sup>	M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,036	g	1,5 × 10 <sup>-7</sup>	M
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,033	g	1,0 × 10 <sup>-7</sup>	M
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,26	g	1,0 × 10 <sup>-6</sup>	M
NaVO <sub>3</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,14	g	1,0 × 10 <sup>-6</sup>	M
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1 l			

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

### 2.2.3. Medienzusätze

Bei Bedarf wurden den Medien die in Tab. 4 angeführten Zusätze beigemischt.

**Tab. 4: Medienzusätze**

Medienzusatz	Stammlösung <sup>1</sup>	Konzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	125 µg/ml
Tetracyclin	25 mg/ml in 50 % Ethanol	12,5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	40 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	35 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	50 µg/ml
Anhydrotetracyclin	20 mg/ml in DMF	0,2 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml in DMF	48 µg/ml
IPTG	40 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	40 µg/ml

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

### 2.2.4. Zellanzucht

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

Zur Bestimmung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten verschiedener *E. coli*-Stämme erfolgte deren Anzucht anaerob in TGYEP-Medium, dem 30 mM Na-Formiat, 1 µM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> und 1 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> zugesetzt wurden, unbewegt bei 37 °C in Serumflaschen unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre.

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

### 2.2.5. Messung des Bakterienwachstums

Die optische Dichte einer Bakterienkultur wurde bei 550 bzw. 600 nm gegen nicht bewachsenes Nährmedium direkt in Hungate-Röhrchen mit einem Spectronic 20<sup>+</sup>-Spektrometer (Ochs Laborbedarf, Bovenden) oder in Plastik-Küvetten mit einem Spektralphotometer Spekol 1200 (Carl-Zeiss-Technology, Jena) bestimmt.

### 2.2.6. Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden diese in LB-Medium mit 15 % (v/v) Glycerin bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Eine kurzfristige Lagerung auf Vollmediumplatten erfolgte bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kulturen von *E. acidaminophilum* konnten im Hungate-Röhrchen über mehrere Monate bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden

### 2.3. *In-vivo*-Markierung mit [ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit

Die entsprechenden *E. coli*-Stämme mit Selenoprotein-codierenden Genen auf den Expressionsvektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5 (IBA, Göttingen) wurden in LB-Medium mit  $30\text{ }\mu\text{g/ml}$  L-Cystein bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  angezogen. Bei einer  $\text{OD}_{550}$  von ca. 0,5 erfolgte die Zugabe von [ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit (Endkonzentration  $2\text{ }\mu\text{M}$ ;  $0,3\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ), danach wurde die heterologe Expression der Selenoprotein-Gene durch Zusatz von  $200\text{ }\mu\text{g/l}$  Anhydrotetracyclin induziert. Nach 1 h bzw. 3 h Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde jeweils 1 ml Probe entnommen, die Zellen durch Zentrifugation (2 min,  $10\text{ }000\text{ g}$ ) geerntet und das Pellet zweimal mit LB-Medium gewaschen. Je  $\text{OD}_{600}$ -Einheit der entsprechenden Kultur wurden die Zellpellets in  $100\text{ }\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer ( $62,5\text{ mM}$  Tris/HCl, pH 6,8; 25 % (v/v) Glycerin; 2,5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) SDS) aufgenommen, 5 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Selen-haltige Makromoleküle konnten durch Autoradiographie unter Verwendung eines PhosphorImagers<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics, Krefeld) sichtbar gemacht werden.

Zur Markierung von Makromolekülen aus *E. acidaminophilum* wurde [ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit (Endkonzentration  $1,2\text{ }\mu\text{M}$ ;  $0,18\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ) unmittelbar nach dem Animpfen einer 10 ml-Kultur zugegeben, diese wurde über Nacht bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 1,0 inkubiert. Die Ernte der Zellen (1 ml-Aliquots) erfolgte durch Zentrifugation (2 min,  $10\text{ }000\text{ g}$ ), das Pellet wurde zweimal mit Medium gewaschen und in  $100\text{ }\mu\text{l}$  TE-Puffer ( $10\text{ mM}$  Tris/HCl, pH 8,0;  $1\text{ mM}$  EDTA) aufgenommen. Nach Zusatz von  $0,1\text{ mg}$  Lysozym erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung (s. 2.14.1.3.). Nach einer Zentrifugation (5 min,  $10\text{ }000\text{ g}$ ) wurden je  $25\text{ }\mu\text{l}$  des Ansatzes mit  $10\text{ }\mu\text{g}$  RNase A oder mit  $20\text{ }\mu\text{g}$  Proteinase K für 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol.  $2\times$ SDS-Probenpuffer erfolgte die weitere Behandlung wie oben beschrieben.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte an einem Flüssig-Szintillationszähler LS 6500 (Beckman, Palo Alto/CA, USA).

## 2.4. Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.4.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus *E. acidaminophilum* (SAITO und MIURA, 1963, mod.)

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus *E. acidaminophilum* erfolgte aus 3 g eingefrorener Zellen. Diese wurden in 4 ml Saline-EDTA-Lösung (0,15 M NaCl; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert, mit 6 mg Lysozym versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde bei –20 °C eingefroren und nach dem Auftauen mit 25 ml Tris-SDS-Puffer (0,1 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 1 % SDS, pH 9,0) versetzt. Es erfolgte ein 3-5-maliges Einfrieren und Auftauen der Suspension bis zur vollständigen Lyse der Zellen. Je 15 ml der Suspension wurden mit 1 Vol. Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0, Roth, Karlsruhe) versetzt und vorsichtig geschüttelt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis (unter gelegentlichem Mischen) erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 3000 g, 4 °C) zur groben Phasentrennung. Die Oberphase wurde erneut 10 min zentrifugiert (20 000 g, 4 °C), der Überstand mit 2,5 Vol. Ethanol versetzt und über Nacht bei –20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 20 000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 25 ml 0,1×SSC gelöst, anschließend mit 2,5 ml 1×SSC (150 mM NaCl; 15 mM Na-Citrat, pH 7,0) sowie 11 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Phenol-Extraktion, der Überstand der Zentrifugation (10 min, 20 000 g, 4 °C) wurde mit 2,5 Vol. Ethanol versetzt und 1 h bei –20 °C inkubiert. Das durch Zentrifugation (10 min, 20 000 g, 4 °C) gewonnene Pellet wurde nacheinander mit eiskalter 70, 80 und 90 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und nach dem Trocknen in 20 ml 0,1×SSC aufgenommen. Nach Zusatz von 2,2 ml Acetat-EDTA-Lösung (3 M Na-Acetat, pH 7,0; 1 mM EDTA) folgte eine Fällung mit 0,54 Vol. Isopropanol mit anschließender Zentrifugation (30 min, 20 000 g, 20 °C). Das Pellet wurde erneut mit 70, 80 und 90 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und in 10 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst.

### 2.4.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli*

Chromosomale DNA aus *E. coli* wurde mit dem 'QIAGEN Genomic-tip System' (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA

*High-copy*-Plasmide wurden in der Regel aus Übernachtskulturen von *E. coli* XL1-Blue MRF' isoliert. Zur Gewinnung größerer Mengen an *low-copy*-Plasmiden wurde die entsprechende Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 mit 50 µg/ml Spectinomycin versetzt, anschließend über Nacht inkubiert und nach den Vorschriften für *high-copy*-Plasmide bearbeitet.

#### **2.4.3.1. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (BIRNBOIM und DOLY, 1979)**

Das Zellpellet aus 3-5 ml Übernachtskultur wurde vollständig in 100 µl Lösung 1 (25 mM Tris pH 8,0; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl frisch hergestellter Lösung 2 (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS) und anschließendes Mischen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl eiskalte Lösung 3 (3 M K-Acetat; 2 M Essigsäure) zugesetzt, der Ansatz vorsichtig gemischt und für 3-5 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10 000 g, der Überstand wurde mit 1 Vol. Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0, Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach Zentrifugation (2 min, 10 000 g) wurde die wässrige Oberphase mit 2,5 Vol. Ethanol versetzt und 5 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O dest. mit RNase A (20 µg/ml) aufgenommen.

#### **2.4.3.2. Plasmidisolation mit dem 'E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I' (Peqlab, Erlangen)**

Zur Gewinnung qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurden 5 ml einer Übernachtskultur entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet.

#### **2.4.3.3. Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Um größere Mengen qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde der 'Plasmid Midi Kit' (Qiagen, Hilden) eingesetzt, wobei eine leicht modifizierte Vorschrift des Herstellers zum Einsatz kam: der dreifachen Menge des empfohlenen Kulturvolumens wurde jeweils die dreifache Menge der Puffer P1, P2 und P3 zugesetzt. Vom anschließend erhaltenen Zentrifugationsüberstand wurde nur ein Drittel auf die äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule gegeben, nach Vorschrift gewaschen und eluiert. Nach erneuter Äquilibration der Säule wurde das nächste Drittel des Zentrifugationsüberstandes verarbeitet usw.

#### **2.4.4. Isolierung von RNA**

Die Isolierung von RNA aus *E. acidaminophilum* erfolgte unter Verwendung des 'RNeasy Mini Kit' (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers aus Zellen einer 10 ml-Kultur, welche in der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurde. Zur Entfernung der nicht vollständig abgetrennten chromosomalen DNA erfolgte ein Verdau mit RNase-freier DNase I (Promega, Mannheim) in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Pro µg RNA wurde 1 U Enzym zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung (s. 2.6.1.) gereinigt.

## 2.5. *In-vitro*-Synthese von RNA (WYATT *et al.*, 1991)

Die *in-vitro*-Synthese von RNA erfolgte mit Hilfe partiell doppelsträngiger Oligonukleotide. Der Template-Strang enthielt die komplementäre Sequenz sowohl zur herzustellenden RNA als auch (am 3'-Ende) zum Promotor der T7-RNA-Polymerase. In diesem Bereich erfolgte die Hybridisierung mit einem zweiten, 18 Nukleotide umfassenden Oligonukleotid, welches dem Promotor der T7-RNA-Polymerase entsprach. Die Reaktion erfolgte im 0,5 ml-Maßstab mit je 200 pmol beider Oligonukleotide im folgenden Puffer:

Tris/HCl, pH 7,9	40	mM
MgCl <sub>2</sub>	42	mM
Spermidin	1	mM
Triton X-100	0,01	% (v/v)
DTT	5	mM
PEG 8000	8	% (w/v)
ATP, CTP, GTP, UTP	je 4	mM
GMP	8	mM

Die Oligonukleotide wurden in Tris-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> 5 min auf 70 °C erwärmt und langsam abgekühlt, danach erfolgte die Zugabe der übrigen Komponenten sowie von 0,25 U Pyrophosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim), 240 U RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 8000 U T7-RNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Nach 4 h bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mM EDTA, pH 8,0 beendet, die Proteine durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die RNA mit Ethanol präzipitiert (s. 2.6.1.). Die weitere Reinigung der Transkripte erfolgte durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen (s. 2.6.2.3.).

## 2.6. Standard-Techniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Für die Arbeit mit DNA und RNA verwendete Lösungen und Materialien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert, hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Lösungen für den Umgang mit mRNA wurden mit 0,1 % DEPC versetzt, mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert. Glasgeräte wurden für 8 h bei 180 °C behandelt, ansonsten wurden RNase-freie Verbrauchsmaterialien eingesetzt.

### **2.6.1. Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren**

Zur Abtrennung von Proteinen aus DNA-Lösungen wurde 1 Vol. eines Gemisches aus gleichen Teilen TE-Puffer-gesättigtem Phenol (Roth, Karlsruhe) und Chloroform zugegeben, die Lösungen gründlich gemischt und 3 min bei  $\geq 10\ 000\ g$  zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und die DNA unter Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 2,5-3 Vol. Ethanol präzipitiert. Die Fällung erfolgte für mindestens 1 h bei  $-20\ ^\circ C$ , nach 15-minütiger Zentrifugation ( $15\ 000\ g$ ,  $4\ ^\circ C$ ) wurde das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und nach dem Trocknen in  $H_2O$  dest. aufgenommen.

Lösungen von RNA wurden analog behandelt, mit dem Unterschied, dass ein Gemisch von Wasser-gesättigtem Phenol, pH 4,5-5,0 (Roth, Karlsruhe) mit Chloroform zum Einsatz kam, danach wurde die RNA nochmals mit Chloroform extrahiert und nach Zusatz von 3 M Na-Acetat, pH 4,6 mit Ethanol präzipitiert.

### **2.6.2. Auftrennung von Nukleinsäuren**

#### **2.6.2.1. Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Die Auftrennung von DNA erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1989) in 0,8-1,5 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA). Vor dem Auftragen wurde die Probe mit 0,2 Vol. Stopp-Lösung (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 40 % (v/v) Glycerin) versetzt, die Auftrennung erfolgte bei 80 V in horizontalen Elektrophoresekammern (Peqlab, Erlangen). Anschließend wurde das Gel 15-20 min in Ethidiumbromid (1  $\mu g/ml$  in Wasser) inkubiert, mit Wasser gespült und mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems (TFX-20.M, MWG-Biotech, Ebersberg) ausgewertet und fotografiert.

#### **2.6.2.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA**

Gesamt-RNA von *E. acidaminophilum* wurde in 3 % Formaldehyd enthaltenden, 1,2-1,5 %igen Agarosegelen in MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,0; 5 mM Na-Acetat) aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurde die RNA-Lösung mit 3-5 Vol. Probenpuffer (50 mM MOPS, pH 7,0; 12,5 mM Na-Acetat; 62,5 % (v/v) Formamid; 1,14 M Formaldehyd; 1,25 mM EDTA; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 0,02 % (w/v) Xylencyanol; 0,005 % (w/v) Ethidiumbromid) versetzt, 10 min bei  $65\ ^\circ C$  inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V in horizontalen Kammern (Peqlab, Erlangen) für ca. 2 h.

### 2.6.2.3. Elektrophorese von RNA in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen

Die Produkte der *in-vitro*-Synthese von RNA wurden in 8 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen (Quervernetzung 19:1, 7 M Harnstoff) in TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure, pH 8,3; 2 mM EDTA) bei 300 (Minigel) bzw. 600 V aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurde die RNA-Lösung mit 1 Vol. Probenpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM EDTA; 90 % (v/v) Formamid; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und 5 min bei 70 °C erwärmt. Bei präparativen Gelen erfolgte die Visualisierung der RNA durch UV-*shadowing* unter Verwendung von DC-Folien (Kieselgel 60 F 254, Riedel de Haan, Seelze). Die RNA-haltigen Gel-Bereiche wurden ausgeschnitten, zerkleinert und über Nacht in Elutionspuffer (0,3 M Na-Acetat, pH 6,0; 0,2 % (w/v) SDS) bei 30 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die RNA erneut durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt und in H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen. In analytischen Gelen wurde die RNA durch 1-stündiges Färben mit 0,005 % (w/v) *Stains-All* (Sigma, Taufkirchen) in 15 mM Tris/HCl, pH 8,8; 25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Formamid sichtbar gemacht.

### 2.6.3. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

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

$\lambda$ -DNA/*Pst*I-verdaut:

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

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

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

DNA-Längenstandard VII, Digoxigenin-markiert (Roche Diagnostics, Mannheim):

8,58 / 7,43 / 6,11 / 4,90 / 3,64 / 2,80 / 1,95 / 1,88 / 1,52 / 1,48 / 1,16 / 0,99 / 0,72 / 0,71 / 0,49 / 0,36 / 0,08 kb

RNA-Marker 0,24-9,49 kb (Life Technologies, Karlsruhe):

9,49 / 7,46 / 4,40 / 2,37 / 1,35 / 0,24 kb

RNA-Längenstandard I, Digoxigenin-markiert (Roche Diagnostics, Mannheim):

6,95 / 4,74 / 2,66 / 1,82 / 1,52 / 1,05 / 0,58 / 0,44 / 0,31 kb

#### **2.6.4. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Abschätzung von DNA-Mengen erfolgte nach Auftrennung in Agarosegelen durch Vergleich mit Proben bekannter Konzentration ( $\lambda$ -DNA, pUC18, M13-DNA).

Die Konzentration von RNA- und Oligonukleotid-Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm mittels eines 'GeneQuant RNA/DNA Calculator' (Pharmacia, Freiburg) ermittelt.

#### **2.6.5. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Für Klonierungsexperimente wurden DNA-Fragmente und PCR-Produkte nach Auftrennung in Agarose-Gelen unter Verwendung des 'E.Z.N.A. Gel Extraction Kit' (Peqlab, Erlangen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

#### **2.6.6. Reinigung von PCR-Produkten**

Zur Abtrennung von Primern und Nukleotiden aus PCR-Reaktionen wurden die Ansätze unter Anwendung des 'E.Z.N.A. Cycle Pure Kit' (Peqlab, Erlangen) nach den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet.

#### **2.6.7. Spaltung von DNA**

Die Spaltung von DNA erfolgte für 2-3 h (analytischer Verdau von Plasmid-DNA) bzw. über Nacht (Verdau von Vektoren, PCR-Fragmenten, chromosomaler DNA usw.) bei der laut Anbieter optimalen Reaktionstemperatur des jeweiligen Restriktionsenzym. Nach erfolgter Reaktion wurden diese, sofern möglich, mittels Hitzedenaturierung (20 min, 65 °C) inaktiviert und/oder durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt.

#### **2.6.8. Dephosphorylierung von DNA**

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

### 2.6.9. Ligation

Ligationen erfolgten im 20 µl-Ansatz mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Vektor- und Fragment-DNA wurden 5 min bei 45 °C inkubiert, danach erfolgte die Zugabe von Puffer und Enzym. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C (Ligation kohäsiver Enden) bzw. 20 °C (glatte Enden) inkubiert. Ligationsprodukte, die mittels Elektroporation transformiert werden sollten, wurden zur Entfernung von Salzen einer 30-minütigen Mikrodialyse gegen 10 %iges Glycerin unterzogen. Dabei kamen Nitrocellulose-Filterscheiben (Millipore, Eschborn) mit einem Porendurchmesser von 0,025 µm zum Einsatz.

### 2.6.10. Radioaktive Markierung von RNA

Die Markierung der gereinigten Produkte von RNA-Synthesen (s. 2.5.) erfolgte am 5'-Ende mit [<sup>32</sup>P]-Phosphat. Ca. 5 µg RNA wurden im 50 µl-Ansatz mit Alkalischer Phosphatase (CIAP, New England Biolabs, Frankfurt/Main) behandelt. Die RNA wurde im Reaktionspuffer 1 min auf 90 °C erwärmt und sofort auf Eis gestellt, dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 U Enzym und eine 15-minütige Inkubation bei 65 °C. Nachdem der Ansatz erneut auf 90 °C erwärmt und auf Eis gestellt wurde, erfolgte nochmals die Zugabe von 10 U Enzym sowie eine jeweils 20-minütige Inkubation bei 37 °C und anschließend bei 50 °C. Danach wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in 20 µl H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen.

Von der dephosphorylierten RNA wurden 10 µl unter Verwendung von 15 U T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs, Frankfurt/Main) und 30 µCi γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, PerkinElmer, Zaventem/Belgien) im 20 µl-Ansatz für 30 min bei 37 °C markiert. Das Enzym konnte anschließend durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert werden, die Abtrennung der nicht inkorporierten Nukleotide erfolgte mittels Gelfiltration unter Verwendung von Mikrozentrifugen-Säulen (*Spin Column* 10, Sigma, Taufkirchen) nach Anweisung des Herstellers.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssig-Szintillationszähler LS 6500 (Beckman, Palo Alto/CA, USA)

## 2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Je nach Verwendung des PCR-Produktes kamen verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz: sollten die Amplifikate für Klonierungen genutzt werden, wurde die Reaktion mit *Pwo*-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt, da diese über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*) verfügt. Für analytische Zwecke wurde *Taq*-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen). Im folgenden ist die Zusammensetzung für einen 100 µl-Standardansatz aufgeführt:

**Tab. 5: PCR-Ansatz**

Komponenten	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase
Template-DNA	10-100 ng	100-750 ng
Primer	20 pmol	30 pmol
10×Reaktionspuffer <sup>1</sup>	10 µl	10 µl
dNTP's	0,2 mM	0,2 mM
DNA-Polymerase	1,0 U	2,5 U

<sup>1</sup> enthielt 15 mM MgCl<sub>2</sub> (*Taq*-DNA-Polymerase) bzw. 20 mM MgSO<sub>4</sub> (*Pwo*-DNA-Polymerase)

Bei Reaktionen mit *Taq*-DNA-Polymerase wurden alle Komponenten bis auf das Enzym zusammengegeben, der Ansatz mit 50 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet und 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurde die DNA-Polymerase zugesetzt und 30 Zyklen mit folgenden Schritten durchgeführt:

Denaturierung:	30 s	bei 94 °C
Annealing:	40 s	bei 45-55 °C
Extension:	30 s - 4 min	bei 72 °C

Die Extensionszeit richtete sich nach der Größe der gewünschten Produkte, je kb wurden etwa 45 s veranschlagt. Die Annealingtemperatur wurde in der Regel so gewählt, dass sie mindestens 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer lag, wobei jeweils der geringere Wert maßgebend war. Die Berechnung erfolgte dabei nach folgender Formel:

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

Nach Beendigung der Zyklen folgte eine 5-minütige Inkubation bei 72 °C, anschließend wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

Bei der Verwendung von *Pwo*-DNA-Polymerase wurden zwei Master-Mixe (je 50 µl) hergestellt: Mix I enthielt Template, Primer und dNTP's; Mix II Puffer und Enzym. Diese Ansätze wurden auf Eis vereinigt, mit Mineralöl überschichtet und 3 min bei 95 °C inkubiert, danach folgten 25 Zyklen wie für *Taq*-DNA-Polymerase beschrieben, wobei ab dem 11. Zyklus die Extensionszeit pro Zyklus um 10 s erhöht wurde. Anschließend folgte eine 7-minütige Inkubation bei 72 °C, danach wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

## 2.8. Zielgerichtete Mutagenese

Die Einführung von Mutationen (Austausch von Basen, Einfügen von Basen) in DNA erfolgte nach WEINER *et al.* (1994). An Hand der Sequenz der zu mutierenden Region wurden zwei komplementäre Primer von 35-45 Nukleotiden abgeleitet, welche etwa in der Mitte die gewünschte Mutation trugen. Mit diesen Primern erfolgte eine Polymerase-Reaktion mit dem Plasmid, in welches die Mutation eingeführt werden sollte, als Template. Der 50 µl-Standardansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Template:	100	ng
Primer:	25	pmol
10×Reaktionspuffer:	5	µl
dNTP's:	0,2	mM
<i>PWO</i> -DNA-Polymerase:	2,5	U

Die einzelnen Komponenten wurden dabei wie für die Standard-PCR-Reaktion mit *Pwo*-DNA-Polymerase beschrieben (s. 2.7.) zusammengegeben. Der Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und 3 min bei 95 °C inkubiert. Danach erfolgten 12 (Punktmutation) bis 16 (Austausch mehrerer Basen) Zyklen mit folgenden Schritten:

Denaturierung:	30 s	bei 95 °C
Annealing:	40 s	bei 55 °C
Extension:	4 min	bei 68 °C

Daran schloß sich eine 7-minütige Inkubation bei 72 °C mit nachfolgender Abkühlung auf 4 °C an. Direkt zum Ansatz wurden nun 20 U des Restriktionsenzym *DpnI* gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Da *DpnI* nur methylierte DNA schneidet, wird durch diesen Schritt das nicht mutierte Template entfernt, die Produkte der Polymerase-Reaktion dagegen werden nicht abgebaut. Nach einer Mikrodialyse (s. 2.6.9.) wurden 5 µl des Ansatzes durch Elektroporation (s. 2.9.2.) transformiert.

## 2.9. Übertragung von DNA in *E. coli*

### 2.9.1. Herstellung kompetenter Zellen

200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 kultiviert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (20 min, 4500 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde zweimal mit je 200 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O dest. und einmal mit 30 ml 10 %igem Glycerin gewaschen, anschließend mit 0,5-0,7 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

## 2.9.2. Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit einem 'Gene Pulser<sup>TM</sup>' (Biorad, München). Pro Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz versetzt und nach 1-minütiger Inkubation auf Eis in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF und einer Feldstärke von 12,5 kV/cm. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen 60-90 min bei 37 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 5-200 µl auf Selektivmedium ausgestrichen.

## 2.10. Hybridisierung von Nukleinsäuren

### 2.10.1. Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Markierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem 'DIG DNA Labeling Kit' (Roche Diagnostics, Mannheim), wobei jeweils 1 µg DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit Digoxigenin-11-dUTP markiert wurde.

Oligonukleotide (100 pmol) wurden unter Verwendung des 'DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit' (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Vorschrift des Herstellers mit Digoxigenin-11-dUTP markiert.

### 2.10.2. DNA-Hybridisierung nach SOUTHERN (1975)

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA (s. 2.6.2.1.) wurde das Agarosegel 10 min in 0,25 M HCl inkubiert, um größere DNA-Moleküle zu fragmentieren und so deren Transfer zu erleichtern. Anschließend folgte eine jeweils 20-minütige Inkubation in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und in Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl), danach wurde das Gel in 10×SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat) getränkt. Der Transfer der Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe einer Vakuumblot-Apparatur (Appligene-Oncor, Heidelberg) für 1 h bei 50 mbar mit 10×SSC auf eine ebenfalls in Transferpuffer getränkte, ungeladene Nylonmembran (Qiagen, Hilden). Im Anschluß daran wurde die DNA durch 2-minütige UV-Bestrahlung (Transilluminator TF-20M, Vilber Lourmat, Marne la Vallée/Frankreich) fixiert. Die Membran konnte direkt für die Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Prähybridisierung ( $\geq 2$  h) und Hybridisierung ( $\geq 6$  h; 0,5 µg DNA-Sonde oder 50 pmol Oligonukleotid-Sonde) erfolgten in Standard-Puffer (5×SSC; 1 % Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim); 0,1 % (v/v) N-Laurylsarcosin; 0,02 % (w/v) SDS) in einem Hybridisierungsofen (OV4, Biometra, Göttingen). Für homologe DNA-Sonden wurde eine Hybridisierungstemperatur von 68 °C gewählt, für Oligonukleotide wurde die Hybridisierung 10 °C unter der nach folgender Formel berechneten Schmelztemperatur der Sonde durchgeführt:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600/\text{N}$$

Nach Abschluß der Hybridisierung wurde die Membran 2×5 min bei Raumtemperatur in 2×SSC; 0,1 % (w/v) SDS und 2×15 min bei Hybridisierungstemperatur in 0,1×SSC; 0,1 % (w/v) SDS gewaschen.

Die anschließende Detektion erfolgte mit dem 'DIG Luminescent Detection Kit' (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers, das Ergebnis wurde auf einem 'Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film' (Roche Diagnostics, Mannheim) festgehalten.

### 2.10.3. Northern-Hybridisierung

Northern-Blots wurden nach einem modifizierten Protokoll nach ENGLER-BLUM *et al.* (1993) durchgeführt. Bis zu 20 µg RNA aus *E. acidaminophilum* wurden in 1-1,3 %igen Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt (s. 2.6.2.2.), das Gel anschließend kurz in H<sub>2</sub>O geschwenkt und 2×20 min in 20×SSC inkubiert. Der Transfer der RNA erfolgte unter Verwendung einer Vakuumblot-Apparatur (Appligene-Oncor, Heidelberg) für 3 h bei 60 mbar mit 20×SSC auf eine in Transferpuffer getränkte, positiv geladene Nylonmembran (Qiagen, Hilden). Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte analog zum Southern-Blot. Prähybridisierung (≥ 2 h) und Hybridisierung (≥ 6 h) mit 0,5 µg DNA-Sonde erfolgten unter Verwendung eines High-SDS-Hybridisierungspuffers (0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 0,5 % Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim); 1 mM EDTA; 20 % SDS) bei 68 °C. Die Membran wurde anschließend 3×20 min mit 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 1 % SDS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Detektion unterschied sich nicht von der Southern-Hybridisierung.

### 2.10.4. Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierung erfolgte mit ungeladenen Nylonmembranen (Qiagen, Hilden), welche, auf LB-Agarplatten liegend, mit bis zu 96 verschiedenen Klonen beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Mit den Bakterienkolonien nach oben wurden die Membranen anschließend wie folgt auf Lösungs-getränkten Filterpapierstapeln inkubiert: 5 min Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl; 0,1 % (w/v) SDS), 5 min Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) und 2 min 2×SSC. Danach wurde die DNA durch 2-minütige UV-Bestrahlung fixiert. Zur Entfernung von Zellresten erfolgte zusätzlich eine 30-minütige Behandlung der Membranen (*prewashing*) bei 50 °C in 5×SSC; 0,5 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA. Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschen und Detektion wurden danach analog zum Southern-Blot durchgeführt.

## 2.11. Methoden zur DNA-Analyse

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

Die DNA-Sequenzierung erfolgte enzymatisch über das Kettenabbruch-Verfahren (SANGER *et al.*, 1977) unter Verwendung des 'AutoRead<sup>TM</sup> Sequencing Kit' (Pharmacia, Freiburg) nach Anweisung des Herstellers mit Primern, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (Cy5) markiert waren. Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzreaktionen und die Erfassung der Daten wurde am automatisierten Sequenziergerät (A.L.F.<sup>TM</sup>-Sequencer, Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

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

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

### 2.11.3. Auswertung von Sequenzdaten

Die ermittelten Sequenzdaten wurden unter Verwendung des Analyseprogramms CLONE MANAGER, Version 4.1 (Scientific & Educational Software, Durham/NC, USA) ausgewertet. Sequenzhomologien zu in Datenbanken aufgeführten Nukleinsäure- und Proteinsequenzen wurden mit dem Algorithmus BLAST (*basic local alignment search tool*; ALTSCHUL *et al.*, 1997) über das *National Center for Biotechnological Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ermittelt. Die Analyse von RNA-Sekundärstrukturen an Hand der vorliegenden DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des Programmes MFOLD (MATHEWS *et al.*, 1999; <http://www.bioinfo.math.rpi.edu>) durchgeführt.

Multiple Alignments von Proteinen erfolgten mit dem Programm CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) über das *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). Paarweise Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Programm LALIGN (HUANG und MILLER, 1991) durchgeführt (<http://www.embnet.org/software/LALIGN-form.html>). Die Bestimmung physikalischer Daten der bearbeiteten Proteine an Hand der Aminosäuresequenz erfolgte mit Hilfe von Programmen des Instituts für Bioinformatik, Genf (<http://www.expasy.ch>).

## 2.12. Methoden zur RNA-Analyse

### 2.12.1. Bestimmung des Startpunktes der Transkription mittels *primer extension*

Die Bestimmung von Transkriptions-Startpunkten erfolgte nicht-radioaktiv am A.L.F.<sup>TM</sup>-Sequencer nach MYÖHÄNEN und WAHLFORS (1993). In einem Volumen von 12 µl wurden 3-5 µg Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* mit 10 pmol des Cy5-markierten Primers gemischt, 10 min bei 70 °C inkubiert und danach 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5×*First Strand Buffer*, 1 µl dNTP's (20 mM) sowie 2 µl 0,1 M DTT zugegeben und der Ansatz 2 min bei 50 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> II (200 U/µl, Life Technologies, Eggenstein) gestartet und 1 h bei 50 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 5-minütiges Erwärmen auf 95 °C, anschließend wurde der Ansatz an der *speed vac* auf 10 µl eingengt. Nach Zugabe von 1 Vol. Stopplösung des 'AutoRead<sup>TM</sup> Sequencing Kit' (Pharmacia, Freiburg) erfolgte die Auftrennung im Sequenzgel (A.L.F.<sup>TM</sup>-Sequencer, Pharmacia, Freiburg).

Zur Bestimmung der Größe des entstandenen Produktes wurde eine Sequenzierung mit dem für die *primer extension* verwendeten Oligonukleotid durchgeführt und im gleichen Sequenzgel aufgetrennt

### 2.12.2. Reverse Transkription (RT-PCR)

Die Präsenz bestimmter mRNA-Transkripte wurde durch Reverse Transkription der mRNA in cDNA und nachfolgende Amplifikation des DNA-Fragmentes mittels PCR nachgewiesen. Die Reverse Transkription erfolgte mit 2 µg DNA-freier Gesamt-RNA von *E. acidaminophilum* wie in 2.12.1. beschrieben. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion mit *Taq*-DNA-Polymerase unter Standardbedingungen (s. 2.7.) durchgeführt, wobei 10 µl des RT-Ansatzes als Template dienten. Zur Kontrolle wurden RT-Ansätze mit RNase-behandelter RNA (10 µg RNase A, 2 h, 37 °C) bzw. mit denaturierter Reverser Transkriptase (10 min, 95 °C) sowie eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* durchgeführt.

## 2.13. Proteinchemische Methoden

### 2.13.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (BRADFORD, 1976)

Zu 20 µl der Proteinprobe wurde 1 ml BRADFORD-Reagenz (0,007 % (w/v) Serva Blau G-250; 5 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) gegeben und gründlich gemischt. Nach 3 min Inkubation bei RT erfolgte die Vermessung der Absorption bei 590 nm mit einem Spekol 1200 (Carl-Zeiss-Technology,

Jena) in Plastik-Küvetten. Eine Eichgerade wurde mit Rinderserum-Albumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 1-10 µg / 20 µl Probe erstellt.

### **2.13.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in 10-15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (LAEMMLI, 1970) in einer vertikalen Minigel-Apparatur (Biometra, Göttingen). Sammelgel (5 % (w/v) Acrylamid (37,5:1); 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS) und Trenngel (10-15 % (w/v) Acrylamid (37,5:1); 376 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS) wurden nach Vorschrift des Herstellers vorbereitet. Die Proteinlösung wurde mit 1 Vol. 2×SDS-Proben-Puffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 50 % (v/v) Glycerin; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (w/v) SDS) versetzt und nach Denaturierung (5 min, 95 °C) bei 25 mA in Tris/Glycin-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) aufgetrennt.

Als Molekulargewichtsmarker dienten die folgenden Proteine (Sigma, Taufkirchen): Myosin (205 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), Rinderserum-Albumin (66,0 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Glyzeraldehyd-3-phosphat-DH (36,0 kDa), Carboanhydrase (29,0 kDa), Trypsinogen (24,0 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa), α-Lactalbumin (14,2 kDa).

### **2.13.3. Coomassie-Färbung von Proteinen**

In SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennte Proteine wurden für 30-60 min auf einer Laborwippe (Biometra, Göttingen) in Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Serva Blau R250; 0,05 % (w/v) Serva Blau G250; 42,5 % (v/v) Ethanol; 5 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert und anschließend innerhalb von 1-2 h durch 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure bzw. über Nacht mit 7 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

### **2.13.4. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen**

Die Gele wurden nach 5-minütiger Vorbehandlung mit Trockenlösung (40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 3 % (v/v) Glycerin) luftblasenfrei zwischen zwei ebenfalls mit dieser Lösung getränkte Zellophan-Folien (Biometra, Göttingen) gespannt und bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Tagen getrocknet.

### 2.13.5. Einengen und Umpuffern von Proteinlösungen

Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse gegen das 1000-fache Volumen der Probe unter ständigem Rühren bei 4 °C über Nacht. Zur Anwendung kamen dabei 'Snake Skin™' Dialysemembranen (Pierce, Rockford/IL, USA) in Form eines Dialyseschlauchs bzw. mit der Membran überspannte Dialysekapseln (Roth, Karlsruhe).

Das Einengen von Proteinlösungen erfolgte mittels 'Nanosep™ Zentrifugen-Konzentratoren' (Pall Gelman Laboratory, Dreieich) bei 5000 g und 4 °C.

### 2.13.6. Transfer von Proteinen auf Membranen

Die Übertragung von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Pierce, Rockford/IL, USA) erfolgte mit einer Fastblot B34-Apparatur (Biometra, Göttingen). Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel 10 min in Transferpuffer (50 mM Naborat pH 9,0; 10 % (v/v) Methanol) inkubiert und die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran nacheinander je 1 min in Methanol, Wasser und Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde von der Anode aus folgende Schichtung luftblasenfrei vorgenommen: drei Lagen Transferpuffer-getränktes Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel, drei Lagen getränktes Gel-Blotting-Papier. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 4 °C und 1,2 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche. Danach wurde die PVDF-Membran zur Visualisierung der übertragenen Proteine, insbesondere der Marker, für 3-5 min in Ponceau S-Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (w/v) Trichloressigsäure; 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure) geschwenkt und anschließend in Wasser entfärbt.

### 2.13.7. Antikörpernachweis von Proteinen

#### 2.13.7.1. *Strep-tag II*-Fusionsproteine

Der Nachweis der Expression rekombinanter, mit einem *Strep-tag II* fusionierter Proteine erfolgte mittels StrepTactin-HRP-Konjugat (IBA, Göttingen). Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (2.13.6.) wurde diese 30-60 min in 0,5 ml/cm<sup>2</sup> PBS-Puffer (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 115 mM NaCl) mit 1 % (w/v) BSA und 0,5 % (v/v) Tween 20 inkubiert. Nach der Zugabe von 0,25 µl StrepTactin-HRP-Konjugat pro ml Puffer folgte eine weitere 30-minütige Inkubation. Anschließend wurde die Membran kurz mit Wasser gespült, 2×15 min in PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen und erneut kurz mit Wasser gespült. Danach erfolgte die Detektion in Puffer ER (100 mM Tris/HCl, pH 8,5) mit 0,02 % (w/v) 4-Chlornaphtol und 0,03 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nachdem die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten, wurde die Reaktion durch intensives Spülen der Membran mit Wasser beendet.

### 2.13.7.2. Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine

Der Nachweis der Glutathion-S-Transferase erfolgte mit dem 'GST Western Blotting Kit' (Roche Diagnostics, Mannheim), wobei die Vorschrift des Herstellers leicht modifiziert wurde. Die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen (2.13.6.) wurde 1 h in TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) mit 10 % (v/v) Blockierungs-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gegen TBS-Puffer mit 5 % (v/v) Blockierungs-Reagenz ausgetauscht und 1 µl Anti-GST-Peroxidase-Konjugat (Sigma, Taufkirchen) pro ml Puffer zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Membran 4×10 min in TBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen und anschließend 1 min in Substratlösung ('GST Western Blotting Kit', Roche Diagnostics, Mannheim) geschwenkt. Nach dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran in Folie eingeschweißt, die Detektion der Signale erfolgte durch 1-5-minütige Exposition eines 'Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film' (Roche Diagnostics, Mannheim).

## 2.14. Heterologe Expression von Proteinen

### 2.14.1. His-tag-Fusionsproteine

Die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine mit einem N-terminalen His-tag erfolgte unter Verwendung des Vektors pQE30 (Qiagen, Hilden) in Verbindung mit *E. coli* M15 oder mit dem Vektor pT7-7 in Verbindung mit *E. coli* BL21(DE3). Beide Stämme wurden zusätzlich mit dem *lacI*-tragenden Plasmid pREP4 transformiert, um eine strenge Kontrolle der heterologen Genexpression zu erreichen.

#### 2.14.1.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Für die Überprüfung der Genexpression im kleinen Maßstab (*rapid screenig*) wurden 10 ml, für präparative Zwecke dagegen 200 ml LB-Medium (mit Ampicillin und Kanamycin) mit 0,2 bzw. 4 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 wurde IPTG zugegeben (0,4 mM Endkonzentration für Kulturen von *E. coli* BL21(DE3) und 1 mM für *E. coli* M15) und weiter wie zuvor inkubiert. Im *screening*-Maßstab erfolgte bis 5 h nach Induktion alle 60 min die Entnahme von je 1 ml Probe, welche durch Zentrifugation (1 min, 10 000 g) bei RT geerntet wurde. Im präparativen Maßstab erfolgte die Zellernte 4-5 h nach der Zugabe von IPTG. Dazu wurde die Kultur 15 min auf Eis gestellt, die Zellen anschließend durch Zentrifugation (20 min, 5000 g, 4 °C) geerntet und bei -80 °C gelagert.

### 2.14.1.2. *rapid screening* von Expressionskulturen

Die aus 1 ml Kulturvolumen geernteten Zellen wurden in 200 µl Puffer B (8 M Harnstoff; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und durch vortexen lysiert. Das Lysat wurde 10 min bei 15 000 g zentrifugiert und der Überstand anschließend mit 40 µl Ni-NTA-Agarose (50 %ige Suspension, Qiagen, Hilden) unter leichtem Schwenken 30 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation (30 s, 12 000 g) wurde der Überstand verworfen und die Ni-NTA-Agarose dreimal mit je 1 ml Puffer C (s. Puffer B, pH 6,3) gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Zugabe von 20 µl Puffer C mit 100 mM EDTA. Nach 2-minütiger Inkubation des Ansatzes unter leichtem Schwenken wurde die Ni-NTA-Agarose durch Zentrifugation (30 s, 12 000 g) sedimentiert, der Überstand abgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

### 2.14.1.3. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt im präparativen Maßstab

Nach dem Auftauen des Zellpellets auf Eis wurden pro Gramm Feuchtgewicht 3 ml Aufschlusspuffer (50 mM Na-Phosphat pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) zugegeben. Nach Resuspension der Zellen wurde der Ansatz mit Lysozym versetzt (Endkonzentration 1 mg/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (5 s *bursts* bei 60 Watt, dazwischen 10 s Pause) mit einem Desintegrator UW 60 (Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried) unter ständiger Kühlung bis zur vollständigen Lyse der Zellen. Anschließend wurden RNase A (10 µg/ml) und DNase I (5 µg/ml) zugesetzt und der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation (10 000 g, 4 °C), der erhaltene Überstand (Rohextrakt) wurde auf Eis gelagert.

### 2.14.1.4. Native Reinigung

Je ml Rohextrakt wurden 0,25 ml Ni-NTA-Agarose zugegeben und der gesamte Ansatz 1 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine mit Fritte versehene Propylen-Säule mit 1 ml Bettvolumen (Qiagen, Hilden) gegeben und nach Absetzen der Ni-NTA-Agarose zweimal mit 4 ml Waschpuffer (50 mM Na-Phosphat pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit 4×0,5 ml Elutionspuffer (Waschpuffer mit 250 mM Imidazol). Die Protein-enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer Q (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 2 mM DTT; 1 mM EDTA) dialysiert und einer Chromatographie an einer MonoQ<sup>®</sup> HR 5/5 (Pharmacia, Freiburg) unterzogen. Zur Anwendung kam dabei eine FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg), bestehend aus einer Pumpe P 500, einer UV-Einheit UV1 und einem Fraktionssammler FRAC-100 mit angeschlossenen Schreiber REC 101. Die verwendete Flußrate betrug 1 ml/min. Alle benutzten Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch durch

Celluloseacetat-Filter (Sartorius, Göttingen) mit 0,2 µm Porendurchmesser filtriert und anschließend entgast. Die Säule wurde mit 5 ml Puffer Q äquilibriert, danach konnte das dialysierte Protein mit 20 ml des gleichen Puffers aufgebracht werden. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten von 0-1,0 M in Puffer Q. Nach Dialyse gegen Lagerpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin) wurden die gereinigten Proteine bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.14.2. *Strep-tag* II-Fusionsproteine

Für die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine als N-terminale *Strep-tag* II-Fusion kamen die Vektoren pASK-IBA5 und pASK-IBA7 (IBA, Göttingen) sowie die Stämme *E. coli* BL21(DE3) mit pUBS520 bzw. *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL zum Einsatz.

#### 2.14.2.1. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Je 1 l LB-Medium (mit Ampicillin und Kanamycin für *E. coli* BL21(DE3) mit pUBS520 bzw. Ampicillin und Chloramphenicol für *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) wurde mit 20 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur von Zellen, die das entsprechende pASK-IBA5/7-Derivat enthielten, beimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>550</sub> von 0,5-0,7 wurde Anhydrotetracyclin zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben, die Kultur für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 15 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min, 5000 g, 4 °C) geerntet und bei -80 °C gelagert.

#### 2.14.2.2. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 10 ml (je 1 Kulturvolumen) Puffer W (100 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 2 mM DTT) resuspendiert. Nach dem Zusatz von 1 mg/ml Lysozym und 0,1 µM PMSF wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert, der Zellaufschluss erfolgte mittels zwei Passagen durch eine French-Press (20K-Zelle, SLM Instruments, Rochester/NY, USA) bei 1260 psi. Anschließend wurden DNase I (5 µg/ml) und Avidin (25 µg/ml) zugegeben, letzteres diente zur Maskierung von Biotin, welches ansonsten irreversibel an das Affinitätsmaterial bindet. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte die Abtrennung unlöslicher Komponenten durch Zentrifugation (30 min, 60 000 g, 4 °C), der Überstand (Rohextrakt) wurde auf Eis gelagert.

### 2.14.2.3. Native Reinigung

Die Reinigung von *Strep*-tag II-Fusionsproteinen erfolgte bei 4 °C über Polypropylen-Säulen (Qiagen, Hilden), die mit 0,7-1,0 ml StrepTactin-Sepharose (IBA, Göttingen) beladen waren. Nach dem Äquilibrieren der Säule (5 ml Puffer W) wurde der Rohextrakt in 2 ml-Schritten aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 5×1 ml Puffer W entfernt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 5×0,4 ml Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM  $\alpha$ -Desthiobiotin (Sigma, Taufkirchen). Die Säulenmatrix konnte durch Zugabe von 3×5 ml Puffer R (Puffer W mit 1 mM HABA, Sigma, Taufkirchen) und anschließendes Waschen mit 2×4 ml Puffer W regeneriert und auf diese Weise 3-5-mal verwendet werden.

Im Falle von SelB schloss sich eine Chromatographie an einer MonoQ<sup>®</sup> HR 5/5 (Pharmacia, Freiburg) an, dabei wurde wie in 2.14.1.4. beschrieben verfahren.

Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte ebenfalls analog zu den His-tag-Fusionsproteinen.

### 2.14.2.4. Entfernung des *Strep*-tag II

Zur Abspaltung des *Strep*-tag II wurde das Eluat der Affinitätsreinigung gegen den Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub>) dialysiert und pro mg Fusionsprotein mit 50  $\mu$ g Biotin-markiertem Factor Xa (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Die Spaltung erfolgte 8 h bei 15 °C. Zur Abtrennung der Protease wurden 2  $\mu$ l immobilisiertes Streptavidin (50 %ige Suspension, Roche Diagnostics, Mannheim) pro  $\mu$ g Factor Xa zugesetzt und der Ansatz unter leichtem Schütteln 30 min bei 15 °C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (5 min, 10 000 g) konnte die an das Gel gebundene Protease separiert werden. Um nicht gespaltenes Fusionsprotein zu entfernen, wurde der Ansatz auf eine StrepTactin-Affinitätssäule aufgebracht und der Durchlauf aufgefangen.

## 2.15. Bestimmung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten

Alle Schritte erfolgten anaerob unter Formiergas-Athmosphäre (95 % N<sub>2</sub> / 5 % H<sub>2</sub>) in einer Anaerobenbox (Coy Laboratory Products, Ann Arbor/MI, USA) oder unter ständiger Begasung mit N<sub>2</sub>. Die verwendeten Puffer wurden ebenfalls mit N<sub>2</sub> begast und in Serumflaschen mit Septen gelagert.

### 2.15.1 Herstellung von Rohextrakten

Nach anaerobem Wachstum in TGYEP-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,2 wurden die Zellen einer 400 ml-Kultur durch Zentrifugation (20 min, 5000 g, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 2 ml Puffer A (25 mM MES/NaOH, pH 6,0; 3 mM Na-Azid; 2 mM DTT; 1 mM EDTA) aufgenommen, der

Zellaufschluss erfolgte mittels zwei Passagen durch eine French-Press (Mini-Zelle, SLM Instruments, Rochester/NY, USA) bei 960 psi. Unlösliches Material wurde anschließend durch Zentrifugation (20 min, 27 000 g, 4 °C) entfernt.

### 2.15.2. Aktivitätsbestimmung

Die Messung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte modifiziert nach AXLEY *et al.* (1990) durch die Formiat-abhängige Reduktion von Benzylviologen ( $\epsilon_{578} = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), welche bei 578 nm an einem Spektrophotometer (Uvikon 630, Kontron Instruments, Mailand/Italien) verfolgt wurde. Zur Anwendung kamen dabei mit Naturkautschuk-Septen (Sigma, Taufkirchen) verschlossene Halbmikro-Glasküvetten (Ochs Labortechnik, Bovenden). Gemessen wurde bei Raumtemperatur (25 °C), der Testansatz (1 ml) enthielt folgende Komponenten:

**Tab 6: Meßansatz für die Bestimmung der FDH**

Komponente	eingesetzte Menge [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration [mM]
Tris/HCl pH 7,5 (50 mM)	950	50
Benzylviologen (100 mM) <sup>1</sup>	20	2
Na-Dithionit (50 mM) <sup>1</sup>	2-3	0,1-0,15
Rohextrakt	1-15	–
Na-Formiat (1 M) <sup>1</sup>	20	20

<sup>1</sup>in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Puffer und Benzylviologen wurden vorgelegt und die Extinktion mit Na-Dithionit auf ca. 0,3 eingestellt, dieser Schritt diente der Entfernung von Restsauerstoff aus dem Messansatz. Nach Zusatz von Rohextrakt wurde zunächst die Blindreaktion vermessen, anschließend erfolgte die Zugabe von Na-Formiat und die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der einsetzenden Reaktion. Aus der ermittelten Extinktionsänderung wurde die Volumenaktivität der Probe wie folgt berechnet:

$$A_v = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_T}{d \cdot \epsilon \cdot v_p}$$

$A_v$  = Volumenaktivität [U/ml]

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

$d$  = Schichtdicke [cm]

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

$V_T$  = Volumen des Testansatzes [ml]

$v_p$  = Volumen der eingesetzten Probe [ml]

Ein Unit ist definiert als Reduktion von 1  $\mu\text{mol}$  Benzylviologen pro Minute (AXLEY *et al.*, 1990). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Probe (s. 2.13.1.) konnte die spezifische Aktivität [U/mg] berechnet werden.

## 2.16. Bestimmung der b-Galactosidase-Aktivität

### 2.16.1. Zellanzucht

Je 20 ml TP-Medium wurden mit 0,4 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur versetzt und bei 37 °C inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 erfolgte die Induktion des *lac*-Promotors durch Zugabe von 50 mM IPTG (Endkonzentration). Die Kulturen wurden weitere 2 h bei 37 °C inkubiert, danach 5 min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (2 min, 10 000 g) in mehreren Aliquots von je 1 ml geerntet. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -20 °C.

### 2.16.2. Aktivitäts-Bestimmung (MILLER, 1992, mod.)

Je nach zu erwartender Aktivität wurde die Zellmenge, welche 0,1-1,0 ml Kulturvolumen entsprach, in 950  $\mu\text{l}$  Z-Puffer (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Permeabilitätsmix (0,25 % (w/v) CTAB; 0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat). Nach weiteren 10 min bei RT wurde die Reaktion durch Zusatz von 100  $\mu\text{l}$  Substratlösung (ONPG, 4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet und nach Gelbfärbung des Ansatzes mit 500  $\mu\text{l}$  einer 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung abgestoppt. Nach Zentrifugation der Proben (10 min, 10 000 g) wurde die Absorption des Überstandes bei 420 nm an einem Spekol 1200 (Carl-Zeiss-Technology, Jena) bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zellpellet. Die Enzymaktivität (Miller-Units) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{1000 \cdot A_{420}}{t \cdot v \cdot \text{OD}_{600}}$$

A = Aktivität [Miller-Units]

$A_{420}$  = Absorption des Überstandes bei 420 nm

t = Reaktionszeit [min]

v = ursprüngliches Volumen der eingesetzten Probe [ml]

$\text{OD}_{600}$  = optische Dichte der Kultur unmittelbar vor der Zellernte

## 2.17. Gelretardations-Experimente mit SelB bzw. SelB-Domänen aus *E. acidaminophilum*

Für die Gelretardations-Experimente wurden eine Reihe verschiedener Bindungs- und Elektrophorese-Bedingungen getestet (Tab. 7). Je 1 pmol radioaktiv markiertes Transkript (20 000 bis 50 000 cpm) wurde in 20 µl Bindungspuffer mit unterschiedlichen Mengen des gereinigten Proteins für 15-30 min bei Raumtemperatur oder 30 °C inkubiert. Unspezifische Bindungen sollten durch Zusatz eines 100-fachen molaren Überschusses an Hefe-tRNA (Sigma, Taufkirchen) unterdrückt werden. Danach wurde der Ansatz mit 6 % Glycerin versetzt (falls nicht bereits im Puffer vorhanden) und in einem 4,5-5 %igen (SelB und SelB-Domänen) bzw. 10 %igen (SelB-Domänen) nativen Polyacrylamidgel bei 8 V/cm für ca. 2 h aufgetrennt. Wenn die Elektrophorese bei 4 °C erfolgte, wurde der Ansatz vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei dieser Temperatur inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines 'Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film' (Roche Diagnostics, Mannheim) sichtbar gemacht.

**Tab. 7: Bedingungen in Gelretardations-Experimenten mit SelB und SelB-Domänen**

SelB und SelB-Domänen				
Bindungspuffer	Inkubation	Gelmatrix <sup>1</sup>	Elektrophorese	
50 mM K-Phosphat, pH 7,0 5 mM Mg-Acetat 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM GTP [0,02 % Tween 20] <sup>2</sup>	30 min, 30 °C	50 mM K-Phosphat, pH 7,0 5 mM Mg-Acetat 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 5 % PAA (60:1)	4 °C	
50 mM Tris/Acetat, pH 7,0 50 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 0,5 mM GTP [5 % Glycerin] <sup>2</sup>	20 min, RT	40 mM Tris-Acetat, pH 7,0 4,5 % PAA (60:1)	RT	
89 mM Tris/Borat, pH 7,0 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM GTP [5% Glycerin] <sup>2</sup>	15 min, RT	89 mM Tris/Borat, pH 7,0 1 mM DTT 4,5 % PAA (60:1)	RT	
40 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 0,5 mM GTP [10 % Glycerin] <sup>2</sup>	20 min, RT	45 mM Tris/Borat, pH 8,3 1 mM EDTA (0,5×TBE) 4,5 % PAA (60:1)	4 °C	

Fortsetzung Tab. 7

SelB-Domänen					
Bindungspuffer		Inkubation	Gelmatrix <sup>1</sup>		Elektrophorese
160	mM K-Glutamat, pH 7,5	15 min, RT	40	mM Tris/Acetat, pH 7,5	RT
20	mM MgCl <sub>2</sub>		1	mM EDTA	
2	mM DTT			(1×TAE)	
			20	mM Mg-Acetat	
			10	% PAA (37,5:1)	
40	mM Hepes/KOH, pH 7,9	15 min, 30 °C	50	mM Tris/Glycin, pH 9,4	4 °C
5	mM MgCl <sub>2</sub>		1	mM DTT	
1	mMDTT		10	% PAA (37,5:1)	

<sup>1</sup> identisch mit dem Laufpuffer

<sup>2</sup> Experimente mit und ohne diese Komponenten wurden durchgeführt.

## 2.18. Oligonukleotide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotide (Tab. 8) wurden von den Firmen Metabion (Martinsried), MWG-Biotech (Ebersberg) oder Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein) bezogen. Für *in-vitro*-Synthesen von RNA und für *primer-extension*-Experimente wurden HPLC-gereinigte Oligonukleotide verwendet.

Tab. 8: Übersicht über verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
SA9F	GCA ATG ACG GCG TAA TAG AGC	Herstellung von Hybridisierungs-Sonden
SA223R	GCC TAG ATT CGT ATG TAC CAC	s. o.
GS1708N	TAA TCA CAA AGG CAG ACA CGG	RT-PCR, Herstellung von Hybridisierungs-Sonden
GS2502R	CAC TAC AAA CTG CGG GTC TCC	s. o.
GS3443R	ACA CCA GCA CCC ATC TAC TCC	s. o.
SDBV	ACI GGI TTY GGH YTI YTI GGI CA <sup>1</sup>	Herstellung von Hybridisierungs-Sonden
SDUH	IAR ICC ICC ISW IGT YTS IGS <sup>1</sup>	s. o.
SCNORN1	TTC AGC AAG AGA ATT TGG GAG	s. o.
SCNORC1	CCT TAA TTT ACA TAA TTG GCG G	s. o.
GS1527R	TAC TAT GCC CGC CCT TTT ACC	RT-PCR
SD2V	GGC CCA TCT AAA CAA GTA TGC AGC	s. o.
GS521	CTG AGC AAG GAA GAA AAG AGC	s. o.
SCEXT1	Cy5-CCA CCC AGG AGG CTC TTA AC	primer extension
SD1EXT1	Cy5-GTC AAA GCC TAC AAG AAG CC	s. o.
PREXSA	Cy5-TTT GCT CCC TTA TGA CCT CG	s. o.
SAEXT2	Cy5-CCA GCT CTA TTA CGC CGT C	s. o.

**Fortsetzung Tab. 8**

PREXSB	Cy5- <b>ACT ATG CCC GCC CTT TTA CC</b>	s. o.
MUKPNDN	<b>GTA GAT GGG TGC TGG TAC CGT GCC CTC TGG TCT TC</b>	Mutagenese ( <i>KpnI</i> -Schnittstelle in pTN2 eingeführt)
MUKPNUP	<b>GAA GAC CAG AGG GCA CGG TAC CAG CAC CCA TCT AC</b>	s. o.
SCECKPND	<b>CGG GGT ACC TGC TTT CGT GAT AAT ACG CTG</b>	Klonierung von <i>selC<sub>Ec</sub></i> in pTN2K
SCECKPNU	<b>CGG GGT ACC TGA TGG CAG TCT GAT TAT TGG</b>	s.o.
SBE1	<b>GCG GAT CCG ATG ACG ATG ACA AAA TGA AGA ATA TAA TAA TAG GAA CG</b>	Klonierung von <i>selB</i> in pQE30
SBE359	<b>GCG GAT CCG ATG ACG ATG ACA AGA AAA AAC ACA AGA GGT TTG AC</b>	Klonierung von <i>selB</i> (Domäne 4) in pQE30
SBE494	<b>GCG GAT CCG ATG ACG ATG ACA AAA AGA TTG AAG AAA ATC TGG CT</b>	Klonierung von <i>selB</i> (Domäne 4b) in pQE30
SBE627	<b>GCG TCG ACC TAT GAA AGG ACC CGC TTT TC</b>	Klonierung von <i>selB</i> , <i>selB</i> -Bereichen in pQE30 bzw. pT7-7
ET7H	<b>GCT ATT CCA TAT GAG AGG ATC GCA TCA CC</b>	Klonierung von <i>selB</i> in pT7-7
STG5V	<b>CGA CGA GGT CTC CGC GCC AAG AAT ATA ATA ATA GGA ACG G</b>	Klonierung von <i>selB</i> in pASK-IBA5
STG5VD4	<b>CGA CGA GGT CTC GGC GCC CCA AAA AAA CAC AAG AGG TTT G</b>	Klonierung von <i>selB</i> (Domäne 4) in pASK-IBA5
STG5VD4B	<b>CGA CGA GGT CTC GGC GCC AAG ATT GAA GAA AAT CTG GCT TC</b>	Klonierung von <i>selB</i> (Domäne 4b) in pASK-IBA5
STG5H	<b>CGA CGA GGT CTC GTA TCA CTA TGA AAG GAC CCG CTT TT</b>	Klonierung von <i>selB</i> , <i>selB</i> -Bereichen in pASK-IBA5
EXPV7SB	<b>CGA CGA GGT CTC GGC GCA AGA ATA TAA TAA TAG GAA CGG CAG</b>	Klonierung von <i>selB</i> in pASK-IBA7
PRO1IIVT	<b>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</b>	<i>In-vitro</i> -Transkription (Promotor-Strang)
GRDB1IIVT	<b>TTC TAT TTC TTT AAC CAT AGA TGC ACC GCA TCT AGT ACA AGT GCC TCA TGT CCT ATA GTG AGT CGT ATT A</b>	<i>In-vitro</i> -Transkription (Template-Strang)
PXIVT57	<b>TTT GGA ACT CTG GAT ATT TTT CAG CAA CTG CTG AAA CCT CAG TGG CTG AGA CAA ACC TAT AGT GAG TCG TAT TA</b>	s. o.
SD1IIVT54	<b>AGA CCG ACA AGC GCC TTG GCC AAA TCC TCT GGC CCT ATC TTG GCT GCT CAG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA</b>	s. o.
GB1IIVTM1	<b>TTC TAT TTC TTT AAC CAT AGA TGC TGC GCA TCT AGT ACA AGT GCC TCA TGT CCT ATA GTG AGT CGT ATT A</b>	s. o.
PXIVTM1	<b>TTT GGA ACT CTG GAT ATT TTT CAG CAA GGG CTG AAA CCT CAG TGG CTC AGA CAA ACC TAT AGT GAG TCG TAT TA</b>	s. o.
SD1IIVTM1	<b>AGA CCG ACA AGC GCC TTG GCC AAA TTT TCT GGC CCT ATC TTG GCT GCT CAG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA</b>	s. o.
SBSCDN	<b>CGC GGA TCC TGG GAT AGG GAG GAT TTG ATG</b>	Klonierung von <i>selB</i> , <i>selC</i> in pACYC184
SBSCUP	<b>CGC GTC GAC ATC CGT TGC ACT GTG CTT TAC</b>	s. o.

**Fortsetzung Tab. 8**

SBSCDN3	CGC GTC GAC ATT AAA TCA ATC AGG AAA GAG GCG	Klonierung von <i>selC</i> in pACYC184-Derivate
MUCLADN	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATA TCG ATT ACG AAT TCG AGC TCG G	Mutagenese ( <i>Clal</i> -Schnittstelle in pTN2 eingeführt)
MUCLAUP	CCG AGC TCG AAT TCG TAA TCG ATA TGG TCA TAG CTG TTT CCT G	s. o.
MUSACDN	CCT ATA CCT TGT CTG CGA GCT CCC CGC GTT GCG TC	Mutagenese ( <i>SacI</i> -Schnittstelle in pACYC184 eingeführt)
MUSACUP	GAC GCA ACG CGG GGA GCT CGC AGA CAA GGT ATA GG	s. o.
FUSECNTER	CGA CGA GGT CTC GGA TCC GGT TTT TGG AGA TGT TGT TGA	Klonierung von <i>selB<sub>Ec</sub>-selB<sub>Ea</sub></i> -Fusionen in pACYC184
FUSEACTER1	CGA CGA CGT CTC GTC GAC TGC ATG CCT ATG AAA GG	s. o.
FUSEACTER2	CGA CGA GGT CTC GTC GAC TGC ATG CCT ATG AAA GG	s. o.
FUSECRGD	CGA CGA GGT CTC GTC GCC ACG GTT AAT CTG CT	s. o.
FUSECNP	CGA CGA GGT CTC CGG GTT AAG CAT CAC GAC GC	s. o.
FUSECLR	CGA CGA GGT CTC TCG CAG ACG TTC GCG CCC AG	s. o.
FUSECFS	CGA CGA GGT CTC GCT GAA GCC CGC TTT GTG AT	s. o.
FUSEARGD	CGA CGA CGT CTC GGC GAT GTA CTG GCA AAG CC	s. o.
FUSEANP	CGA CGA CGT CTC AAC CCA AAA AAA CAC AAG AGG TTT G	s. o.
FUSEALR	CGA CGA GGT CTC CTG CGC TCA AGA GTT GAG AG	s. o.
FUSEAFS	CGA CGA GGT CTC TTC AGT GAT TCT GAT ATT AAA ATA A	s. o.
GB1SMSSD	GTA CTA GAT GCG GTG CAA GCA TGG TTA AAG AAA TAG AAA GAT CTG G	Mutagenese des putativen <i>grdB1</i> -SECIS-Elements
GB1SMSSU	CCA GAT CTT TCT ATT TCT TTA ACC ATG CTT GCA CCG CAT CTA GTA C	s. o.
GB1LP1D	GGC ACT TGT ACT AGA TGC GCA GCA TCT ATG GTT AAA GAA ATA G	s. o.
GB1LP1U	CTA TTT CTT TAA CCA TAG ATG CTG CGC ATC TAG TAC AAG TGC C	s. o.
GB1SSRPD	CTA CAT GAG GCA CTT GTA CTG CTT GCG GTG CAA GCA TGG	s. o.
GB1SSRPU	CCA TGC TTG CAC CGC AAG CAG TAC AAG TGC CTC ATG TAG	s. o.
PXUSMSSD	GTC TGA GCC ACT GAG GTT AGC GCA GTT GCT GAA AAA TAT CCA	Mutagenese des putativen <i>prxU</i> -SECIS-Elements
PXUSMSSU	CTG GAT ATT TTT CAG CAA CTG CGC TAA CCT CAG TGG CTC AGA	s. o.
PXULP1D	GAG CCA CTG AGG TTT CAG CCC TTG CTG AAA AAT ATC CAG AG	s. o.
PXULP1U	CTC TGG ATA TTT TTC AGC AAG GGC TGA AAC CTC AGT GGC TC	s. o.
PXUSSRPD	CTG AGG TTA GCG CAG TTG CGC TAA AAT ATC CAG AGT TCC AAA AGC	s. o.

**Fortsetzung Tab. 8**

PXUSSRPU	GCT TTT GGA ACT CTG GAT ATT TTA GCG CAA CTG CGC TAA CCT CAG	s. o.
SD1SMPGD	CTG AGC AGC CAA GAT AGG CGG AGA GGA TTT GGC CAA GG	Mutagenese des putativen <i>selD1</i> -SECIS-Elements
SD1SMPGU	CCT TGG CCA AAT CCT CTC CGC CTA TCT TGG CTG CTC AG	s. o.
SD1LP1D	GCC AAG ATA GGG CCA GAA AAT TTG GCC AAG GCG CTT G	s. o.
SD1LP1U	CAA GCG CCT TGG CCA AAT TTT CTG GCC CTA TCT TGG C	s. o.
SD1PGRPD	GAT AGG CGG AGA GGA TTT CCG CAA GGC GCT TGT CGG TC	s. o.
SD1PGRPU	GAC CGA CAA GCG CCT TGC GGA AAT CCT CTC CGC CTA TC	s. o.
GRDBKP1	GAT CAA GCT TAA CTT CTA CAT GAG GCA CTT G	Klonierung eines <i>grdB1</i> - Fragments in pSKAGS
GRDBKP2	GAT CGG GCC CGA TCT TTC TAT TTC TTT AAC C	s. o.
GRDBCP1	GAT CAA GCT TAA CTT CTA CAT GCG GCA CTT G	s. o.
PRXUKP1	GAT CAA GCT TTA CAT TTG TCT GAG CCA CTG AG	Klonierung eines <i>prxU</i> - Fragments in pSKAGS
PRXUKP2	GAT CGG GCC CAG CTT TTG GAA CTC TGG ATA T	s. o.
PRXUCP1	GAT CAA GCT TTA CAT TTG TCT GCG CCA CTG AG	s. o.
SELD1KP1	GAT CAA GCT TAG CTT CGG GCT GAG CAG CCA AG	Klonierung eines <i>selD1</i> - Fragments in pSKAGS
SELD1KP2	GAT CGG GCC CGG AAG ACC GAC AAG CGC CTT GG	s. o.
SELD1CP1	GAT CAA GCT TAG CTT CGG GCT GCG CAG CCA AG	s. o.

<sup>1</sup>I = Inosin; H = A oder C oder T; R = A oder G; S = C oder G; W = A oder T; Y = C oder T

## 2.19. Geräte und Chemikalien

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

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

Sorvall (Hanau): Zentrifuge RC 5BPlus  
Roth (Karlsruhe): Magnetrührer R 1000

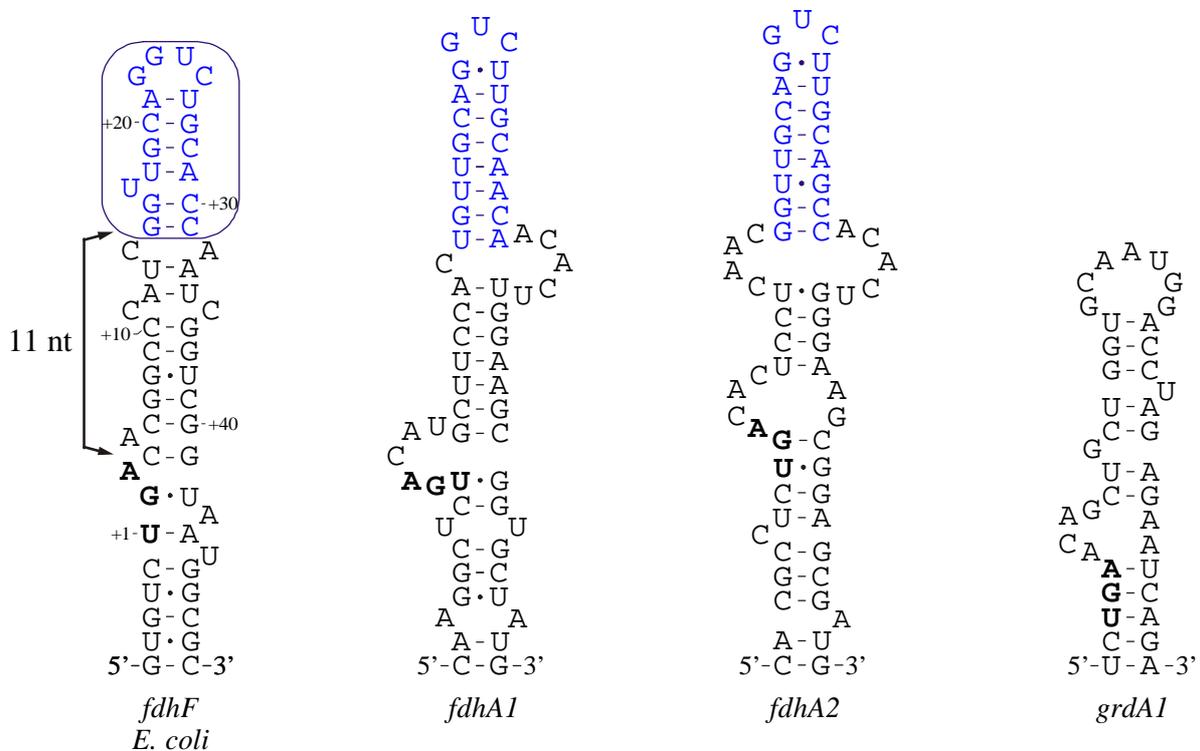
Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Gerbu (Gaiberg) im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen. Weiterhin wurden Chemikalien und Enzyme folgender Firmen bzw. Anbieter eingesetzt:

Appligene-Oncor (Heidelberg):	Lysozym, Ampicillin
MBI Fermentas (St. Leon-Rot):	Restriktionsenzyme, $\lambda$ -DNA, NTP's
Messer Griesheim (Krefeld):	Stickstoff (4.0), Wasserstoff (3.0), Formiergas
New England Biolabs (Frankfurt/Main):	Restriktionsenzyme
Peqlab (Erlangen):	dNTP's
Risø National Laboratory Isotope Division: (Roskilde/Dänemark)	[ <sup>75</sup> Se]-Selenit (176 mCi/mmol)
Serva (Heidelberg):	BSA, Lysozym, Pepton
University of Missouri Research Reactor Center: (Columbia/MO, USA)	[ <sup>75</sup> Se]-Selenit (88 Ci/mmol)

### 3. Experimente und Ergebnisse

#### 3.1. Putative Sekundärstrukturen der Selenoprotein-mRNAs aus *E. acidaminophilum*

Um mRNA-Elemente zu identifizieren, die möglicherweise den Einbau von Selenocystein in Proteine von *E. acidaminophilum* vermitteln, wurde mit Hilfe des Programmes MFOLD (s. 2.11.3.) die unmittelbare Umgebung des Selenocystein-Codons (UGA) der bisher bekannten Selenoprotein-Gene von *E. acidaminophilum* nach mRNA-Sekundärstrukturen durchsucht, bzw. verschiedene bereits postulierte Strukturen (SONNTAG, 1998; GRÄNTZDÖRFFER, 2000; GURSINSKY *et al.*, 2000; B. SÖHLING, persönliche Mitteilung) nochmals überprüft und verglichen. Mit Ausnahme von *grdA* konnten direkt stromabwärts vom UGA-Codon aller untersuchten Gene Strukturen formuliert werden, welche als Gemeinsamkeit eine 15-20 Basen umfassende Haarnadelstruktur aufwiesen, die in einem Abstand von elf bis dreizehn Basen zum Selenocystein-Codon lokalisiert war (Abb. 2). Den allgemeinen Aufbau betreffend, zeigten die postulierten Strukturen somit gewisse Homologien zu den für *E. coli* und andere Bakterien beschriebenen SECIS-Elementen (HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998a), andererseits konnten jedoch keine konservierten Nukleotid-Sequenzen identifiziert werden.



Fortsetzung nächste Seite



Neben der unmittelbaren Umgebung des Selenocystein-Codons wurde auch der 3'-nicht-translatierte Bereich der bekannten Selenoprotein-Gene aus *E. acidaminophilum* analysiert. Dabei konnten jedoch weder Strukturen mit Homologien zu den in Eukaryoten (LOW und BERRY, 1996) oder Archaea (WILTING *et al.*, 1997) gefundenen SECIS-Elementen, noch andere konservierte mRNA-Sekundärstrukturen identifiziert werden.

### 3.2. Klonierung von *selA* aus *E. acidaminophilum*

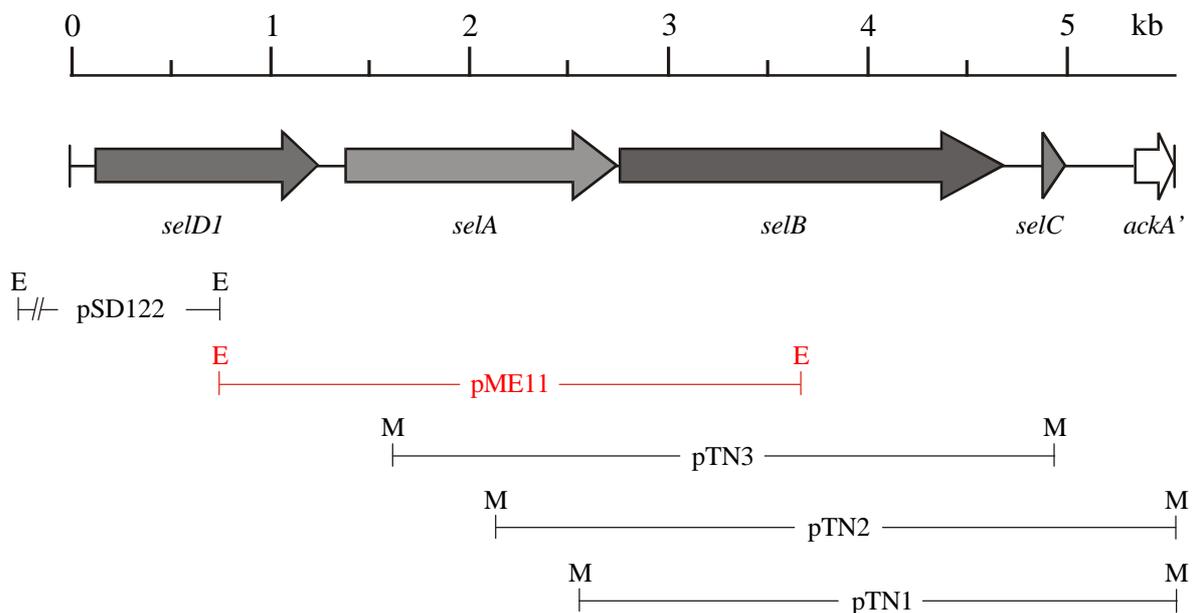
Den Ausgangspunkt für die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Charakterisierung der *sel*-Genprodukte von *E. acidaminophilum* bildeten die aus einer *Mbo*I-Genbank stammenden Plasmide pTN1, pTN2 und pTN3 (GURSINSKY, 1996). Deren überlappende Inserts ergaben zusammen eine 4097 bp umfassende Genregion, auf der die Gene *selB* (Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor) und *selC* (tRNA<sup>Sec</sup>) sowie der größte Teil des Gens *selA* (Selenocystein-Synthase) aus *E. acidaminophilum* kloniert vorlagen, wobei alle drei Gene die gleiche Transkriptionsrichtung aufwiesen. Zur weiteren Analyse des Selenocystein-inkorporierenden Systems von *E. acidaminophilum* sollte als erster Schritt *selA* vollständig kloniert werden.

Der Vergleich der bereits vorliegenden Sequenz mit den in Datenbanken aufgelisteten Genen bzw. Proteinen anderer Organismen zeigte, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nur ein Bereich von ca. 40-50 Nukleotiden im 5'-Bereich von *selA* aus *E. acidaminophilum* zu klonieren war, um das Gen vollständig zu isolieren. Aus vorangegangenen Southern-Hybridisierungen mit chromosomaler DNA war bekannt, dass *selA* auf einem ca. 3 kb großen *Eco*RI-Fragment lokalisiert ist (GURSINSKY, 1996), wobei die entsprechende Schnittstelle stromabwärts von *selA* etwa 2,2 kb vom 5'-Ende des Gens entfernt in *selB* liegt. Durch Klonierung dieses *Eco*RI-Fragmentes würde die bereits vorliegende Genregion also um ca. 0,8 kb verlängert, wodurch das *selA*-Gen auf jeden Fall vollständig isoliert wäre.

Als Ausgangspunkt für die Klonierung diente partiell mit *Eco*RI verdaute und in einem Saccharose-Dichtegradienten separierte chromosomale DNA von *E. acidaminophilum* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. KOHLSTOCK). Die Fraktion mit dem größten Anteil an Fragmenten einer Größe von ca. 3 kb wurde gegen TE-Puffer dialysiert und zur Ligation mit *Eco*RI-geschnittenem Vektor pUC18 eingesetzt. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* XL1-Blue MRF' wurden ca. 1200 Klone auf Nylonmembranen ausgestrichen und anschließend einer Koloniehybridisierung unterzogen. Als Sonde diente ein ca. 0,2 kb großes PCR-Fragment, welches mit den Primern SA9F und SA223R aus dem bereits vorliegenden Bereich des *selA*-Gens (auf pTN3) gewonnen und anschließend mit Digoxigenin markiert wurde. Dabei konnte ein Klon isoliert werden, welcher das gesuchte *Eco*RI-Fragment enthielt, das entsprechende Plasmid wurde mit pME11 bezeichnet. Nach Sequenzierung des Fragments, dessen Größe mit 2896 Basen bestimmt wurde, konnte der fehlende Bereich des *selA*-Gens (44 Nukleotide) identifiziert werden. Das an Hand der DNA-Sequenz abgeleitete Protein wies 467 Aminosäuren auf, das Molekulargewicht betrug 52,5 kDa. Stromaufwärts von *selA* und in gleicher

Transkriptionsrichtung wurde der 3'-Bereich eines offenen Leserahmens identifiziert, dessen Produkt deutliche Homologien zu Selenophosphat-Synthetasen verschiedener Organismen aufwies. Die vollständige Klonierung dieses Gens (auf dem Insert des Plasmids pSD122) erfolgte durch J. JÄGER. Unabhängig davon wurde ebenfalls von J. JÄGER ein zweites, *selD*-homologes Gen identifiziert, dieses war nicht mit dem erwähnten *selDABC*-Cluster assoziiert. Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen beider Gene waren zu 62,9 % identisch (GURSINSKY *et al.*, 2000)

Die folgende Abb. verdeutlicht die Anordnung der aus *E. acidaminophilum* klonierten Gene *selD1*, *selA*, *selB* und *selC*.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der klonierten *sel*-Gene aus *E. acidaminophilum*.** Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierte Fragment ist rot hervorgehoben. Die Transkriptionsrichtung der Gene ist durch Pfeile verdeutlicht. Zur Klonierung genutzte *MboI* (M)- und *EcoRI* (E)-Schnittstellen sind angegeben.

Die vollständige Sequenz der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genregion inklusive postulierter bzw. identifizierter Signale der Transkription und Translation (s. 3.3.) ist im Anhang angeführt, beginnend mit der intergenen Region stromaufwärts von *selD1*.

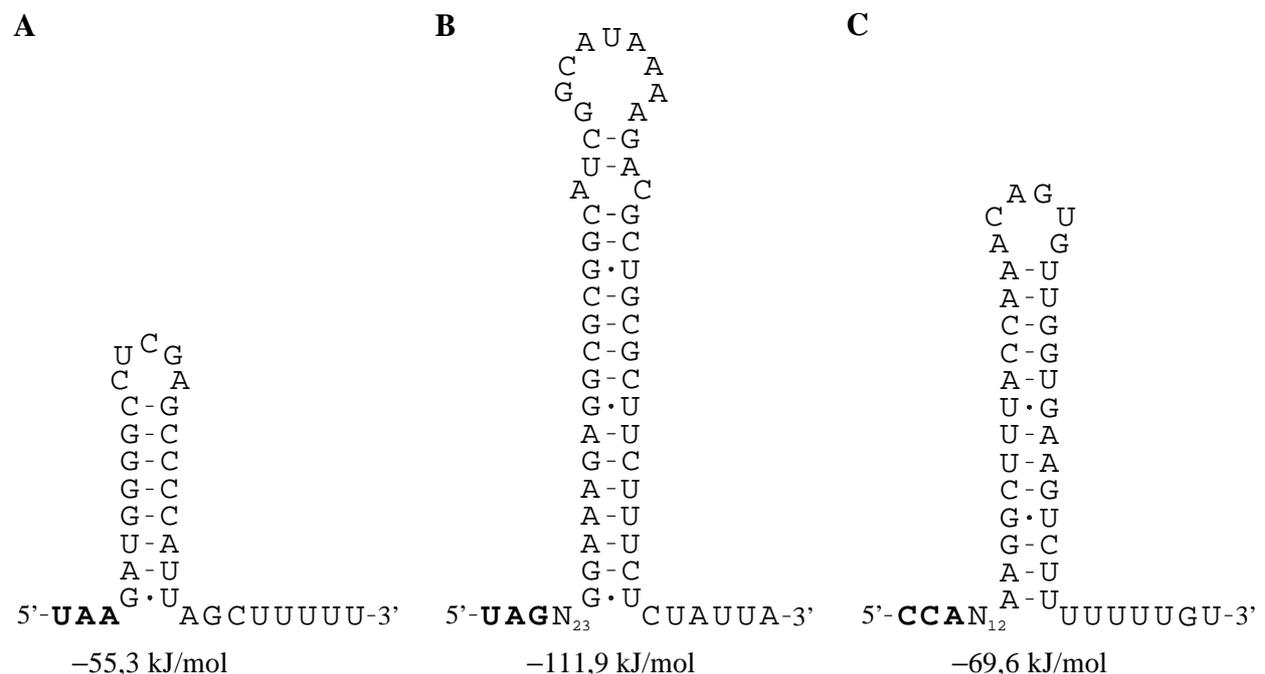
Durch Southern-Hybridisierung mit der für die Klonierung von *selA* verwendeten Sonde (s. o.) wurde nachgewiesen, dass im Genom von *E. acidaminophilum* nur eine Kopie des Gens der Selenocystein-Synthase vorliegt. Das Gleiche war in der vorangegangenen Diplomarbeit auch für *selB* und *selC* festgestellt worden. Die Daten für diese beiden Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nochmals bestätigt, als *selB*-spezifische Sonde diente ein 0,8 kb großes PCR-Fragment, das mit den Primern GS1708N und GS2502R sowie pTN2 als Template amplifiziert wurde. Als *selC*-spezifische Sonde wurde das Oligonukleotid GS3443R eingesetzt.

### 3.3. Untersuchungen zur Transkription der *sel*-Gene

#### 3.3.1. Analyse der DNA-Sequenz nach Transkriptions- und Translations-Signalen

Begünstigt durch den geringen AT-Gehalt der intergenen Bereiche der klonierten Genregion wurden stromaufwärts der Gene *selD1*, *selA* und *selC* jeweils mehrere Bereiche mit Homologie zur Konsensus-Sequenz (5'-TTGACA-17±1bp-TATAAT-3')  $\sigma^{70}$ -abhängiger *E. coli*-Promotoren (HARLEY and REYNOLDS, 1987) bzw.  $\sigma^A$ -abhängiger *Bacillus subtilis*-Promotoren (HELMANN, 1995) identifiziert. Eine Aussage über mögliche Startpunkte der Transkription sollte deshalb erst nach weiteren Untersuchungen erfolgen (s. 3.3.4).

Stromabwärts der Gene *selB* und *selC* wurden bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (GURSINSKY, 1996) potentielle mRNA-Sekundärstrukturen identifiziert, die im 3'-Bereich Uridin-reiche Sequenzen aufwiesen und deshalb als Rho-unabhängige Terminatoren fungieren könnten (PLATT, 1986). Nach der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Klonierung der Bereiche stromaufwärts von *selA* wurde auch für die intergene Region zwischen *selD1* und *selA* eine mRNA-Sekundärstruktur mit dem erwähnten Merkmal postuliert (Abb. 4).



**Abb. 4:** Postulierte mRNA-Sekundärstrukturen stromabwärts der Gene *selD1* (A), *selB* (B) und *selC* (C). Die Stopp-Codons der Gene *selD1* (UAA) und *selB* (UAG) sowie das 3'-Ende der tRNA<sup>Sec</sup>-Sequenz (CCA) sind fett hervorgehoben. Die Änderung der Freien Energie wurde mit dem Programm MFOLD kalkuliert.

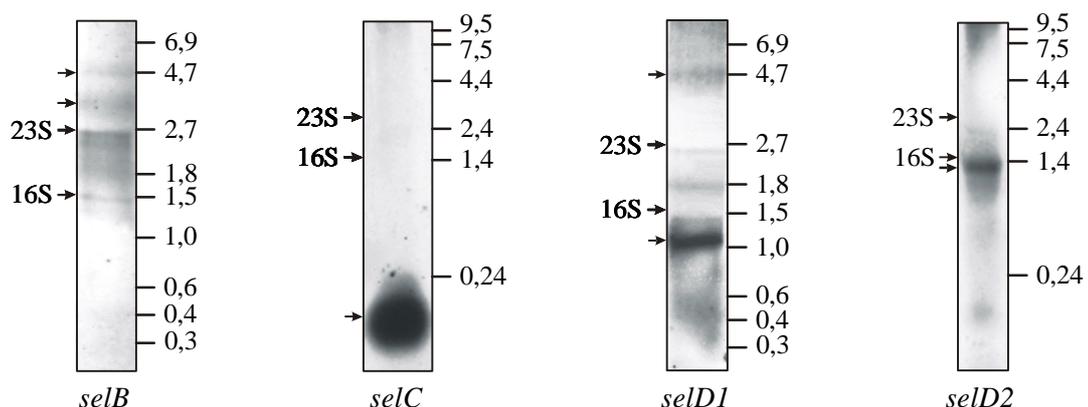
Die Gene *selD1*, *selA* und *selB* weisen jeweils das Start-Codon ATG auf, als Stopp-Codon werden UAA (*selD1*) sowie UAG (*selA* und *selB*) genutzt. Stromaufwärts der drei Protein-codierenden *sel*-Gene sind

die Sequenzen 5'-GGAGGT-3' (*selD1*) 5'-GAAGGGGT-3' (*selA*) und 5'-TAGGGAGG-3' (*selB*), die als Ribosomen-Bindestellen (SHINE und DALGARNO, 1974) in Frage kommen, in einem Abstand von sechs, zwölf bzw. fünf Nukleotiden zum Start-Codon lokalisiert.

### 3.3.2. Northern-Hybridisierungen

Die Anordnung von *selD1*, *selA*, *selB* und *selC* ließ vermuten, dass eine gemeinsame Transkription zumindest einiger dieser Gene vorliegt. Andererseits wurden mRNA-Sekundärstrukturen, die als Rho-unabhängige Terminatoren in Frage kommen, stromabwärts von *selD1* und *selB* (und natürlich auch 3' von *selC*) identifiziert (s. 3.3.1., Abb. 4). Dies deutete darauf hin, dass lediglich *selA* und *selB*, welche durch eine intergene Region von nur zehn Nukleotiden getrennt sind, zusammen transkribiert werden.

Um gemeinsame Transkripte der genannten Gene nachzuweisen, wurden Northern-Hybridisierungen mit Sonden aus dem Bereich von *selD1*, *selB* und *selC* durchgeführt. Zur klaren Unterscheidung der beiden Gene der Selenophosphat-Synthase erfolgte außerdem eine Hybridisierung mit einer *selD2*-Sonde. Die Sonden wurden durch PCR mit den Primerpaaren SDBV und SDUH (*selD1*, *selD2*), GS1708N und GS2502R (*selB*) sowie SCNORN1 und SCNORC1 (*selC*) mit den Plasmiden pME11, pSD15 bzw. pTN2 als Template hergestellt und anschließend mit Digoxigenin markiert. Erwähnenswert ist, dass im Southern-Blot mit chromosomaler DNA aus *E. acidaminophilum* beide *selD*-Sonden ausschließlich mit der komplementären Sequenz und nicht mit dem jeweils anderen Gen hybridisierten (J. JÄGER, persönliche Mitteilung). Für Northern-Blots wurde Gesamt-RNA von *E. acidaminophilum* mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese separiert, auf Nylonmembranen übertragen und mit den entsprechenden Sonden hybridisiert (Abb. 5).

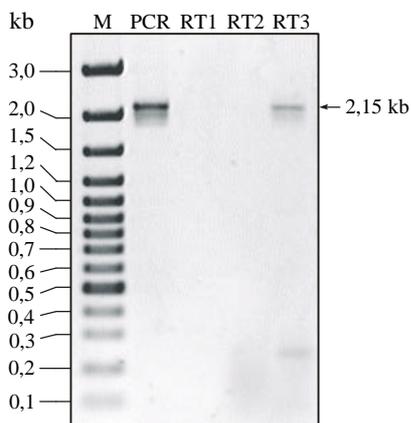


**Abb. 5: Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum*.** Die Hybridisierung erfolgte jeweils mit einer Sonde aus dem Bereich der unterhalb der Blots angegebenen Gene. Signale, welche einem möglichen Transkript zugeordnet werden konnten, sowie die Positionen der 16S- und 23S-rRNA sind auf der linken Seite durch Pfeile gekennzeichnet. Die Fragmente der verwendeten RNA-Standards sind jeweils auf der rechten Seite angegeben.

Mit einer Sonde gegen *selB* wurden Signale bei ca. 4,7 kb sowie bei ca. 3,5 kb erhalten, was auf eine gemeinsame Transkription der Gene *selD1*, *selA* und *selB* ( $\geq 4,5$  kb) bzw. *selA* und *selB* ( $\geq 3,3$  kb) hindeutet. Die *selC*-Sonde ergab ein starkes Signal bei ca. 0,1 kb, welches vermutlich hauptsächlich der prozessierten tRNA (97 Nukleotide) zuzuordnen ist, wobei eine Unterscheidung zwischen dieser und dem primären Transkript (wahrscheinlich ca. 0,15 kb, s. 3.3.4.) im Fall des vorliegenden Blots nicht möglich war. Für eine gemeinsame Transkription von *selC* mit anderen Genen wurden hingegen keine Hinweise gefunden. Beide *selD*-Gene werden monocistronisch transkribiert (Signale bei 1,2 bzw 1,3 kb). Im Unterschied zu *selD2* ergab die *selD1*-Sonde ein zusätzliches Signal bei ca. 4,7 kb, wodurch das Vorliegen eines *selDIAB*-Transkriptes bestätigt wurde.

### 3.3.3. Nachweis eines gemeinsamen Transkripts durch RT-PCR

Zur Überprüfung der mittels Northern-Hybridisierung gewonnenen Daten wurden RT-PCRs mit Primerpaaren aus den Bereichen der Gene *selB* und *selD1* (GS1527R und SD2V) sowie *selC* und *selD1* (GS3443R und GS521) durchgeführt. Dazu wurde jeweils mit dem 3'-Primer eine reverse Transkription mit DNase-behandelter Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* durchgeführt, die erhaltene cDNA diente anschließend als Template für die PCR-Reaktion. Um auszuschließen, dass DNA-Kontaminationen (z. B. durch unvollständigen DNase-Verdau der RNA-Probe) zu PCR-Produkten führen, erfolgten Kontrollreaktionen mit RNase-behandelter RNA bzw. mit inaktivierter Reverser Transkriptase. Mit den Oligonukleotiden GS1527R und SD2V wurde mittels RT-PCR ein Fragment amplifiziert, dessen Größe (2,15 kb) dem Abstand der beiden Primer-Bindestellen in der vorliegenden DNA-Sequenz entsprach. Bei der PCR-Kontrollreaktion mit chromosomaler DNA wurde ebenfalls ein 2,15 kb großes Produkt erhalten (Abb. 6). Dagegen ergab die RT-PCR mit den Primern GS3443R und GS521, im Gegensatz zur Kontrolle mit chromosomaler DNA, kein Fragment der zu erwartenden Größe (ca. 3,7 kb). Dieses Resultat bestätigte die an Hand der Northern-Hybridisierungen vermutete Existenz eines gemeinsamen *selDIAB*-Transkriptes, während das Gen der tRNA<sup>Sec</sup> offensichtlich nicht zusammen mit den anderen *sel*-Genen transkribiert wird.

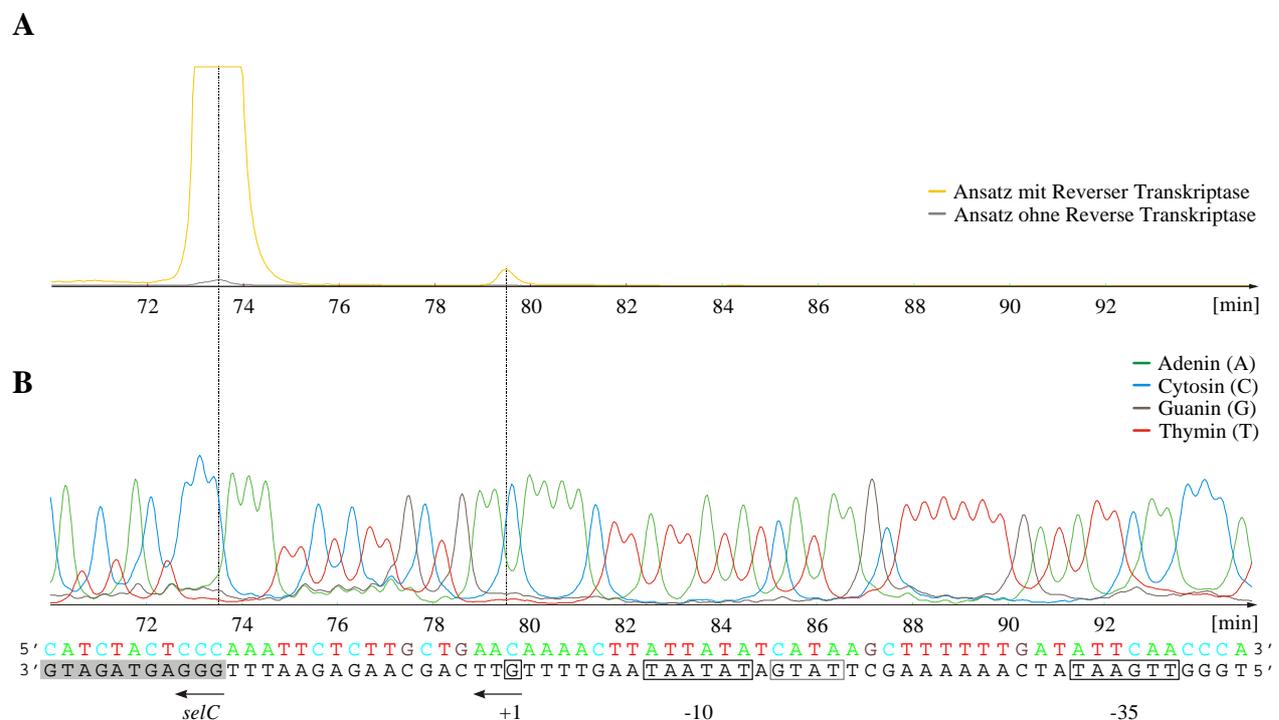


**Abb. 6: RT-PCR zum Nachweis eines *selDIAB*-Transkriptes.**  
M: DNA-Größenstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus)  
PCR: PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA aus *E. acidaminophilum*  
RT1: RT-PCR mit RNase-behandelter RNA aus *E. acidaminophilum*  
RT2: RT-PCR mit inaktiver (hitzenedenaturierter) Reverser Transkriptase  
RT3: RT-PCR mit intakter RNA und aktiver Reverser Transkriptase

### 3.3.4. Bestimmung von Transkriptions-Startpunkten mittels *primer extension*

Um die entsprechenden Transkriptions-Startpunkte zu identifizieren, wurden *primer-extension*-Experimente mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden aus dem Bereich der Gene *selC*, *selD1*, *selB* und *selA* durchgeführt.

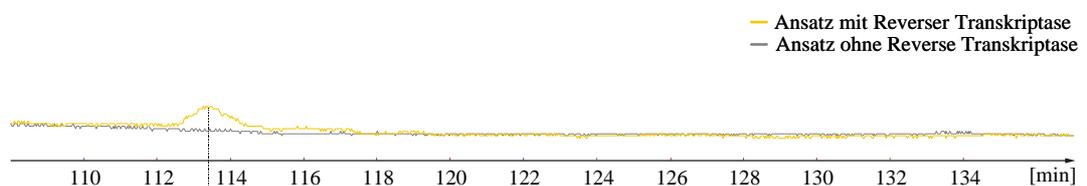
Der *selC*-spezifische Primer (SCEXT1) wurde so gewählt, dass er an die variable Schleife der tRNA bindet. Erwartungsgemäß ergab die Reaktion mit diesem Oligonukleotid ein sehr starkes Signal, welches exakt mit dem 5'-Ende der postulierten tRNA-Sequenz übereinstimmte (Abb. 7). Ein zweites, wesentlich schwächeres Signal entsprach einem Guanin, welches 17 Nukleotide stromaufwärts der tRNA-Sequenz lokalisiert war und offensichtlich das 5'-Ende des primären Transkripts darstellt. In 5'-Richtung von diesem Guanin, in einem Abstand von sieben Nukleotiden, befand sich eine mögliche -10-Region (5'-TATAAT-3'), weitere 17 Nukleotide stromaufwärts eine potentielle -35-Region (5'-TTGAAT-3'), so dass sich ein hoher Grad an Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz (5'-TTGACA-17±1 bp-TATAAT-3')  $\sigma^{70}$ -abhängiger *E. coli*-Promotoren (HARLEY and REYNOLDS, 1987) bzw.  $\sigma^A$ -abhängiger *Bacillus subtilis*-Promotoren (HELMANN, 1995) ergab. Auch die in Promotoren Gram-positiver Organismen an den Positionen -18 bis -15 häufig auftretende Sequenz 5'-TNTG-3' (GRAVES und RABINOWITZ, 1986; HELMAN, 1995) konnte im entsprechenden Abstand stromaufwärts des postulierten Transkriptionsstarts von *selC* identifiziert werden.



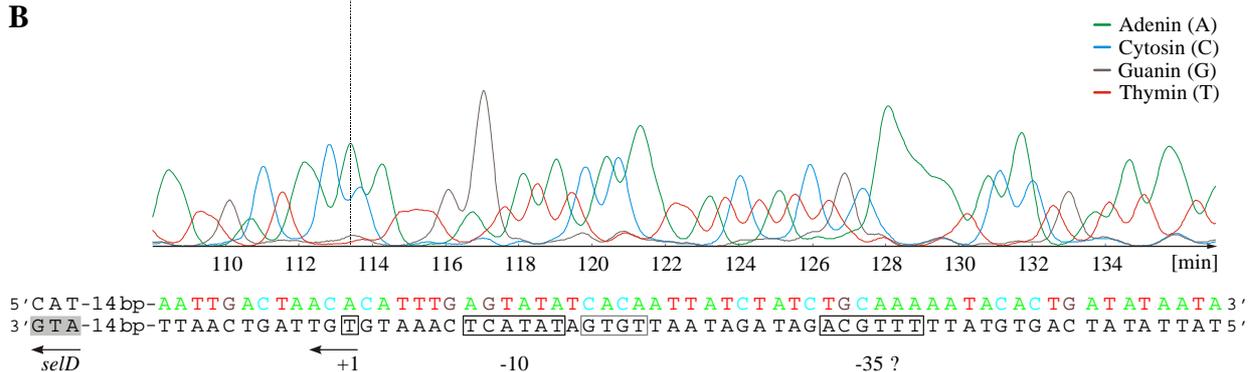
**Abb. 7: Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes des *selC*-Gens.** Dargestellt sind die am A.L.F.<sup>TM</sup>-Sequencer ermittelten Elutionszeiten der durch *primer extension* erhaltenen cDNA-Fragmente (A) sowie die mit dem gleichen Primer durchgeführte Sequenzreaktion (B). Unterhalb dieser ist der komplementäre, nicht-codierende DNA-Strang angegeben, die Sequenz der Selenocystein-spezifischen tRNA (*selC*), der ermittelte Transkriptions-Startpunkt (+1), die postulierte Promotorregion (-10/-35) und das TNTG-Motiv wurden gekennzeichnet.

Mit einem *selD1*-spezifischen Primer (SD1EXT1) wurde ein Signal erhalten, das auf ein Thymin, welches 25 Nukleotide stromaufwärts des entsprechenden Start-Codons lokalisiert war, als Startpunkt des Transkriptes schließen ließ (Abb. 8). In 5'-Richtung davon befand sich in einem Abstand von sechs Nukleotiden als mögliche Promotorregion die Sequenz 5'-TTTGCA<sub>-15bp</sub>-TATACT-3'. Die Übereinstimmung mit der -10-Region der Konsensus-Sequenz beträgt fünf Basen, mit der -35-Region sogar nur vier, und auch der Abstand zwischen diesen beiden Motiven wäre für einen Promotor nicht optimal. Wie bei *selC* befand sich stromaufwärts der -10-Region, durch ein Nukleotid von dieser getrennt, die oben erwähnte Sequenzfolge 5'-TNTG-3'.

A



B

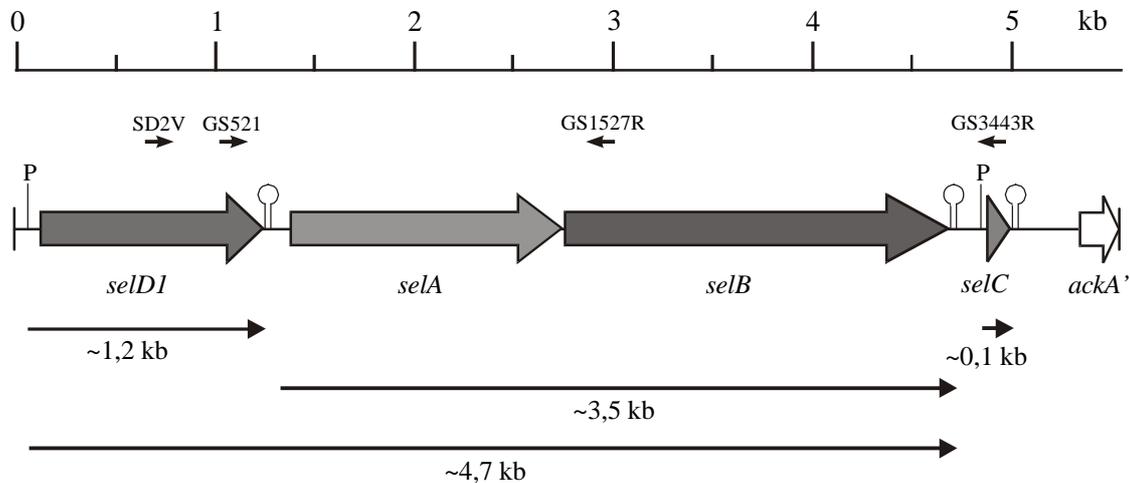


**Abb. 8: Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes des *selD1*-Gens.** Dargestellt ist die am A.L.F.<sup>TM</sup> - Sequencer ermittelte Elutionszeit des durch *primer extension* synthetisierten cDNA-Fragments (A) sowie die mit dem gleichen Primer durchgeführte Sequenzreaktion (B). Unterhalb dieser ist der komplementäre, nicht-codierende DNA-Strang angegeben, wobei der ermittelte Transkriptions-Startpunkt (+1), die postulierte Promotorregion (-10/-35), das TNTG-Motiv sowie das Start-Codon von *selD1* gekennzeichnet wurden.

Die *primer extension* mit einem *selA*-spezifischen Primer (PREXSA) ergab mehrere Signale, die verschiedenen Nukleotiden innerhalb der intergenen Region zwischen *selD1* und *selA* entsprachen (Daten nicht gezeigt). Von diesen konnte jedoch keines mit einem zweiten Primer (SAEXT2) bestätigt werden, auch die Analyse der jeweils stromaufwärts lokalisierten Sequenzen nach möglichen -10- und -35-Regionen ergab kein Ergebnis, welches eines dieser Signale eindeutig bevorzugen würde. Eine Bestimmung des Startpunktes des postulierten *selAB*-Transkriptes war somit nicht möglich.

Die Reaktion mit einem Primer aus dem Bereich von *selB* (PREXSB) erbrachte keinen Hinweis auf einen Transkriptions-Startpunkt direkt stromaufwärts dieses Gens.

In Abb. 9 sind die Ergebnisse hinsichtlich der Transkription der *sel*-Gene aus *E. acidaminophilum* schematisch dargestellt.



**Abb. 9: Transkription der Gene *selD1*, *selA*, *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum*.** Nachgewiesene Transkripte sind durch Pfeile unterhalb der entsprechenden Gene wiedergegeben. Pfeile oberhalb der Gene kennzeichnen die Lage der für RT-PCR-Reaktionen genutzten Primer. Mittels *primer extension* identifizierte Transkriptions-Startpunkte bzw. Promotoren (P) sowie an Hand der DNA-Sequenz postulierte mRNA-Sekundärstrukturen ( $\cap$ ), die eine Rho-unabhängige Termination der Transkription bewirken könnten, sind ebenfalls angegeben.

### 3.4. Komplementation von *E. coli*-Mutanten

Um einen Überblick zu erhalten, inwiefern die Produkte der *sel*-Gene aus *E. acidaminophilum* auch in *E. coli* aktiv sind bzw. mit den jeweils anderen Faktoren eines heterologen Systems korrekt interagieren, wurde untersucht, ob der Defekt der *E. coli*-Mutanten für *selA* (Stamm AH819), *selB* (WL81300) bzw. *selC* (MN1) durch die entsprechenden Gene des Gram-positiven Organismus komplementiert wird. Dabei sollte als Nachweis für einen in den jeweiligen Mutanten erfolgenden Selenocystein-Einbau die Aktivität des *E. coli*-eigenen Selenoproteins Formiat-Dehydrogenase H bestimmt und mit der eines Wildtyp-Stammes (*E. coli* FM433) verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der Gene *selA*, *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* in *E. coli* untersucht, entsprechende Experimente zur Selenophosphat-Synthetase werden gegenwärtig im Rahmen der Promotion von J. JÄGER durchgeführt. Da dieses Protein keine direkten Wechselwirkungen mit den anderen Faktoren, die für den Selenocystein-Einbau verantwortlich sind, eingeht, hat es für die Aufklärung des entsprechenden Mechanismus vermutlich keine Relevanz.

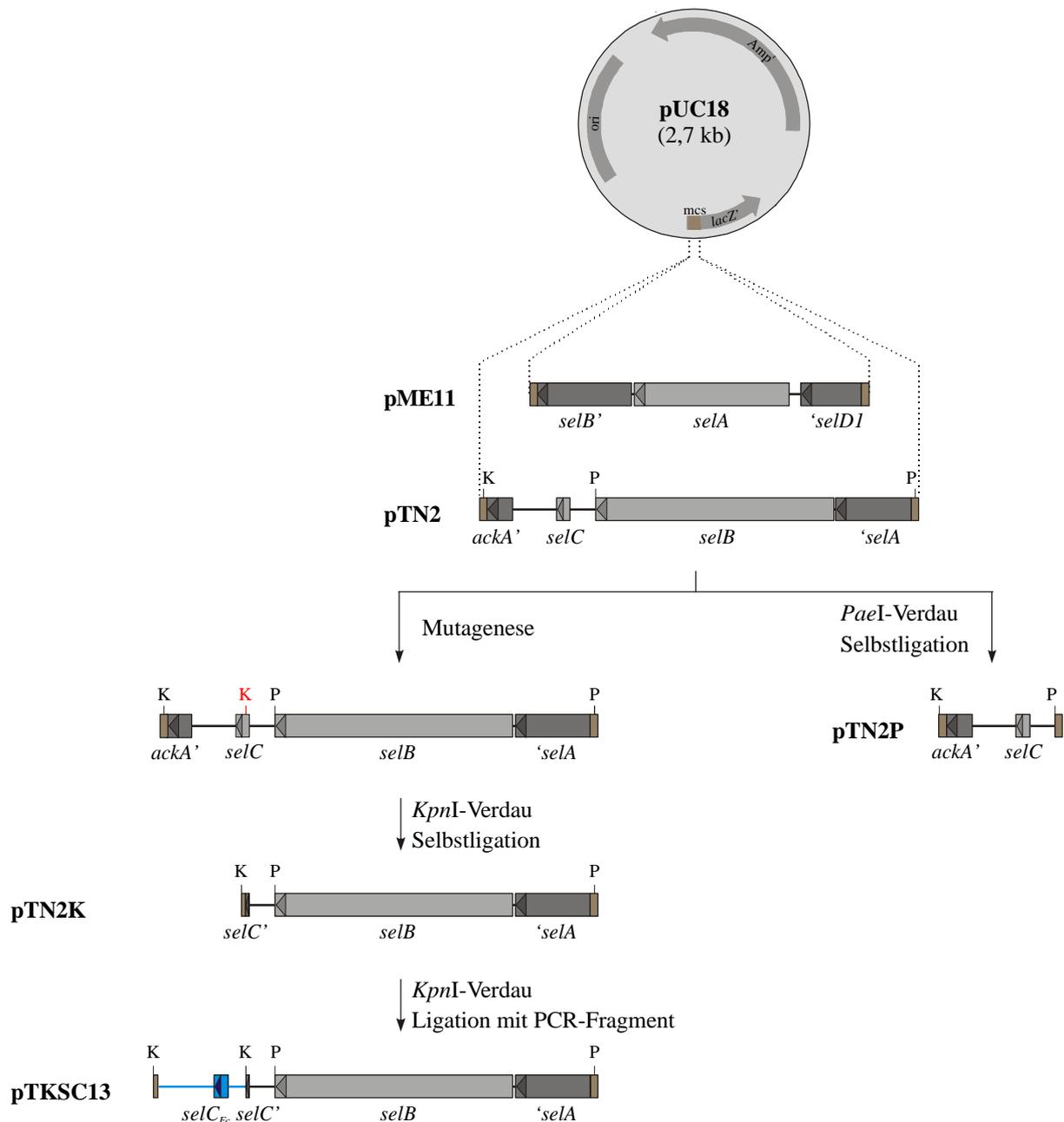
### 3.4.1. Konstruktion von Plasmiden für Komplementations-Experimente

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierte pUC18-Derivat pME11 trägt das vollständige Gen der Selenocystein-Synthase (*selA*), außerdem enthält es den 3'-Bereich (556 bp von 1044) des Gens der Selenophosphat-Synthetase (*selDI*) sowie den 5'-Bereich (794 bp von 1881) des Gens des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors SelB (*selB*). Das Plasmid pTN2, ebenfalls ein pUC18-Derivat, trägt die kompletten Gene *selB* und *selC* (Selenocystein-spezifische tRNA) sowie einen erheblichen Teil des 3'-Bereiches von *selA* (1077 bp von 1404). Die Transkriptionsrichtung aller genannten Gene ist entgegengesetzt zu der des auf dem Vektor vorliegenden *lacZ'*-Gens.

Um ein Plasmid zu erhalten, welches zwar noch das *selC*-Gen aufweist, nicht aber *selB*, wurde ein 3,0 kb großes *PaeI*(*SphI*)-Fragment aus pTN2 entfernt, wobei eine Schnittstelle aus der stromaufwärts von *selA'* liegenden *multiple cloning site* des Vektors (pUC18) stammte, die zweite befand sich direkt stromabwärts von *selB*. Das nach Selbstligation des anderen Fragmentes (Vektor plus restliches Insert) erhaltene Plasmid wurde mit pTN2P bezeichnet.

Zur Konstruktion eines Plasmids, welches *selB* enthält, nicht aber *selC*, standen keine geeigneten Schnittstellen zur Verfügung. Um *selC* zu entfernen, wurde eine *KpnI*-Schnittstelle in das Gen eingeführt. Direkt stromabwärts der innerhalb der tRNA-Sequenz (17 bp vom 5'-Ende entfernt) liegenden Nukleotide 5'-GGT-3' wurde durch zielgerichtete Mutagenese die Sequenz 5'-ACC-3' eingefügt, wodurch eine *KpnI*-Schnittstelle (5'-GGTACC-3') entstand. Zur Anwendung kam dabei die von WEINER *et al.* (1994) beschriebene Methode: mit zwei zueinander vollständig komplementären Primern (MUKPNDN und MUKPNUP), die in der Mitte die gewünschte Mutation trugen, wurde mit pTN2 als Template eine Polymerase-Reaktion durchgeführt. Anschließend erfolgte der Verdau der Template-DNA mit *DpnI*, einem Enzym, welches spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Nach Transformation des Ansatzes in *E. coli* XL1-Blue MRF' konnten die entsprechenden Plasmide mit der eingefügten Schnittstelle isoliert werden; durch *KpnI*-Verdau wurde anschließend ein 0,6 kb großes Fragment, auf dem der überwiegende Teil von *selC* lokalisiert war, entfernt. Die zweite Schnittstelle stammte dabei aus dem stromabwärts des Inserts gelegenen Teil der *multiple cloning site*. Das aus Vektor plus restlichem Insert bestehende zweite Fragment wurde einer Selbstligation unterzogen, das so gewonnene Plasmid erhielt die Bezeichnung pTN2K.

Als ein weiteres Konstrukt sollte *selC* aus *E. coli* zusammen mit *selB* aus *E. acidaminophilum* auf ein Plasmid gebracht werden. Zu diesem Zweck wurde mittels PCR (Primer SCECKPND und SCECKPNU) ein 0,6 kb großes Fragment, welches das *selC*-Gen inklusive des postulierten Promotors enthielt (LEINFELDER *et al.*, 1989a), von chromosomaler DNA aus *E. coli* FM433 amplifiziert und in die *KpnI*-Schnittstelle des Plasmids pTN2K ligiert. Von den erhaltenen Plasmiden wurde eines ausgewählt, bei denen das *selC*-Gen die gleiche Transkriptionsrichtung aufwies wie *selB* aus *E. acidaminophilum*, dieses Konstrukt wurde mit pTKSC13 bezeichnet. Abb. 10 zeigt schematisch die Konstruktion der verwendeten Plasmide.



**Abb. 10: Konstruktion der Plasmide pTN2K, pTN2P und pTKSC13 aus pTN2.** Schematisch dargestellt sind jeweils Insert und Teile der ursprünglichen *multiple cloning site* (mcs) der verschiedenen pUC18-Derivate mit den relevanten Schnittstellen für *KpnI* (K) und *PaeI* (P). Die mittels Mutagenese eingefügte *KpnI*-Schnittstelle ist rot markiert. Unvollständige Gene wurden dunkelgrau, vollständige dagegen hellgrau gekennzeichnet. Das mittels PCR von chromosomaler DNA aus *E. coli* amplifizierte Fragment des Konstruktes pTKSC13 ist blau hervorgehoben. Der Vektor ist im Vergleich zu den Inserts nicht maßstabsgerecht dargestellt.

### 3.4.2. Bestimmung der Aktivität der Formiat-Dehydrogenase H

Die verschiedenen *E. coli*-Mutanten wurden mit den oben genannten Plasmiden bzw. mit pUC18 transformiert und in TGYEP-Medium mit Na-Formiat (30 mM) sowie Na-Selenit und Na-Molybdat (je 1  $\mu$ M) anaerob bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,2 kultiviert. Nach Aufschluss der geernteten Zellen mittels

French-Press-Zelle wurde in dem so gewonnenen Rohextrakt die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase H durch die Formiat-abhängige Reduktion von Benzylviologen bestimmt. Die Messung erfolgte dabei geringfügig modifiziert nach AXLEY *et al.* (1990). Nach Zugabe von Rohextrakt zum Benzylviologen-enthaltenden Messpuffer wurde die Blindreaktion aufgenommen, bis diese entweder abgeklungen war oder einen konstanten Wert annahm. Anschließend erfolgte der Start der Messung durch Zugabe von Formiat. Es wurden mindestens fünf verschiedenen Rohextraktmengen zwischen einem und 15  $\mu$ l eingesetzt, in diesem Bereich war die gemessene Enzymaktivität proportional zum Extraktvolumen.

Da die Ernte der Kulturen nicht exakt bei der gleichen OD erfolgte, sollte zunächst überprüft werden, ob innerhalb des Bereiches von 0,8 bis 1,2 die Zelldichte einen Einfluss auf die spezifische Enzymaktivität hat. Diese erwies sich jedoch für pUC-transformierte Zellen des Wildtyp-Stammes *E. coli* FM433, die bei drei verschiedenen OD<sub>600</sub>-Werten (0,7; 1,0; 1,3) geerntet wurden, als konstant.

Anschließend wurde der Einfluß der Gene *selA*, *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* auf den Selenocystein-Einbau im Wildtyp-Stamm untersucht. Dazu wurde die Formiat-Dehydrogenase H-Aktivität in Rohextrakten von *E. coli* FM433, der die Plasmide pUC18, pTN2, pME11, pTN2K oder pTN2P enthielt, bestimmt (Tab. 9).

**Tab. 9: Aktivität der Formiat-Dehydrogenase H in Rohextrakten verschiedener *E. coli*-Stämme**

<i>E. coli</i> -Stamm (Mutation)	Plasmid ( <i>E. acidaminophilum</i> -Gene) <sup>1</sup>	FDH <sub>H</sub> -Aktivität [U/mg] <sup>2</sup>
FM433	pUC18	10,6
	pTN2 ( <i>selA'</i> , <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>ackA'</i> )	10,1
	pTN2K ( <i>selA'</i> , <i>selB</i> , <i>selC'</i> )	9,1
	pTN2P ( <i>selC</i> )	13,2
	pME11 ( <i>selD1'</i> , <i>selA</i> , <i>selB'</i> )	6,4
AH819 ( <i>selA</i> )	pUC18	<0,1
	pME11 ( <i>selD1'</i> , <i>selA</i> , <i>selB'</i> )	5,3
MN1 ( <i>selC</i> )	pUC18	<0,1
	pTN2 ( <i>selA'</i> , <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>ackA'</i> )	5,8
	pTN2P ( <i>selC</i> )	10,3
WL81300 ( <i>selB</i> )	pUC18	<0,1
	pTN2 ( <i>selA'</i> , <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>ackA'</i> )	5,6
	pTN2K ( <i>selA'</i> , <i>selB</i> , <i>selC'</i> )	<0,1
	pTN2P ( <i>selC</i> )	<0,1
	pTKSC13 ( <i>selA'</i> , <i>selB</i> , <i>selC<sub>Ec</sub></i> )	0,7

<sup>1</sup>Unvollständige Gene sind durch ein Apostroph gekennzeichnet, vollständige dagegen fett hervorgehoben.

<sup>2</sup>Ein Unit entspricht dem Umsatz von 1  $\mu$ mol Benzylviologen/min (AXLEY *et al.*, 1991), wobei zu beachten ist, dass pro Molekül Formiat zwei Moleküle Benzylviologen reduziert werden.

Die Anwesenheit des Plasmids pTN2 (*selB<sub>Ea</sub>*, *selC<sub>Ea</sub>*) hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Enzymaktivität (95 % des Wertes der pUC18-transformierten Zellen). Dagegen führte das Plasmid

pME11 (mit *selA* aus *E. acidaminophilum*) zu einer Verringerung der FDH<sub>H</sub>-Aktivität auf 60 % der Kontrolle mit pUC18. Das Konstrukt pTN2K (*selB<sub>Ea</sub>*) führte ebenfalls zu einer leichten Verringerung der Enzymaktivität (auf 86 %), pTN2P (*selC<sub>Ea</sub>*) erhöhte diese hingegen um 25 %.

Die *E. coli* Mutanten AH819 (*selA*), WL81300 (*selB*) und MN1 (*selC*), transformiert mit pUC18, zeigten keine nennenswerte Formiat-Dehydrogenase H-Aktivität. Mit pME11 wurde dagegen für die *selA*-Mutante eine Enzymaktivität von 50 % im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *E. coli* FM433 (pUC18) gemessen. Die *selC*-Mutante zeigte eine deutliche FDH<sub>H</sub>-Aktivität mit dem Plasmid pTN2 (55 % des Wildtyps). Mit pTN2P, welches *selC*, nicht aber *selB* aus *E. acidaminophilum* enthielt, wurde sogar annähernd (zu 97 %) der Wert von *E. coli* FM 433 mit pUC18 erreicht. Dagegen ließ sich der Defekt der *selB*-Mutante durch ein Plasmid (pTN2K), welches das entsprechende Gen aus *E. acidaminophilum* trug, nicht komplementieren, erst bei gleichzeitiger Anwesenheit von *selC* aus *E. acidaminophilum* (pTN2) konnte eine nennenswerte Enzymaktivität gemessen werden, diese betrug 53 % im Vergleich zum Wildtyp. Wurde dagegen *selC* aus *E. acidaminophilum* durch das entsprechende Gen aus *E. coli* ersetzt (Plasmid pTKSC13), konnte in Rohextrakten der *selB*-Mutante eine FDH<sub>H</sub>-Aktivität von 7 % des Wildtyps bestimmt werden.

### 3.5. Expression von SelB und SelB-Domänen von *E. acidaminophilum* in *E. coli*

#### 3.5.1. Expression als His-tag-Fusionsproteine

Da bisher kein Transformationssystem für *E. acidaminophilum* existiert und der Organismus deshalb genetischen Manipulationen nicht zugänglich ist, sollte durch *in-vitro*-Untersuchungen geklärt werden, ob die in Abschnitt 3.1. vorgestellten mRNA-Sekundärstrukturen eine Funktion als SECIS-Elemente haben.

Um die für den Selenocystein-Einbau essentielle Bindung des Elongationsfaktors SelB an die entsprechenden mRNA-Bereiche nachweisen zu können, sollten das *E. acidaminophilum*-Protein bzw. dessen mRNA-bindenden, C-terminalen Domänen 4 (AS 359-627) und 4b (AS 494-627) als His-tag-Fusionsproteine in *E. coli* überproduziert und anschließend gereinigt werden. Die Fusion mit einem 6×His-Affinitäts-tag wurde gewählt, um durch dessen Metall-bindende Eigenschaften eine effektive Reinigung der Proteine in einem Schritt zu ermöglichen. Außerdem konnte *in vivo* gezeigt werden, dass ein N-terminaler His-tag die Funktionalität von *E. coli*-SelB nicht signifikant beeinträchtigte (KROMAYER *et al.*, 1996).

### 3.5.1.1. Klonierung in die Expressionsvektoren pQE30 und pT7-7

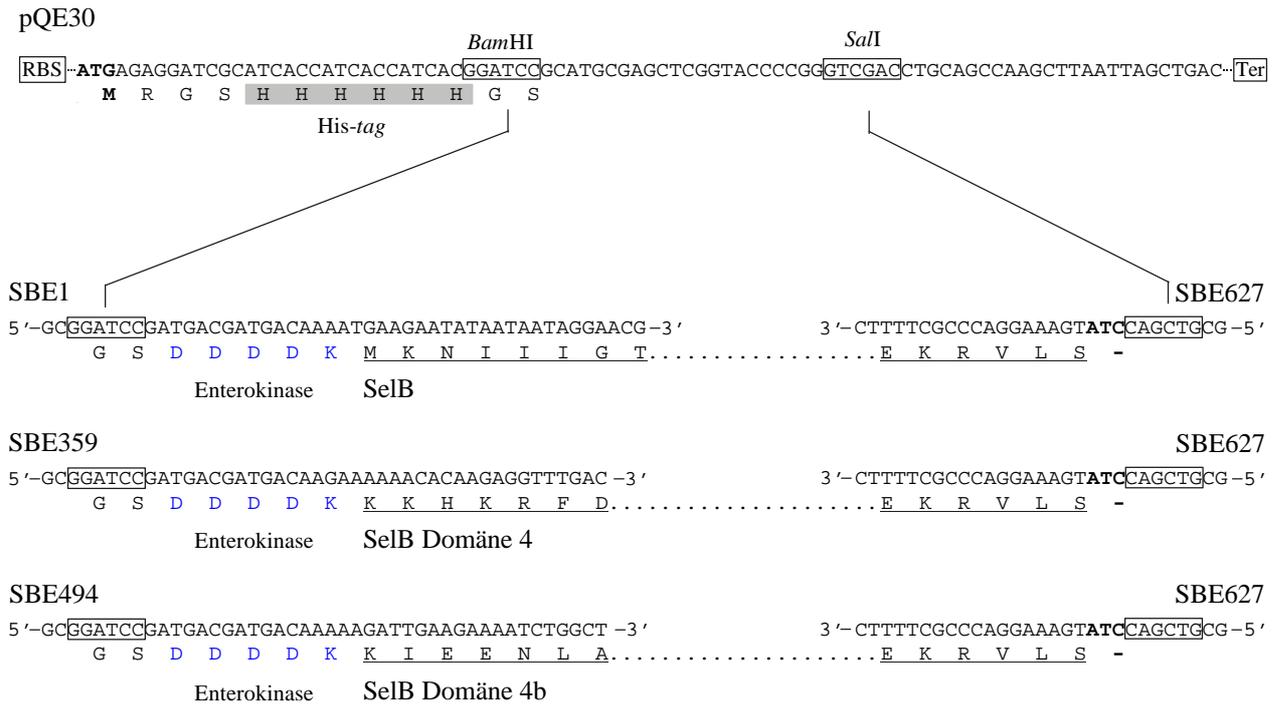
Als Expressionsvektor wurde pQE30 (Qiagen, Hilden) gewählt, ein Ampicillin-Resistenz vermittelndes *low-copy*-Plasmid mit ColE1-Replikationsursprung. Das zu exprimierende Gen steht unter Kontrolle eines Promotor-Operator-Elements, welches aus einem T5-Promotor und zwei *lac*-Operator-Sequenzen besteht. Die heterologe Genexpression kann durch Zugabe von IPTG induziert werden.

Die entsprechenden Sequenzen für SelB bzw. SelB-Domänen wurden durch PCR mit den 5'-Primern SBE1 (SelB), SBE359 (Domäne 4) sowie SBE494 (Domäne 4b), jeweils kombiniert mit dem 3'-Primer SBE627, amplifiziert. Als Template diente das Plasmid pTN2. Über den 5'-Primer wurde dabei eine Enterokinase-Schnittstelle zwischen *His-tag* und den SelB-Sequenzen eingefügt. Die PCR-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Sal*I in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor ligiert (Abb. 11A), die so erhaltenen Plasmide erhielten die Bezeichnung pSBE1 (SelB), pSBE359 (SelB-Domäne 4) und pSBE494 (SelB-Domäne 4b).

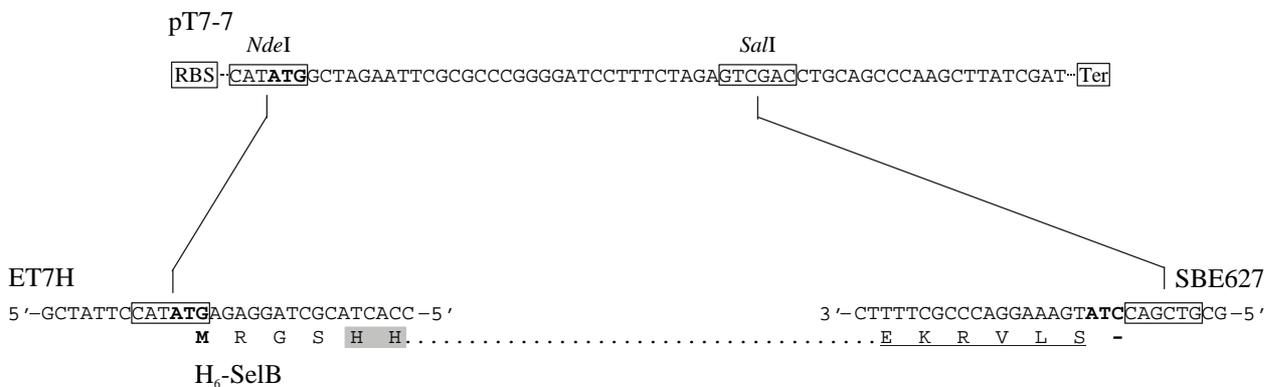
Da die tRNA<sup>Sec</sup> möglicherweise eine stabilisierende Wirkung auf den Elongationsfaktor SelB ausübt (TORMAY *et al.*, 1996), wurde mit den Primern SC5E und SC3E ein 0,6 kb großes Fragment mit *E. acidaminophilum-selC* von pTN2 amplifiziert, mit *Sal*I verdaut und in das mit dem gleichen Enzym linearisierte Plasmid pSBE1 kloniert. Das Konstrukt, in dem *selC* die gleiche Transkriptionsrichtung aufwies wie *selB*, erhielt die Bezeichnung pSBSCE1.

Für die Überproduktion des vollständigen Elongationsfaktors wurde noch ein zweites Expressionssystem gewählt, bei dem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors stand. Dazu wurde mit den Primern ET7H und SBE627 sowie dem Plasmid pSBE1 als Template das *selB*-Gen inklusive der Sequenzen für den *His-tag* und die Enterokinase-Schnittstelle amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *Nde*I und *Sal*I in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pT7-7 kloniert (Abb. 11B). Wie pQE30 vermittelt dieses Plasmid mit ColE1-Replikationsursprung eine Ampicillin-Resistenz. Das erhaltene Konstrukt wurde mit pT7SBE3 bezeichnet.

## A



## B



**Abb. 11: Schematische Darstellung der verschiedenen SelB-Konstrukte in den Expressionsvektoren pQE30 (A) und pT7-7 (B).** Angegeben ist die *multiple cloning site* der Vektoren sowie die Sequenz der Primer SBE1, SBE359, SBE494, SBE627 und ET7H, mit denen die für SelB bzw. die SelB-Domänen 4 und 4b codierenden DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Die für die Klonierung genutzten *Bam*HI-, *Sal*I- und *Nde*I-Schnittstellen sind eingezeichnet, die relevanten Start- und Stopp-Codons wurden fett hervorgehoben, die SelB-Sequenzen unterstrichen. Der 6×His-Affinitäts-tag ist grau unterlegt, eine über die 5'-Primer eingefügte Enterokinase-Schnittstelle blau hervorgehoben. RBS = Ribosomen-Bindestelle, Ter = Transkriptions-Terminator.

### 3.5.1.2. Expression und Reinigung

Die heterologe Expression von *selB* sowie dessen C-terminalen Bereichen erfolgte in *E. coli* M15, welcher zusätzlich das Repressorplasmid pREP4 enthielt. Dieses *low-copy*-Plasmid trägt das *lacI*-Gen und ist auf Grund seines p15A-Replikationsursprungs kompatibel zu Plasmiden mit ColE1-Replikationsursprung wie pQE30. Durch den konstitutiv und in großer Menge exprimierten *lac*-Repressor wird eine strenge Kontrolle der Synthese des rekombinanten Proteins erreicht.

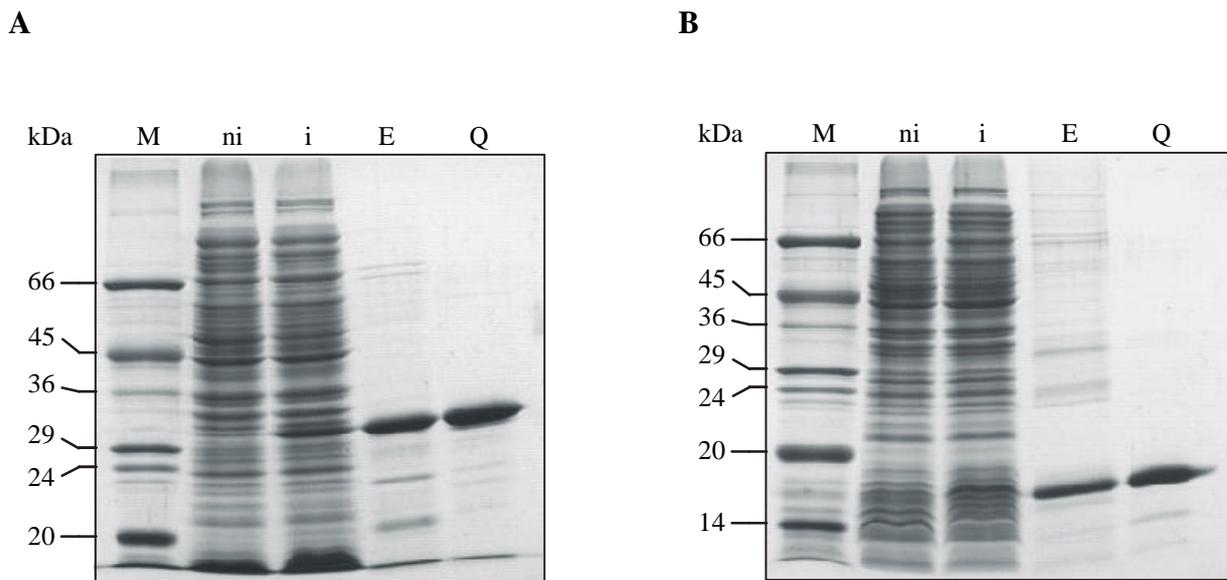
Die Produktion der drei Proteine in *E. coli* M15 wurde zuerst durch eine denaturierende Reinigung (in Gegenwart von 8 M Harnstoff) im kleinen Maßstab überprüft (*rapid screening*, s. 2.14.1.2.). Im Falle der beiden SelB-Domänen konnten dabei in den Proben, die nach Induktion mit IPTG abgenommen wurden, Ni<sup>2+</sup>-bindende Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 31 bzw. 16 kDa durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Diese traten in den vor der Zugabe von IPTG entnommenen Proben bzw. in der Kontrolle (*E. coli* M15 mit Vektor pQE30) nicht auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Die beobachteten Molekulargewichte stimmten mit den theoretischen, aus der DNA-Sequenz abgeleiteten (33 097 bzw. 17 417 Da) annähernd überein. Die maximale Proteinmenge trat ca. 4 h nach Induktion auf. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der getesteten Klone eine Expression des vollständigen Gens detektiert werden, wobei Konstrukte mit und auch ohne *selC* aus *E. acidaminophilum* untersucht wurden. Auch eine Verringerung der Anzucht-Temperatur auf 30 °C bzw. 20 °C führte nicht zu einer nachweisbaren Produktion des Proteins.

Daraufhin wurde ein anderes Expressionssystem getestet, bei dem das *selB*-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors des Vektors pT7-7 stand (s. 3.5.1.1.). Als Wirtstamm kam *E. coli* BL21(DE3) zum Einsatz, dieser enthält einen  $\lambda$ -Prophagen (DE3) mit dem *lacI*-Gen und dem Gen der T7-RNA-Polymerase, letzteres unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Um eine bessere Kontrolle der heterologen Genexpression zu erreichen, wurde der oben genannte Stamm mit dem *lacI*-tragenden Plasmid pREP4 transformiert.

Analog zu den Versuchen mit den pQE30-Derivaten wurde die Produktion von SelB durch ein *rapid screening* im kleinen Maßstab überprüft (s. 2.14.1.2.). Erneut konnte jedoch kein Ni<sup>2+</sup>-bindendes Protein der entsprechenden Größe detektiert werden.

Die Reinigung der SelB-Domänen unter nativen Bedingungen erfolgte aus 200 ml Kulturvolumen, die 4 h nach der Induktion mit IPTG geerntet wurden. Die Zellen wurden durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen, die Bindung der rekombinanten Proteine an das Affinitätsmaterial (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose) erfolgte im *batch*-Verfahren. Nach Überführung der Suspension in eine Leersäule wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol im Puffer Proteine entfernt, die mit geringer Affinität an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gebunden hatten; die Elution der His-tag-Fusionsproteine erfolgte dagegen durch eine Imidazol-Konzentration von 250 mM. Bei allen Chromatographie-Schritten wurde unter Gravitationsfluss gearbeitet. Da die Elutionsfraktionen bei beiden SelB-Domänen noch stark mit anderen Proteinen

verunreinigt waren, wurde ein weiterer Reinigungsschritt über eine MonoQ-Säule (ein starker Anionen-Austauscher) durchgeführt. Dazu wurden die Protein-haltigen Fraktionen der Affinitätsreinigung vereinigt, zum Entfernen von Salzen und Imidazol dialysiert und auf die Säule aufgebracht. Die Elution erfolgte durch einen kontinuierlichen KCl-Gradienten, die zu reinigenden Proteine eluierten bei ca. 250 mM (Domäne 4) bzw. 200 mM KCl (Domäne 4b). Nach Dialyse gegen Lagerpuffer wurden die gereinigten Proteine bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Aus 200 ml Kulturvolumen konnten ca. 0,7 mg von Domäne 4 und 0,25 mg von Domäne 4b isoliert werden. Abb. 12 zeigt den Verlauf der durchgeführten Reinigungen.



**Abb. 12: Reinigung der in *E. coli* M15 exprimierten SelB-Domänen 4 (A) und 4b (B) von *E. acidaminophilum* als His-tag-Fusionsprotein.** Die Proben wurden in einem 12,5 %igen (A) bzw. 15 %igen (B) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M: Marker (MW-SDS-70L, Sigma, Taufkirchen), ni: SDS-Lysat von Zellen vor der Induktion, i: SDS-Lysat von Zellen nach Induktion mit IPTG, E: Eluat der Affinitätschromatographie mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (2  $\mu\text{g}$ ), Q: Eluat der MonoQ-Säule (2  $\mu\text{g}$ )

Da für beide Proteine eine geringe Abweichung zwischen dem theoretischen, an Hand der Sequenz bestimmten Molekulargewicht und dem in der SDS-PAGE beobachteten auftrat (s. o.), wurde die Masse der gereinigten Proteine über MALDI-MS bestimmt. Damit sollte sichergestellt werden, dass kein C-terminal verkürztes Protein vorlag, z. B. in Folge eines Abbruchs der Translation an einem der in *selB* und anderen Genen aus *E. acidaminophilum* in hoher Anzahl auftretenden, in *E. coli* jedoch sehr selten genutzten Arginin-Codons AGG und AGA (ROSENBERG *et al.*, 1993). Außerdem galt es auszuschließen, dass eine Inkorporation von Lysin (*misreading*) mit hoher Frequenz an diesen Triplets stattfindet (SEETHARAM *et al.*, 1988). Für Domäne 4 wurde ein Molekulargewicht von 33 147 Da bestimmt, für Domäne 4b dagegen 17 418 Da (K. P. RÜCKNAGEL, persönliche Mitteilung), diese Daten zeigten eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Werten (s. o.).

### 3.5.2. Expression als *Strep-tag II*-Fusionsproteine

Da die Expression der Domänen 4 und 4b des Elongationsfaktors SelB als His-tag-Fusionsprotein keine effektive Reinigung in einem Schritt ermöglichte, sollte ein weiteres, *Strep-tag II*-basierendes Expressions- und Reinigungssystem getestet werden. *Strep-tag II* ist ein aus acht Aminosäuren bestehendes Peptid, welches N- oder C-terminal mit Proteinen fusioniert werden kann und eine hohe Affinität zu StrepTactin (ein durch Mutagenese erzeugtes Streptavidin-Derivat) aufweist (SCHMIDT *et al.*, 1996; VOSS und SKERRA, 1997). Durch die hohe Spezifität dieser Interaktion wäre eventuell auch bei sehr geringen Expressionsraten eine effektive Reinigung von SelB möglich, was einen weiteren Grund für den Wechsel des Expressionssystems darstellte.

#### 3.5.2.1. Klonierung in die Expressionsvektoren pASK-IBA5 und pASK-IBA7

Der verwendete Vektor pASK-IBA5 erlaubt eine N-terminale Fusion des zu exprimierenden Proteins mit dem *Strep-tag II*. Das klonierte Gen steht unter Kontrolle der Promotor-Operator-Region des *tetA*-Gens, durch das ebenfalls auf dem Vektor vorliegende, konstitutiv exprimierte Gen des *tet*-Repressors wird eine strenge Regulation der Genexpression erreicht. Induziert wird diese durch Anhydrotetracyclin in geringen, nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen.

Durch PCR mit den 5'-Primern STG5V (SelB), STG5VD4 (Domäne 4) und STG5VD4B (Domäne 4b), kombiniert mit dem 3'-Primer STG5H und dem Plasmid pTN2 als Template wurden die entsprechenden Bereiche des *selB*-Gens amplifiziert und nach Verdau mit *BsaI* in den ebenfalls mit diesem Restriktionsenzym geschnittenen Vektor ligiert (Abb. 13A). Da *BsaI* außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, können verschiedene 5'-Überhänge entstehen, so dass die Orientierung des PCR-Fragmentes im Vektor festgelegt ist. Die so konstruierten Plasmide wurden mit pSBST5-1 (SelB), pSBD4-3 (Domäne 4) und pSBDB4-6 (Domäne 4b) bezeichnet.

Das Gen für SelB wurde außerdem in den Vektor pASK-IBA7 kloniert (Abb. 13B), wobei zur Amplifikation der 5'-Primer EXPV7SB (zusammen mit dem 3'-Primer STG5H) zur Anwendung kam, das Konstrukt erhielt die Bezeichnung pSBST7-3. Der Vektor pASK-IBA7 bietet die Möglichkeit, das N-terminale Affinitätspeptid über eine Factor Xa-Schnittstelle abzuspalten, ansonsten ist er identisch mit pASK-IBA5.

## A

## pASK-IBA5

RBS-ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAAGGCGCCGAGACC.....N<sub>62</sub>.....GGTCTCTGATATCTAACTAAGCTT-Ter  
 M A S W S H P Q F E K G A

*Strep-tag II*

## STG5V

5'-CGACGAGGTCTCGCGCCAAGAATATAATAATAGGAACGG-3'  
 R A K N I I I G T.....

SelB

## STG5H

3'-TTTTCGCCCAGGAAAGTATCACTATGCTCTGGAGCAGC-5'

## STG5VD4

5'-CGACGAGGTCTCGCGCCCAAAAAACACAAGAGGTTTG-3'  
 G A P K K H K R F.....

SelB Domäne 4

## STG5H

3'-TTTTCGCCCAGGAAAGTATCACTATGCTCTGGAGCAGC-5'

## STG5VD4B

5'-CGACGAGGTCTCGCGCCAAGATTGAAGAAAATCTGGCTTC-3'  
 G A K I E E N L A.....

SelB Domäne 4b

## STG5H

3'-TTTTCGCCCAGGAAAGTATCACTATGCTCTGGAGCAGC-5'

## B

## pASK-IBA7

RBS-ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAATCGAAGGGCGCCGAGACC.....N<sub>62</sub>.....GGTCTCTGATATCTAACTAAGCTT-Ter  
 M A S W S H P Q F E K I E G R

*Strep-tag II*

Factor Xa

## EXPV7SB

5'-CGACGAGGTCTCGCGCCAAGAATATAATAATAGGAACGGCAG-3'  
 R R K N I I I G T A.....

SelB

## STG5H

3'-TTTTCGCCCAGGAAAGTATCACTATGCTCTGGAGCAGC-5'

**Abb. 13: Schematische Darstellung der verschiedenen SelB-Konstrukte in den Expressionsvektoren pASK-IBA5 (A) und pASK-IBA7 (B).** Angegeben ist die *multiple cloning site* der Vektoren sowie die Sequenz der Primer STG5V, STG5VD4, STG5VD4B, STG5H und EXPV7SB, mit denen die für SelB bzw. die SelB-Domänen 4 und 4b codierenden DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Die Erkennungssequenzen der für die Klonierung genutzten *BsaI*-Schnittstellen sind eingerahmt, der nach dem Restriktionsverdau entstehende 5'-Überhang ist doppelt unterstrichen. Die relevanten Start- und Stopp-Codons wurden fett hervorgehoben, die SelB-Sequenzen unterstrichen. Die Sequenz des *Strep-tag II* ist grau unterlegt, die Factor Xa-Schnittstelle des Vektors pASK-IBA7 blau hervorgehoben. RBS = Ribosomen-Bindestelle, Ter = Transkriptions-Terminator.

### 3.5.2.2. Expression und Reinigung

Für die heterologe Synthese von SelB sowie der SelB-Domänen 4 und 4b als *Strep-tag* II-Fusion wurde zunächst der Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet, der zusätzlich das Plasmid pUBS520 (BRINKMANN *et al.*, 1989) enthält. Dieses von pACYC177 abgeleitete Plasmid trägt das *dnaY*-Gen (*argU*) der in *E. coli* seltenen tRNA<sub>4</sub><sup>Arg</sup>; diese erkennt die Codons AGA und AGG. Durch seinen p15A-Replikationsursprung ist pUBS520 kompatibel zu den Vektoren pASK-IBA5 und pASK-IBA7 (ColE1-Replikationsursprung). Der im Chromosom des Wirtstammes integrierte Bacteriophage DE3, welcher das Gen der T7-RNA-Polymerase trägt, ist für die Expression in diesem Falle ohne Bedeutung, da der *tetA*-Promotor der verwendeten Expressionsvektoren durch die *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt wird.

Zur Analyse der Expression wurden die entsprechenden Klone im kleinen Maßstab (20 ml) in LB angezogen, der *tet*-Promotor mit Anhydrotetracyclin induziert und 1 h sowie 3 h danach eine Probe abgenommen. Die Identifizierung der rekombinanten Proteine erfolgte durch Western-Blot-Nachweis des *Strep-tag* mittels StrepTactin-HRP-Konjugat. Für beide SelB-Domänen wurden in den nach der Induktion abgenommenen Proben entsprechende Proteine von ca. 31 bzw. 16 kDa detektiert, in den nicht-induzierten Proben bzw. in der Kontrolle (Vektor ohne Insert) wurde kein Signal erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Synthese von SelB konnte hingegen in keinem der untersuchten Klone beobachtet werden.

Ein weiterer Versuch, *selB* nachweisbar zu exprimieren, wurde mit einem reicheren Medium (2×LB) in Verbindung mit dem Wirtstamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL unternommen. Dieser speziell für die Überproduktion von Proteinen aus Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt geeignete Stamm enthält auf einem pACYC184-Derivat die Gene *argU* (*dnaY*), *ileY* und *leuW*, welche für drei in *E. coli* nur in geringer Anzahl vorhandene tRNA-Spezies codieren: tRNA<sub>4</sub><sup>Arg</sup> (erkennt die Codons AGA und AGG), tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> (Codon AUA) sowie tRNA<sub>3</sub><sup>Leu</sup> (Codons CUA und CUG). Unter diesen Bedingungen erfolgte eine sichtbare Expression von SelB, in Western-Blots wurde nun bei allen getesteten Klonen ein Protein von ca. 70 kDa nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Einfluss von 2×LB (statt LB) vergleichsweise gering ausfiel, so dass offensichtlich die Limitierung einer oder mehrerer der genannten tRNAs dafür verantwortlich war, dass SelB in anderen *E. coli*-Stämmen nicht in ausreichender Menge produziert wurde. Die tRNA<sub>4</sub><sup>Arg</sup> kann nicht der entscheidende Faktor gewesen sein, da in vorangegangenen Versuchen das Plasmid pUBS520, welches ebenfalls das entsprechende Gen trägt, hinsichtlich der Expression von *selB* keinen sichtbaren Effekt hatte (s. o.). Tab. 10 zeigt, mit welcher Frequenz die Codons CUA und AUA, welche von den beiden anderen in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL überproduzierten tRNA-Spezies erkannt werden, einerseits in Genen von *E. coli* und andererseits in *selB* aus *E. acidaminophilum* auftreten. Das Triplet CUG ist hier nicht aufgeführt, da es nicht nur von der tRNA<sub>3</sub><sup>Leu</sup>, sondern auch von der tRNA<sub>1</sub><sup>Leu</sup> gelesen wird.

**Tab. 10: Nutzung der Codons CUA und AUA in *E. acidaminophilum-selB***

Codon	<i>E. coli</i> -K12-Genom (1 363 279 Codons) <sup>1</sup>		<i>selB<sub>Ea</sub></i> (Codons 1-627)		<i>selB<sub>Ea</sub></i> (Codons 358-627) <sup>2</sup>	
	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]	Anzahl	[%]
CUA (Leu)	5316	0,39	3	0,48	1	0,37
AUA (Ile)	5967	0,44	49	7,81	16	5,93

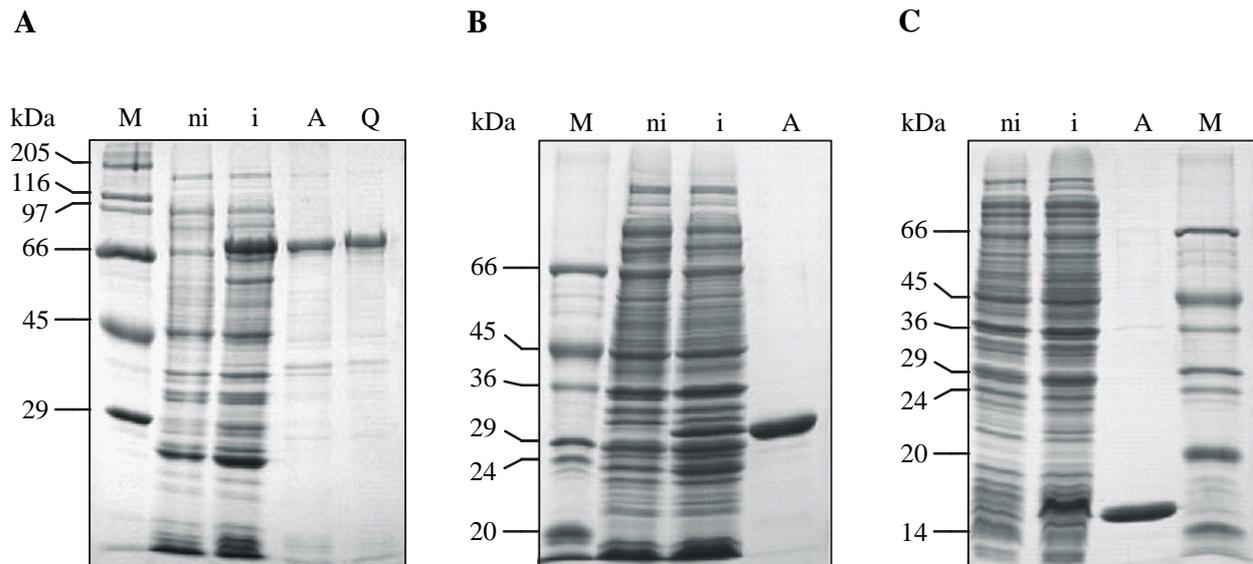
<sup>1</sup>Quelle: *E. coli codon usage table* ([http://bioinformatics.weizmann.ac.il:3456/kegg/codon\\_table/codon\\_eco.html](http://bioinformatics.weizmann.ac.il:3456/kegg/codon_table/codon_eco.html))

<sup>2</sup>entspricht Domäne 4

Während hinsichtlich der Verwendung des Leucin-Codons CUA kein signifikanter Unterschied zwischen dem *E. coli*-Genom und dem *selB*-Gen aus *E. acidaminophilum* festgestellt werden konnte, wird das Isoleucin-Codon AUA in letzterem mit ca. 18-fach höherer Frequenz als in einem durchschnittlichen *E. coli*-Gen genutzt. Im Gegensatz zum vollständigen Protein wurde jedoch die Domäne 4 des Elongationsfaktors aus *E. acidaminophilum* auch ohne die gleichzeitige Überexpression der drei genannten tRNA-Gene in ausreichender Menge in *E. coli* synthetisiert, obwohl das Triplet AUA in dem entsprechenden Teil von *selB* mit annähernd gleicher Häufigkeit auftritt wie im gesamten Gen. Entscheidend für die geringe Expressionsrate von *selB* könnte jedoch die Tatsache sein, dass direkt am N-Terminus des Proteins (Aminosäuren 4-6) drei Isoleucin-Reste, die alle durch das Triplet AUA codiert werden, direkt hintereinander auftreten.

Im Gegensatz zum vollständigen Protein konnte für die SelB-Domänen 4 und 4b keine signifikante Erhöhung der Expressionsrate im Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL festgestellt werden, weshalb weiterhin mit *E. coli* BL21(DE3) mit pUBS520 gearbeitet wurde, SelB hingegen wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL überproduziert.

Die Reinigung der Proteine erfolgte unter nativen Bedingungen. Aus je 1 l Kulturvolumen wurden die Zellen 3 h nach Induktion mit Anhydrotetracyclin geerntet und mit Hilfe einer French-Press aufgeschlossen. Nach dem Auftragen des Rohextraktes auf eine StrepTactin-Affinitätssäule wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit dem Aufschlusspuffer entfernt, die Elution gebundener Proteine erfolgte durch 2,5 mM Desthiobiotin im Puffer. Bei allen Schritten wurde unter Gravitationsfluss gearbeitet. Im Gegensatz zu den einzelnen Domänen, die in nahezu homogener Form erhalten werden konnten, eluierte SelB stets mit einer großen Anzahl kontaminierender Proteine. Um diese zu entfernen, erfolgte analog zur Isolierung der His-tag-Fusionen (s. 3.5.1.2.) ein weiterer Reinigungsschritt über eine MonoQ-Säule, wobei SelB bei einer KCl-Konzentration von ca. 0,58 M eluierte. Allerdings wurde damit nur eine geringe Verbesserung der Reinheit erzielt. Auch eine Erhöhung der Ionenstärke in den für die Affinitäts-Chromatographie verwendeten Puffern (Zusatz von bis zu 1 M NaCl oder NH<sub>4</sub>Cl) führte nicht zu einer deutlich besseren Abtrennung kontaminierender Proteine. Abb. 14 zeigt das Ergebnis der Reinigung von SelB und SelB-Domänen.



**Abb. 14: Reinigung der in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bzw. *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520 exprimierten Proteine SelB (A), SelB-Domäne 4 (B) und SelB-Domäne 4b (C) von *E. acidaminophilum* als *Strep-tag-II*-Fusionsprotein.** Die Proben wurden in einem 12,5 %igen (A und B) bzw. 15 %igen (C) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M: Molekulargewichtsmarker, ni: SDS-Lysat von Zellen vor der Induktion, i: SDS-Lysat von Zellen nach Induktion mit IPTG, A: Eluat der Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose (A: 1,5 µg, B und C: 2 µg), Q: Eluat der MonoQ-Säule (1,5 µg)

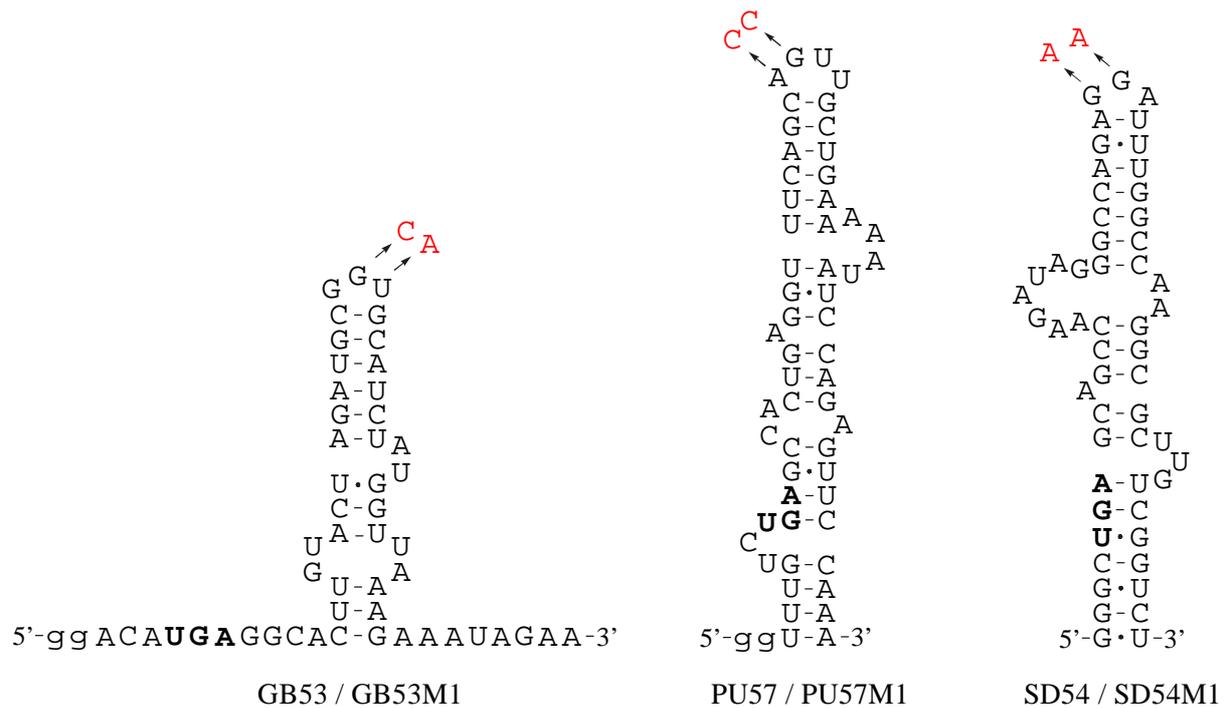
Mittels MALDI-MS wurde für das gereinigte SelB ein Molekulargewicht von ca. 72,5 kDa bestimmt (A. SCHIERHORN, persönliche Mitteilung), der aus der Sequenz abgeleitete theoretische Wert betrug 72 322 Da. Nach Dialyse gegen Lagerpuffer erfolgte die Aufbewahrung der Proteine bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aus je einem Liter Kulturvolumen wurden 2,1 mg SelB, 2,4 mg Domäne 4 und 1,1 mg Domäne 4b isoliert, allerdings wurde vor allem bei der Reinigung des vollständigen Proteins die Bindungskapazität der StrepTactin-Affinitätssäule deutlich überschritten, so dass vermutlich wesentlich höhere Erträge möglich sind.

Zur Abspaltung des *Strep-tag II* (nach Expression des *selB*-Gens vom Vektor pASK-IBA7) wurde das Protein wie oben beschrieben über eine StrepTactin-Affinitätssäule gereinigt, gegen Reaktionspuffer dialysiert und mit Biotin-markiertem Faktor Xa versetzt. Nach der Entfernung der Protease mittels Streptavidin-Gel und der Abtrennung nicht gespaltener Fusionsproteine durch erneute Chromatographie an StrepTactin-Affinitätsmaterial erfolgte wie im Falle des nicht spaltbaren, vom Vektor pASK-IBA5 exprimierten Fusionsproteins eine weitere Reinigung über eine MonoQ-Säule. Da im SDS-Polyacrylamidgel kein Unterschied zum unbehandelten Protein festzustellen war, wurde erneut das Molekulargewicht durch MALDI-MS-Analyse bestimmt, dabei wurde ein Wert von ca. 70,9 kDa ermittelt (A. SCHIERHORN, persönliche Mitteilung), das an Hand der Sequenz kalkulierte Molekulargewicht betrug 70 864 Da.

### 3.6. Gelretardations-Experimente mit SelB und SelB-Domänen aus *E. acidaminophilum*

Unter Verwendung der gereinigten Proteine (SelB als *Strep-tag* II-Fusionsprotein, SelB-Domänen 4 und 4b als *Strep-tag* II- und als *His-tag*-Fusionsproteine) sollte untersucht werden, ob *in vitro* eine spezifische Bindung des Elongationsfaktors aus *E. acidaminophilum* an die postulierten SECIS-Elemente verschiedener Selenoprotein-mRNAs (s. 3.1.) erfolgt.

Zu diesem Zweck wurden für die Gene *grdB1* (Selenoprotein B der Glycin-Reduktase), *prxU* (Seleno-Peroxiredoxin) und *selD1* (Selenophosphat-Synthetase) RNA-Fragmente hergestellt, die im wesentlichen die unter 3.1. aufgeführten Strukturen umfassen sollten. Diese RNAs wurden durch *in-vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase synthetisiert, wobei die zuerst von MILLIGAN *et al.* (1987) beschriebene Methode zur Anwendung kam: ein 18 Nukleotide umfassendes Oligonukleotid (PRO11VT), welches den Promotor der T7-RNA-Polymerase repräsentiert, wurde mit einem Template-Strang (GRDB11VT, PXIVT57, SD11VT54), der die komplementären Sequenzen zum Promotor und zur herzustellenden RNA enthält, hybridisiert. Von dem so entstandenen, partiell doppelsträngigen DNA-Fragment erfolgte dann die RNA-Synthese nach WYATT *et al.* (1991); die Transkripte erhielten die Bezeichnung GB53 (*grdB1*), PU57 (*prxU*) und SD54 (*selD1*). Zusätzlich wurde von allen drei RNA-Fragmenten unter Verwendung der Oligonukleotide GB11VTM1, PXIVTM1 und SD11VTM1 als Template eine mutierte Version synthetisiert (GB53M1, PU57M1 und SD54M1), bei der jeweils zwei Basen in der Schleife der postulierten Haarnadelstruktur ausgetauscht waren (Abb. 15).

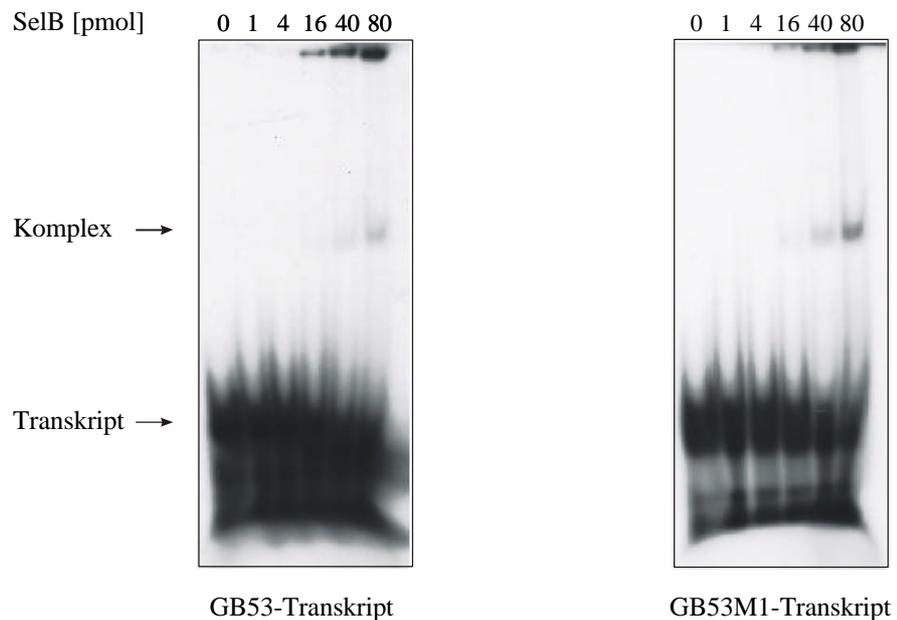
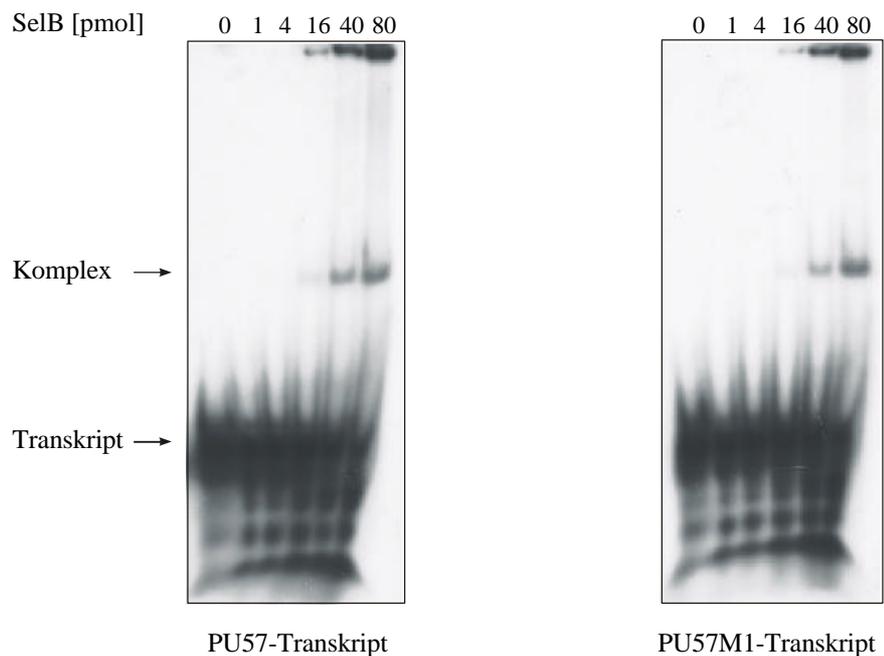


**Abb. 15: Postulierte Strukturen der in Gelretardations-Experimenten mit SelB und SelB-Domänen eingesetzten Transkripte.** Durch Pfeile sind die ausgetauschten Basen in den als Kontrolle synthetisierten, mutierten Versionen gekennzeichnet. Die mit kleinen Buchstaben dargestellten Basen der Transkripte für *grdB1* und *prxU* wurden angefügt, um eine höhere Effizienz der *in-vitro*-Transkription zu erreichen.

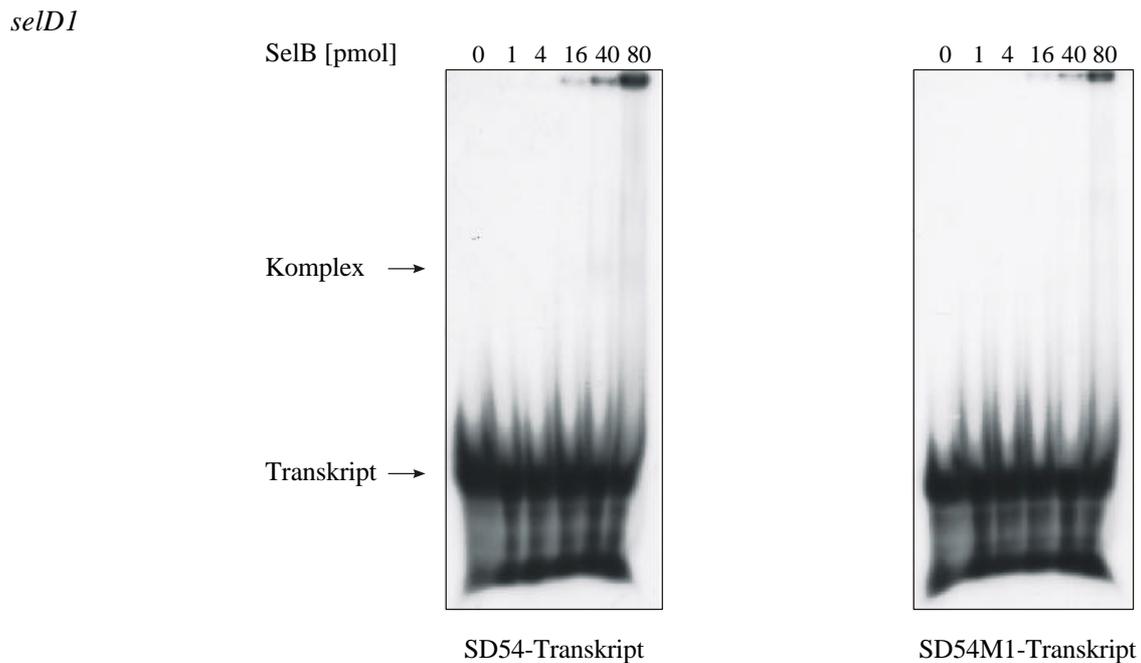
Die hergestellten mRNA-Fragmente wurden am 5'-Ende dephosphoryliert, mit [<sup>32</sup>P]-Phosphat markiert und in Gelretardations-Experimenten mit den gereinigten Proteinen eingesetzt, wobei eine Vielzahl verschiedener Puffersysteme (s. 2.17., Tab. 7) getestet wurden. Um eine unspezifische Interaktion von Proteinen und RNA zu unterdrücken, wurde allen Ansätzen jeweils ein 100-facher molarer Überschuss an Gesamt-tRNA aus Hefe zugegeben. Je 1 pmol markiertes Transkript wurde mit unterschiedlichen Mengen Protein versetzt, nach entsprechender Inkubation erfolgte die Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel.

Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte eine Bindung der SelB-Domänen 4 und 4b an die verschiedenen Transkripte beobachtet werden, wobei sowohl die *His-tag*- als auch die *Strep-tag* II-Fusionsproteine untersucht wurden. Das *Strep-tag* II-Fusionsprotein von SelB dagegen bildete Komplexe mit den eingesetzten RNA-Fragmenten der Gene *grdB1*, *prxU* und (in deutlich geringerem Maß) auch *selD1*. Bei einer Zugabe von Rinderserum-Albumin (BSA) wurde hingegen keine Retention der RNA beobachtet. In allen Puffersystemen entstanden bevorzugt Aggregate, die nicht in die Gelmatrix einliefen sondern in den Taschen präzipitierten. Nur bei den Systemen mit 40 mM Tris/Acetat, pH 7,0 oder 0,5×TBE, pH 8,3 als Gel- und Laufpuffer migrierten signifikante Mengen des Komplexes ins Gel (Abb. 16). Auch durch die Zugabe von 0,5 mM GTP zu Gelmatrix und Laufpuffer konnte die Löslichkeit der Komplexe nicht erhöht werden.

Eine Interaktion von SelB mit den eingesetzten Transkripten war nur bei sehr hohem molarem Überschuss an Protein zu beobachten. Zudem konnte jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-RNAs und den Fragmenten mit einer Änderung von zwei Basen in der Schleife der Haarnadelstruktur festgestellt werden. Auch eine Abspaltung des *Strep-tag* II vom SelB-Fusionsprotein hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis der Versuche. Eine spezifische Bindung von SelB an die postulierten mRNA-Sekundärstrukturen der drei untersuchten Gene konnte deshalb aus den durchgeführten Gelretardations-Experimenten nicht ohne weiteres abgeleitet werden.

*grdB1**prxU*

Fortsetzung nächste Seite



**Abb. 16: Gelretardations-Experimente mit SelB aus *E. acidaminophilum* (Strep-tag II-Fusionsprotein).** Jeweils 1 pmol  $^{32}\text{P}$ -markiertes Transkript wurde mit den angegebenen Mengen SelB in Bindungspuffer (40 mM Tris/HCl, pH 7,6; 50 mM NaCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 2 mM DTT; 0,5 mM GTP; 10 % Glycerin) inkubiert und in einem nativen, 4,5 %igen Polyacrylamidgel in 0,5×TBE, pH 8,3 aufgetrennt.

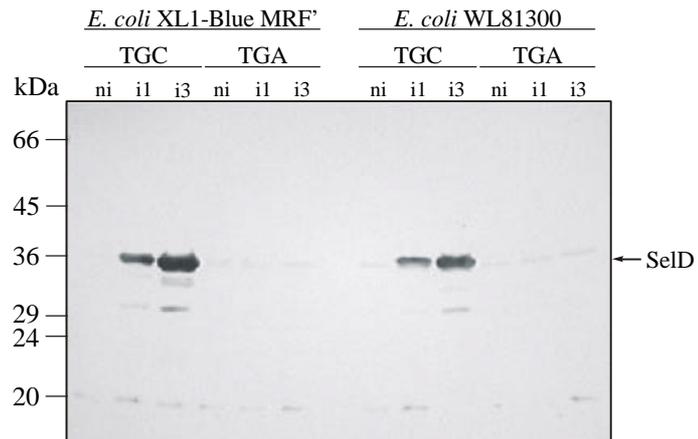
### 3.7. Synthese von *E. acidaminophilum*-Selenoproteinen in *E. coli*

In Komplementationsversuchen mit der *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 konnte gezeigt werden, dass der Selenocystein-spezifische Elongationsfaktor aus *E. acidaminophilum* in *E. coli* aktiv ist (s. 3.4.). Deshalb sollte untersucht werden, ob sich eine Coexpression von *E. acidaminophilum-selB* positiv auf die heterologe Expression von Selenoprotein-codierenden Genen aus diesem Organismus in *E. coli* auswirkt. Dadurch würde sich die Möglichkeit ergeben, die vermutete Interaktion von SelB mit den entsprechenden mRNA-Strukturen *in vivo* zu studieren (wenn auch nicht in *E. acidaminophilum* selbst).

#### 3.7.1. Heterologe Expression der Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* in *E. coli*

Zunächst wurde untersucht, in welchem Maße die entsprechenden Genprodukte in *E. coli* synthetisiert werden, ohne dass eine zusätzliche Expression von *selB* aus *E. acidaminophilum* erfolgt. Dazu wurden die bereits auf den Expressionsvektoren pASK-IBA3 (*grdB1* und *prxU*) und pASK-IBA5 (*selD1*) vorliegenden C- bzw. N-terminalen Strep-tag II-Fusionen verwendet. Von allen drei Fusionsproteinen existierte auch eine Cystein-Mutante, bei welcher das Selenocystein-codierende TGA durch ein TGC-Codon ersetzt war. Die Plasmide für Wildtyp und Cystein-Mutante wurden freundlicherweise von M. REUTER (pIBA3B, pIBA3MBU), T. PARTHER (pPRXU, pPRXU47C) sowie J. JÄGER (pSD1N, pMUD15) zur Verfügung gestellt.



*selD1*

**Abb. 17: Western-Blot-Nachweis der in *E. coli* produzierten Selenoproteine aus *E. acidaminophilum*.** SDS-Lysate ganzer Zellen, die das entsprechende Expressionsplasmid enthielten, wurden mittels SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Heterolog exprimierte Proteine wurden mit Hilfe von StrepTactin-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen. TGC: Cystein-Mutante, TGA: Wildtyp, ni: Zellen vor Induktion, i1: Zellen nach 1 h Induktion mit AHT, i3: Zellen nach 3 h Induktion mit AHT. Von den *grdB1*- und *selD1*-exprimierenden Zellen wurde im Vergleich zum *prxU*-Ansatz die vierfache Lysat-Menge aufgetragen.

Für *grdB1* (Wildtyp) konnte in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> die Synthese des entsprechenden Genproduktes nachgewiesen werden; die mit der Cystein-Mutante übereinstimmende Größe des Proteins sowie die Lokalisation des hier detektierten *Strep-tag* II am C-Terminus des Polypeptids ließen auf ein (zumindest partielles) Durchlesen des UGA-Codons schließen. Eine Expression wurde auch in der *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 beobachtet, allerdings in deutlich geringerem Maße. Da aber auch die Cystein-Mutante in diesem Stamm in wesentlich geringerer Menge als in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> exprimiert wurde, konnte nicht gefolgert werden, dass die deutlich höhere Expressionsrate des Wildtyp-Proteins in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> auf den Einbau von Selenocystein zurückzuführen ist. Dennoch sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass *E. coli*-SelB die für *grdB1* postulierte mRNA-Struktur erkennt. Neben dem *grdB1*-Genprodukt wurden auch Proteine mit einer Größe von ca. 30 kDa und ca. 33 kDa mittels StrepTactin-Peroxidase-Konjugat detektiert. Diese Banden beschrieb auch REUTER (2000) bei der heterologen Expression und Reinigung von Selenoprotein B als C-terminale *Strep-tag* II-Fusion; vermutlich handelt es sich um Abbauprodukte oder Proteine, die auf einen internen Startpunkt der Translation zurückgehen.

Das Gen *prxU* (Wildtyp) wurde sowohl in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> als auch *E. coli* WL81300 in relativ hohem Maße exprimiert. Ein Unterschied zwischen beiden Stämmen war kaum feststellbar und auch die Differenz zur Cystein-Mutante war hier geringer ausgeprägt als bei *grdB1*. Offensichtlich wurde das Selenocystein-codierende UGA in *prxU* in beiden Stämmen unter den gegebenen Bedingungen in hohem Maße durchgelesen. Wahrscheinlich erfolgte eine starke Suppression (z. B. durch die Insertion von Tryptophan), da zumindest für *E. coli* WL81300 in Folge des *selB*-Defektes ein spezifischer Einbau von Selenocystein auszuschließen war. Wie bei *grdB1* bestand jedoch die Möglichkeit, das zumindest ein Teil des in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> synthetisierten Proteins diese Aminosäure enthielt.

Für *selD1* konnte weder in *E. coli* XL1-Blue MRF' noch in *E. coli* WL81300 eine Expression des Wildtyp-Gens nachgewiesen werden, allerdings wurde auch die Cystein-Mutante in deutlich geringerer Menge produziert als das bei *grdB1* und *prxU* der Fall war.

### 3.7.2. Konstruktion von Plasmiden zur Coexpression von *selB* und *selC*

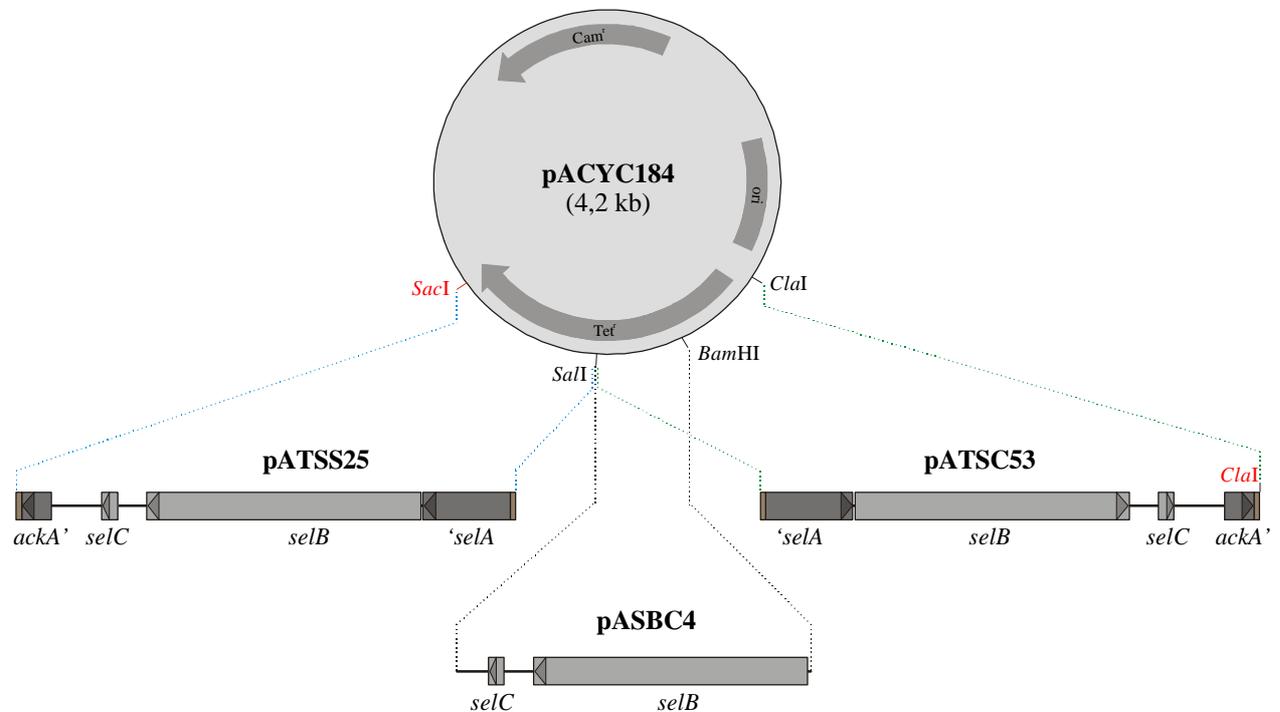
Um eine Coexpression von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* zu ermöglichen, wurden drei verschiedene Konstrukte (pASBC4, pATSC53 und pATSS25) mit diesen beiden Genen hergestellt. Durch die (nachfolgend beschriebene) unterschiedliche Klonierung sollten Plasmide mit verschiedener *selB*-Expressionsrate generiert werden, da die Stöchiometrie der Komponenten, die an der Bildung des aus *SelB*, GTP, Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und mRNA bestehenden quaternären Komplexes beteiligt sind, einen großen Einfluss auf die Effizienz des Prozesses hat (TORMAY *et al.*, 1996).

Die Konstruktion des Plasmids pASBC4 erfolgte durch Ligation eines 2,4 kb großen PCR-Fragments, welches die Gene *selB* (inklusive Ribosomen-Bindestelle) und *selC* aus *E. acidaminophilum* enthielt, in die *Bam*HI- und *Sal*I-Schnittstellen des Vektors pACYC184 (Abb. 18). Die Amplifikation des entsprechenden Bereichs erfolgte vom Plasmid pTN2 unter Verwendung der Primer SBSCDN und SBSCUP. In pASBC4 steht *selB* aus *E. acidaminophilum* unter der Kontrolle des Promotors des Tetracyclin-Resistenzgens. Der Vektor pACYC184 wurde verwendet, da er auf Grund seines p15A-Replikationsursprungs kompatibel zu den hier genutzten Expressionsvektoren mit ColE1-Replikationsursprung ist.

Das Plasmid pATSC53 enthielt das gesamte Insert von pTN2 (mit den Genen '*selA*, *selB*, *selC* und *ackA*'), kloniert in die *Sal*I- und *Cla*I-Schnittstellen von pACYC184 (Abb. 18). Im Gegensatz zu pASBC4 wiesen die Gene *selB* und *selC* hier nicht die gleiche Transkriptionsrichtung wie das Tetracyclin-Resistenzgen auf. Um ein solches Konstrukt herzustellen, war es notwendig, in pTN2 eine *Cla*I-Schnittstelle einzuführen. Das geschah im stromabwärts von *selC* gelegenen Teil der *multiple cloning site* des Vektors pUC18, indem durch zielgerichtete Mutagenese mit den Primern MUCLADN und MUCLAUP vor der bereits vorhandenen Sequenz 5'-GAT-3' (Position 224-226 im Vektor) die Basenfolge 5'-ATC-3' eingefügt wurde, wodurch die gewünschte Erkennungssequenz für *Cla*I (5'-ATCGAT-3') entstand. Die für die Klonierung verwendete *Sal*I-Schnittstelle in pTN2 gehörte zum stromaufwärts von *selA* gelegenen Teil der *multiple cloning site* des Vektors.

Auch pATSS25 enthielt das gesamte Insert des Plasmids pTN2, allerdings lagen wie bei pASBC4 die Gene *selB* und *selC* in Transkriptionsrichtung des Tetracyclin-Resistenzgens (Abb. 18). In dieses wurde durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer MUSACDN und MUSACUP eine *Sac*I-Schnittstelle eingefügt, wobei nach dem oben beschriebenen Schema vorgegangen wurde: direkt stromaufwärts der bereits existierenden Sequenz 5'-CTC-3' (Position 2723-2725 im Vektor pACYC184) wurden die Nukleotide 5'-GAG-3' inseriert, dadurch ergab sich die *Sac*I-Erkennungssequenz 5'-GAGCTC-3'. Die Isolierung des zu klonierenden Inserts erfolgte durch Verdau von pTN2 mit *Sal*I und

*SacI*, unter Verwendung der Schnittstellen, die sich stromaufwärts von *selA*' bzw. stromabwärts von *selC* in der *multiple cloning site* des Vektors befanden. Das entstandene Fragment wurde anschließend in das mit den gleichen Enzymen geschnittene pACYC184-Derivat ligiert.



**Abb. 18: Konstruktion der Plasmide pASBC4, pATSS25 und pATSC53.** Die verschiedenen, in den Vektor pACYC184 eingefügten Fragmente sind schematisch dargestellt. Die für die Klonierung verwendeten Restriktions-Schnittstellen des Vektors sind angegeben, die durch Mutagenese eingefügten Schnittstellen für *SacI* und *ClaI* wurden rot hervorgehoben. Unvollständige Gene sind dunkelgrau, vollständige dagegen hellgrau angegeben. Braune Rechtecke kennzeichnen Teile der *multiple cloning site* des Vektors. Dieser ist im Vergleich zu den Inserts nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Die Bindung der Sekundärstruktur einer Selenoprotein-codierenden mRNA erfolgt allein durch die SelB-Domäne 4b, während den Domänen 1-3 die Funktion von EF-Tu (Bindung von GTP und Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup>, Interaktion mit dem Ribosom) zukommt. Auf Grund dieser Funktionstrennung sollte es möglich sein, Hybridproteine aus dem C-terminalen Teil von *E. acidaminophilum*-SelB und den N-terminalen Bereichen von *E. coli*-SelB zu konstruieren, welche sowohl die SECIS-Elemente des Gram-positiven Organismus erkennen, als auch effektiv mit *E. coli*-Ribosomen interagieren.

Insgesamt wurden vier verschiedene Hybride hergestellt, wobei die Fusion der beiden Proteine einmal am Übergang zwischen den Domänen 2 und 3, einmal am Übergang zwischen den Domänen 3 und 4 sowie jeweils kurz vor und kurz nach dem Beginn von Domäne 4b erfolgte (Abb. 19).

	Domäne 1		
SelB_Ea	MKNI I IGTAGHIDHGKTTLLIKALTKGKETDRLKKEEKKRGISIDLGFTNFDLP SGKRAGIVDVP GHEKFIK NMLAGVHGMDL	80	
SelB_Ec	--MI IATAGHVDHGKTTLLQAITGVNADRLPEEKKRGM TIDLGYAYWPQPDGRVPGFIDVPGHEKFLSNMLAGVGGIDH	77	
SelB_Ea	VLLVVSAD EGVMPQTIEHLEILNLLDIKKGLVITKADTVDTDFKELVKEDVMEKLEGTFL ENADIVEVDSISGTGIKEL	160	
SelB_Ec	ALLVVACDDGVMAQTREHLAILQLTGNPMLTVALTKADRVD EARVDEVERQVKEVLR EYGF AEAKLFITAAATEGRMDAL	157	
	Domäne 2		
SelB_Ea	TEEIDRLTDEVEDKNIDANPRLSIDRVFSIKGFGTVVTGT LIEGKMNLDDDDMMIYPGEIKTKIRSLQVHGESQKIAYAGQ	240	
SelB_Ec	REHLLQLPER--EHASQHSFRLAIDRAFTVKGAGLVVVTGT ALSGEVKGVGD SLWLTGVNKP MRVRLHAQNQPTETANAGQ	235	
	Domäne 3		
SelB_Ea	RVAINLA-NVRVEEIERGDVLAKPNSMQSSMMIDVKLKL IKNLDRGLRYWDRIRLYHGAK EILGRVAFLDREELAPGEEC	319	
SelB_Ec	RIALNIAGDAEKEQINRGDWLLADVPPEPFTRVIVELQT ---HTPLTQWQPLHIHHAASHVTGRVSL L-----EDN	303	
	<b>pFRGCM1</b>		
	Domäne 4		
SelB_Ea	FCQIRLED TIVAKDDR FVIRYYS PMITVGGGAI D TNP-KKHKRFDE DV--LSSLNMKES-GDPQFVVEENIR TNSKDY	395	
SelB_Ec	LAELVFDTP LWLADNDR LVRDISARNTLAGARVVM LNPPRRGRKRKPEY LQWLASLARAQSDADALSVHLERGAVNLADF	383	
	<b>pFNPCM1</b>		
SelB_Ea	PVLKEIAKSLGENEDIVLENIKGLVASGRVIDINGTYI HLEHYDRLRQKICSTLEEFHKS NR LKRGM LKEELRSRVESKL	475	
SelB_Ec	AWARQLN---GEGMRELLQQ-PGYIQAGYSL-LNAPVAA ---RWQRKILDTLATYHEQHRDEPGPGRERLR-RMALPM	452	
	<b>pFLRCM2</b>		
	Domäne 4b		
SelB_Ea	KSKDFDILL-ERVAADKEIKIEENLASISSFSVKFSDSDIKIRQEIEDTIRQGGFSPEQIDVITG--ERSEYIQVFESMV	552	
SelB_Ec	EDEALVLL LIEKMRESGDIHSHHGWLHLPDHKAGFSEEQAIWQKAEPLFGDEPWWVRDLAKETGTDEQAMRLTLRQAAQ	532	
	<b>pFFSCM9</b>		
SelB_Ea	GETLVRVSEDTVFHKEIYEKALDLLRDHVQKNGEITLAEFRDMIGASRKYAMLLLED FDRKRITRRIGEKRVLS-----	626	
SelB_Ec	QGIITAIVKDRYRNDRIVEFANMIRDLDQECGSTCAADFRDLGVGRKLAIQILEYFDRIGFTRRRGNDHLLRDALLFP	612	
SelB_Ea	-- 626		
SelB_Ec	EK 614		

**Abb. 19: Lokalisation der Fusionen zwischen *E. acidaminophilum*-SelB und *E. coli*-SelB.** Identische Aminosäuren beider Sequenzen sind durch Doppelpunkte markiert. Die Bereiche, an denen eine Fusion der beiden Proteine erfolgte, sind grau unterlegt. N-terminal der gekennzeichneten Stellen bestehen die jeweiligen Fusionsproteine aus der *E. coli*-Sequenz, C-terminal davon hingegen aus der *E. acidaminophilum*-Sequenz. Der Beginn der verschiedenen SelB-Domänen (nach KROMAYER *et al.*, 1996) ist ebenfalls angegeben.

Zur Konstruktion der verschiedenen SelB-Hybride wurden die zu fusionierenden Bereiche mittels PCR amplifiziert. Die vier *E. coli*-Fragmente wurden unter Verwendung der Primer FUSECRGD, FUSECNP, FUSECLR und FUSECFS, jeweils kombiniert mit FUSECNER, hergestellt. Als Template diente chromosomale DNA von *E. coli* FM433. Die Synthese der entsprechenden *E. acidaminophilum*-Sequenzen erfolgte mit pTN2 als Template sowie den Primern FUSEARGD und FUSEANP, kombiniert mit FUSEACTER1 bzw. den Primern FUSEALR und FUSEAFS, kombiniert mit FUSEACTER2. Durch diese Primer wurden an den Enden der PCR-Fragmente *Bsa*I- bzw. *Bsm*BI-Schnittstellen so eingeführt, dass nach dem Restriktionsverdau stromaufwärts des N-Terminus von SelB (*E. coli*-Fragmente) ein *Bam*HI-kompatibler und stromabwärts des C-Terminus (*E. acidaminophilum*-Fragmente) ein *Sal*I-kompatibler 5'-Überhang entsteht, während die anderen Enden der PCR-Produkte nach Verdau mit *Bsa*I



**Tab. 11: Aktivität der Formiat-Dehydrogenase H in Rohextrakten von *E. coli* WL81300**

Plasmid	<i>E. acidaminophilum</i> -Gene <sup>1</sup> / <i>selB</i> -Transkriptionsrichtung	FDH <sub>H</sub> -Aktivität [U/mg] <sup>2</sup>
pACYC184	-	<0,1
pASBC4	<i>selB</i> , <i>selC</i> / identisch zu <i>tet</i> -Gen	5,3
pATSC53	' <i>selA</i> , <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>ackA</i> ' / entgegengesetzt zu <i>tet</i> -Gen	5,5
pATSS25	' <i>selA</i> , <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>ackA</i> ' / identisch zu <i>tet</i> -Gen	3,5
pFRGCM1	<i>selB</i> (Hybrid), <i>selC</i> / identisch zu <i>tet</i> -Gen	<0,1
pFNPCM1	<i>selB</i> (Hybrid), <i>selC</i> / identisch zu <i>tet</i> -Gen	<0,1
pFLRCM2	<i>selB</i> (Hybrid), <i>selC</i> / identisch zu <i>tet</i> -Gen	<0,1
pFFSCM9	<i>selB</i> (Hybrid), <i>selC</i> / identisch zu <i>tet</i> -Gen	<0,1

<sup>1</sup> Unvollständige Gene sind durch ein Apostroph gekennzeichnet.

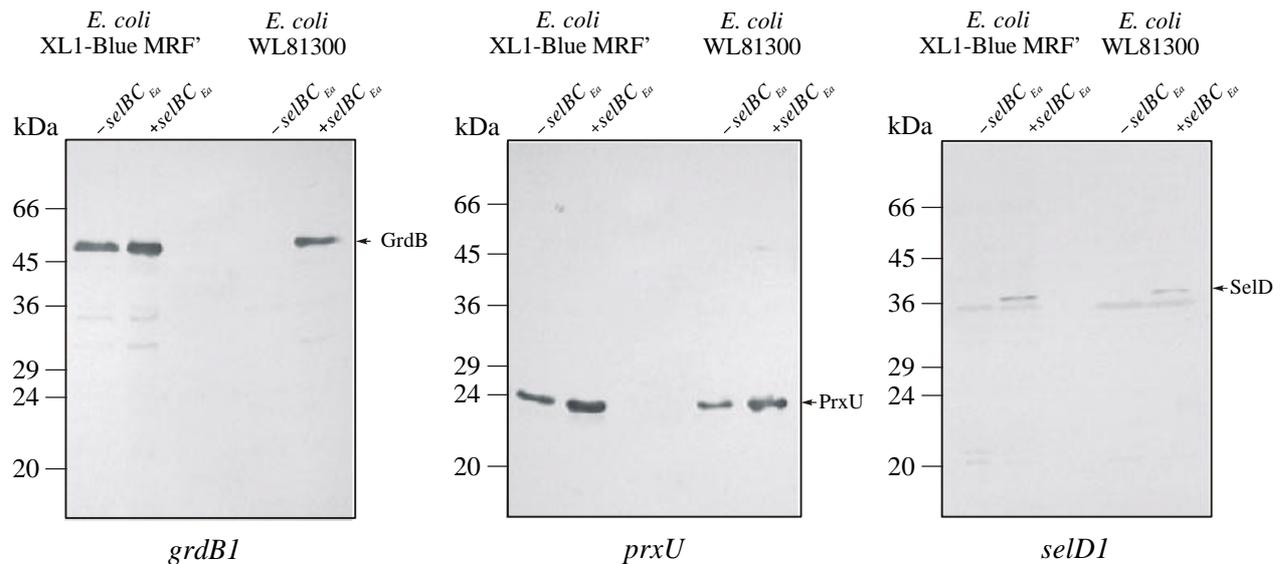
<sup>2</sup> Ein Unit entspricht dem Umsatz von 1 µmol Benzylviologen/min.

Die Plasmide pATSC53 und pASBC4 komplementierten den Defekt der *selB*-Mutante mit annähernd gleicher Effizienz wie pTN2 (s. 3.4.2., Tab. 9), und auch pATSS25 führte zur einer deutlichen Wiederherstellung der FDH<sub>H</sub>-Aktivität. Für weitere Untersuchungen wurde pASBC4 ausgewählt, da es auf Grund seiner geringeren Größe effektiver transformiert werden konnte als pATSC53. Von den konstruierten *selB*-Hybridgenen war keines in der Lage, den Defekt der Mutante *E. coli* WL81300 zu komplementieren.

### 3.7.3. Heterologe Expression von *grdB1*, *prxU* und *selD1* in Gegenwart von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum*

Zellen von *E. coli* XL1-Blue MRF' sowie *E. coli* WL81300, welche die Expressionsplasmide pIBA3B, pPRXU oder pSD1N (s. 3.7.1.) enthielten, wurden mit dem Plasmid pASBC4 bzw. dem Vektor pACYC184 transformiert. Anzucht der Zellen und Nachweis der *Strep-tag* II-Fusionsproteine erfolgten wie unter 3.7.1. beschrieben, allerdings wurde nur nach 3-stündiger Induktion mit AHT eine Probe entnommen.

Für alle drei Selenoprotein-Gene konnte durch die Präsenz des Plasmids pASBC4 mit den Genen *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* eine Steigerung der Expressionsrate im Vergleich zur Kontrolle (Expressionsplasmid plus Vektor pACYC184) festgestellt werden, das galt sowohl für *E. coli* XL1-Blue MRF' als auch für die *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 (Abb. 21). Im Falle von *selD1* wurde sogar überhaupt erst in Gegenwart der beiden *sel*-Gene aus *E. acidaminophilum* eine Expression des Wildtyps in *E. coli* nachgewiesen (vgl. 3.7.1., Abb. 17).



**Abb. 21: Western-Blot-Nachweis der in *E. coli* exprimierten Selenoproteine aus *E. acidaminophilum*.** SDS-Lysate AHT-induzierter Zellen, die das entsprechende Expressionsplasmid sowie entweder den Vektor pACYC184 (*-selBC<sub>Ea</sub>*) oder pASBC4 (*+selBC<sub>Ea</sub>*) als zweites Plasmid enthielten, wurden mittels SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Heterolog exprimierte Proteine wurden mit Hilfe von StreptTactin-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen (Pfeil). Von den *grdB1*- und *selD1*-exprimierenden Zellen wurde im Vergleich zum *prxU*-Ansatz die vierfache Lysat-Menge aufgetragen.

### 3.7.4. Nachweis einer Inkorporation von Selenocystein durch *in-vivo*-Markierung mit <sup>75</sup>Se

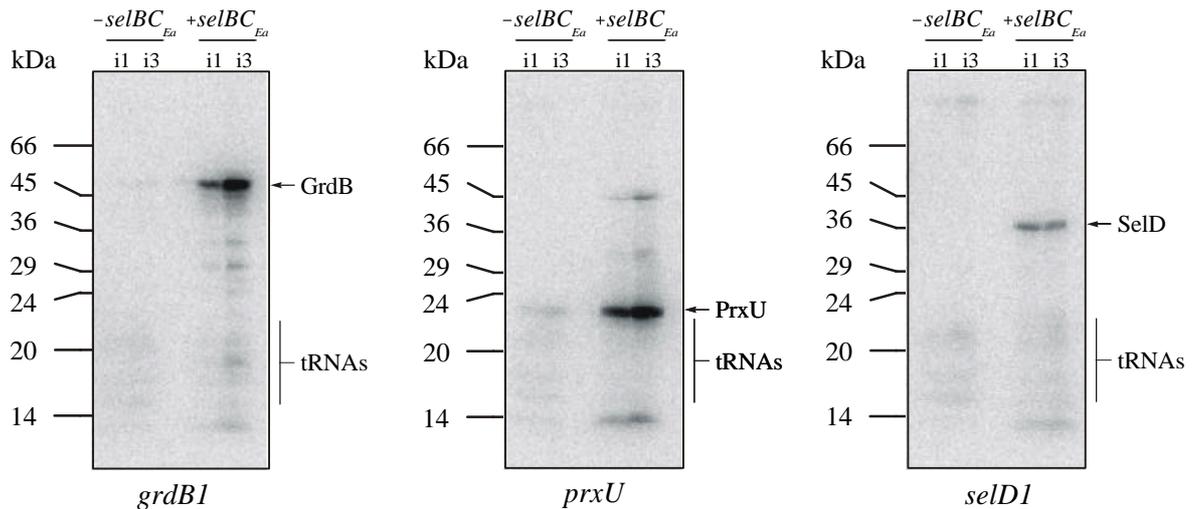
An Hand der durchgeführten Western-Blots konnte nicht ausgeschlossen werden, dass *E. coli*-SelB in der Lage ist, Selenocystein in die Produkte der hier untersuchten Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* einzubauen. In weiteren Versuchen wurde deshalb die Expression in *E. coli* XL1-Blue MRF' bzw. *E. coli* WL81300 in Gegenwart von [<sup>75</sup>Se]-Selenit im Medium durchgeführt. Auf diese Weise sollte außerdem gezeigt werden, dass die Erhöhung der Expressionsrate der drei Selenprotein-codierenden Gene durch *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* tatsächlich auf die Inkorporation von Selenocystein zurückzuführen war.

Die Anzucht der Zellen, die neben dem entsprechenden Expressionsplasmid entweder pASBC4 oder pACYC184 als zweites Plasmid enthielten, erfolgte in LB-Medium, das zusätzlich mit Cystein (30 µg/ml) versetzt wurde, um einen unspezifischen Einbau von Selen in Proteine über den Weg der Cystein-Biosynthese zu unterdrücken (MÜLLER *et al.*, 1997). Unmittelbar vor Induktion der heterologen Genexpression mit AHT wurde [<sup>75</sup>Se]-Selenit (Endkonzentration 2 µM; 0,3 µCi/ml) zugegeben. Nach 1-stündiger und nach 3-stündiger Induktion wurden Zellen geerntet, mit LB gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen, die so erhaltenen Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

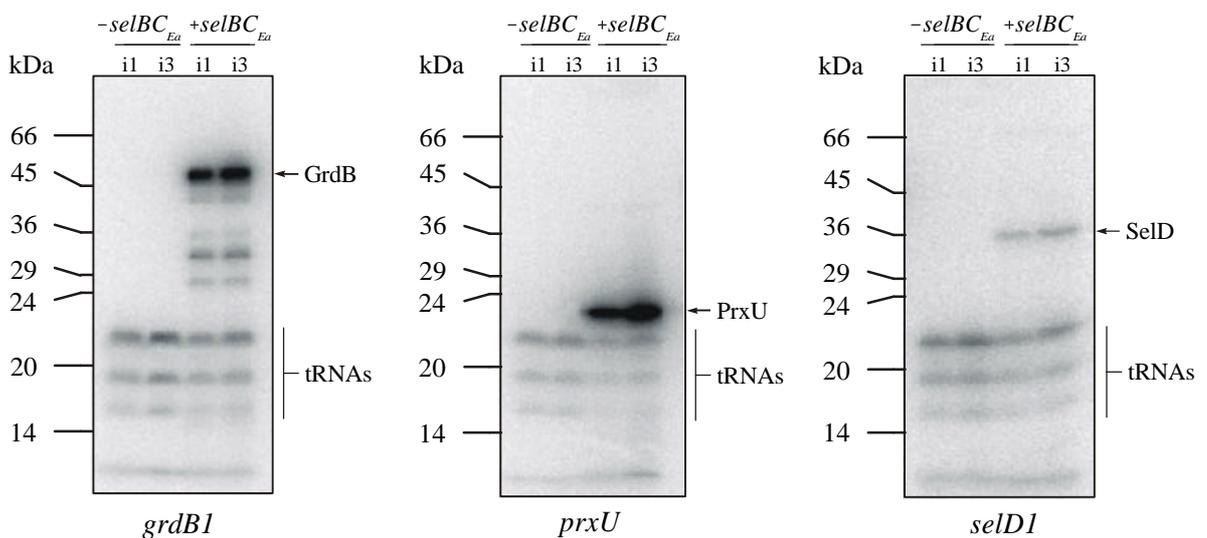
Nach Expression in *E. coli* XL1-Blue MRF' zeigte das Autoradiogramm (Abb. 22) für alle drei Gene eine <sup>75</sup>Se-markierte Bande der erwarteten Größe (*grdB1*: ~ 48 kDa, *prxU*: ~23 kDa, *selD1*: ~37 kDa), wenn mittels pASBC4 eine Coexpression von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* erfolgte. Ohne diese beiden Gene, d. h. nur in Gegenwart des *E. coli*-eigenen, Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors und der entsprechenden tRNA wurde für *grdB1* sowie *prxU* nur eine sehr schwach markierte Bande der

entsprechenden Größe detektiert, im Vergleich zum Ansatz mit pASBC4 betrug deren Intensität (kalkuliert mit dem Programm IMAGEQUANT) lediglich ca. 0,5 % (*grdB1*) bzw. 1 % (*prxU*). Unter den gegebenen Bedingungen erfolgte somit durch die entsprechenden *E. coli*-Faktoren allein kein effektiver Einbau von Selenocystein in die drei untersuchten Selenoproteine aus *E. acidaminophilum*.

#### *E. coli* XL1-Blue MRF'



#### *E. coli* WL81300



**Abb. 22:** Autoradiographie einer <sup>75</sup>Se-Markierung der in *E. coli* exprimierten Selenoproteine aus *E. acidaminophilum*. SDS-Lysate AHT-induzierter Zellen, die das entsprechende Expressionsplasmid sowie den Vektor pACYC184 (-*selBC*<sub>*Ea*</sub>) bzw. das Plasmid pASBC4 (+*selBC*<sub>*Ea*</sub>) enthielten, wurden in einem 13 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. i1: Zellen nach 1 h Induktion mit AHT, i3: Zellen nach 3 h Induktion mit AHT. Die rekombinanten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Expression von *grdB1*, *prxU* und *selD1* in der *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 führte zu ähnlichen Ergebnissen: eine Markierung der Proteine erfolgte nur in Gegenwart von pASBC4. In diesem Fall konnte die beobachtete Inkorporation von Selen allein dem Elongationsfaktor aus *E. acidaminophilum* zugeschrieben werden, da ein Beitrag von *E. coli*-SelB auszuschließen war. Sowohl in *E. coli* XL1-Blue MRF' als auch in *E. coli* WL81300 stieg in Gegenwart von pASBC4 die Intensität der Selen-markierten Proteinbanden in der Reihenfolge *selD1*<<*grdB*<*prxU* an. Dabei muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass sich die Expressionsraten der Cystein-Mutanten der drei Proteine ähnlich verhielten (s. 3.7.1., Abb. 17).

### **3.8. Einfluss von Mutationen der putativen SECIS-Elemente auf die heterologe Selenoprotein-Synthese**

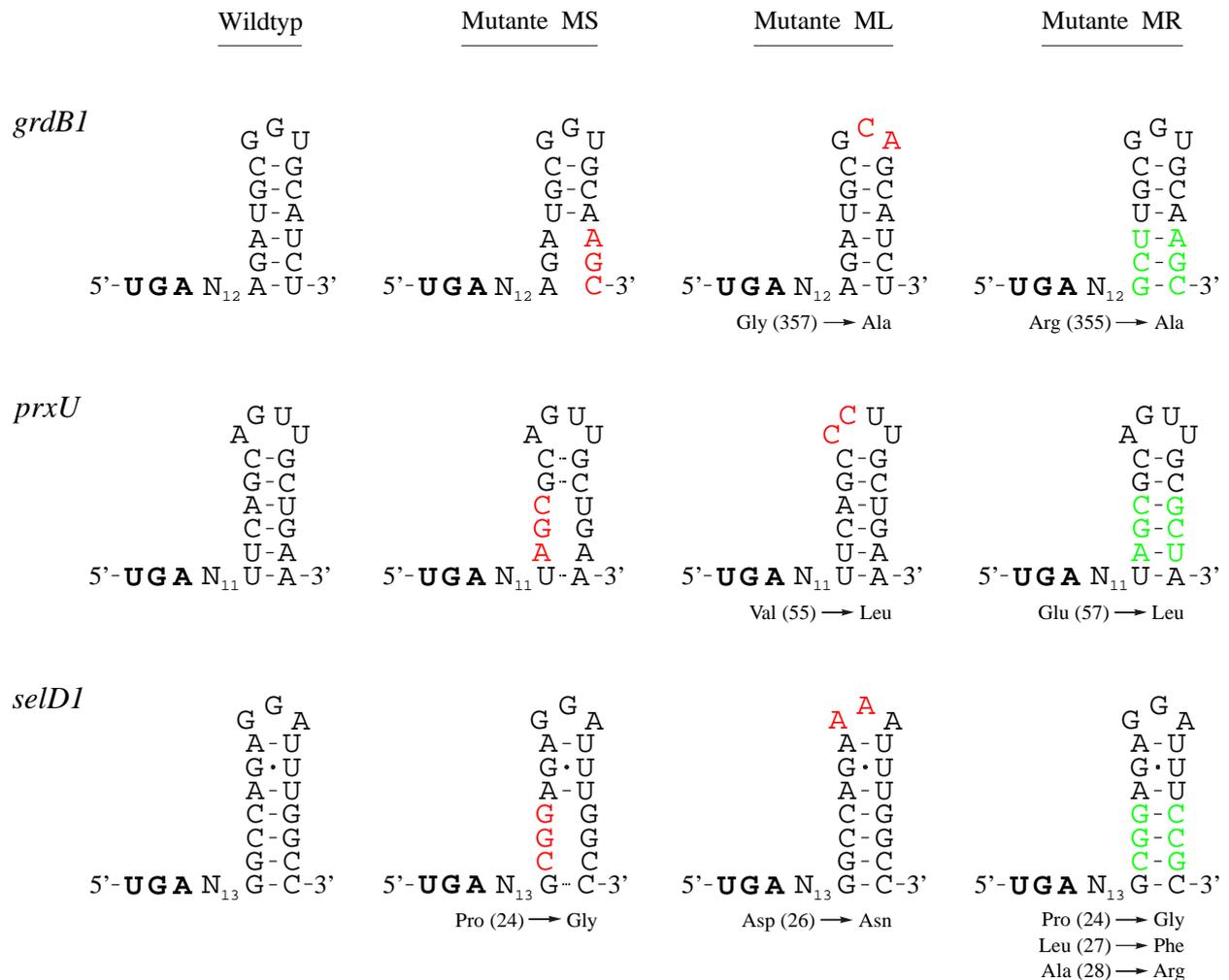
#### **3.8.1. Einführung von Mutationen in die postulierten mRNA-Sekundärstrukturen**

Um die Bedeutung der stromabwärts des UGA-Codons postulierten mRNA-Sekundärstrukturen für den Einbau von Selenocystein in die Genprodukte von *grdB1*, *prxU* und *selD1* zu klären, wurden durch zielgerichtete Mutagenese verschiedene Veränderungen in der entsprechenden Region eingeführt (Abb. 23). Als Template dienten dabei die auf den Expressionsplasmiden pIBA3B, pPRXU bzw. pSD1N vorliegenden *Strep-tag* II-Fusionen der Gene. Die Auswirkungen auf die Proteinsequenz sollten möglichst gering bleiben, um Faktoren zu minimieren, die nicht unmittelbar mit der Effizienz der Selenocystein-Inkorporation verbunden sind, aber Einfluss auf die Detektion der <sup>75</sup>Se-markierten Genprodukte haben können (wie z. B. unterschiedliche Stabilität von Wildtyp- und Mutanten-Proteinen).

In der Schleife der apikalen Haarnadelstruktur wurden unter Verwendung der Primerpaare GB1LP1D und GB1LP1U, PXULP1D und PXULP1U sowie SD1LP1D und SD1LP1U jeweils zwei benachbarte Nukleotide verändert (Mutante ML; vgl. 3.6., Abb. 15). Im Falle von *grdB* resultierte daraus die Umwandlung eines Glycin-Codons in ein Alanin-Codon, für die Genprodukte von *prxU* bzw. *selD1* ergab sich der Austausch von Valin gegen Leucin bzw. Aspartat gegen Asparagin.

Des Weiteren wurden mit Hilfe der Primerpaare GB1SMSSD und GB1SMSSU, PXUSMSSD und PXUSMSSU sowie SD1SMPGD und SD1SMPGU Mutanten hergestellt, in denen drei aufeinander folgende Nukleotide im Stamm der apikalen Haarnadelstruktur verändert waren, so dass mindestens drei Basenpaarungen nicht mehr ausgebildet werden konnten (Mutante MS). Für *grdB* und *prxU* war das möglich, ohne die entsprechende Aminosäure-Sequenz zu verändern, da jeweils ein Serin-Codon durch ein synonymes Triplett ersetzt wurde, für das Genprodukt von *selD1* resultierte die Mutation in dem Austausch von Prolin gegen Glycin. Diese Varianten wurden als Template für eine weitere Mutagenese mit den Primerpaaren GB1SSRPD und GB1SSRPU, PXUSSRPD und PXUSSRPU bzw. SD1PGRPD und SD1PGRPU eingesetzt. Dabei wurden auf der anderen 'Seite' des Stammes jeweils die Nukleotide, die ursprünglich im Wildtyp mit den nun veränderten Basen gepaart waren, so verändert, dass eine

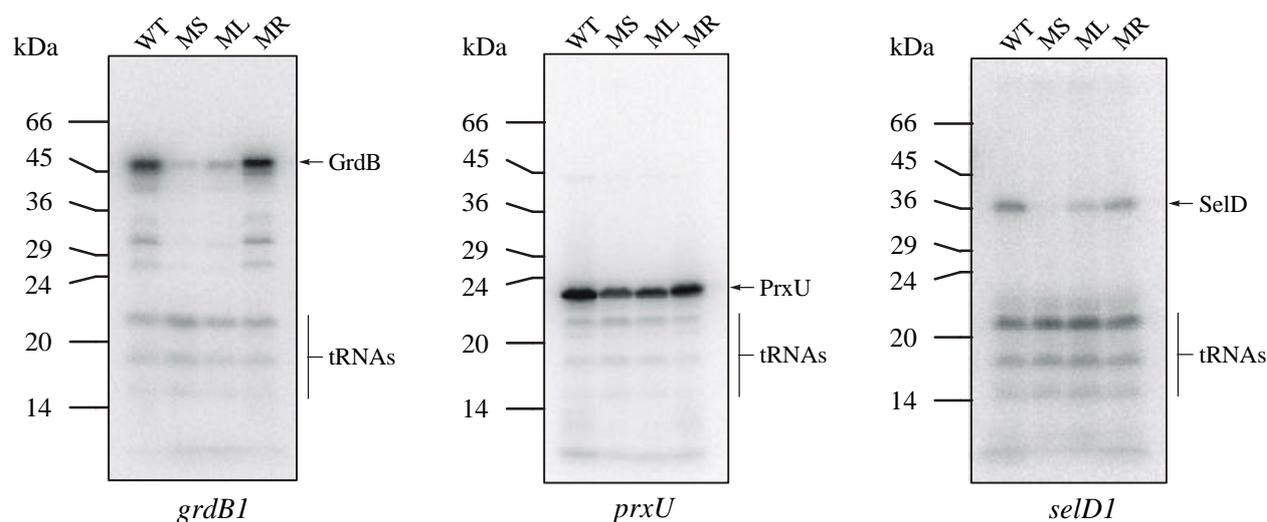
Basenpaarung an den entsprechenden Positionen erneut möglich sein sollte. In diesem Falle ergaben sich allerdings schwerwiegendere Änderungen in den entsprechenden Proteinsequenzen: Austausch von Arginin gegen Alanin (*grdB*), von Glutamat gegen Leucin (*prxU*) bzw. von Leucin gegen Phenylalanin und Alanin gegen Arginin (*selD1*).



**Abb. 23: Innerhalb der putativen SECIS-Elemente von *grdB*, *prxU* und *selD1* eingeführte Mutationen.** Dargestellt ist jeweils der apikale Teil der postulierten mRNA-Sekundärstrukturen. Änderungen in der Schleife (Mutante ML) sowie auf einer 'Seite' des Stammes (Mutante MS) der Haarnadelstruktur wurden rot, Mutationen auf beiden 'Seiten' des Stammes unter Beibehaltung der Basenpaarung (Mutante MR) dagegen grün hervorgehoben. Die resultierenden Veränderungen auf Aminosäure-Ebene sind unterhalb der jeweiligen Struktur angegeben.

### 3.8.2. Inkorporation von Selenocystein in die Produkte der mutierten Gene

Die verschiedenen Varianten von *grdB1*, *prxU* und *selD1* wurden in der *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 in Gegenwart von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* (auf dem Plasmid pASBC4) in [<sup>75</sup>Se]-Selenit-enthaltendem Medium exprimiert. Zellanzucht, Induktion der Genexpression und Zellernte wurden wie unter 3.7.4. beschrieben durchgeführt. Die Analyse der markierten Makromoleküle erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie (Abb. 24).



**Abb. 24:** Autoradiographie einer  $^{75}\text{Se}$ -Markierung der in *E. coli* WL81300 exprimierten Selenoprotein-Mutanten aus *E. acidaminophilum*. SDS-Lysate ganzer Zellen, die das entsprechende Expressionsplasmid sowie das Plasmid pASBC4 (+*selBC<sub>Ed</sub>*) enthielten, wurden in einem 13 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. WT: Wildtyp der Selenoprotein-Gene, MS, ML, MR: Mutationen in den putativen SECIS-Elementen der Selenoprotein-Gene. Die rekombinanten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Um die Menge an Selen, die in die verschiedenen Mutanten inkorporiert war, in Relation zum jeweiligen Wildtyp setzen zu können, wurde die Intensität der Signale des Autoradiogramms mit Hilfe des Programms IMAGEQUANT verglichen. Zur Bestätigung der so erhaltenen Daten erfolgte ein zweites Markierungsexperiment wie oben beschrieben. Die SDS-Lysate der induzierten Zellen wurden ebenfalls durch SDS-PAGE aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und deren Radioaktivität am Szintillationszähler erfasst. Die ermittelten Werte sind in Tab. 12 zusammengefasst.

**Tab. 12: Inkorporation von Selen in die Genprodukte verschiedener *grdB1*-, *prxU*- und *selD1*-Varianten**

Gen	Variante (Plasmid)		Inkorporation von $^{75}\text{Se}$ , [%] des Wildtyps, ermittelt mit:	
			IMAGEQUANT	Szintillationszähler
<i>grdB1</i>	Wildtyp	(pIBA3B)	100	100
	Mutante MS	(pGBMS11)	12	7
	Mutante ML	(pGBML2)	23	15
	Mutante MR	(pGBMR3)	116	94
<i>prxU</i>	Wildtyp	(pPRXU)	100	100
	Mutante MS	(pPUMS1)	43	46
	Mutante ML	(pPUML2)	56	56
	Mutante MR	(pPUMR3)	91	85
<i>selD1</i>	Wildtyp	(pSD1N)	100	100
	Mutante MS	(pSDMS11)	11	8
	Mutante ML	(pSDML2)	25	36
	Mutante MR	(pSDMR1)	69	59

Die eingeführten Mutationen hatten einen deutlichen Einfluss auf die Inkorporation von Selen in die entsprechenden Proteine. Der Austausch von drei aufeinander folgenden Nukleotiden im Stamm der postulierten Haarnadelstruktur der mRNAs von *grdB1* und *prxU1* (Mutante MS) reduzierte die Synthese der Selen-markierten Proteine auf etwa ein Zehntel, im Falle von *prxU* war der Effekt allerdings deutlich geringer (Rückgang auf 43-46 %). Wenn eine Paarung dieser drei Nukleotide durch die entsprechende Veränderung der gegenüber liegenden Basen wieder ermöglicht wurde (Mutante MR), führte das für *prxU* und *selD1* zur teilweisen Wiederherstellung der Selen-Inkorporation (85-91 % bzw. 59-69 % markiertes Protein im Vergleich zum Wildtyp). Im Falle von *grdB* vermittelte die so veränderte Struktur den Einbau von Selenocystein mit gleicher, möglicherweise sogar höherer Effizienz als das Wildtyp-Element (94 bzw. 116 %). Die Veränderung von jeweils zwei Basen in der Schleife der postulierten Struktur (Mutante ML) reduzierte ebenfalls in allen drei Fällen deutlich die Inkorporation von Selen in die entsprechenden Proteine, wobei erneut für *prxU* (56 % Selen-markiertes Genprodukt im Vergleich zum Wildtyp) ein geringerer Effekt beobachtet wurde als für *grdB1* (15-23 %) oder *selD1* (25-36 %).

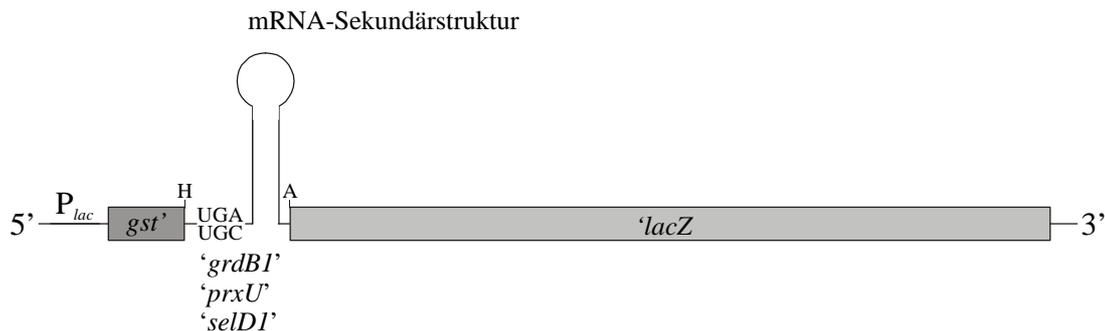
### **3.9. Die Effizienz der Inkorporation von Selenocystein in die Genprodukte von *grdB1*, *prxU* und *selD1***

Ein direkter Vergleich der Effizienz des Selenocystein-Einbaus an Hand der Markierung der entsprechenden Proteine mit <sup>75</sup>Selen war durch die unterschiedlichen Expressionsraten der drei Gene (auch der Cystein-Mutanten) in *E. coli* erschwert (s. 3.7.1.) Zudem zeigten die entsprechenden Expressionskulturen ein stark abweichendes Wachstumsverhalten. Während im Falle von *grdB* und *prxU* die OD<sub>600</sub> nach Induktion der heterologen Genexpression mittels AHT nahezu konstant blieb, waren kaum Auswirkungen auf das Wachstum der *selD1*-exprimierenden Zellen feststellbar. Zu erwähnen ist auch, dass *selD1* auf einem pASK-IBA5-Derivat (N-terminaler *Strep-tag* II) vorlag, die beiden anderen Gene dagegen auf einem pASK-IBA3-Derivat (C-terminaler *Strep-tag* II). Alle diese Faktoren könnten sich auf die Stöchiometrie der an der Bildung des quaternären Komplexes beteiligten Komponenten SelB•GTP, Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und mRNA auswirken, was wiederum die Effizienz der Selenocystein-Inkorporation in nicht unerheblichem Maße beeinflusst (TORMAY *et al.*, 1996).

Um für alle drei Gene vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden Translations-Fusionen der postulierten SECIS-Elemente mit dem *lacZ*-Gen hergestellt, um die gemessene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität als weitgehend Protein-unabhängiges Maß für die Durchleserate des UGA-Codons heranziehen zu können. Außerdem sollte auf diese Weise gezeigt werden, dass analog zur *fdhF*-mRNA aus *E. coli* die Region unmittelbar 3' vom UGA-Codon der Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Inkorporation von Selenocystein durch *E. acidaminophilum*-SelB ist.

### 3.9.1. Konstruktion der *lacZ*-Fusionen

Ein Bereich von jeweils 63 bp, der die postulierten SECIS-Elemente der Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* umfasste (zehn Nukleotide stromaufwärts und 50 Nukleotide stromabwärts des Selenocystein-codierenden UGA), wurde unter Verwendung der Primerpaare GRDBKP1 und GRDBKP2, PRXUKP1 und PRXUKP2, sowie SELD1KP1 und SELD1KP2 mittels PCR amplifiziert, als Template dienten die *Strep-tag* II-Expressionsvektoren. In gleicher Weise wurde mit den entsprechenden Cystein-Mutanten verfahren (Primer GRDBCP1, PRXUCP1 und SELD1CP1, jeweils kombiniert mit dem zweiten Oligonukleotid der oben genannten Paare). Nach Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit *Hind*III und *Apa*I (die entsprechenden Schnittstellen waren über die Primer eingeführt worden) erfolgte die Ligation mit dem gleichermaßen geschnittenen Vektor pSKAGS. Die so erzeugten Plasmide (Wildtyp: pGBWT11, pPUWT1 und pSDWT24; Cystein-Mutanten: pGBMC2, pPUMC4 und pSDMC2) trugen eine Translations-Fusion zwischen dem Gen der Glutathion-S-Transferase (*gst*), gefolgt von der 63 bp-Region des jeweiligen Selenoprotein-Gens aus *E. acidaminophilum* und dem  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (Abb. 25).



**Abb. 25: Schematische Darstellung der konstruierten *gst*'-'*grdB1*'/'*prxU*'/'*selD1*'-'*lacZ*-Fusionen.** Die für die Klonierung der jeweils 63 bp umfassenden Genregionen aus *E. acidaminophilum* genutzten Schnittstellen für *Hind*III (H) und *Apa*I (A) sind angegeben.

### 3.9.2. $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten der Fusions-Konstrukte

Die verschiedenen pSKAGS-Derivate wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert, der als zweites Plasmid entweder pASBC4 oder den Vektor pACYC184 enthielt, in diesem Stamm ist durch die Überproduktion des *lac*-Repressors (*lacI<sup>d</sup>*) eine strikte Kontrolle der Expression vom *lac*-Promotor gewährleistet. Um Faktoren auszuschließen, welche die Menge des produzierten Fusionsproteins beeinflussen, aber nicht direkt mit der UGA-Durchleserate verbunden sind (z. B. unterschiedliche *codon usage* der Genabschnitte aus *E. acidaminophilum*), sollten die Cystein-Mutanten als Maßstab für die jeweils maximale Expressionsrate dienen. Für jede Plasmidkombination wurden drei unabhängige

Kulturen (jeweils drei verschiedene Klone) angesetzt, die Ernte der Zellen erfolgte 2 h nach Induktion mit IPTG. Die ermittelten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten sind in Tab. 13 zusammengefasst.

**Tab. 13:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten der *gst'*-*'grdB'*/*'prxU'*/*'selD'*-*'lacZ*-Fusionen in *E. coli* XL1-Blue MRF'**

Genfragment	Coexpression von <i>selB<sub>Ea</sub></i> , <i>selC<sub>Ea</sub></i> <sup>1</sup>	$\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten [Miller-Units] <sup>2</sup>
' <i>grdB1</i> '(TGA)	-	1325 ( $\pm$ 133)
	+	6767 ( $\pm$ 778)
' <i>grdB1</i> '(TGC)	-	11212 ( $\pm$ 1098)
	+	11863 ( $\pm$ 418)
' <i>prxU</i> '(TGA)	-	129 ( $\pm$ 7)
	+	5261 ( $\pm$ 351)
' <i>prxU</i> '(TGC)	-	8232 ( $\pm$ 464)
	+	8095 ( $\pm$ 247)
' <i>selD1</i> '(TGA)	-	377 ( $\pm$ 42)
	+	3713 ( $\pm$ 269)
' <i>selD1</i> '(TGC)	-	10471 ( $\pm$ 1393)
	+	9635 ( $\pm$ 1247)

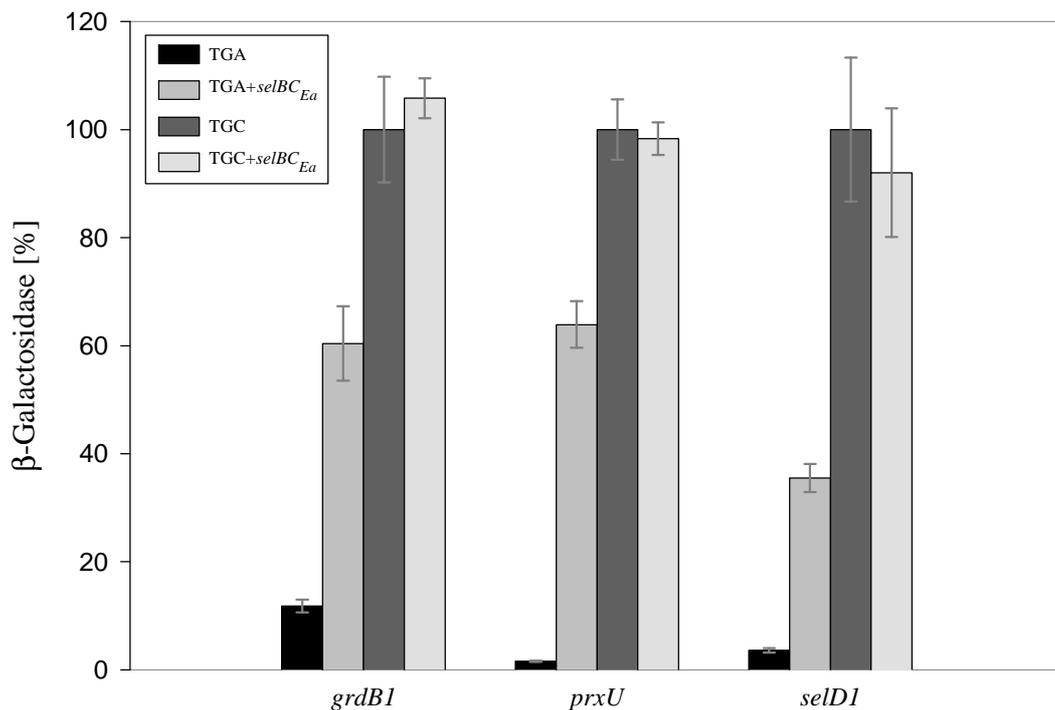
<sup>1</sup> auf dem Plasmid pASBC4

<sup>2</sup> Durchschnittswerte und Standardabweichungen von je drei unabhängigen Ansätzen, deren Enzymaktivität wurde mindestens doppelt bestimmt.

Um die Werte der verschiedenen Gene vergleichen zu können, wurden die Aktivitäten jeweils ins Verhältnis zur entsprechenden Cystein-Mutante (TGC-Konstrukt in Gegenwart des Vektors pACYC184) gesetzt (Abb. 26).

Im Falle des Wildtyps (TGA-Codon) aller drei Gene bewirkte die Coexpression von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* eine deutliche Steigerung der  $\beta$ -Galactosidase-Produktion, auf die Expression der Cystein-Mutanten (TGC-Codon) des Fusionsproteins konnte hingegen kein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Offensichtlich ist für *grdB1*, *prxU* und auch *selD1* der hier klonierte Bereich von zehn Nukleotiden stromaufwärts und 50 Nukleotiden stromabwärts des UGA-Triplets ausreichend, um dieses als Selenocystein-Codon zu spezifizieren. Während die Fusionen von *grdB1* und *prxU* in Gegenwart von *SelB<sub>Ea</sub>* eine vergleichbare UGA-Durchleaserate aufwiesen (60,4 % bzw. 63,9 % der Enzymaktivität der entsprechenden Cystein-Mutante), wurde für *selD1* ein wesentlich geringer Wert ermittelt (35,5 %).

Ohne pASBC4 zeigten die *selD1*- und vor allem die *grdB1*-Fusion deutlich höhere  $\beta$ -Galactosidase-Werte (3,6 % bzw. 11,8 % der entsprechenden Cystein-Mutante) als das *prxU*-Konstrukt (1,6 %). Dieses Resultat entsprach nicht den Verhältnissen, die bei der heterologen Expression der drei Gene als *Streptag*-Proteine in *E. coli* zu beobachten waren (s. 3.7.1.), da hier das *prxU*-Genprodukt in relativ großer Menge synthetisiert wurde.



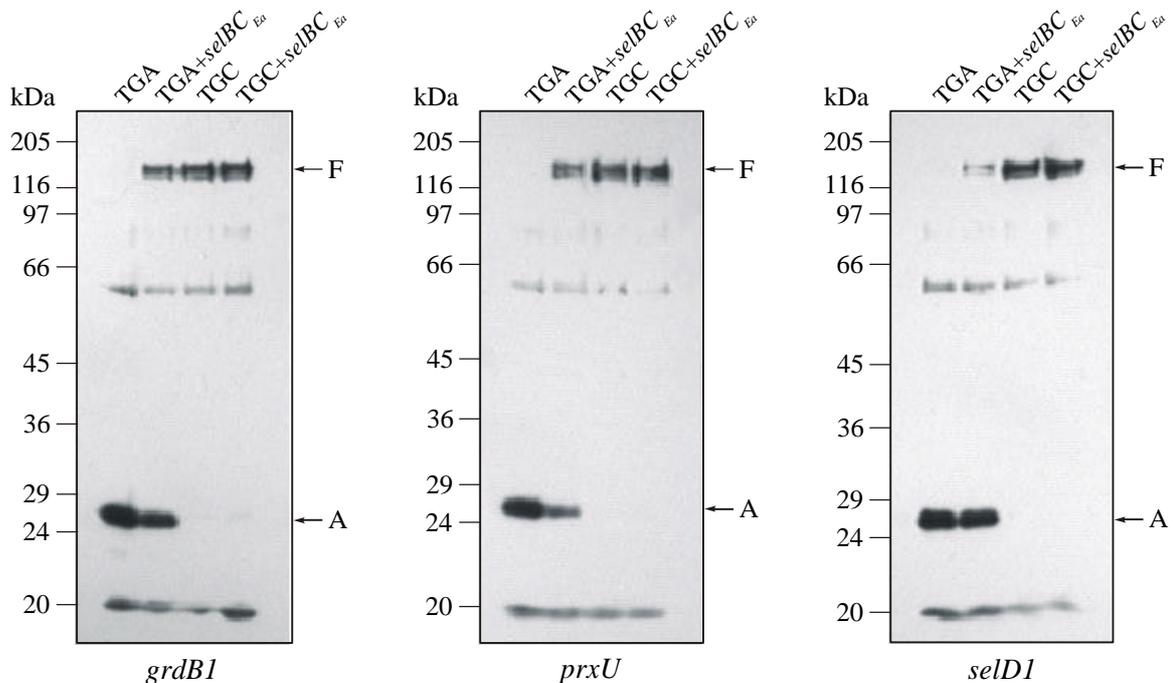
**Abb. 26: Relative  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten der Fusions-Konstrukte in *E. coli* XL1-Blue MRF'.** Die gemessenen Aktivitäten (Durchschnittswerte) sind für jedes der drei Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* im Vergleich zur jeweiligen Cystein-Mutante (mit dem Vektor pACYC184) angegeben. Schmale Balken bezeichnen die ermittelten Standardabweichungen.

Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten der Wildtyp-Konstrukte ohne Coexpression von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* wurden auch in der *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die ermittelten Werte waren zwar jeweils deutlich niedriger als in *E. coli* XL1-Blue MRF', das Verhältnis der für *grdB1*, *prxU* und *selD1* gemessenen Miller-Units stimmte jedoch annähernd mit dem zuvor beobachteten überein. Ein Vergleich mit der jeweiligen Cystein-Mutante war hier nicht möglich, da für diese keine reproduzierbaren Werte ermittelt werden konnten. Die Tatsache, dass frisch transformierte Zellen in der Regel deutlich höhere Aktivitäten ergaben als Zellen, die ein bis zwei Tage bei 4 °C gelagert wurden, deutete darauf hin, dass die entsprechenden Plasmide in *E. coli* WL81300 nicht stabil waren. Das Gleiche galt auch für die Wildtyp-Konstrukte in Gegenwart der *sel*-Gene aus *E. acidaminophilum*, dennoch konnte in diesem Fall eine deutliche Steigerung  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten gegenüber der Vektorkontrolle (pACYC184) beobachtet werden.

### 3.9.3. Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine

Das in den Translationsfusionen unmittelbar stromaufwärts des Selenocystein-Codons lokalisierte *gst*-Gen ermöglicht die immunologische Erfassung sowohl der Proteine, die durch die Termination der

Translation am UGA-Codon entstehen (ca. 27 kDa), als auch der Produkte, die in Folge eines Durchlesens dieses Triplets zustande kommen (ca. 145 kDa). Zu diesem Zweck wurden unter Verwendung von Anti-GST-Peroxidase-Konjugat Western-Blots mit SDS-Lysaten der für die Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten geernteten Zellen durchgeführt (Abb. 27).



**Abb. 27: Nachweis von GST-Fusionsproteinen durch Western-Blot.** SDS-Lysate IPTG-induzierter Zellen, die das entsprechende pSKAGS-Derivat sowie entweder den Vektor pACYC oder das Plasmid pASBC4 (+*selBC<sub>Ea</sub>*) enthielten, wurden mittels SDS-PAGE (11,5 %) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Abbruch-Produkte (Termination der Translation am UGA-Codon) und Fusionsproteine (Durchlesen des UGA-Codons) wurden mit Hilfe von Anti-GST-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen und sind in der Abb. mit A bzw. F bezeichnet.

Für alle drei Wildtyp-Konstrukte erfolgte durch die Coexpression von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* eine Verschiebung des Verhältnisses von Abbruch-Produkt und Fusionsprotein zu Gunsten des letzteren. In Übereinstimmung mit den gemessenen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten fiel dieser Effekt für das *selD1*-Fragment deutlich geringer aus als für die Fusionen der beiden anderen Gene.

Zusätzliche Signale bei ca. 60 kDa und 80 kDa sind vermutlich auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen, da sie in allen Ansätzen mit vergleichbarer Intensität auftraten und somit unabhängig vom Durchlesen des UGA-Codons waren.

Nach längerer Exposition des Films (als in dem in Abb. 27 dargestellten Beispiel) konnte für die Wildtyp-Konstrukte das entsprechende 145 kDa-Fusionsprotein auch in den Ansätzen ohne *SelB* und *tRNA<sup>Sec</sup>* aus *E. acidaminophilum* detektiert werden. Dessen Menge unterschied sich für alle drei Gene nicht signifikant, obwohl die zuvor für die *grdB1*-Fusion bestimmte relative  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität (11,8 %

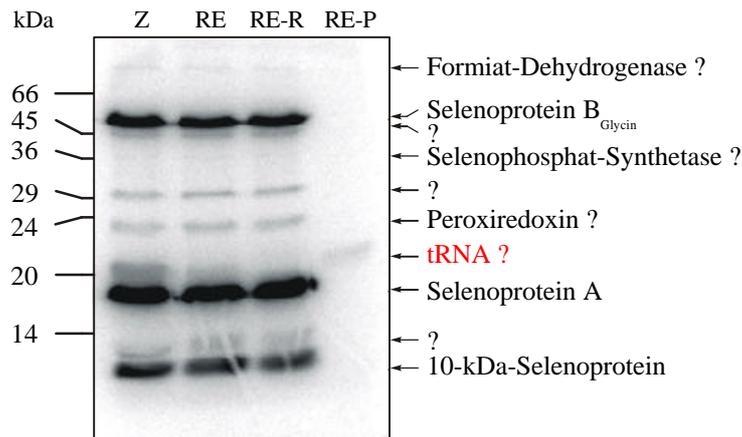
der Cystein-Mutante) deutlich über den Werten für die entsprechenden Konstrukte von *prxU* (1,6 %) und *selDI* (3,6 %) lag (vgl. 3.9.2.).

Daraufhin wurde die Sequenz stromabwärts des Selenocystein-Codons von *grdB* nach möglichen internen Translations-Startpunkten durchsucht, da ein N-terminal verkürztes Fusionsprotein natürlich nicht durch die gegen die Glutathion-S-Transferase gerichteten Antikörper erfasst wird, andererseits jedoch zur  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität beiträgt. Auf diese Weise wäre die Diskrepanz zwischen den Resultaten der beiden hier angewandten Methoden zum Nachweis des Fusionsproteins zu erklären. Tatsächlich war in dem 63 bp umfassenden *grdBI*-Fragment, zehn Triplets stromabwärts vom Selenocystein-codierenden TGA, ein ATG-Codon lokalisiert. Da sich unmittelbar stromaufwärts von diesem, in einem Abstand von fünf Nukleotiden, eine Purin-reiche Sequenz (5'-GAUGCGGUG-3') befand, die teilweise komplementär zum 3'-Ende der 16S-rRNA von *E. coli* ist und deshalb als Ribosomen-Bindestelle dienen könnte, scheint eine Initiation der Translation an diesem Codon möglich. Die entsprechenden Fragmente der Gene *prxU* und *selDI* wiesen hingegen stromabwärts des TGA-Codons kein ATG-Triplett auf.

### 3.10. Nachweis einer Selen-modifizierten tRNA in *E. acidaminophilum*

Bisherige Experimente zur Inkorporation von  $^{75}\text{Se}$  in Makromoleküle von *E. acidaminophilum* beschäftigten sich nicht mit der Frage, ob der Organismus Selen-haltige tRNAs aufweist (HORMANN und ANDREESEN, 1989). Auch an Hand der von WAGNER (1997) vorgenommenen, umfangreichen Anzuchten von *E. acidaminophilum* in Gegenwart von  $^{75}\text{Se}$ -Selenit konnte in dieser Hinsicht keine Aussage getroffen werden, da den entsprechenden Ansätzen zum Zellaufschluss generell RNase zugesetzt wurde.

Um einen Hinweis auf die Präsenz einer Seleno-tRNA zu erhalten, wurde *E. acidaminophilum* mit Glycin als C- und N-Quelle in Gegenwart von  $^{75}\text{Se}$ -Selenit kultiviert, nach dem Zellaufschluss mittels Lysozym- und Ultraschallbehandlung erfolgte die Inkubation des Rohextraktes mit RNase A oder Proteinase K. Die markierten Makromoleküle wurden anschließend durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 28).



**Abb. 28: Autoradiographie einer  $^{75}\text{Se}$ -Markierung von Makromolekülen aus *E. acidaminophilum*.** Die Auftrennung erfolgte in einem 13,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel.  $^{75}\text{Se}$ -markierte Komponenten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Z: SDS-Lysat ganzer Zellen, RE: Rohextrakt, RE-R: RNase A-behandelter Rohextrakt, RE-P: Proteinase K-behandelter Rohextrakt.

Insgesamt waren zehn markierte Banden zu unterscheiden, davon zeigten neun Sensitivität gegenüber Proteinase K-Behandlung und Resistenz gegen RNase A. Von diesen konnten drei auf Grund der Größe sowie der Intensität der Markierung den Selenoproteinen A und B der Glycin-Reduktase sowie dem 10 kDa-Protein zugeordnet werden. Bei drei weiteren Banden entsprach das Molekulargewicht dem der Selenoenzyme Formiat-Dehydrogenase, Selenophosphat-Synthetase und Peroxiredoxin. Eine Bande bei ca. 30 kDa repräsentierte möglicherweise ein Peroxiredoxin-Derivat, da in Western-Blots mit polyklonalen Antikörpern gegen dieses Protein neben dem erwarteten Signal bei ca. 23 kDa stets ein weiteres bei ca. 30 kDa zu beobachten war (T. PARTHER, persönliche Mitteilung). Andererseits könnte es sich auch um ein Abbauprodukt von Selenoprotein B handeln, da Banden der entsprechenden Größe auch bei der heterologen Expression von *grdB* in *E. coli* detektiert wurden (s. 3.7.4.). Die Signale bei 12 kDa und 45 kDa konnten keinem bekannten Selenoprotein aus *E. acidaminophilum* zugeordnet werden. Zwar weist das Substrat-spezifische Selenoprotein B der Betain-Reduktase ein Molekulargewicht von 45 kDa auf, allerdings wird das entsprechende Gen (*grdH*) offensichtlich nur exprimiert, wenn die Anzucht von *E. acidaminophilum* auf Betain erfolgt (WAGNER, 1997; SONNTAG, 1998), was in dem hier beschriebenen Versuch nicht der Fall war.

Eine der markierten Komponenten, die im SDS-Polyacrylamidgel bei ca. 21 kDa lokalisiert war, erwies sich als resistent gegenüber Proteinase K, konnte jedoch nach Behandlung des Rohextraktes mit RNase A nicht mehr detektiert werden. Offensichtlich handelt es sich dabei um eine (oder mehrere) Selen-haltige tRNA(s).

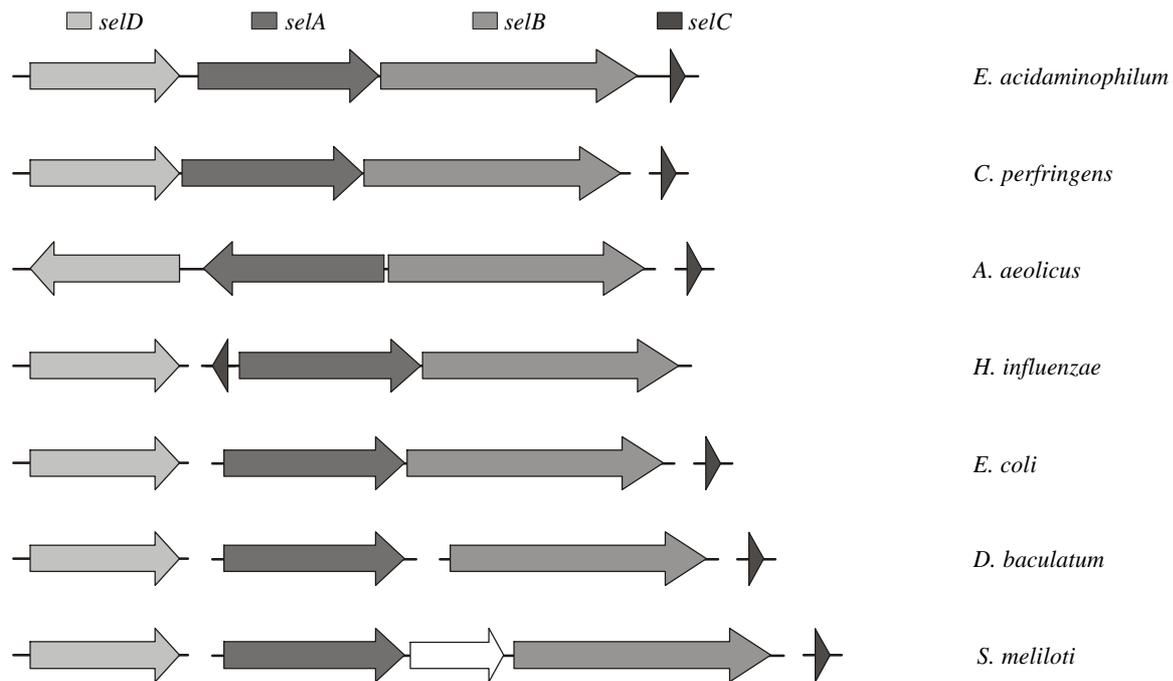
## 4. Diskussion

### 4.1. Organisation und Transkription der *sel*-Gene aus *E. acidaminophilum*

In *E. acidaminophilum* liegen die vier Gene, welche für die cotranslationale Inkorporation von Selenocystein in Proteine essentiell sind, in identischer Transkriptionsrichtung in einem Cluster in der Anordnung *selD1* (Selenophosphat-Synthetase), *selA* (Selenocystein-Synthase), *selB* (Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor SelB) und *selC* (tRNA<sup>Sec</sup>) vor (GURSINSKY *et al.*, 2000; s. 3.2., Abb. 3). Ein zweites für eine Selenophosphat-Synthetase codierendes Gen, *selD2*, ist nicht mit diesem Cluster assoziiert.

Die in *E. acidaminophilum* anzutreffende Genanordnung konnte bisher in keinem weiteren Organismus in dieser Form nachgewiesen werden (Abb. 29). Im Genom von *Clostridium difficile* (*C. difficile*-Genomprojekt, Sanger Center, <http://www.sanger.ac.uk>) liegen *selD*, *selA* und *selB* zwar ebenfalls in gleicher Transkriptionsrichtung direkt hintereinander, getrennt durch intergene Regionen von 26 bzw. 113 Nukleotiden, *selC* jedoch ist nicht in der Nähe dieser Gene lokalisiert. Das Gleiche gilt für *Clostridium perfringens* (SHIMIZU *et al.*, 2002) und *Thermoanaerobacter tengcongensis* (BAO *et al.*, 2002), hier umfasst die intergene Region zwischen *selD* und *selA* 16 bzw. 22 Nukleotide, während das Start-Codon von *selB* direkt auf das Stopp-Codon von *selA* folgt bzw. sogar mit diesem überlappt. Auch in *Aquifex aeolicus* sind *selD* und *selA* stromaufwärts von *selB* lokalisiert, weisen aber die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung auf (DECKERT *et al.*, 1998). Außer in diesen Organismen ist das Gen der Selenophosphat-Synthetase (*selD*) in keiner der bisher vollständig bekannten bakteriellen Genomsequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft der anderen *sel*-Gene anzutreffen. Gleiches gilt für *selC*, eine Ausnahme bildet dabei nur *H. influenzae*, hier befindet sich das Gen der tRNA<sup>Sec</sup> direkt stromaufwärts von *selA*, weist allerdings die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung auf (FLEISCHMANN *et al.*, 1995).

Sowohl in *Sinorhizobium meliloti* (wo alle vier *sel*-Gene auf dem Megaplasmid pSymA lokalisiert sind, BARNETT *et al.*, 2001) als auch in *Pasteurella multocida* (MAY *et al.*, 2001) sind *selA* und *selB* durch einen offenen Leserahmen getrennt, und auch in *D. baculatum* liegen beide Gene nicht in einem Cluster vor (KROMAYER *et al.*, 1996). Von diesen beiden Ausnahmen abgesehen, findet man in der Regel eine sehr enge Assoziation der Gene der Selenocystein-Synthase und des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors. In *E. coli* überlappen sogar das Terminations-Codon (TGA) von *selA* und das Start-Codon (ATG) von *selB* um vier Nukleotide (FORCHHAMMER *et al.*, 1991; BLATTNER *et al.*, 1997), was für eine enge Kopplung der Translation spricht. Die koordinierte Synthese beider Proteine resultiert in einer ähnlichen Kopienzahl von ca. 1100-2000 pro Zelle (FORCHHAMMER *et al.*, 1990; Sawers *et al.*, 1991).



**Abb. 29: Beispiele für die Organisation der Gene *selD*, *selA*, *selB* und *selC* in verschiedenen Organismen.** Bei nicht assoziierten Genen erfolgte keine Berücksichtigung der Transkriptionsrichtung.

In *E. coli* werden alle vier *sel*-Gene konstitutiv exprimiert, ihre Transkription wird weder vom Sauerstoffgehalt, noch von der intrazellulären Selen-Konzentration beeinflusst (SAWERS *et al.*, 1991). Das *selC*-Gen ist monocistronisch, als Startpunkt der Transkription konnte ein Guanin identifiziert werden, welches 24 Nukleotide vor dem 5'-Ende der prozessierten tRNA<sup>Sec</sup> lokalisiert ist (BURKARD und SÖLL, 1988). Dagegen ist das Gen der Selenophosphat-Synthetase Bestandteil eines Operons: stromabwärts von *selD* ist das Gen der DNA-Topoisomerase III (*topB*) lokalisiert, während sich stromaufwärts ein offener Leserahmen befindet, der ein 20-kDa-Protein unbekannter Funktion codiert. Ein Transkriptionsstart konnte sowohl vor diesem Gen als auch vor *selD* nachgewiesen werden (SAWERS *et al.*, 1991). Wie bereits erwähnt, werden *selA* und *selB* gemeinsam transkribiert. Die Promotoren des *selAB*- sowie des *selD*-Operons aus *E. coli* zeigten nur schwache Sequenzhomologien zur Konsensus-Sequenz 5'-TTGACA-17±1bp-TATAAT-3' aus *E. coli* (HARLEY und REYNOLDS, 1987) bzw. *B. subtilis* (HELMANN, 1995), dem entsprechend wurden nur geringe Mengen der jeweiligen mRNAs identifiziert (SAWERS *et al.*, 1991). Der stromaufwärts von *selC* postulierte Promotor (LEINFELDER *et al.*, 1988b) wies dagegen zumindest in der -10-Region eine 100 %ige Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz auf, während die -35-Region nur geringe Homologie zu dieser zeigte. Mit nur ca. 200-350 Molekülen pro Zelle tritt die tRNA<sup>Sec</sup> in sehr geringer Menge auf, lediglich die tRNA<sub>1</sub><sup>Thr</sup> zeigt eine noch geringere Konzentration (DONG *et al.*, 1996; TORMAY *et al.*, 1996).

In *E. acidaminophilum* befindet sich *selC* zwar direkt stromabwärts von *selB*, wird aber dennoch wie in *E. coli* monocistronisch transkribiert (s. 3.3.2.). Die Sequenzfolge 5'-TTGAAT-17±1bp-TATAAT-3',

welche stromaufwärts des mittels *primer extension* identifizierten 5'-Endes des tRNA-Precursors lokalisiert ist (s. 3.3.4., Abb. 7), zeigt eine sehr hohe Homologie zur oben erwähnten Konsensus-Sequenz. Auch die stromaufwärts der postulierten -10-Region von *selC* zu findende Sequenz 5'-TNTG-3' (Positionen -18 bis -15) ist in den Promotoren Gram-positiver Organismen häufig anzutreffen (GRAVES und RABINOWITZ, 1986; HELMANN, 1995) und hat einen positiven Einfluss auf die Stärke des Promotors, wobei der Effekt dieser so genannten -16-Region vor allem bei -10- und -35-Motiven mit geringerer Homologie zur Konsensus-Sequenz zum Tragen kommt (VOSKUIL *et al.*, 1995). Diese Merkmale sprechen für eine höhere Expressionsrate des *selC*-Gens als in *E. coli*, was angesichts der größeren Anzahl an Selenoproteinen, die z. T. in erheblicher Menge synthetisiert werden, durchaus sinnvoll erscheinen würde. Allerdings wird die intrazelluläre Konzentration einer tRNA nicht nur von der Effizienz der Transkription bestimmt, sondern hängt auch von anderen Faktoren wie z. B. *processing* des Precursor-Moleküls oder Abbau der Produkte ab (INOKUCHI und YAMAOKA, 1995).

Das stromaufwärts von *selA* gelegene Gen der Selenophosphat-Synthetase (*selDI*) wird ebenfalls hauptsächlich monocistronisch transkribiert. Durch *primer extension* konnte ein Transkriptionsstart 26 bp stromaufwärts von *selDI* nachgewiesen werden, die mögliche Promotorregion zeigte geringere Übereinstimmung zur Konsensus-Sequenz als das bei *selC* der Fall war, wobei vor allem der ungewöhnliche Abstand von 15 Basenpaaren zwischen dem -10- und dem -35-Motiv hervorzuheben ist (s. 3.3.4., Abb. 8). Der ungünstige Einfluss dieses Merkmals könnte zumindest teilweise durch den positiven Effekt der optimalen -16-Region (5'-TGTG-3') des *selDI*-Promotors kompensiert werden.

Im Northern-Blot wurden Signale erhalten, deren Größe sowohl einem *selAB*- als auch einem *selDIABC*-Transkript entsprach (s. 3.3.2.), die Existenz des letzteren konnte durch RT-PCR bestätigt werden (s. 3.3.3.). Ein Transkriptionsstart unmittelbar stromaufwärts von *selA* konnte allerdings durch *primer extension* nicht identifiziert werden, eine Ursache dafür könnte eine geringe Transkriptmenge sein.

Die monocistronische *selDI*-mRNA scheint in deutlich größerer Menge vorzuliegen als das *selDIABC*-Transkript. Das steht im Einklang mit der Beobachtung, dass von der Selenophosphat-Synthetase etwa 10 000 Kopien pro *E. coli*-Zelle existieren (EHRENREICH *et al.*, 1992), während Selenocystein-Synthase und Elongationsfaktor SelB wie erwähnt in ca. 1100-2000 Kopien pro Zelle auftreten.

Im Gegensatz zu *selDI* ist das zweite Selenophosphat-Synthetase-Gen aus *E. acidaminophilum* nicht Bestandteil eines Operons.

## 4.2. Charakterisierung der Genprodukte von *selA*, *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum*

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit (GURSINSKY, 1996) wurde *selA* nur unvollständig kloniert. Mit der nun vollständig bekannten DNA-Sequenz soll hier erneut eine Charakterisierung des abzuleitenden Genproduktes erfolgen. Mittlerweile steht durch die Entschlüsselung verschiedener mikrobieller Genome eine Vielzahl weiterer Sequenzen zu Homologie-Vergleichen zur Verfügung. Aus diesem Grund sowie zum besseren Verständnis der in Abschnitt 4.3. diskutierten Komplementations-Versuche mit *sel*-Mutanten von *E. coli* werden neben dem *selA*-Genprodukt auch die an Hand der DNA-Sequenz von *selB* und *selC* abzuleitenden Eigenschaften des Elongationsfaktors und der tRNA<sup>Sec</sup> hier nochmals besprochen.

### 4.2.1. Selenocystein-Synthase (Sela)

Die zur  $\alpha/\gamma$ -Superfamilie der Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängigen Enzyme gehörende Selenocystein-Synthase (TORMAY *et al.*, 1998) katalysiert die Umwandlung von Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> in Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> in einer zweistufigen Reaktion (FORCHHAMMER und BÖCK, 1991). Zuerst bildet die Carbonylfunktion der prosthetischen Gruppe eine Schiff'sche Base mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Serins, durch 2,3-Eliminierung eines Wassermoleküls entsteht Aminoacrylyl-tRNA<sup>Sec</sup>. An die Doppelbindung dieses Intermediates erfolgt die nukleophile Addition von HSe<sup>-</sup>; als Selendonor dient dabei Selenophosphat, welches vom *selD*-Genprodukt in einer ATP-abhängigen Reaktion gebildet wird (GLASS *et al.*, 1992; VERES *et al.*, 1994). Aktive Selenocystein-Synthase ist ein Homooligomer, bestehend aus zehn Untereinheiten, die in zwei Ringen angeordnet sind (ENGELHARDT *et al.*, 1992). Je zwei Monomere binden ein Molekül Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> (FORCHHAMMER und BÖCK, 1991).

Das *selA*-Gen aus *E. acidaminophilum* codiert für ein 467 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 52,5 kDa (Swiss-Prot Q9S3K3). In Tab. 14 sind die in der EMBL-Datenbank enthaltenen bzw. mit dem Datenbank-Suchprogramm ENTREZ identifizierten Proteine (oder translatierten DNA-Sequenzen) mit signifikanter Homologie zur Selenocystein-Synthase aus *E. acidaminophilum* aufgelistet. Die mit Abstand höchste Identität ergab sich zu dem entsprechenden Enzym aus *C. difficile*, einem opportunistisch humanpathogenen Organismus, der ebenso wie *E. acidaminophilum* in Cluster XI der Clostridien einzuordnen ist (die Sequenz wurde von den unter <http://www.sanger.ac.uk> zugänglichen Daten des *C. difficile*-Genomprojektes abgeleitet).

**Tab. 14: Vergleich von SelA aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken**

Organismus	Protein: AS / MG [kDa]	accession number	Identität [%] <sup>1</sup>
<i>Clostridium difficile</i> <sup>2</sup>	SelA: 467 / 52,1	-	62,7
<i>Clostridium perfringens</i>	SelA: 462 / 51,8	Swiss-Prot Q8XIK2	51,8
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	SelA: 461 / 51,7	TrEMBL Q8R8W4	51,4
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	SelA: 465 / 50,7	Swiss-Prot P56372	44,6
<i>Haemophilus influenzae</i>	SelA: 461 / 51,1	Swiss-Prot P43910	44,6
<i>Moorella thermoacetica</i>	SelA: 470 / 50,6	Swiss-Prot O33277	44,3
<i>Aquifex aeolicus</i>	SelA: 452 / 50,8	Swiss-Prot O67140	44,0
<i>Salmonella typhi</i> <sup>3</sup>	SelA: 463 / 50,8	Swiss-Prot Q8Z2D8	43,8
<i>Salmonella typhimurium</i> <sup>3</sup>	SelA: 463 / 50,9	Swiss-Prot Q8ZL69	43,8
<i>Escherichia coli</i> <sup>4</sup>	SelA: 463 / 50,6	Swiss-Prot P23328	41,6
<i>Pasteurella multocida</i>	SelA: 460 / 50,7	Swiss-Prot Q9CK66	41,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SelA: 468 / 50,3	Swiss-Prot Q9HV01	41,2
<i>Yersinia pestis</i>	SelA: 462 / 50,2	Swiss-Prot Q8Z9Y1	40,6
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SelA: 466 / 49,0	Swiss-Prot P58226	40,5
<i>Campylobacter jejuni</i>	SelA: 440 / 50,6	Swiss-Prot Q9PMS2	37,4

<sup>1</sup> Paarweise Sequenzvergleiche erfolgten mit dem Programm LALIGN (s. 2.11.3.).

<sup>2</sup> Die Sequenzierung des Genoms von *C. difficile* war zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand 1. 7. 2002) noch nicht abgeschlossen, so dass sich Abweichungen zu den angeführten Daten ergeben können.

<sup>3</sup> Die SelA-Sequenzen beider Organismen sind zu 99,8 % identisch.

<sup>4</sup> Die SelA-Sequenzen aus *E. coli* K-12 und *E. coli* O157:H7 zeigen 100 % Übereinstimmung.

Im Genom von *Helicobacter pylori* wurde ebenfalls ein Gen für ein SelA-homologes Protein (386 Aminosäuren, im überlappenden Bereich 31,2 % Identität zu SelA aus *E. coli*) identifiziert und entsprechend bezeichnet (TOMB *et al.*, 1997). Auf Grund der deutlich abweichenden Größe und der Tatsache, dass *H. pylori* anscheinend keines der Gene *selB*, *selC* oder *selD* besitzt, ist jedoch fraglich, ob es sich bei dem abgeleiteten Polypeptid tatsächlich um eine Selenocystein-Synthase handelt.

Die in Tab. 14 angeführten SelA-Sequenzen weisen im zentralen Bereich die größte Homologie auf, N- und C-Terminus sind dagegen weniger stark konserviert (Abb. 30).

SelA_Ea	--MDKRTFLSKLPSVDKIILGNDGVIIELEKEYPRSLIVEVIREQIELARKRILELNESDMEGFDIDEDILINDIGHQLKLLK	78
SelA_Cd	--MSKRELFAMLPVDEVLSDNRIVEIINEYPRSLVLESVREVIDLKRQFILLRLKEDASNSVTIEFGEIIEISAIERVKLN	78
SelA_Cp	--MTK-ELLRALPKIDEILG-IFNEDFLNENGRETVSALRDIINENRKAILNEEVD---YALTKKEAKSKCEHRLLKK	72
SelA_Tt	----MEDLYRKLPVDEIILREEKINEVLKFNKREVVKNCIREVLERYREKIRRGVEK----KIDIEKILEDDVVSQIEEK	71
SelA_St	MTSETRTLYSQLPADRLLHDSAFLSLRDRYGHQVVDLLRRMLDDARDVIRNTQTLPDW--YADWA---QEAKRLLENA	75
SelA_Ec	MTTETRSLSQLPADRLLRDSFSLRDRYGHTRVVELLRQMLDEAREVIRGSQTLPAW--CENWA---QEV DARLTKE	75
SelA_Yp	MSAEPHPLYRQLPAIDRLLNEPEMAPLLAEYGPVLLADTLRQLQAEAREYIGQFHTLADW--CADWP---AALRQLN-Q	74
SelA_Hi	----MTALFQQLPVSDKILKTPQGLQLITEFGHTAVVATCRELLTQARQFIKKNQOLPEY--FSNFDRTFLEIHSHLQKQ	74
SelA_Pm	----MSLYSSLPIDKLLKTPEGARLSHEFGHTAVVNICRQLIEQGREYIKNENKLLPV--FQDISDTLREIELQLHAQ	73
SelA_Pa	--MSS----VRLPSVDRLLRSAAAAPLHQRYGREALLATLRDLDLDELREPARHG-ALAEI--ELSEAVLAGRAGERLAAQ	71
SelA_Sm	--MSGPVDLRALPSVDQMLNAAAVSPLVEQHGRAVVTDLRKVLGEVRLAVRSGGALPGK--DGIVAALLS---RLDDR	72
SelA_Mt	--MESRNLLRQLPAVDQLLQHPRLKDLRSREN-YKMLVALTRQVLDWRLLKIKNGATTIPD--PGQLA---REIENRYHEA	72
SelA_Db	----MSSLFRHIPVDRFLQDLEQDRALADLPQMLKDLVAEFLDLCREEIRAGVVTDDES--ALAFTTLAARAGAYVRTR	74
SelA_Aa	----MKSLLRQIPQISKVVIE-IFKKK----YPEIYVVKAAAREVAEKYRKEIEIEGKRKD-----LNGFLEDVERIKKSL	64
SelA_Cj	----MNFRTFPQINTLIEDESELKS----YPFYIKAFFCKKVVAKLKENFFQDEIS-----KDKLLEIKKEIKTF	63
SelA_Ea	YALKLKRILINATGVVHTNLGRSPMAEEIKEDLWLIASRYSNLEYDIESGKRGSRYSHLEEIVRKITGAEDVLVNNNA	158
SelA_Cd	YLSLKKVINATGTVIHTNLGRSLLSEDIKDELWCAASRYSNLEYDLDNGERGSRYSHLTSTIKRLTGAEDVLVNNNA	158
SelA_Cp	RERNLKRVINAGTVIHTNLGRSLLSKEATEAVALAASSYSNLEYDLEKGERGSRYSLIEGIIKIDITGAEAALVNNNA	152
SelA_Tt	KKMSLRVVNGTGIILHTNLGRALFPPQVKEHLLDIAFCYSTLEYDVEKGERGSRYSHVEKLLCELLDVEAALVNNNA	151
SelA_St	AQSALRPVINLTGTVLHTNLGRALQAEAEI EAVTQAMRAPVTLEYDLDGAGRGHDRALATLLCRITGAEDACIVNNNA	155
SelA_Ec	AQSALRPVINLTGTVLHTNLGRALQAEAAVEAVAQAMRSPVTLEYDLDGAGRGHDRALQALLCRITGAEDACIVNNNA	155
SelA_Yp	SRSNLRPLFNLGTGTVLHTNLGRALAEAAVDAVDAAMRREAALEFDLDSGGRGERDHLRELLCELTGAEDATVNNNA	154
SelA_Hi	NQVQIKAVHNLGTGTVLHTNLGRALWSEAAQAALSAMQKNVSLLEYDLEKGRSHRDNYISELLCKLTGAEAAACIVNNNA	154
SelA_Pm	SQVKIQSVHNLGTGTVLHTNLGRALWSDAAQAALTSMSHVALLEYDLEKGRSHRDNYISELLCKLTGAEAAACIVNNNA	153
SelA_Pa	HASRVRRVNLGTGTVLHTNLGRALLPDEAIEAITLAARYPLNLEFDLASGKGRDRDDIAGLIRELTGAEAVTVNNNA	151
SelA_Sm	SRSNLRPLFNLGTGTVLHTNLGRALAEAAVDAVDAAMRREAALEFDLDSGGRGERDHLRELLCELTGAEDATVNNNA	152
SelA_Mt	GRSSLRPVINATGVVHTNLGRALISPAARAAALTAAGRYTNLEYDLEKGRGNRYSHVTGLLKELTGAEEALVNNNA	152
SelA_Db	SRPHFRVVNATGVVHTNLGRSILAEAAVLAVAEGRHYSNLEMDLDTGQRGSRYSHVEKLLCRITGAEDACIVNNNA	154
SelA_Aa	MKPNIKRVINATGVVHTNLGRAPLSKDVINFISEIANGYSNLEYNLEEGKRGSRIAHIEKYLNELTGAESSFVNNNA	144
SelA_Cj	YRKDLQSVINASGVVHTNLGRSVIHEELYEACKDIIICNYSNVEFDLENGKRGSRYALVLEKLLKMLFECEDALVNNNA	143
SelA_Ea	AVMLVLGTMAQGKEVITSRGELVEIGGSFRIPVMEQSGAKLVEVGTNNKTYASDYEAAITENTGALLKVHTSNFRVVG	238
SelA_Cd	AVLLVLSTMAKGGAEIVSRGELVEVGGFRIPVMEQSGAKLVEVGTNNKTHLKYKEAITEDTNVLMKVHTSNYRIMGF	238
SelA_Cp	AIMLVLNSLCENKEVIVSRGELVEIGGSFRIPVMEQSGAKLVEVGTNNRTHLYDYEDAITEETGAFKLVHSSNFKIVGF	232
SelA_Tt	AVLLALNTLAKGKEVIVSRGQLIEIGGSFRIPVMEQSGAILKEVGTNNKTYDFDYINAITENTALLKVHTSNYRIVGF	231
SelA_St	AVLLMLAATASGKEVVVSRGELVEIGGAFRIPVMEQAGCTLHEVGTNNRTHAKDYRQAVNENTGLLMKVHTSNYSIEGF	235
SelA_Ec	AVLLMLAATASGKEVVVSRGELVEIGGAFRIPVMEQAGCTLHEVGTNNRTHANDYRQAVNENTALLMKVHTSNYSIQGF	235
SelA_Yp	AVFLLLTVMAAGKQVVVSRGELVEIGGAFRIPVMEQAGCELVEVGTNNRTHLKYRQAINENTGLLMKVHTSNYSIEGF	234
SelA_Hi	AVLLMLATFAQGKEVIVSRGELVEIGGAFRIPVMEQAGCHLVEVGTNNRTHLKYRQAINENTAFMLKVHSSNYQICGF	234
SelA_Pm	AVLLMLATFAQGKEVIVSRGELVEIGGAFRIPVMEQAGCKLVEVGTNNRTHLSYRHAINENTAFMLKVHSSNYQICGF	233
SelA_Pa	AVLLALNSLAEIGRELDIPVADLGGSLVDLSQYGLPK-EPMPQQLIAAGVSLVFSFGDKLLGGPQAGIIVGKKAMIAQ	231
SelA_Sm	AVLLALNSVAGRQAIVSRGELVEIGGAFRMPDIMERAGVDLVEVGTNNRTHAKDYVKAIGPETALILKVHTSNYRIEGF	232
SelA_Mt	AVLLALSTLAAGRETIIVSRGQLVEIGGSFRIPVMEQSGTRLVEVGTNNKTYIHDYERAVGPDATALLKVHPSNYRIQGF	232
SelA_Db	AVLLVLDTLAKGREVVVSRGQLVEIGGSFRIPVMEKKSAGVLRVGVATNTRTHLRDYAEAIGPDTAMLKVHTSNYRIIGF	234
SelA_Aa	AVFLVLNTLAEKKEVIVSRGELVEIGGSFRIPVMEKKSAGVLRVGVATNTRTHLRDYAEAIGPDTAMLKVHTSNYRIIGF	224
SelA_Cj	AVFLVLNSLCYDKEVISSRGELVEIGGSFRVPEVKAAGVKLCEVGTNNKTHLKYEQAINENTALILKTHKSNFALMGF	223
SelA_Ea	TNTPELEELREIGDKYDIPVIEDLGGGVFIDLKSYGLSY-EPTVMDSLRKGADIVTFSGDKMLGGPQAGIIVGKKKYIDK	317
SelA_Cd	TESVSEELVNLGKKYKLPVIEDLGGGVFIDLKSYGLSY-EPTVLDVIRQGADVTFSGDKMLGGPQAGIIVGKKKEYIEK	317
SelA_Cp	TKSVSANDICNLAKKGIPIVIEDLGGVLDLIDLSKYGLEK-EPTVIESLESGVDIVTFSGDKMLGGAQAGIIVGKKKFIK	311
SelA_Tt	THDIATEELVQIGRKYDIPVIEDLGGGVMDLREYGLPH-EPTVQEVVKAQVDIVTFSGDKMLGGPQAGIIVGKKKYIDL	310
SelA_St	TKTVEEAELAEIGRELDIPVADLGGSLVDLSQYGLPK-EPMPQQLIAAGVSLVFSFGDKMLGGPQAGIIVGKKAMIAQ	314
SelA_Ec	TKAIDEAELVALGKELDVPVVDLGGSLVDLSQYGLPK-EPMPQQLIAAGVSLVFSFGDKMLGGPQAGIIVGKKEMIAQ	314
SelA_Yp	TAAVSEQQLAALGQECIPTATDLGGSLVDMTRYGLPA-EPMPQQLIAAGVSLVFSFGDKMLGGPQAGIIVGKKQWIER	313
SelA_Hi	TSSVSEELTELQEMNVVVDLGGGALVDLSQYGLPK-EPTVQEKIAQGVDLVFSFGDKMLGGVQAGIIVGKKKEWIEQ	313
SelA_Pm	TKSVTEAELVTLAREFNLPMVTDLGGGALVDLAQYGLPK-EPTVQEKWAQGVLEISFSFGDKMLGGPQAGIIVGKKAWIDR	312
SelA_Pa	TASVPTAQLAAIAHGHLPLLEDLGGSTLVDLRYGLPK-EPTVQEAALADGADIVTFSGDKMLGGPQAGIIVGKNREIIGR	310
SelA_Sm	TAEVPGAELAAIAHERGVLLNDLGGGSLVDLSRYGLGR-EPTVREAVAEGADLIVTFSGDKMLGGPQAGIIVGRRDLIAE	311
SelA_Mt	TREVTTAEFVLELGRVGVPMEDLGGGFLIDLEAYGITG-EPTVQAEINQGVVTFSGDKMLGGPQAGIIVGRRDLVAA	311
SelA_Db	HKEVDLPDLVLRERGLSTFEDLGGGNLFDSPYGFMP-EPTVQVLRSGVDVTFSGDKMLGGPQAGIIVGRRREFIER	313
SelA_Aa	VEEVKLEDLVKLGHKYGIPTYDAGSGLLNLKKEFGISVDEPNFRDCISLIGIDLVSFGSGDKMLGGPQAGIIVGKKNLIEK	304
SelA_Cj	HSEVNIKDLHELAKKELLSYDGLGGWCENLNEK-LIKNEPKIRKLVQE-CDILSFSFGDKMLFGSVQAGIIVGKKKELIEK	301

Fortsetzung nächste Seite

```

SelA_Ea  VGGGLLPLERIESRVISIVPENMS-----VSRLEESLRLCDDHIIGRVYDEKYVIDVRTLFDEEYEIICNQLKSILG-- 467
SelA_Cd  VGGGSMPLTISTKVISITPEHMN-----VSSLEKKLRLSEAHIIARVYDNKYVLDVRTIFDDEFDVIIVEELRKA FN-- 467
SelA_Cp  VGGGSMPPDSKLSYLLRIDS DRIN-----EVNLERELREYKIPIITRVYKGAVYIDLRTILEDDYEVIFNALKEIGEK- 462
SelA_Tt  SGGGSLPEESLPSYGITLVEGFD-----TEDLERRLRIRDIPITIRIVDGVVTIDVRTLLEGDEEVILHAL EETGVC 460
SelA_St  IGSGSLPVDRLPSAAMTFTPHDGR---GSRLEAL AARWRMLPVPVIGRIYDGRLWLD MRCLE--DESRF MEMMLK----- 463
SelA_Ec  IGSGSLPVDRLPSAALTFTPHDGR---GSHLES LAARWREL PVPVIGRIYDGRLWLD LRCLE--DEQRFL EMLLK----- 463
SelA_Yp  IGSGSLPVDRLPSWALTFTPKDGR---GSTLEAL TARWRTLTKPVI GRVADGRLWLD LRCLE--DEAALLR ELAS----- 462
SelA_Hi  IGSGSQPMERIPSVAVTIAEKTN----AKLSAL SARFKLSQPIIGRMENGIWLDL RSLA--DIETLLN TLDEL----- 461
SelA_Pm  IGSGSQPMATIPSVAVTISTEKA-----GKLTALLQRFKALPQPIICRVEKEKIWLDL RGLA--DIDSLLK TIMQL---- 460
SelA_Pa  IGSGAQPVARLASAALCLRPQRRLRGRALRNLEALRGLPLPVI GRLDLDDALWLDL RQLD--DEPAFLA QLPRLRSEL 467
SelA_Sm  IGSGALPVDTIP SAGLRIVGSS----GSALEAL AALFRSLSRPILGR LRDGALVLDL RCLS--DEAEFLK TLSEGS GDA 464
SelA_Mt  AGGGSLPVTELP SWAITIRPEQGG-----AAGLV TALARRTDPPV LARVQDDL LLDVRTL LPPGEGEELARALVQALEGA 464
SelA_Db  VGGGSFPEQDLSTTLVSVAPT GMD-----VDSL RQGLLAEDIPV VGRVEDGAFCLDPRTLMDAEFALVAGAMKAVLAR- 465
SelA_Aa  PGGGSLPELELPTYCVAIRHDLRSS-----QELSRRLRLAEPPIVCRIREDQLLFDMRTV FHEDLKTIKKT LQELLSI- 452
SelA_Cj  VGGGSMPPDKSLDTYILTFQGDALK-----LQTRFRKEN--IIGRIENDEFVLD FRTTIRENELQKL IILTINQ MENL- 440

```

```

SelA_Ea  ----- 467
SelA_Cd  ----- 467
SelA_Cp  ----- 462
SelA_Tt  Q----- 461
SelA_St  ----- 463
SelA_Ec  ----- 463
SelA_Yp  ----- 462
SelA_Hi  ----- 461
SelA_Pm  ----- 460
SelA_Pa  S----- 468
SelA_Sm  VA---- 466
SelA_Mt  VHGGES 470
SelA_Db  ----- 465
SelA_Aa  ----- 452
SelA_Cj  ----- 440

```

**Abb. 30: Alignment von SelA-Sequenzen.** Der Sequenzvergleich erfolgte mit CLUSTAL W (s. 2.11.3.) Identische Aminosäuren sind dunkelgrau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) dagegen hellgrau unterlegt. Der innerhalb der  $\alpha$ -Familie Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängiger Enzyme konservierte Aspartat-Rest sowie der die prosthetische Gruppe tragende Lysin-Rest wurden blau bzw. grün hervorgehoben. Ea: *E. acidaminophilum*, Cd: *C. difficile*, Cp: *C. perfringens*, Tt: *T. tengcongensis*, St: *S. typhimurium*, Ec: *E. coli* K-12, Yp: *Y. pestis*, Hi: *H. influenzae*, Pm: *P. multocida*, Pa: *P. aeruginosa*, Sm: *S. meliloti*, Mt: *M. thermoacetica*, Db: *D. baculatum*, Aa: *A. aeolicus*, Cj: *C. jejuni*.

Durch die Analyse von Mutanten konnte für das *E. coli*-Enzym der Lysin-Rest an Position 295 als Träger der prosthetischen Gruppe Pyridoxal-5'-Phosphat identifiziert werden (TORMAY *et al.*, 1998). Diese Aminosäure ist erwartungsgemäß in allen hier angeführten SelA-Sequenzen konserviert, beim Enzym aus *E. acidaminophilum* handelt es sich um Lys(298). Vertreter der  $\alpha$ -Familie Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängiger Enzyme weisen einen invarianten Aspartat-Rest auf, der mit dem Pyridin-Stickstoff der prosthetischen Gruppe interagiert (ALEXANDER *et al.*, 1994). Für die Selenocystein-Synthase aus *E. coli* wurde diese Funktion an Hand von Sequenzvergleichen Asp(258) zugeordnet (TORMAY *et al.*, 1998), dieser Rest ist ebenfalls in allen SelA-Sequenzen konserviert (Position 261 im Protein aus *E. acidaminophilum*).

#### 4.2.2. Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor (SelB)

SelB stellt einen auf die cotranslationale Inkorporation von Selenocystein in Selenoproteine spezialisierten Elongationsfaktor dar, der dabei die Funktion von EF-Tu übernimmt. Phylogenetische Analysen lassen auf eine enge Beziehung zur  $\gamma$ -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 schließen (KEELING *et al.*, 1998). Anders als EF-Tu bindet SelB nicht nur GTP und die Aminoacyl-tRNA (in diesem Falle Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup>), sondern auch die unmittelbar stromabwärts des Selenocystein-spezifischen UGA-Codons lokalisierte mRNA-Sekundärstruktur (SECIS-Element). Entsprechend der Funktion des Proteins weist der N-terminale Teil von SelB eine hohe Homologie zu allen drei Domänen von EF-Tu auf, dieser Bereich ist für die Bindung von Guanin-Nukleotiden und Aminoacyl-tRNA sowie für die Interaktion mit dem Ribosom verantwortlich. Der C-terminale Teil des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors bildet hingegen eine zusätzliche, in EF-Tu nicht vorhandene Domäne (HILGENFELD *et al.*, 1996; KROMAYER *et al.*, 1996). Für *E. coli*-SelB konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich des Moleküls, speziell das am C-Terminus lokalisierte 17 kDa große Segment (Subdomäne 4b), spezifisch die Sekundärstruktur der Selenoprotein-mRNA bindet (KROMAYER *et al.*, 1996). Ein weiterer Unterschied zu EF-Tu besteht darin, dass SelB zu GTP eine höhere Affinität aufweist als zu GDP (FORCHHAMMER *et al.*, 1989; THANBICHLER *et al.*, 2000). Ein Faktor wie EF-Ts, der den beschleunigten Austausch von GDP gegen GTP bewirkt, ist aus diesem Grund nicht notwendig, entsprechend fehlt in SelB die Bindestelle für EF-Ts (HILGENFELD *et al.*, 1996).

SelB erkennt spezifisch Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup>, der mit Serin beladene Precursor oder andere aminoacylierte tRNA-Spezies werden nicht gebunden (FORCHHAMMER *et al.*, 1989). Die Interaktion mit der geladenen tRNA führt zu einer signifikanten Steigerung der Affinität des Elongationsfaktors zur entsprechenden Bindungsstelle der Selenoprotein-mRNA (THANBICHLER *et al.*, 2000). Diese Wechselwirkung wiederum erhöht die Ribosomen-abhängige GTPase-Aktivität von SelB um den Faktor drei bis vier, wahrscheinlich durch Induktion einer Konformationsänderung, welche die Affinität gegenüber dem Ribosom steigert (HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998b).

Das vom *selB*-Gen aus *E. acidaminophilum* codierte Produkt (Swiss-Prot Q9S3K2) besteht aus 626 Aminosäuren und weist eine molekulare Masse von 71,0 kDa auf. Wie im Falle von SelA zeigt das Protein die deutlichste Homologie zu der entsprechenden Sequenz aus *C. difficile* (Tabelle 15).

**Tab. 15: Vergleich von SelB aus *E. acidaminophilum* mit homologen Proteinen aus Datenbanken**

Organismus	Protein: AS / MG [kDa]	accession number	Identität [%] <sup>1</sup>
<i>Clostridium difficile</i> <sup>2</sup>	SelB: 627 / 71,6	-	55,3
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	SelB: 626 / 71,4	TrEMBL Q8R8W5	49,4
<i>Clostridium perfringens</i>	SelB: 635 / 72,2	TrEMBL Q8XIK3	46,0
<i>Moorella thermoacetica</i>	SelB: 634 / 70,7	Swiss-Prot Q46455	43,5
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	SelB: 634 / 70,1	Swiss-Prot Q46497	36,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SelB: 641 / 71,0	TrEMBL Q9HV02	31,2
<i>Escherichia coli K-12</i> <sup>3</sup>	SelB: 614 / 68,9	Swiss-Prot P14081	30,7
<i>Escherichia coli O157:H7</i> <sup>3</sup>	SelB: 614 / 68,8	TrEMBL Q8XDI8	29,6
<i>Aquifex aeolicus</i>	SelB: 582 / 66,2	TrEMBL O67141	30,5
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SelB: 666 / 72,4	TrEMBL Q931D5	30,0
<i>Pasteurella multocida</i>	SelB: 624 / 70,6	TrEMBL Q9CK68	29,5
<i>Salmonella typhi</i> <sup>4</sup>	SelB: 616 / 68,8	TrEMBL Q8Z2D7	29,2
<i>Salmonella typhimurium</i> <sup>4</sup>	SelB: 616 / 68,7	TrEMBL Q8ZL70	28,9
<i>Yersinia pestis</i>	SelB: 650 / 71,6	EMBL AL590842 <sup>5</sup>	27,5
<i>Haemophilus influenzae</i>	SelB: 619 / 70,0	Swiss-Prot P43927	27,4
<i>Campylobacter jejuni</i>	SelB: 601 / 69,5	TrEMBL Q9PMS1	26,7
<i>Methanococcus jannaschii</i>	SelB: 469 / 51,9	Swiss-Prot Q57918	22,0

<sup>1</sup> Paarweise Sequenzvergleiche erfolgten mit dem Programm LALIGN (s. 2.11.3.).

<sup>2</sup> Die Sequenzierung des Genoms von *C. difficile* war zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand 1. 7. 2002) noch nicht abgeschlossen, so dass sich Abweichungen zu den angeführten Daten ergeben können.

<sup>3</sup> Die SelB-Sequenzen beider Organismen sind zu 98,4 % identisch.

<sup>4</sup> Die SelB-Sequenzen beider Organismen sind zu 98,7 % identisch.

<sup>5</sup> *Yersinia pestis* CO92, komplettes Genom

Das Alignment der in Tabelle 15 angeführten bakteriellen SelB-Sequenzen verdeutlicht den hohen Grad der Ähnlichkeit im N-terminalen, EF-Tu-homologen Teil, während die vierte Domäne mit Ausnahme einiger invarianter Reste nahe des C-Terminus (vorwiegend basische und saure Seitenketten) kaum Übereinstimmungen zeigt (Abbildung 31).

	Domäne 1	G1	G2	G3	
SELB_Ea	MKNI	IIGTAGHIDHGKTTLIKAL	TGKETDRLKEEKKRGIS	IDLGFTNFDLPSG----	KRAGIVDVPGHEKFIKNMLAGVH 76
SELB_Cd	MKNVVIGTAGHIDHGKTTLIKAL	TGRETDRLDEEKKRGIS	INLGFYFDLPSN----	RRAGIVDVPGHEKFIKNMLAGAS 76	
SELB_Cp	MKHVI	IIGTAGHIDHGKTTLIKAL	TGRETDKIDEKKRGIS	INLGFYFDLPSG----	KRAGIVDVPGHEKFIKNMLAGAT 76
SELB_Tt	MKNI	IIGTAGHIDHGKTTLIKAL	TGKTDRLKEEKKRGIS	IDLGFAYFDLPSG----	IRAGIVDVPGHEKFIKNMLAGAH 76
SELB_Mt	MDYIVVGTAGHVDHGKTVL	VKALTGVDTRLKEEKKRGIS	IELGFAPLTLPSG----	RQLGLVDVPGHERFIRQMLAGVG 76	
SELB_Db	MPVIMGTAGHIDHGKTTLIKAL	TGINCDRLAEEQKRGIS	IELGFAYDLTPE----	VRLVAGVPGHERFVKNMVSGAA 75	
SELB_St	MI	IATAGHVDHGKTTLLQAIT	GVNADRLPEEKKRGMT	IDLGYAYWPQPDG----	RVLGFIDVPGHEKFLSNMLAGVG 73
SELB_Ec	MI	IATAGHVDHGKTTLLQAIT	GVNADRLPEEKKRGMT	IDLGYAYWPQPDG----	RVPGFIDVPGHEKFLSNMLAGVG 73
SELB_Yp	MI	IVTAGHVDHGKTTLLQAIT	GVNADRLPEEKKRGMT	IDLGYAYWPLPDG----	RIMGFIDVPGHEKFLANMLAGG 73
SELB_Hi	MI	IVTSGHVDHGKTTALLKAL	TGTSTAHLPEEKKRGMT	IDLGYAYLPLEN----	KVLGFIDVPGHEKFLSNMLAGL 72
SELB_Pm	MI	IVTSGHVDHGKTTALLQAL	TGTSTAHLPEEKKRGMT	IDLGYAYLPLEKNGKIDRTL	GFIDVPGHEKFLVNMLAGLG 77
SELB_Pa	MIVGTAGHIDHGKTSLLRAL	TGIEGDRRPAERQRGIT	IDLGYLYADLDG----	SPTGFIDVPGHERFVHNMLAGAS 73	
SELB_Sm	MIVGTAGHIDHGKTTLVKAL	TGVDTRLKEEKKRGIS	IDLGFAYARFAK----	AVTGFVDVPGHERFIHTMLAGAG 73	
SELB_Aa	MKYILFATAGHVDHGKTTLIK	TLTGIDTRLPEEKKRGLS	IDIGFAYIDFPDIN----	TRLEIDVPGHERFIKNAIAGIC 77	
SELB_Cj	MKSVI	IIGTAGHIDHGKTTLIKAL	NGFEGDSLKEEQRQIT	INLSFNSNLKDK-----	NISFIDVPGHKDLVKTVMVSGAF 75

		G4	
SELB_Ea	GMDLVLLVVADEGVMPQ	TIEHLEILNLLDIKGLI	VITKADTVDTDFKELVKEDVMEKLEGTFFLE--NADIVEVDSISG 154
SELB_Cd	GIDIVLLVVADEGVMPQ	TVEHLDILSFLNIKNGIV	LVKSDTVDDREFELVKEDICEKIKGTFFLE--DAEIEVDSISK 154
SELB_CP	SLDVVLLIITALDEGIMP	QTKHELEILELLEVKKCI	VALTKRDLVDDEWAEEMIKEDIKNYLKSTSFK--DATMIEVSSKTK 154
SELB_Tt	GIDIVMLVIAADEGVMPQ	TKEHVDILSFLDIKAGI	IVLVKCDLVEKDWLLIVEEDVRENKLGTFLE--NAPIVHVSSVTG 154
SELB_Mt	GMDLVLLVVADEGVMPQ	TREHLAIDLQIKKGI	IVITKIDLVEADWLELVREEVQAVKGTVLE--DAPLVEVSAALTG 154
SELB_Db	GIDFVLLVIAADEGIMP	QTREHLEICSLGIRAGL	VALTKTDMVEEDWLELVHEEVQTYLAGSFLE--GAPIVPSAHTG 153
SELB_St	GIDHALLVACDDGVMAQ	TREHLQILQLTGNLQ	LTVLTKADRVDPEARIEGVEVREVLAAALDNYGF--ADTVLFVTAANEG 151
SELB_EC	GIDHALLVACDDGVMAQ	TREHLAIDLQTNPML	TVALTKADRVDPEARIEGVEVREVLAAALDNYGF--ADTVLFVTAANEG 151
SELB_Yp	GIDHALLVACDDGVMAQ	TREHLAIDLQTNPML	TVALTKADRVDPEARIEGVEVREVLAAALDNYGF--ADTVLFVTAANEG 153
SELB_Hi	GVHYAMLIVAADGVA	VQTKHEHLAILRQLQ	FHEIIVVITKADRTNSAQIESLIQTIKQDYSFLRN----ANYFVTS AETG 148
SELB_Pm	GIHYAMLIVAADGVA	QATLEHLAILRLLQ	LEHILIVITKADRATLPQIEQLSQQLKANHPILAN----SPVFI TSAKTE 153
SELB_Pa	GIDCVLLVVAADDGLMP	QTREHLAIVELGIRRAL	VLTKIDRVEPQRVQVVRTQVEHLLASGPL--ARSPIFPLSSSTG 151
SELB_Sm	GIDYAMLVVAADDG	IKPQLEHLAIDL	DLGVSRLVAITKADLADPARLENLTDEIGAVLSTSLR--DAEILPVSAAG 151
SELB_Aa	SASGLILVDPNEGIMP	QTIHLRVAKSFGIKH	GIAVLTKMDKVDELAHIAEELIAFLEKEEMN--MEIVKVS AVTG 154
SELB_Cj	GFSVCLFVVDINEGL	KEQSLHLEILKIL	DIKNIILVLSKCDLCE--IEQKSVEILEELKNLDYP--ILKV FHTS IKNN 151

## Domäne 2

SELB_Ea	TGIKELTEEIDRLTDE	VEDEKNI-DANPRLSID	RVFSIKGFGTVVTG	TLIEGKMNLDDMMIYPGEIKTKIRSLQVHGESQ 233		
SELB_Cd	RGIDTLIEKIDKMSDD	IEDKNE-NSPARLNID	RVFSIKGFGTVITG	TLIEGKISIEDDLVIYPQLVTKIRSIQVHGENK 233		
SELB_Cp	EGLNELITEIDSAVEE	IEQKDK-EGHFR	LAVDRSFVSVSGF	TVLGTILSGSVKLGDLVQINPSGIEARVRNIQVHENV 233		
SELB_Tt	EGLDILVNTLD	DELAQVKKERSS-EGIF	RPLVDVFSIAGFG	TVVTGTLISGKIKVGDKVMYIPKMIERSVRNLQVHERNV 233		
SELB_MT	EGIAELREQLDALAA	AVTPRPA-AGRVR	LPIDRVSVTGF	TVVTGTLWVSGTIKVGDELEVQPEGLKTRARNLQVHGRTV 233		
SELB_Db	AGLEELKGYIAELS	SSTFAPDRR-SDL	FRLPVDVFTMKGH	GTVTGTSISGALRLGEEIEIVPSGHRSKVRGLQVHGTA 232		
SELB_St	RGIAELRAHLQQL	PARSHAA---QHR	FRLAIDRAFTV	KGAGLVVTGTALSGEVNVGDTLWLTGVNTPMRVRSLHAQNQPT 228		
SELB_Ec	RGMDALREHLLQ	LPEREHAS---QHS	FRLAIDRAFTV	KGAGLVVTGTALSGEVNVGDTLWLTGVNTPMRVRSLHAQNQPT 228		
SELB_Yp	RGIGELREHLAQ	CHQQRDPKGR	LQRRFRLAIDRV	SVKAGLVVTGTALAGQVAVGDTLWLTGGDCPVRVRGIIHAQNQPA 233		
SELB_Hi	QGISELRHYLAN	LAEADTQ---KPF	RYAIDRVSVK	GAGTVVTGTAFSGTVKVNDEIYLS-TGQKIRIKAIHAQNTSS 223		
SELB_Pm	QGIDELRNYLAK	PNLADSN---KPF	RYAIDRVSVK	GAGTVVTGTAFSGTVKVNDEIYLS-TGQKIRIKAIHAQNTSS 228		
SELB_Pa	EGVEALREALG	LAGEVRRSR-EGY	FRLAVDRAFSV	AGSIVVTGTAFSGQVAVGDELLEGNAGRPPVRVRLGHAQNRPA 230		
SELB_Sm	QGIPELLKERL	AAECATAAS-AV	GRFRLAVDRS	FTLSGAGTVVTGTVLSGTVGVDQVTVSPAGRSARVRSIIHAQNQRA 230		
SELB_Aa	QGIEDLKNSIK	KLLESINLNK	-HKPLRIFV	DSAFVVKGYGTVLVRGSCFEGEVKEGDKVVVEPIGIVISRVRKMQNHGVVF 233		
SELB_Cj	QGIIEELKNY	LYTIENK	ENDE---ELIF	HYIDRVSLKGI	GTVVTGSLNEGSITLNEKII	CLDTQFELIVKNIQNHDTNL 228

## Domäne 3

SELB_Ea	KIAYAGQRVA	INLANV--RV	EIEERG	DVLAKPNSM-QSSM	MDVKKLKIKNLDRGLRYWDRIRLYHGAK	EILGRVAF	LDR 310	
SELB_Cd	DTAYAGQRTA	INISNV--KV	DDIKRG	DVLAAPNSL-EES	MMLDVKLSLVNHLDKLKHWRDLRLRY	HGTREILCRAV	PLDK 310	
SELB_Cp	EIGEAGQR	CALNLSGV--T	KEEVT	RGMVVCTANTI-EPS	YMDCKFRYLKSNKLNVRQVRVRIYHGT	SEIFGRIVLL	DK 310	
SELB_Tt	ECAFAGQRTA	INLANV--KV	EIEERG	DVIAPPEAI-IP	STMIDVKLSLLK-EAK	TLKNRERIRFY	TGASEVIGRAVLLDR 309	
SELB_Mt	KEARAGQR	VAVNLAGI--E	TEAVHR	GSSLLTPGFL-TPT	YRLDASFKLLN-GAR	PLANRDRVHFY	LGTSEALGRVLLDR 309	
SELB_Db	EVARAGERT	AVNLYGL--E	VAELER	GEVLAHPQTL-F	PSVWDVEMTCLSS	SPNPLKHRTEV	HFHHSREILAKLFFLDR 309	
SELB_St	DHAYAGQRI	ALNIAGD-AE	KEQLNR	GDWLLSDAPV	GEAFSRVIVSL----AL	HAPLSQWQPL	LIHHAASHVTGRVSL-- 301	
SELB_Ec	ETANAGQRI	ALNIAGD-AE	KEQLNR	GDWLLADVPP-E	PFTRVIVEL----Q	THTPLTQWQ	PLIHHHAASHVTGRVSL-- 300	
SELB_Yp	QQAQAGQRI	ALNLSGD-IS	KQINRG	DWLLAQPLL-PP	VRVLVTV----DAD	PLQHWQPL	HLHYGARHITGRFSLGH 307	
SELB_Hi	EQGIAGQR	LALNLNAD-L	DRTPMK	RGDWLLQNEPL-P	PTRDISVQI----L	AEVPLNESQ	PPVHIYHGASRTTGKLTLLQG 297	
SELB_Pm	NVGNAGER	LALNLNVD-L	DRITIER	GDWLLSQQLP-P	PTSRITVLL----N	AETTLQESQ	PIHLYHASARTTGKLNLLQH 302	
SELB_Pa	QQAWAGQR	VALNIAGER	LALAEQI	QRGDWLLQAALH-A	PTTRVIDFRLL	PDELDFTHW	TPVHLLHGTQDVTGRLLALEG 309	
SELB_Sm	ERGFAGQR	CALNLAGEG	ISKDAIT	TRGDMVVD	PHLH-APSDRL	DASVLESETK	PIGEWFGARFHASAE	TGIRIVPLEG 309
SELB_Aa	KKAVAGER	IALNLPEV--D	AKVKR	GFLLK	PESY-EKSN	VLIVKT-----E	IDLKPGKIYQVFFGMRE	TVGKISVIDK 304
SELB_Cj	EQIKACNR	VALSLNCD--Y	KELKKG-Y	LLSKK	GYFKAFK	ECDALVKAK-----N	LQN-SKMI	FCVGSRQIECKINLLK 298

Fortsetzung nächste Seite

Domäne 4

SELB_Ea	EELAP-----GEECFQIRLEDITIVAKKDDRFVIRYSPMITVGGGAIIDTNPKKHRRFDEVDL	369
SELB_Cd	ELIES-----GESGYVQLRLEESIVSKKGDFTVVRYSMETIGGGVIDPSPKKHKKFDEKVI	369
SELB_Cp	EEVKP-----GEEVYIQLRLEREICAQKGDNLVIRNYSMPVTLGGGKIINPVAKKAKRFKEDYL	369
SELB_Tt	DELHG-----GESCYAQIYLEDVSVLRKDKFVIRTYSPLMTIGGGIILDNPCKHRRFDEVI	368
SELB_Mt	DELNG-----GEEALIQLLMEKPVVASREDRFFILRSYSMETIGGGIIDPVPKHHRRFQPEVL	368
SELB_Db	DKLEP-----GETAVCQVRFPRPLPGVYGDRCIVRSFSPQLQTVAGGRIINPLGRKVRHRSKD-M	367
SELB_St	-----EGGLAELIFDTPWLWADNDRVLVLRDISARATLAGARVVTLKAPRRGKRKPDYL	354
SELB_Ec	-----EDNLAELVFDTPWLWADNDRVLVLRDISARNTLAGARVVMNPPRRGKRKPEYL	353
SELB_Yp	QQLIDDQQLPIDHQIINNQSTSGGHSSQILAEALLDPSLWLVENDRVILRDIGAKKTLGGARVIHLAVPSRGRKQPAYL	387
SELB_Hi	KNAAK-----NDRTLAEIILDSPLFLAFGDKLILRSKDTKTLIAGARVLEINSPKRHKRTEVRL	356
SELB_Pm	KTLLP-----AQQGLAEIILEKPLFLAYADKLLILRSKDAKHLVAGAKVIEINSPKRHKRTEQRL	361
SELB_Pa	EQLEP-----GHRAFAQLVNLAPIQALHGDRVLVLRDQSAQRTLGGGRVLDGAAPARNRRTPARL	368
SELB_Sm	PLLP-----ERRRVQLVLRDPTAAAVGDRFVILRDVSARRTIGGGRLDLRAPARKRRSPERL	367
SELB_Aa	G-----IYLVRLEKNAIIVRRFLGGAEVLVLD-SSGNFLGGAEVLHPKVRVTKK-----	348
SELB_Cj	LENDE-----FFVHFSFDKNVFLSFDEAFILLQ--NRRVIGGGKVLNPLSEPLKKEQKNKF	352

SELB_Ea	SSLNMKESGDPQFVVEENIRTNKSDYPVLKEIAKSLGENEDIVLENIKGLVASGRVIDING----TYIHLEHYDRLRQKI	445
SELB_Cd	EALKIKEKELKDIIEEYLKRNLNYPNIKEIMSYSGAHEEDVKRALETLISEDKVFIIGN----MYMHIHQYNKIKENT	445
SELB_Cp	NELKLMKESGIEEIVENVVLSLSETFPNSQEIIEKGLGRNIDNIDFILEKLCEDKKIIGIDNGKSKVFIHNKFFTKSEI	449
SELB_Tt	ETLSTLGAATGEEELLAQLRLAGRGGLTVAELRIMTDMESKLLDRTLQILGKQLAFQFDRD-DKRFVAGDVLGDLGAC	440
SELB_Mt	VSLQRRLEGSPEKILAQIIEQEHREGLDW-QEAATRASLSLEETRLLQSMAGQVTLRLVENDLYAISTERYQAWWQAV	447
SELB_Db	ETLSTLGAATGEEELLAQLRLAGRGGLTVAELRIMTDMESKLLDRTLQILGKQLAFQFDRD-DKRFVAGDVLGDLGAC	446
SELB_St	HWLSTLAAQDDSAALAIH-LERGAVNLPDFGWARQ-----LNPLGMRQLIEQHG-FIQAG---DNLLSAPVAARWRKI	424
SELB_Ec	AQLASLAEKQSDADALSVH-LERGAVNLPDFGWARQ-----LNPLGMRQLIEQHG-FIQAG---DNLLSAPVAARWRKI	423
SELB_Yp	AWLTALAQAQSDREVLDLH-LAQGPVSVRFWARQ-----LTDNEMAALLAATD-TVVAG---DIALSHPHAQQQTL	457
SELB_Hi	NFLANLALAEASQRIALT-LQHNATTARQLMWTEQ-----LTSQLDKALAERD-AVRVYQ---DWCFNPNVQEKTTQI	426
SELB_Pm	NFVYALQQAQKTTTERTALY-LQNKAVDAQTLMWTEQ-----LNAEQLAEIVAVNQ-QVRFQ---DWIFNADYQQQTEKL	431
SELB_Pa	AQLQALRQESLEELPTLLGAAENGLDPQRLVQSFN-----RPREHWRLPPEEVVEVQTRLG---PRLFAGERWFALVEQL	440
SELB_Sm	SYLQAASLSHAGEALAAALLDVPPFLVDLDFVARDRA-----LSEAEQLNARSASAEVIEGSAVRHALSKQRAAFSDEV	442
SELB_Aa	-AFIKKNIKDLLENFECYLLKERGPIGLKLEFFKRITGVSPKVALNKPESIEIRGVVYLLK-----FIENLK	414
SELB_Cj	LMFLKNKDFKAAFSLFKDAHKYGFGLSSYQRFKLS-----HQKALKLAKELNQVVFDEK-----NLNVYHLQSL	419

Domäne 4b

SELB_Ea	CSTLEEFHKSNNLRKRGMLKEELRSR-VESKLSKDFDILLERVAADKEIKIEENLASISSFSVKFSDSDIKIRQETEDTI	524
SELB_Cd	IKLLSEYHKYRLRKGILKEEVRSK-IESNFKTRMDDILEKLSSTENAIKIENNIVSLDFEVLINDKQKEIAKLIKRL	524
SELB_Cp	YEILRKFHEENPLKVGMMKEELRSKSFNSKIKQKIFQSFLEMLKKEIKIEGINIISLKDPEIKLTKAQAIRKAILKAY	529
SELB_Tt	KEILEDHFHRKNPLKREGISKEELKKN-LFGDIKSKLCDFIFELMEKEEIKIKNQVLALKDFKVVLNVEEQEKLERIKIY	519
SELB_Mt	TRALEEFHSRYPLRPLGLAREELRSR-YFSLRPARVYQALLEEWSREGRLQAANTVALAGTTPSFSETQKLLKDLKEDKY	526
SELB_Db	LEYLGEYHRRPMPRQGLSRAELISG-FGRGMHPKLVHFLVERLVKSGQVLEADILRLPGHVVSASDQSGRLRTMETTY	525
SELB_St	LDTLATYHEQHRDEPGPGRERLRRM-ALPMEDEALVLMLETRMRDDGLIHSHHGWLHLPDHKAGFSDEQQAVWQVPEPLF	503
SELB_Ec	LDTLATYHEQHRDEPGPGRERLRRM-ALPMEDEALVLMLETRMRDDGLIHSHHGWLHLPDHKAGFSDEQQAVWQVPEPLF	502
SELB_Yp	LHVLAALYHQHGDQLGLGRARLRRM-ALPTLDEGVVFRLEIDNLLAEGALHNRGWLHLPDHKAGFSDEQQAVWQVPEPLF	536
SELB_Hi	LTALNIYHEQHNDQLGVSKARLYRM-ATLNQPENLIHFFIDEMLDDGRLQQTGRGWIHLPEHKIQFNTEEKSRWTDVLFNEF	505
SELB_Pm	LTALAQYHQHNDQLGISKARLYRI-ATLNQPENLIHFFIDEMLDDGRLQQTGRGWIHLPEHKIQFNTEEKSRWTDVLFNEF	510
SELB_Pa	LAGLRRFHEELPDELGPDRDRLRY-ALPQLERPVIALLDAALAGGDVHSSGPPWLHLPGHVEVRLSDSEEQLRRLWPLL	519
SELB_Sm	QRVLSAFHVENPDLQIGRERLRLQ-VTPRLPPPFLVALRAEQTAGRLVLEGAFVRLPGHEVRLSEKEEELYARILPHL	521
SELB_Aa	LKIKKFLDTELQNAFQVDKKEKVKSM--FSLNEELLKYILDELKTYKIVN--ELIIDERKSDLEKNEDFQKLSILKGGI	489
SELB_Cj	IKNFIKFILEKNPYAMLSAHSALR--ITWASENFCEGLGKEMSN--LLDFQNGIYFKKG--IDFEKLQKNNNNQMYEIL	493



SELB_Ea	RQGG-FSPEQ-IDVITGE--RSEYIQVFESMVG-ETLVRVSEDVTFHKEIYEKALDLLDRHVQ--KNGEITLAEFRDMI	596
SELB_Cd	KSCG-VSSILTIDEVSEG--NHNYAEVLESMIGN-KVEKLDLIDYIMDKDIYENAKNILINYIK--ENKEITLGEYRDLI	597
SELB_Cp	LESG-IVSPKIKDIEDKKL-EKEYIKIYNLLIEEGTLIKLPEDRVMMHKEVLQSVKEKIEWLN--KNGSITLGETKEIL	605
SELB_Tt	RDSK-FEPPKLSELEGYP----EIPMVEYLVNIGELVKLDEEIFLSKDNYEAAQNVLINYLK--ENKEITLAVYRDL	591
SELB_Mt	RVSR-WQPPSFKEVAGSFNLDPSELEELLHYLVREGVLVINDHFVWHRQALGEAREVIKN-LA--STGPFGLAEARDAL	602
SELB_Db	VQAG-LMPPTTKAFLEENGLTAKDVAQMFRLMEEGVLIKVSEEFYAKTAMDEIIGRVRSFFE--SNQEMGPQDFRDLT	602
SELB_St	GDE----PWVVRDLAKETGTEEQMLRLVLRQAAQGGIITAIKDRYRNRDIVAFANMIRELDQ--ERGSTCAADFDRDL	577
SELB_Ec	GDE----PWVVRDLAKETGTEEQAMRLTLRQAAQGGIITAIKDRYRNRDIVEFANMIRDLQ--ECGSTCAADFDRDL	576
SELB_Yp	VDD----PWVVRDLAAELQAAEGEMRSLRKAALGYITAVTDRYYLSQRIEQLADLVRELD--RQGSVSAADFDRDL	610
SELB_Hi	EKAN-GQAIWVRDMANALAIIDESIMRNFMKAGKGLYLTPIVKDRFFLTETLYAYARLIKQIAE--EKGKVSVNEVRDKL	582
SELB_Pm	EQQH-GHPLWVRDLANVLGQDESAMRNFLYKAGKGLYLTPIVKDRFFLTETLYAYARLIKQIAE--EKGKVSVNEVRDKL	587
SELB_Pa	EAGR-YDPWVRDLARELRQDEAVMRNLLRKLARLGLQVQVVRDLFYPEATLRQLAEIAVQVRD--PAGLRPAEFDRDL	596
SELB_Sm	EGERFRPVRVDFAEALGVDEREIRRIILKCARLGRVQIRHDFVFTTRQTTAEMVAIRQVAANAERGFSAGLFRDRV	601
SELB_Aa	KEER-----EILLEGIPKEILTSLIKRKYAHRIGEYLIISDELLKKYINELKELGK----TFNVQQAQKNKL	551
SELB_Cj	KKQG-IKPEAPYNLYDFLELDRKSGDNILKKLTKQGLVVRLSHNLFIKQALEKLMQECLELLK--NQSLDVQSMKEYF	569

Fortsetzung nächste Seite

	↓   ↓		
SELB_Ea	GASRKYAMLLLEDFDRKRITRRIGEKRVLS-----	626	
SELB_Cd	DSSRKNCMIILENFDRNKITKRVENKRILF-----	627	
SELB_Cp	GVSRKYLVAILEYLDNEEITKRVEDKRVLN-----	635	
SELB_Tt	NTSRKYAMAILEYFDSIKLTKRIGDVRVRLAREIKN-----	626	
SELB_Mt	GSSRKYVLPLEYLELDQVKFTRRVGDKRVVGN-----	634	
SELB_Db	ELTRKFAIPVLEYLDKEKITMRIGDKRQIRKR-----	634	
SELB_St	NVGRKLAIQILEYFDRIGFTRRRGNDHLLR-----DALLFPQKE-----	616	
SELB_Ec	G <b>V</b> GRKLAIQILEYFDRIGFTRRRGNDHLLR-----DALLFPEK-----	614	
SELB_Yp	GIGRKLAIQILEFFDRSGFTRRRGNHILR-----DSGLFSATGS-----	650	
SELB_Hi	NFGRKLTVQLMEYFDRMGFLRRKGNHILR-----DKNVFDL-----	619	
SELB_Pm	QFGRKLVVQLIEYFDRCGFLRRKGNHIVLR-----DSDVFDL-----	624	
SELB_Pa	GIGRKRSTIIEHFDRIGLTRRIGNDRRLR-----EGSALAEQLLGGVSP-----	641	
SELB_Sm	NNGRKVAIEILEFFDRQGVVTRHGDVRRVNPRLDLYEGPVPEADEGRGSSPVERPDFKFYRAGS	666	
SELB_Aa	GLTRKYLIPLEYLELDYLGLTVREGNERRWKR-----	582	
SELB_Cj	NLSRKYAIAYLEYLDKFPQVSKEAEKRFLTNI-----	601	

**Abb. 31: Alignment von SelB-Sequenzen.** Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm Clustal W (s. 2.11.3.). Identische Aminosäuren sind grau, Reste mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften (unpolar / polar, ungeladen / basisch / sauer) dagegen hellgrau unterlegt. Die in GTPasen konservierten Motive G1 (GXXXXGKS/T), G2 (DX<sub>n</sub>T), G3 (DXXG) und G4 (NKXD) sind oberhalb der Sequenz angegeben, signifikante Abweichungen von der Konsensus-Sequenz dieser Motive wurden blau hervorgehoben. Ein Arginin-Rest, der möglicherweise bei der Erkennung des tRNA-gebundenen Selenocysteyl-Restes eine Rolle spielt, ist grün gekennzeichnet. Aminosäuren in *E. coli*-SelB, deren Veränderung die Spezifität der Bindung an das *fdhF*-SECIS-Element beeinflusste, sind rot markiert, die entsprechende Position im Alignment wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet (vgl. Abb. 32). Ea: *E. acidaminophilum*, Cd: *C. difficile*, Cp: *C. perfringens*, Db: *D. baculatum*, Mt: *M. thermoacetica*, St: *S. typhimurium*, Ec: *E. coli*-K12, Yp: *Y. pestis*, Hi: *H. influenzae*, Pm: *P. multocida*, Pa: *P. aeruginosa*, Sm: *S. meliloti*, Aa: *A. aeolicus*, Cj: *C. jejuni*.

Ein hervortretendes Merkmal der angeführten SelB-Spezies ist der Austausch des in fast allen GTPasen (einschließlich EF-Tu) konservierten Asparagins der so genannten G4-Box (NKXD-Motiv; BOURNE *et al.*, 1991) gegen Threonin (bzw. Serin in *C. jejuni*). In EF-Tu interagiert dieses Asparagin mit Segmenten der Peptidkette, die an der Bindung der Guanin-Base der Nukleotide GTP oder GDP beteiligt sind. (BERCHTOLD *et al.*, 1993). Einige dieser Wechselwirkungen zum Guanin gehen von dem für EF-Tu-homologe Proteine typischen SAL-Motiv (G5-Box) aus (BOURNE *et al.*, 1991; BERCHTOLD *et al.*, 1993). In SelB fehlt dieses Motiv, was vermutlich die Ursache dafür ist, dass die Nukleotide GTP und GDP von diesem Protein schwächer gebunden werden als von EF-Tu (HILGENFELD *et al.*, 1996).

Erwähnenswert ist auch die in den vier Gram-positiven Vertretern *E. acidaminophilum*, *C. difficile*, *C. perfringens* und *M. thermoacetica* sowie in *A. aeolicus* zu findende Abweichung von der Konsensus-Sequenz des G2-Motivs: das ansonsten in GTPasen streng konservierte Threonin ist durch Serin ersetzt, eine Aminosäure mit sehr ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften.

Eine wichtige Funktion bei der Diskriminierung zwischen Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> und Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> wurde für Arg(181) in *E. coli*-SelB postuliert (HILGENFELD *et al.*, 1996). Abbildung 31 zeigt, dass diese Aminosäure in 14 von 15 Sequenzen an der entsprechenden Position lokalisiert ist, eine Ausnahme bildet SelB aus *A. aeolicus*, wo an Stelle des Arginins ein Serin zu finden ist.

Von *E. coli*-SelB wurden mehrere Punktmutanten selektiert, die *in vivo* den negativen Effekt von definierten Änderungen der *fdhF*-mRNA-Sekundärstruktur auf die Inkorporation von Selenocystein kompensierten. KROMAYER *et al.* (1999) isolierten Varianten des Proteins, welche in der Lage waren, den

durch die Mutation einzelner Basen in der Schleife der apikalen Haarnadelstruktur verursachten gravierenden Funktionsverlust des SECIS-Elements abzuschwächen. Auf diese Weise konnten zwischen 10 % und 47 % der UGA-Durchleserate, die mit dem Wildtyp-Element und Wildtyp-SelB zu beobachten war, wiederhergestellt werden. Interessanterweise waren die SelB-Mutanten zumeist auch in der Lage, SECIS-Mutationen zu kompensieren, gegen die sie ursprünglich gar nicht selektiert wurden. Bei der Interaktion mit dem *fdhF*-Wildtyp erreichten diese Proteine allerdings nur 5-24 % der Durchleserate, die mit nicht verändertem SelB gemessen wurde. Eine der Mutante bildete jedoch in dieser Hinsicht eine Ausnahme und zeigte sogar eine höhere Effektivität als Wildtyp-SelB (114 %). Hinsichtlich struktureller Änderungen im SECIS-Element (z. B. Variation des Abstandes zwischen UGA-Codon und apikaler Haarnadelstruktur) verhielten sich die getesteten Mutanten wie das nicht veränderte Protein.

Die Mehrzahl der isolierten SelB-Varianten wies jeweils eine der Punktmutationen Met(556)→Ile, Cys(568)→Arg, Ala(569)→Val oder Val(578)→Ala in einem kurzen Bereich am C-Terminus des Proteins auf. Da diese Region Bestandteil der für die mRNA-Bindung verantwortlichen Domäne 4b ist (KROMAYER *et al.*, 1996), handelt es sich bei den entsprechenden Resten wahrscheinlich um Aminosäuren, die direkte Kontakte mit dem SECIS-Element eingehen (KROMAYER *et al.*, 1999). Innerhalb verschiedener SelB-Sequenzen sind diese Positionen nicht konserviert.

Einige Klone besaßen allerdings einen Aminosäure-Austausch in Domäne 4a: Glu(437)→Lys. Da dieser Bereich nicht an der mRNA-Bindung beteiligt ist, wurde vorgeschlagen, dass diese Mutation die Konformationsänderungen des Proteins, welche durch die Wechselwirkung mit Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und SECIS-Element ausgelöst werden (BARON *et al.*, 1993b; HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998b), in irgendeiner Form beeinflusst.

In einem analogen Experiment selektierten LI *et al.* (2000) SelB-Mutanten, die einen Austausch des ungepaarten U<sub>17</sub> im Stamm der apikalen Haarnadelstruktur der *fdhF*-mRNA gegen Adenin bzw. Cytosin tolerierten und die Funktion des SECIS-Elements teilweise wiederherstellten (bis zu 40 % der UGA-Durchleserate, die mit dem Wildtyp der *fdhF*-Sekundärstruktur und des Elongationsfaktors erreicht wurde). Auch hier waren die isolierten SelB-Mutanten in der Lage, andere Veränderungen in der Schleife und im Stamm der apikalen Haarnadelstruktur mit z. T. relativ hoher Effektivität zu kompensieren. Die neuen Eigenschaften der verschiedenen SelB-Varianten konnten jeweils auf eine von zehn Punktmutationen zurückgeführt werden: Met(556)→Ile/Val, Ile(557)→Phe, Leu(560)→Pro, Asp(561)→Glu, Cys(568)→Arg/Phe, Phe(572)→Tyr, Val(578)→Glu oder Ala(583)→Thr. Diese waren in dem gleichen Bereich lokalisiert wie die von KROMAYER *et al.* (1999) beschriebenen Veränderungen (s. o.) und zum Teil sogar mit jenen identisch.

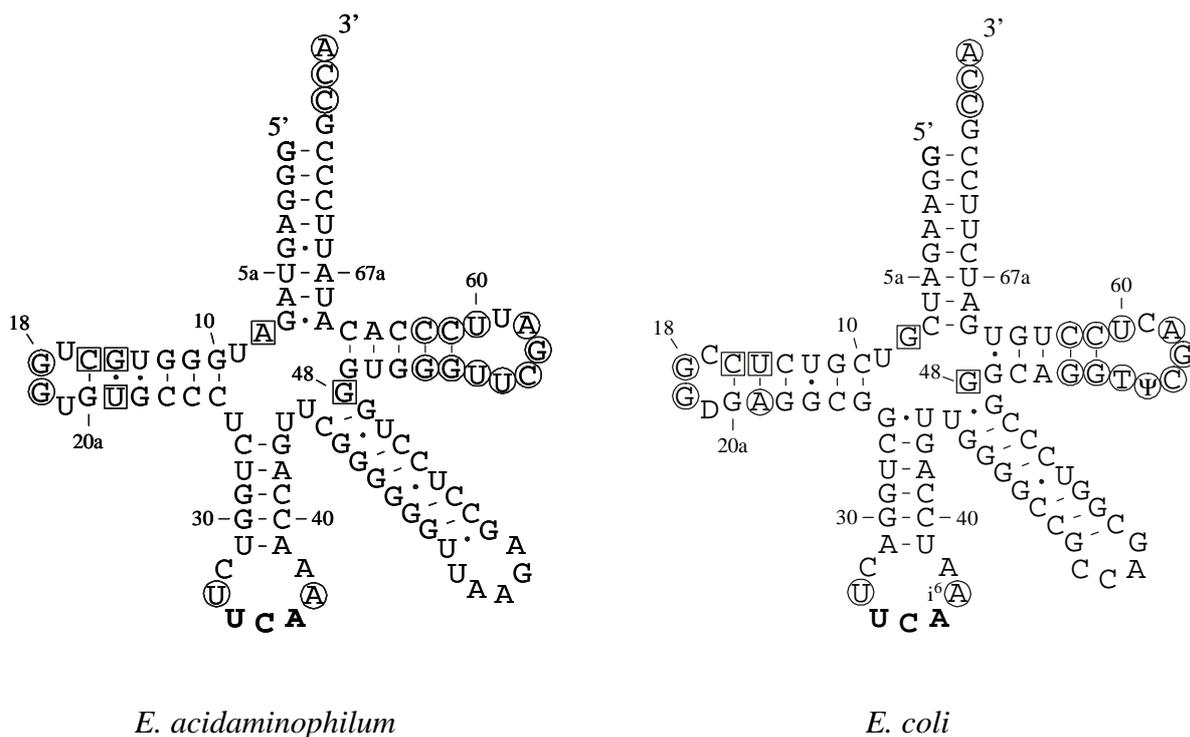
Die Fähigkeit der meisten SelB-Varianten, mehrere unterschiedliche Mutationen im *fdhF*-SECIS-Element zu tolerieren, könnte darauf hindeuten, dass zumindest einige dieser Proteine im Vergleich zum SelB-Wildtyp für ihre Funktion nur einen wesentlich unspezifischeren Kontakt mit der mRNA benötigen (KROMAYER *et al.*, 1999). Eine ähnliche Situation liegt möglicherweise in *E. acidaminophilum* vor, da



Zusammenhang auch, wie sich die Eigenschaften von *E. coli*-SelB ändern, wenn mehrere der angesprochenen Mutationen gleichzeitig vorliegen.

### 4.2.3. Selenocystein-spezifische tRNA

Die sich aus der Sequenz des *selC*-Gens ergebende, 97 Nukleotide umfassende Struktur (Abbildung 33) zeigt die typischen Eigenschaften, welche bakterielle, Selenocystein-spezifische tRNAs (COMMANS und BÖCK, 1999) von den übrigen Elongator-tRNAs (DIRHEIMER *et al.*, 1995) unterscheiden: einen ungewöhnlich großen variablen Arm, ein zusätzliches Basenpaar (5a-67a) im Akzeptor-Stamm und einen verlängerten D-Stamm (sechs Basenpaare statt vier), verbunden mit einem verkürzten D-Loop (vier Basen). Auch hinsichtlich der Primärstruktur findet man die für bakterielle tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies beschriebenen Abweichungen von der allgemeinen Konsensus-Sequenz: die normalerweise invarianten Basen U<sub>8</sub>, A<sub>14</sub>, R<sub>15</sub> und Y<sub>48</sub> (DIRHEIMER *et al.*, 1995) sind ersetzt durch A<sub>8</sub>, G<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> und G<sub>48</sub>.



**Abb. 33:** Postulierte Kleeblatt-Struktur der tRNA<sup>Sec</sup> aus *E. acidaminophilum* im Vergleich zur *E. coli*-tRNA<sup>Sec</sup>. Nukleotide, die in Elongator-tRNAs als konserviert angesehen werden können (DIRHEIMER *et al.* 1995), sind durch Kreise gekennzeichnet, Abweichungen von der Konsensus-Sequenz sind dagegen durch Rechtecke hervorgehoben. Die Struktur der *E. coli*-tRNA<sup>Sec</sup> wurde aus BARON *et al.* (1993a) entnommen.

Für die tRNA<sup>Sec</sup> aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die ungewöhnliche Länge des Aminoacyl-Akzeptor-Stammes (acht bp) eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch SelB spielt, gleichzeitig wird durch dieses Merkmal eine Interaktion mit EF-Tu verhindert. Die Deletion des Basenpaares A<sub>5a</sub>-U<sub>67a</sub> im

Akzeptor-Stamm beeinträchtigte auch die Umwandlung von Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> zu Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> durch die Selenocystein-Synthase (BARON *et al.*, 1990; BARON und BÖCK, 1991).

Dagegen postulierten RUDINGER *et al.* (1996), dass eine Antideterminante, bestehend aus dem letzten Basenpaar des Akzeptor-Stammes (C<sub>7</sub>-G<sub>66</sub>) und den ersten beiden Basenpaaren des T-Stammes (G<sub>49</sub>•U<sub>65</sub> und C<sub>50</sub>-G<sub>64</sub>) die Erkennung der Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> durch EF-Tu verhindert, wobei wahrscheinlich dem Nicht-Watson-Crick-Paar eine entscheidende Rolle zukommt. Die nach Deletion des Basenpaares A<sub>5a</sub>-U<sub>67a</sub> beobachtete Wechselwirkung mit EF-Tu wäre dann eine Folge der Verschiebung der Position der Antideterminante (RUDINGER *et al.*, 1996).

In den entsprechenden tRNAs aus *Proteus vulgaris* und *D. baculatum* findet man wie im *E. coli*-Molekül das Basenpaar G<sub>49</sub>•U<sub>65</sub>, dagegen weist die tRNA<sup>Sec</sup> aus *M. thermoacetica* eine nicht den Watson-Crick-Regeln entsprechende Wechselwirkung (G<sub>7</sub>•A<sub>66</sub>) an der letzten Position des Akzeptor-Stammes auf (TORMAY *et al.*, 1994). Das gleiche Basenpaar findet man auch in *E. acidaminophilum*, die beiden anderen Positionen der potentiellen Antideterminante sind hier ebenfalls identisch zur tRNA aus *M. thermoacetica* (G<sub>49</sub>-C<sub>65</sub> und C<sub>50</sub>-G<sub>64</sub>).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass der Aminoacyl-Akzeptor-Stamm archaealer und eukaryotischer tRNA<sup>Sec</sup>-Moleküle neun Basenpaare umfasst (IOUDOVITCH und STEINBERG, 1999; MIZUTANI und GOTO, 2000). Da jedoch der T-Stamm gleichzeitig auf vier Basenpaare reduziert ist, weist der aus diesen beiden helikalen Abschnitten bestehende Akzeptor-Arm der L-Form wie bei den bakteriellen Vertretern dreizehn Basenpaare auf.

### 4.3. Funktionalität der *sel*-Genprodukte aus *E. acidaminophilum* in *E. coli*

Die Funktionalität der *E. acidaminophilum*-Genprodukte Selenocystein-Synthase (*selA*), Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor SelB (*selB*) und tRNA<sup>Sec</sup> (*selC*) in *E. coli* wurde durch Komplementation des Defektes der entsprechenden *E. coli*-Mutanten AH819, WL81300 und MN1 überprüft. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB, da dieser eine Reihe von Interaktionen mit anderen Komponenten, die am Prozess der Selenocystein-Inkorporation beteiligt sind, eingeht, wobei hier die Bindung des SECIS-Elements der Selenoprotein-mRNA hervorgehoben werden soll.

Jede der drei genannten Mutanten ist nicht mehr in der Lage, Selenocystein spezifisch in Selenoproteine einzubauen, das betrifft in *E. coli* die drei Formiat-Dehydrogenasen FDH<sub>H</sub> (COX *et al.*, 1981; ZINONI *et al.*, 1986), FDH<sub>N</sub> (COX *et al.*, 1981; BERG *et al.*, 1991) und FDH<sub>O(Z)</sub> (SAWERS *et al.*, 1991; ABAIBOU *et al.*, 1995). Als Maß für die Wiederherstellung der Fähigkeit zur Selenocystein-Inkorporation durch die entsprechenden Gene aus *E. acidaminophilum* wurde hier die Synthese der Formiat-Dehydrogenase H betrachtet. Deren Nachweis erfolgte durch die Bestimmung der Aktivität im Rohextrakt unter Verwendung des für das FDH<sub>H</sub>-Isoenzym spezifischen, künstlichen Elektronen-Akzeptors Benzylviologen (AXLEY *et al.*, 1990; SAWERS, 1994).

Das Enzym, dessen Expression unter anaeroben Bedingungen durch Formiat induziert, durch Elektronen-Akzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat und Nitrit dagegen reprimiert wird (PECHER *et al.*, 1983; BIRKMANN *et al.*, 1987), ist Bestandteil des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes. Native FDH<sub>H</sub> ist wahrscheinlich ein Monomer und identisch mit dem vom *fdhF*-Gen codierten, 80 kDa großen Seleno-Polypeptid (AXLEY *et al.*, 1990). Der Selenocystein-Rest an der Aminosäure-Position 140 des Proteins koordiniert gemeinsam mit den Pterin-Cofactoren das Molybdän und ist wahrscheinlich direkt an der Katalyse beteiligt, indem er das  $\alpha$ -Proton des Formiats auf das benachbarte His(141) überträgt (BOYINGTON *et al.*, 1997). Die entsprechende Cystein-Mutante wies gegenüber dem Wildtyp-Enzym eine um den Faktor 300 verringerte katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) auf, obwohl der  $K_m$ -Wert gleichzeitig auf etwa ein Drittel reduziert war (AXLEY *et al.*, 1991). Auch frühere Experimente mit Rohextrakten und partiell gereinigten Präparationen ergaben für das Selen-haltige Enzym eine bis zu 20-fach höher erscheinende Aktivität als für die Mutante (ZINONI *et al.*, 1987; AXLEY *et al.*, 1991). Die Enzymaktivität kann deshalb als Maß für den Einbau von Selenocystein in das Polypeptid herangezogen werden. Eine weitere Möglichkeit, das Selenoprotein Formiat-Dehydrogenase H nachzuweisen, besteht in der radioaktiven Markierung durch Inkorporation von <sup>75</sup>Selen, welches in Form von [<sup>75</sup>Se]-Selenit dem Medium zugegeben wird. Zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Experimente war diese Substanz jedoch kommerziell nicht erhältlich.

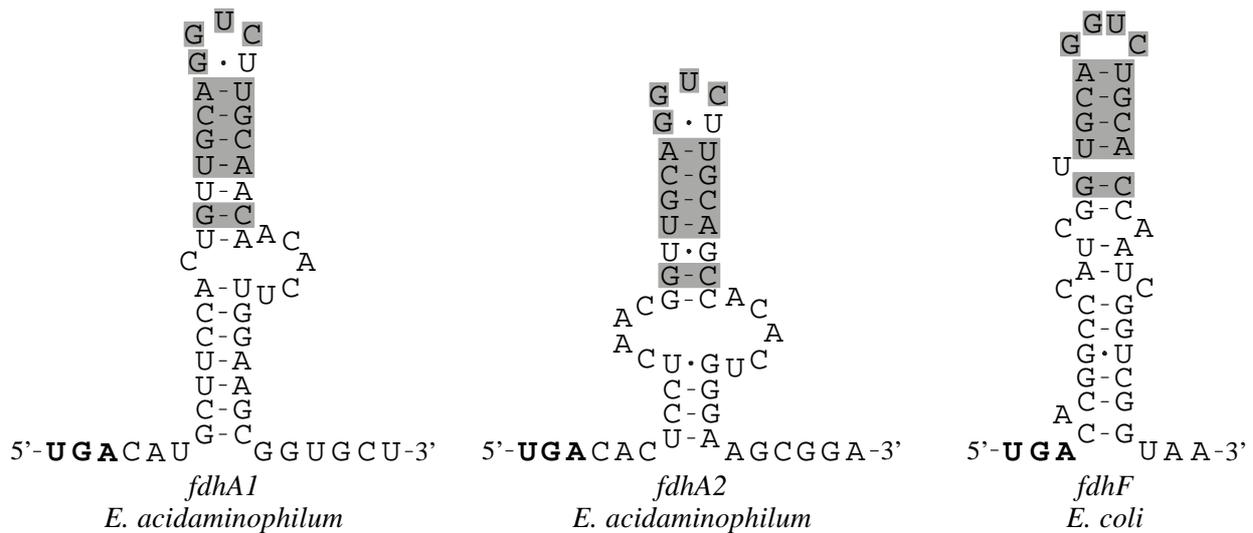
Der *selC*-Defekt der Mutante *E. coli* MN1 konnte wie erwartet durch das entsprechende Gen aus *E. acidaminophilum* komplementiert werden, im Rohextrakt wurde fast die gleiche FDH<sub>H</sub>-Aktivität gemessen wie für den Wildtyp-Stamm *E. coli* FM433 (s. 3.4.2., Tab. 9). Dabei ist allerdings zu beachten, dass das heterologe *selC*-Gen auf einem *high-copy*-Plasmid (pUC18-Derivat) vorlag und die entsprechende tRNA deshalb wahrscheinlich in wesentlich größerer Menge exprimiert wurde als die *E. coli*-tRNA<sup>Sec</sup> im Wildtyp-Stamm, deren Anzahl etwa 200-350 Moleküle pro Zelle beträgt (DONG *et al.*, 1996; TORMAY *et al.*, 1996).

Die Komplementation des *selC*-Defektes einer *E. coli*-Mutante (Stamm MN1 bzw. WL81460) konnte auch für die tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies aus *P. vulgaris* (HEIDER *et al.*, 1989), *H. influenzae* (WILTING *et al.*, 1998), *D. baculatum* und *M. thermoacetica* (TORMAY *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Sogar die tRNA<sup>Sec</sup> aus *Homo sapiens*, die in der Primärstruktur stark von ihrem *E. coli*-Pendant abweicht, war in der Lage, die FDH<sub>H</sub>-Aktivität einer *selC*-Mutante von *E. coli* wiederherzustellen. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die mittels T7-RNA-Polymerase synthetisierten Transkripte der tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies aus *Homo sapiens* und *Xenopus laevis* durch die Seryl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* aminoacyliert sowie anschließend durch die Selenocystein-Synthase in Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> umgewandelt werden können. Auch die Bindung der beiden mit Selenocystein beladenen tRNAs durch den bakteriellen Elongationsfaktor SelB wurde nachgewiesen (BARON *et al.*, 1994).

Die zusätzliche Expression von *selC* aus *E. acidaminophilum* im Wildtyp-Stamm FM433 führte zu einer Steigerung der FDH<sub>H</sub>-Aktivität gegenüber der Kontrolle mit pUC18 um ca. 25 %. Dieses Ergebnis steht

im Einklang mit dem von TORMAY *et al.* (1996) beobachteten Effekt, dass die Überproduktion der homologen tRNA<sup>Sec</sup> in *E. coli* zu einer deutlich erhöhten UGA-Durchleserate führte, im untersuchten Beispiel einer chromosomal integrierten *fdhF'*-*lacZ*-Fusion betrug die Steigerung 100 %. An Hand dieses Resultats wurde postuliert, dass die tRNA<sup>Sec</sup> unter den getesteten Bedingungen ein limitierender Faktor für den Selenocystein-Einbau ist. MANSELL *et al.* (2001) beobachteten ebenfalls einen positiven Einfluss der tRNA<sup>Sec</sup>-Überexpression auf die UGA-Durchleserate einer Plasmid-codierten *lacZ'*-*fdhF'*-*luc*-Fusion, eine Überproduktion von RF 2 hatte hingegen den gegenteiligen Effekt. Beide Faktoren, tRNA<sup>Sec</sup> und RF 2, kompetieren um die UGA-Decodierung in einem dynamischen Prozess.

Überraschenderweise wurde auch der Defekt der *selB*-Deletionsmutante *E. coli* WL81300 durch das entsprechende Gen aus *E. acidaminophilum* komplementiert, allerdings nur in Verbindung mit der homologen tRNA<sup>Sec</sup>. Auf die FDH<sub>H</sub>-Aktivität des Wildtyp-Stammes hatte das gleiche Plasmid (mit *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum*) hingegen keinen signifikanten Einfluss. Bisher konnte nur für *selB* aus *H. influenzae* eine Komplementation der entsprechenden Mutation in *E. coli* nachgewiesen werden (WILTING *et al.*, 1998). Offensichtlich ist jedoch auch SelB aus *E. acidaminophilum* in der Lage, sowohl korrekt mit den *E. coli*-Ribosomen zu interagieren, als auch die Sekundärstruktur der *fdhF*-mRNA zu erkennen. Das lässt vermuten, dass die SECIS-Elemente in diesem Gram-positiven Organismus nach ähnlichen Prinzipien aufgebaut sind wie in *E. coli*. Die Bindung der *fdhF*-Sekundärstruktur durch den heterologen Elongationsfaktor wird wahrscheinlich durch Homologien zwischen den Formiat-Dehydrogenasen beider Organismen begünstigt. Abbildung 34 verdeutlicht den hohen Grad der Übereinstimmung zwischen dem SECIS-Element des *fdhF*-Gens aus *E. coli* und den postulierten mRNA-Sekundärstrukturen der beiden in *E. acidaminophilum* identifizierten Formiat-Dehydrogenase-Gene.



**Abb. 34:** Vergleich der postulierten mRNA-Sekundärstrukturen der Formiat-Dehydrogenase-Gene aus *E. acidaminophilum* mit dem *fdhF*-SECIS-Element aus *E. coli* (HÜTTENHOFER *et al.*, 1996b; HÜTTENHOFER und Böck, 1998a). Nukleotide bzw. Basenpaare, die in der für den Selenocystein-Einbau entscheidenden apikalen Haarnadelstruktur der (putativen) SECIS-Elemente aller drei Gene an vergleichbaren Positionen auftreten, sind grau unterlegt. Das Selenocystein-codierende UGA ist fett hervorgehoben. Gezeigt ist nur der Bereich der mRNA-Sekundärstrukturen stromabwärts vom UGA-Codon, mögliche Strukturen stromaufwärts von diesem sind nicht berücksichtigt (vgl. 3.1., Abb. 2).

Nachdem der überwiegende Teil des *selC*-Gens von dem Plasmid, welches zur Komplementation des *selB*-Defektes der Mutante *E. coli* WL81300 in der Lage war, entfernt wurde (s. 3.4.1.), konnte durch das verbliebene *selB*-Gen aus *E. acidaminophilum* allein die  $FDH_H$ -Aktivität nicht wiederhergestellt werden. Das könnte bedeuten, dass die *E. coli*-eigene  $tRNA^{Sec}$  nur eine geringe Affinität zum heterologen SelB zeigt bzw. nicht korrekt mit diesem interagiert. Eine andere mögliche Erklärung für die nicht beobachtete Komplementation wäre ein ungünstiges stöchiometrisches Verhältnis von  $tRNA$  und Elongationsfaktor, wenn das *selB*-Gen auf einem *high-copy*-Plasmid wie pUC18 vorliegt. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass eine Überproduktion von homologem SelB in einem Wildtyp-Stamm zu einer drastischen Verringerung der Durchleserate einer chromosomal integrierten *fdhF'*-*lacZ*-Fusion führt, wobei dieser Effekt durch die gleichzeitige Überexpression von *selC*, dem  $tRNA^{Sec}$ -codierenden Gen, nahezu vollständig aufgehoben werden konnte (TORMAY *et al.*, 1996). Das gleiche Resultat wurde bei der Überproduktion von SelB aus *D. baculatum* in *E. coli* beobachtet, auch hier konnte die Reduzierung der Durchleserate durch die parallele Überexpression von *E. coli*-*selC* rückgängig gemacht werden (TORMAY und BÖCK, 1997).

Das oben erwähnte Plasmid, welches nach der Deletion von *selC* den Defekt der Mutante WL81300 nicht mehr komplementierte, obwohl es noch immer das intakte *selB*-Gen aus *E. acidaminophilum* enthielt, führte im Wildtyp-Stamm *E. coli* FM433 nur zu einer geringen Reduktion der  $FDH_H$ -Aktivität (auf 86 %). Wurde zusätzlich das Gen der  $tRNA^{Sec}$  aus *E. coli* (LEINFELDER *et al.*, 1988b) in dieses Plasmid gebracht, so war zwar eindeutig eine Komplementation des *selB*-Defektes von *E. coli* WL81300 nachweisbar, allerdings betrug die gemessene Formiat-Dehydrogenase-Aktivität nur ein Achtel des Wertes, der mit dem ursprünglichen Plasmid (mit *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum*) im genannten

Stamm erreicht wurde. Zusammen betrachtet sprechen diese beiden Beobachtungen dagegen, dass die erwähnten stöchiometrischen Effekte (Überschuss an SelB) die Ursache für die nicht beobachtete Komplementation nach der *selC*-Deletion sind. Vielmehr scheint der Elongationsfaktor aus *E. acidaminophilum* zur tRNA<sup>Sec</sup> aus *E. coli* eine deutlich geringere Affinität aufzuweisen, als es gegenüber der homologen tRNA der Fall ist. Möglich wäre auch, dass die Interaktion der heterologen tRNA mit dem Elongationsfaktor aus *E. acidaminophilum* dessen Affinität für das SECIS-Element nicht in der gleichen Weise zu erhöhen vermag, wie es bei der tRNA aus dem gleichen Organismus der Fall wäre (THANBICHLER *et al.*, 2000).

Der *selA*-Defekt der Mutante *E. coli* AH819 wurde ebenfalls durch das entsprechende Gen aus *E. acidaminophilum* komplementiert. Die Funktionalität in *E. coli* konnte bereits für die Selenocystein-Synthasen aus *M. thermoacetica* (KROMAYER *et al.*, 1996) und *H. influenzae* (WILTING *et al.*, 1998) gezeigt werden. Interessanterweise bewirkte das gleiche Plasmid, welches den *selA*-Defekt komplementierte, im Wildtyp-Stamm *E. coli* FM433 eine deutliche Verringerung der Aktivität der Formiat-Dehydrogenase H um fast 40 % im Vergleich zur Kontrolle mit pUC18. Neben dem vollständigen Gen der Selenocystein-Synthase aus *E. acidaminophilum* (und dem C-terminalen Teil von *selDI*) enthielt das getestete Plasmid auch den für die Aminosäuren 1-265 des Elongationsfaktors codierenden Teil von *selB*. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Durchleesrate einer chromosomal integrierten *fdhF*'-*lacZ*-Fusion auch durch die Überproduktion von C-terminal verkürzten SelB-Molekülen bewirkt wird, sofern diese noch in der Lage sind, Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> über die N-terminalen, EF-Tu-homologen Domänen zu binden (TORMAY *et al.*, 1996). Die kürzeste der getesteten SelB-Varianten umfasste die Aminosäuren 1-325, d. h. nur einen Teil von Domäne 3, die sich bis Aminosäure 342 erstreckt (KROMAYER *et al.*, 1996). Die Überproduktion dieses Proteins hatte im Vergleich zu komplettem SelB bzw. zu C-terminal weniger stark verkürzten SelB-Derivaten keine derart drastischen Auswirkungen auf den Selenocystein-Einbau im *E. coli*-Wildtyp, die Durchleesrate der *fdhF*'-*lacZ*-Fusion wurde nur um 26 % reduziert. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass das C-terminal am stärksten verkürzte Protein auch eine deutlich niedrigere Expressionsrate aufwies als alle anderen getesteten Varianten.

An Hand der Kristallstruktur eines ternären Komplexes, bestehend aus Phenylalanyl-tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe, EF-Tu aus *Thermus aquaticus* und einem GTP-Analogon (NISSEN *et al.*, 1995) wurde nachgewiesen, dass alle drei Domänen des Elongationsfaktors an der Wechselwirkung mit der tRNA beteiligt sind, wobei eine zwischen den Domänen 1 und 2 ausgebildete Spalte die Bindungsstelle für das aminoacylierte 3'-Ende darstellt, die Tasche für die Aminosäure wird hauptsächlich durch Seitenketten der Domäne 2 geformt. Die Bindungsstelle für das 5'-Ende der tRNA wird durch alle drei Domänen gebildet, das Zucker-Phosphat-Rückgrat des T-Arms interagiert mit Aminosäuren der Domäne 3. Auf Grund der Sequenzhomologien zwischen EF-Tu aus *Thermus thermophilus* bzw. *E. coli* und dem N-terminalen Teil

der SelB-Sequenzen verschiedener Organismen wurde postuliert, dass der Selenocystein-spezifische Elongationsfaktor die tRNA<sup>Sec</sup> auf ähnliche Weise bindet (HILGENFELD *et al.*, 1996).

Der oben erwähnte N-terminale Bereich von SelB aus *E. acidaminophilum* (AS 1-265) enthielt die kompletten Domänen 1 und 2 des Elongationsfaktors, jedoch nur die ersten drei Aminosäuren von Domäne 3. Falls eine Interaktion zwischen der Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> von *E. coli* und diesem Polypeptid für die Verringerung der FDH<sub>H</sub>-Aktivität im Wildtyp-Stamm verantwortlich war, so bleibt immer noch zu klären, weshalb intaktes SelB nicht diesen deutlichen Effekt zeigte. Eine mögliche Begründung dafür wäre, dass das C-terminal verkürzte Protein vermutlich in wesentlich größerer Menge produziert wurde, da auf dem entsprechenden Plasmid der vor *selA* postulierte Promotor vorhanden war, während er auf dem Plasmid mit dem kompletten *selB*-Gen fehlte, weil hier das Insert mitten in *selA* beginnt. Eine Rolle könnte auch spielen, dass Komplexe aus Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und C-terminal verkürztem SelB im Gegensatz zu denen mit intaktem Protein nicht in der Lage sind, zur Inkorporation von Selenocystein beizutragen.

Ein anderer Aspekt ist, dass *E. coli*-Zellen, die das erwähnte Plasmid mit den Genen '*selD1*, *selA* und *selB*' enthielten, eine deutlich verringerte Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu Zellen mit pUC18 oder anderen Plasmiden mit *sel*-Genen aus *E. acidaminophilum* aufwiesen. Dieser Effekt wurde sowohl in dem für die Klonierung genutzten Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF', als auch in den für die Komplementations-Experimente verwendeten Stämmen AH819 und FM433 beobachtet. Möglicherweise hatte das veränderte Wachstumsverhalten bzw. dessen Ursache einen Einfluss auf die Synthese der Formiat-Dehydrogenase H, ohne dass ein unmittelbarer Zusammenhang zur Inkorporation von Selenocystein in das Protein besteht. Alternativ wäre ein negativer Effekt der Überproduktion von Selenocystein-Synthase auf die Effizienz der Selenocystein-Inkorporation zu diskutieren.

#### 4.4. SECIS-Elemente in Selenoprotein-mRNAs aus *E. acidaminophilum*

Während Daten über mRNA-Sekundärstrukturen, die für die Inkorporation von Selenocystein in Proteine Gram-positiver Organismen verantwortlich sind, bisher kaum vorliegen, waren Struktur und Funktion des *fdhF*-SECIS-Elements aus *E. coli* (s. 3.1., Abb. 2), speziell dessen Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor SelB, Gegenstand einer ganzen Reihe von Untersuchungen.

*In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass der aus den 17 Nukleotiden G<sub>15</sub>-C<sub>31</sub> (UGA = +1) bestehende, obere Bereich der *fdhF*-Sekundärstruktur durch SelB mit vergleichbarer Affinität und Spezifität gebunden wird wie die gesamte Struktur (KROMAYER *et al.*, 1996).

HEIDER *et al.* (1992) zeigten, dass die im Bereich der Schleife der Haarnadelstruktur lokalisierten Nukleotide A<sub>21</sub> bis U<sub>26</sub> essentiell für die *in-vivo*-Funktion des SECIS-Elements sind: der Austausch jeder einzelnen Base führte zu einer drastischen Verringerung des Selenocystein-Einbaus, im Vergleich zur Wildtyp-mRNA war die Durchleserate des UGA-Codons einer '*fdhF*'-*lacZ*-Fusion auf 1-7 % reduziert. Einzig die Mutation von U<sub>24</sub> zu G oder A zeigte einen etwas schwächeren Effekt (Rückgang auf 10 %

bzw. 20 %). Das Basenpaar C<sub>20</sub>-G<sub>27</sub> ist ebenfalls relativ spezifisch, ein G-C-Paar an dieser Position verringerte die Effizienz der Selenocystein-Inkorporation um 70 %. Eine Inversion der weiter basal lokalisierten Basenpaare G<sub>19</sub>-C<sub>28</sub>, A<sub>18</sub>-U<sub>29</sub>, G<sub>16</sub>-C<sub>30</sub> und G<sub>15</sub>-C<sub>31</sub> zeigte hingegen keine oder nur geringe Auswirkungen auf die Durchleaserate des UGA-Codons (HEIDER *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1998). Essentiell für die Funktion ist jedoch ein U an Position 17, dieses muss ungepaart vorliegen (KLUG *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1998). Die Nukleotide G<sub>23</sub>, U<sub>24</sub>, U<sub>17</sub> und U<sub>18</sub> gehen wahrscheinlich eine direkte Interaktion mit SelB ein (HÜTTENHOFER *et al.*, 1996b; LI *et al.*, 2000).

Obwohl die *fdhF*-mRNA sehr spezifisch durch die C-terminale Domäne des Elongationsfaktors SelB erkannt wird, besitzt dieser durchaus das Potential, eine große Anzahl weiterer mRNA-Sequenzen zu binden. Durch *in-vitro*-Selektion von Strukturen mit hoher Affinität zu *E. coli*-SelB wurden aus einem Pool zufälliger Sequenzen verschiedene Motive isoliert, die keine Ähnlichkeit zu den SECIS-Elementen aus *E. coli* aufwiesen. Von 29 selektierten RNA-Fragmenten zeigten nur zwei deutliche Homologien zur Haarnadelstruktur der *fdnG*- bzw. *fdhF*-mRNA. Die übrigen Sequenzen wiesen keinerlei Konsensus-Motiv auf, für einige von ihnen wurde jedoch die Fähigkeit zur Ausbildung einer Sekundärstruktur postuliert. Die Affinität zu SelB war z. T. mehr als 50-fach höher als beim *fdhF*-SECIS-Element, die Mehrzahl der RNA-Fragmente wurde dabei durch die SelB-Domäne 4b gebunden (KLUG *et al.*, 1999).

Bei der *in-vitro*-Selektion SelB-bindender Sequenzen aus einem Pool, der von der mRNA-Sekundärstruktur des *fdhF*-Gens abgeleitet wurde, wiesen die meisten der isolierten Moleküle (19 von 30) die komplette apikale Haarnadelstruktur des SECIS-Elements in unveränderter oder nur leicht abgewandelter Form auf. Die übrigen Motive enthielten entweder nur einige Elemente dieser Struktur bzw. zeigten keine signifikanten Homologien zu Selenoprotein-mRNAs aus *E. coli* (KLUG *et al.*, 1997). Aus dieser zweiten Gruppe wurden drei Sequenzen, die in der Lage waren, eine Haarnadelstruktur auszubilden, im korrekten Abstand zu einem UGA-Codon platziert und auf ihre *in-vivo*-Funktionalität untersucht. Allerdings bewirkte nur eines der Motive eine signifikante UGA-Durchleaserate (17 % im Vergleich zum *fdhF*-Wildtyp), und auch das erst, nachdem der apikale Teil dieser Struktur mit dem unteren Bereich des *fdhF*-SECIS-Elements fusioniert wurde. Eine hohe Affinität zu SelB und die richtige Distanz zum UGA-Codon sind somit nicht die einzigen Voraussetzungen, die eine mRNA-Sekundärstruktur erfüllen muss, um als SECIS-Element zu fungieren. Möglicherweise waren die untersuchten Motive nicht in der Lage, die erforderliche Konformationsänderung in SelB, die in einer Erhöhung der Ribosomen-abhängigen GTPase-Aktivität resultiert, zu induzieren (HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998b).

Die mRNA-Sekundärstrukturen, die unmittelbar stromabwärts vom Selenocystein-codierenden UGA der bisher bekannten Selenoprotein-Gene aus *E. acidaminophilum* formuliert werden können (s. 3.1., Abb. 2), weisen mit einer Ausnahme (*grdA*) eine aus 15-20 Nukleotiden bestehende Haarnadelstruktur auf, die in einem Abstand von elf bis dreizehn Nukleotiden zum UGA-Codon lokalisiert ist. Diese ist bei einigen der

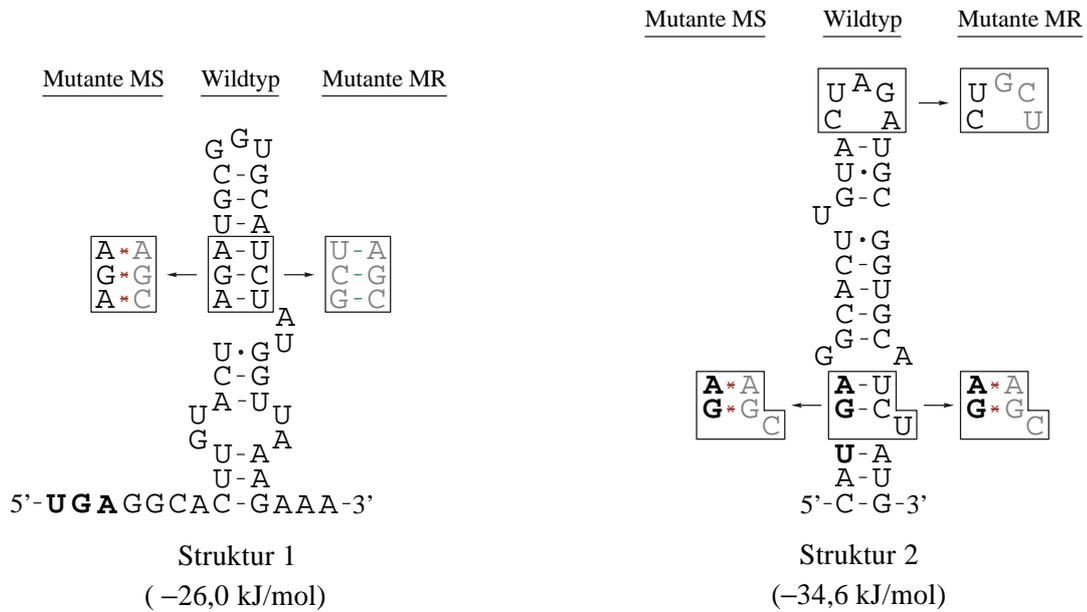
Selenoprotein-mRNAs Bestandteil einer größeren Sekundärstruktur, die sich zum Teil auch auf stromaufwärts des UGA-Codons gelegene Basen erstreckt. Die offensichtlichen Gemeinsamkeiten der postulierten Elemente beschränken sich mehr oder weniger auf die ähnliche zweidimensionale Struktur, ansonsten gibt es kaum konservierte Elemente, die in allen Sequenzen auftreten. Guanin stellt die einzige der vier Basen dar, die ausnahmslos in jeder der postulierten Sekundärstrukturen in der apikalen Schleife zu finden ist, selbst wenn diese mit fünf bzw. sechs Basen statt mit drei bzw. vier (wie in 3.1., Abb. 2) formuliert wird. Ungepaarte Nukleotide im oberen helikalen Bereich weist nur die Struktur von *prpU* auf. Wie bereits erwähnt, sind *grdA1* und *grdA2* die einzigen Gene, bei welchen die stromabwärts des Selenocystein-Codons formulierte mRNA-Struktur keinerlei Ähnlichkeit zum *fdhF*-SECIS-Element aufwies (s. 3.1., Abb. 2). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass ein Großteil des in *E. acidaminophilum* vorliegenden Selenoprotein A auf das unmittelbar stromaufwärts von *grdB1* lokalisierte Gen *grdA3* zurückgeht (SONNTAG, 1998). Von diesem wurde bisher nur der C-terminale Bereich kloniert, so dass keine Aussagen über Sekundärstrukturen 3' vom Selenocystein-Codon möglich sind.

Durch die Einführung von Mutationen in die postulierten SECIS-Elemente der Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* konnte gezeigt werden, dass diese mRNA-Sekundärstrukturen tatsächlich für den SelB<sub>Ec</sub>-abhängigen Einbau von Selenocystein in die entsprechenden Genprodukte essentiell sind (s. 3.8.2.). Im Vergleich zu den erwähnten Daten von HEIDER *et al.* (1992) für Mutanten des *fdhF*-SECIS-Elements hatten die hier vorgenommenen Veränderungen in der apikalen Schleife der mRNA-Sekundärstrukturen der drei untersuchten Gene einen weniger drastischen Effekt auf die Inkorporation von Selenocystein. Selbst die Mutation von drei aufeinander folgenden Nukleotiden im Stamm der oberen Haarnadelstruktur und die daraus resultierende Auflösung der entsprechenden Basenpaare führte nicht zum völligen Funktionsverlust. Anders als *E. coli*-SelB weist der Selenocystein-spezifische Elongationsfaktor aus *E. acidaminophilum* offensichtlich eine relativ geringe Sequenz-Spezifität bzw. eine größere Toleranz gegenüber strukturellen Veränderungen in den SECIS-Elementen auf. Mögliche molekulare Ursachen dafür wurden bereits in Abschnitt 4.2.2. diskutiert.

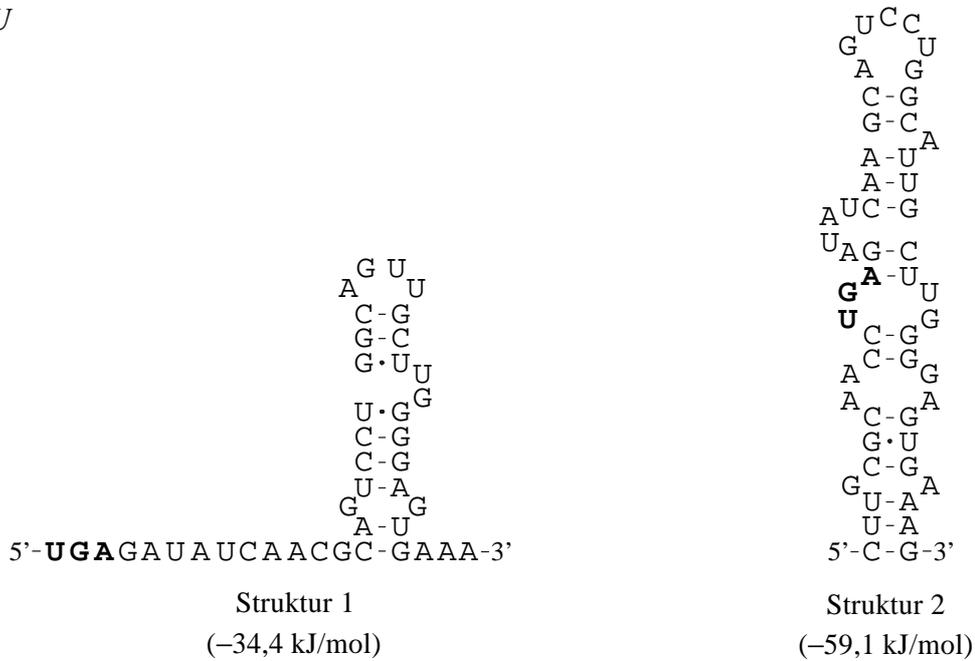
Die Tatsache, dass der negative Effekt der letztgenannten Mutationen durch zusätzliche Veränderungen auf der anderen 'Seite' der apikalen Haarnadelstruktur (Einführung komplementärer Basen, s. 3.8.1., Abb. 23) kompensiert werden konnte (s. 3.8.2.), spricht dafür, dass die postulierten Strukturen zumindest im apikalen Bereich tatsächlich die *in-vivo*-Situation widerspiegeln. Von besonderer Bedeutung ist dies im Falle von *grdB1*, da hier für den gleichen Bereich des Gens, also unmittelbar 3' vom UGA-Codon, eine alternative Sekundärstruktur mit einem höheren kalkulierten Betrag der Freien Energie formuliert werden kann (Abb. 35). Auf der Grundlage dieser Struktur wäre allerdings der positive Effekt der zusätzlichen Mutation (Variante MR) nicht zu erklären, da diese hier im Gegensatz zur ersten Struktur die Basenpaarungen, die in der Mutante MS aufgelöst sind, nicht wiederherstellen würde.

Ähnlich stellt sich die Situation bei *prpU* dar, auch hier wurde eine zweite, scheinbar stabilere Sekundärstruktur berechnet. Auf Grund der fehlenden Homologie zu den postulierten SECIS-Elementen der übrigen Selenprotein-mRNAs aus *E. acidaminophilum* ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Struktur für den Selenocystein-Einbau relevant ist bzw. *in vivo* überhaupt existiert.

*grdB1*



*prpU*



**Abb. 35: Alternative mRNA-Sekundärstrukturen der Gene *grdB1* und *prpU* aus *E. acidaminophilum*.** Die in den Mutanten MS und MR von *grdB1* vorliegenden Veränderungen sind grau markiert. Das Selenocystein-codierende UGA ist fett hervorgehoben. Die Änderung der Freien Energie wurde mit dem Programm MFOLD kalkuliert.

Der erwähnte experimentelle Befund zeigt außerdem, dass analog zum *fdhF*-SECIS-Element nur die apikalen Nukleotide der Sekundärstruktur (Haarnadelschleife plus angrenzende Basenpaare) spezifisch für die Funktion sind, für die basalen Bereiche ist nur von Bedeutung, dass sie doppelsträngig vorliegen.

Obwohl die hier postulierten Sekundärstrukturen der Selenoprotein-mRNAs von *grdB1*, *prxU* und *seld1* offensichtlich SECIS-Elemente darstellen, konnte in Gelretardations-Experimenten keine spezifische Bindung des Elongationsfaktors aus *E. acidaminophilum* an entsprechende *in-vitro*-Transkripte nachgewiesen werden. Nur bei sehr hohem Überschuss an Protein wurde eine Komplexbildung beobachtet, diese trat allerdings auch mit Transkripten auf, in denen zwei Basen in der postulierten apikalen Haarnadelschleife ausgetauscht waren (s. 3.6.). Die gleichen Mutationen führten *in vivo* zu einer deutlichen Verringerung der SelB<sub>Et</sub>-abhängigen Selen-Inkorporation in die entsprechenden Genprodukte (s. 3.8.2.). Dass *in vitro* dennoch kein Unterschied zur Bindung des Wildtyp-Transkripts beobachtet wurde, könnte in der geringen Stringenz der verwendeten Puffer-Bedingungen (s. 2.17.) begründet sein. Auch für *E. coli*-SelB wurde in Gelretardations-Experimenten eine Diskriminierung zwischen Wildtyp-Transkript und einer Mutante, welche *in vivo* eine deutlich verringerte Selenocystein-Inkorporation bewirkte, nur in einem Puffer mit hoher Ionenstärke beobachtet (BARON, 1993; BARON *et al.*, 1993b).

Da SelB nicht bis zur Homogenität gereinigt wurde (s. 3.5.2.2, Abb. 14), muss jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die beobachteten Komplexe durch eine unspezifische Bindung der mRNA-Fragmente an kontaminierende Proteine zu Stande kamen. Bei letzteren handelte es sich möglicherweise um ribosomale Proteine, da für *E. coli*-SelB eine enge Assoziation mit Ribosomen beschrieben wurde (FORCHHAMMER *et al.*, 1990).

Denkbar wäre aber auch, dass sich die in *grdB*, *prxU* und *seld1* eingeführten Mutationen weniger auf die Bindung von SelB an die mRNA, sondern vielmehr auf die durch diese Wechselwirkung induzierte Konformationsänderung des Elongationsfaktors auswirkten (HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998b; s. 4.2.2.). Das würde die Diskrepanz zwischen den *in-vitro*-Daten und dem Verhalten der Mutanten *in vivo* (deutlicher Rückgang der Selen-Inkorporation) erklären.

Für *E. coli*-SelB konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> die Affinität des Elongationsfaktors zum *fdhF*-SECIS-Element deutlich erhöht (THANBICHLER *et al.*, 2000). Möglicherweise ist dieser Effekt in *E. acidaminophilum* wesentlich stärker ausgeprägt als in *E. coli*, was erklären würde, warum in den Gelretardations-Experimenten erst bei sehr sehr hohem Überschuss an SelB eine Wechselwirkung mit den untersuchten Transkripten nachweisbar war und keine Diskriminierung zwischen Wildtyp-Transkript und Mutante erfolgte. Für weitere *in-vitro*-Bindungsstudien mit dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor aus *E. acidaminophilum* empfiehlt sich deshalb die Zugabe der beladenen tRNA<sup>Sec</sup>.

Die gereinigten SelB-Domänen 4 und 4b zeigten *in vitro* keine Wechselwirkung mit den getesteten mRNA-Fragmenten, allerdings wurde nicht untersucht, ob die Proteine korrekt gefaltet waren.

Durch eine Translationsfusion der Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* mit *gst* und *lacZ* (s. 3.9.1.) konnte gezeigt werden, dass ein Bereich, der zehn Nukleotide stromaufwärts und 50 Nukleotide stromabwärts des UGA-Triplets umfasste und somit die postulierten mRNA-Sekundärstrukturen enthielt, für eine effiziente, SelB<sub>Ea</sub>-abhängige Decodierung des Selenocystein-Codons ausreichend war (s. 3.9.2.). Die als Maß für ein Durchlesen des UGA-Codons ermittelten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten entsprachen jeweils 35,5 % (*selD1*); 60,4 % (*grdB1*) bzw. 63,9 % (*prxU*) des Wertes, der mit der entsprechenden Cystein-Mutante (Austausch von TGA gegen TGC) gemessen wurde, wobei im Falle von *grdB* ein geringer Teil der Enzymaktivität auf eine interne Initiation der Translation stromabwärts vom Selenocystein-Codon zurückzuführen sein könnte (s. 3.9.3.).

Für die Translationsfusion eines größeren *prxU*-Fragmentes (28 Nukleotide stromaufwärts und 59 Nukleotide stromabwärts des UGA-Codons) mit *gst* und *lacZ* konnte von GRÖBE (2001) ebenfalls eine deutliche Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in *E. coli* festgestellt werden, wenn eine Coexpression von *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* erfolgte. Für dieses Konstrukt wurde zudem durch *in-vivo*-Markierung mit [<sup>75</sup>Se]-Selenit nachgewiesen, dass die Präsenz der beiden genannten Gene sowohl in *E. coli* XL1-Blue MRF', als auch in der *selB*-Mutante *E. coli* WL81300 zu einer Inkorporation von Selen in das Fusionsprotein führte.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass analog zur Situation in *E. coli* die mRNA-Sekundärstruktur 3' vom UGA das einzige Merkmal darstellt, welches in *E. acidaminophilum* für die Differenzierung zwischen einem Stopp- und einem Selenocystein-Codon verantwortlich ist. Der von WAGNER (1997) vermutete zusätzliche Zusammenhang zwischen einer Inkorporation von Selenocystein an UGA-Triplets in Selenoproteinen aus *E. acidaminophilum* (sowie anderen anaeroben, Gram-positiven Aminosäure-Verwertern) und dem gehäuften Auftreten der basischen Reste Arginin und Lysin im N-terminalen Bereich dieser Polypeptide scheint nicht zu bestehen.

SUPPMANN *et al.* (1999) beschrieben die SelB-abhängige UGA-Codierung in *E. coli* als ineffizienten Prozess, bedingt durch einen Abbruch der Translation am UGA-Codon. Indem sowohl Fusionsprotein als auch Abbruch-Produkt durch Western-Blot-Analyse mit Anti-GST-Antikörpern quantifiziert wurden, konnte für eine Plasmid-codierte *gst'*-*'fdhF'*-*'lacZ*-Fusion die Effizienz der Selenocystein-Inkorporation gegenüber der Termination mit ca. 4-5 % ermittelt werden. Eine Überproduktion von Selenocystein-Synthase, SelB und tRNA<sup>Sec</sup> von einem zweiten Plasmid erhöhte den Wert auf etwa 11 %.

Im Gegensatz dazu bestimmten MANSELL *et al.* (2001) in *E. coli* für eine Plasmid-codierte *lacZ'*-*'fdhF'*-*'luc*-Fusion deutlich höhere UGA-Durchleseraten von etwa 30-60 %, indem sie das Verhältnis von Luziferase-Aktivität zu  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mit dem entsprechenden Wert für eine Cystein (UGC)- bzw. Tryptophan (UGG)-Mutante verglichen. Dabei wurde eine starke Abhängigkeit der Effizienz der Selenocystein-Inkorporation von der Wachstumsgeschwindigkeit der *E. coli*-Zellen beobachtet, eine Verringerung der Wachstumsrate erhöhte die Effizienz der UGA-Decodierung signifikant. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung der SelB<sub>Ea</sub>-abhängigen Durchleserate der *gst'*-*'lacZ*-Fusionen von *grdB1*, *prxU* oder *selD1* verwendeten Zellen (*E. coli* XL1-Blue MRF') zeigten unter

den gegebenen Bedingungen (s. 2.16.1.) eine Verdopplungszeit von ca. 90 min. Diese relativ geringe Wachstumsrate könnte sich durchaus positiv auf den Einbau von Selenocystein ausgewirkt haben.

In *E. coli* haben Sequenz und Struktur des Bereiches zwischen dem Selenocystein-Codon und der apikalen, 17 Basen umfassenden Haarnadelstruktur keinen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität des *fdhF*-SECIS-Elements. Selbst wenn die Ausbildung sämtlicher Basenpaarungen in dieser Region (Nukleotide C<sub>4</sub> bis C<sub>14</sub> und A<sub>32</sub> bis G<sub>41</sub>) durch Mutationen verhindert wurde, hatte das keine gravierende Verringerung der Selenocystein-Inkorporation zur Folge, dabei spielte es keine Rolle, welche 'Seite' des Stammes verändert wurde. Mutationen im helikalen Bereich stromaufwärts des UGA-Codons, die zur Auflösung von Basenpaarungen führten, hatten ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Funktion des SECIS-Elements (LIU *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1999). Während frühere *in-vitro*-Untersuchungen nahelegten, dass die *fdhF*-Sekundärstruktur während der Interaktion mit dem Ribosom intakt bleibt (RINGQUIST *et al.*, 1994), sprechen neuere Daten für eine partielle Entfaltung der Struktur (HÜTTENHOFER *et al.*, 1996a; MANSELL *et al.*, 2001), was ebenfalls darauf hindeutet, dass nur die obere helikale Region strukturiert sein muss.

Entsprechend vielfältig fallen auch bei den bisher bekannten Selenoprotein-Genen aus *E. acidaminophilum* Größe und Stabilität der postulierten mRNA-Sekundärstrukturen aus: diese erstrecken sich bei *fdhA1*, *fdhA2*, *selD1*, *selD2* und *prxU* auch auf Nukleotide 5' vom UGA, während sie sich im Falle von *grdH* und *prpU* im Wesentlichen auf das Pendant zur apikalen Haarnadelstruktur des *fdhF*-SECIS-Elements beschränken.

Eine wichtige Rolle spielt hingegen die Distanz zwischen dieser oberen helikalen Struktur und dem UGA-Codon, in der *fdhF*-mRNA sind es elf Nukleotide. Ein Mindestabstand zwischen dem Selenocystein-Codon und der SelB-bindenden mRNA-Region ist wahrscheinlich notwendig, damit letztere während der UGA-Decodierung außerhalb der ribosomalen mRNA-Bindungstasche lokalisiert bleibt (HÜTTENHOFER *et al.*, 1996a). Die Deletion von drei Basenpaaren (G<sub>7</sub>-C<sub>39</sub>, G<sub>8</sub>-U<sub>38</sub> und C<sub>9</sub>-G<sub>37</sub>) in diesem Bereich bewirkte den vollständigen Verlust der *in-vivo*-Funktion, die Insertion von drei zusätzlichen Basenpaaren zwischen G<sub>7</sub>-C<sub>39</sub> und G<sub>8</sub>-U<sub>38</sub> führte zur Verringerung der Durchleeserate um 50 % im Vergleich zum Wildtyp (HEIDER *et al.*, 1992). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen LIU *et al.* (1998), wobei hier der Einfluss des Abstandes zwischen apikaler Haarnadelstruktur und Selenocystein-Codon an einer Mutante des *fdhF*-SECIS-Elements, in der alle Basenpaarungen in diesem Bereich eliminiert waren (s. o.), untersucht wurde. Die Deletion von drei Nukleotiden unmittelbar stromabwärts vom UGA reduzierte hier die Durchleeserate ebenfalls um ca. 50 %, den gleichen Effekt hatte die Insertion von drei Nukleotiden an dieser Position. Wurden hingegen sechs Nukleotide entfernt oder eingefügt, führte das zum kompletten Funktionsverlust. In einem anderen Versuchsansatz (CHEN *et al.*, 1993) wurde das UGA-Codon schrittweise um ein Basentriplett stromaufwärts versetzt und an der ursprünglichen Position ein Cystein-Codon (UCA) eingesetzt, der Bereich der mRNA-Sekundärstruktur 3' vom UGA

blieb somit unbeeinflusst. Eine Verschiebung um ein Triplet reduzierte die Durchleserate auf 76 %, wurde das UGA um sechs Nukleotide versetzt, betrug diese nur noch 20 % im Vergleich zum Wildtyp-Element. An Position -3 war wieder eine leichte Erhöhung der Durchleserate (gegenüber Position -2) zu beobachten, dieser Effekt war jedoch auf eine unspezifische, Selen-unabhängige Suppression zurückzuführen.

In den Selenoprotein-Genen aus *E. acidaminophilum* beträgt die Distanz zwischen UGA-Codon und der oberen helikalen Region der postulierten mRNA-Sekundärstrukturen elf bis dreizehn Nukleotide, dieser Wert liegt somit in einem Bereich, der im Falle des *fdhF*-Gens eine effiziente Inkorporation von Selenocystein ermöglichte. Dass für eine *gst'*-*'selDI'*-*'lacZ*-Fusion eine deutlich geringere  $\text{SelB}_{\text{Ea}}$ -abhängige UGA-Durchleserate bestimmt wurde als für die entsprechenden *grdB1*- und *prxU*-Konstrukte (s. 3.9.2.), könnte in diesem Merkmal begründet sein, da der erwähnte Abstand hier dreizehn Basen beträgt, was wahrscheinlich weniger optimal ist als die elf bzw. zwölf Nukleotide bei *prxU* und *grdB1*.

Eine nicht unbedeutende Rolle für die *in-vivo*-Funktion der SECIS-Elemente aus *E. coli* wurde ursprünglich auch dem unmittelbar stromabwärts des Selenocystein-Codons lokalisierten Nukleotid zugeschrieben. Durch *cross-linking*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die drei Basen, die einem UGA-Codon folgen, ebenfalls mit RF 2 interagieren und dessen Funktion beeinflussen (POOLE *et al.*, 1998). Den deutlichsten Effekt übt das Nukleotid unmittelbar 3' des Stopp-Codons aus, die Effizienz der Termination steigt in der Reihenfolge C < A < G < U (POOLE *et al.*, 1995; TATE und MANNERING, 1996). In allen drei Formiat-Dehydrogenase-Genen von *E. coli* befindet sich an der entsprechenden Position ein Cytosin, die Sequenz UGAC besitzt in diesem Organismus bei Betrachtung aller drei Stopp-Codons (UAA, UAG und UGA) und Berücksichtigung der jeweils folgenden Base die geringste Terminations-Aktivität aller zwölf möglichen Varianten, das effektivste Signal ist UAAU. Allerdings konnten HEIDER *et al.* (1992) zeigen, dass die Effizienz der Selenocystein-Inkorporation nicht gravierend herabgesetzt ist, wenn das UGA einer *fdhF'*-*'lacZ*-Fusion durch ein anderes Stopp-Codon (UAA oder UAG) ausgetauscht wird, vorausgesetzt natürlich, es erfolgt eine entsprechende Anpassung des Anticodons der tRNA<sup>Sec</sup> (Mutation zu UUA bzw. CUA). Die Durchleserate verringerte sich in diesen Fällen auf ca. 82 % (UAA) bzw. 68 % (UAG) im Vergleich zur Wildtyp-Situation. Auch ein Austausch des Cytosins unmittelbar 3' vom UGA gegen ein Guanin (LIU *et al.*, 1998) oder ein Uracil (MANSELL *et al.*, 2001) hatte relativ geringe Auswirkungen auf die Effizienz der UGA-Decodierung.

Andererseits scheint die Position stromabwärts vom UGA jedoch eine Rolle unter Bedingungen des Selen-Mangels zu spielen. Abgesehen von der SECIS-abhängigen Erkennung durch die tRNA<sup>Sec</sup> können UGA-Codons in *E. coli* auch durch RNA<sup>Tip</sup> mit dem Anticodon CCA gelesen werden (HIRSCH und GOLD, 1971), in geringem Maße scheint auch eine Erkennung durch eine Cystein-spezifische tRNA möglich (GARCIA und STADTMAN, 1992; DÖRING *et al.*, 2001). Eine sehr hohe UGA-Durchleserate konnte auch für tRNA<sup>Tip</sup> aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden (MATSUGI *et al.*, 1998). In *E. coli* ist die

Effizienz der UGA-Decodierung durch Tryptophan-Einbau stark vom unmittelbar stromabwärts lokalisierten Nukleotid abhängig. Die Durchleserate steigt in der Reihenfolge  $U < C < G < A$  deutlich an, das gilt sowohl für die Decodierung durch eine Suppressor-tRNA, als auch für das durch native tRNA<sup>Trp</sup> vermittelte Durchlesen (KOPELOWITZ *et al.*, 1992). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen LIU *et al.* (1999) sowie SANDMAN und NOREN (2000) bei der Untersuchung, welchen Einfluss speziell der UGA-Kontext des *fdhF*-SECIS-Elements auf den Selenocystein-Einbau bzw. auf die Selen-unabhängige Durchleserate hat. Ein Purin unmittelbar stromabwärts des UGA-Codons führte dazu, dass die Decodierung durch die Tryptophan-spezifische tRNA mit dem Einbau von Selenocystein konkurriert, letzterer überwiegt bei ausreichendem Selen-Angebot. Befindet sich dagegen ein Pyrimidin an der entsprechenden Position, so erfolgt auch bei Selen-Mangel keine bzw. nur eine geringfügige Suppression.

In den bisher identifizierten Selenoprotein-Genen aus *E. acidaminophilum* findet sich nur bei den beiden Formiat-Dehydrogenasen ein Pyrimidin (C) unmittelbar 3' vom UGA, ansonsten dagegen ein Purin: Adenin bei *grdA*, in allen anderen Fällen Guanin (Tab. 16).

**Tab. 16: Merkmale der postulierten SECIS-Elemente in Selenoprotein-mRNAs von *E. acidaminophilum***

Gen	Base 3' vom UGA	Aminosäure an Position -2	Aminosäure an Position -1
<i>fdhA1</i>	C	Arg	Leu
<i>fdhA2</i>	C	Arg	Leu
<i>grdA1</i>	A	Phe	Val
<i>grdB1</i>	G	Ser	Thr
<i>grdF</i>	G	Ser	Thr
<i>grdH</i>	G	Ser	Thr
<i>prxU</i>	G	Phe	Val
<i>selD1</i>	G	Ser	Gly
<i>selD2</i>	G	Ala	Gly
<i>prpU</i>	G	Ala	Thr

Für das Verhältnis von Durchlesen und Termination am Stopp-Codon UGA spielen in *E. coli* neben dem stromabwärts lokalisierten Nukleotid auch die beiden stromaufwärts gelegenen Triplets eine Rolle, wobei hier die Wirkung jedoch nicht auf der Ausbildung bestimmter Strukturen sondern auf den codierten Aminosäuren beruht. Basische und hydrophile Seitenketten an der Position -2 (Selenocystein = Position +1) begünstigen im Allgemeinen die Termination, saure und vor allem hydrophobe Reste dagegen das Durchlesen. Im Gegensatz dazu korreliert der Einfluss der Aminosäure an der Position -1 auf die UGA-Decodierung nicht mit deren Ladung oder Hydrophobizität, entscheidend ist hier vielmehr die Tendenz zu bestimmten Sekundärstrukturen im Protein. Aminosäuren, welche die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix oder eines  $\beta$ -Faltblattes fördern, begünstigen in der Regel die Termination, während die Tendenz zur Bildung von  $\beta$ -Schleifen mit einer Erhöhung der Durchleserate einhergeht (MOTTAGUI-TABAR *et al.*, 1994; BJÖRNSSON *et al.*, 1996). Die Wirkung der beiden Aminosäuren ist kooperativ, wobei der Effekt einer

Position dominant sein kann. Die oben genannten Regeln konnten auch für das Selenocystein-Codon des *fdhF*-Gens aus *E. coli* bestätigt werden, hier bewirkt Arginin an Position -2 in Verbindung mit Valin an Position -1 eine Unterdrückung des Durchlesens bei Selen-Mangel (LIU *et al.*, 1999).

Falls diese Abhängigkeiten auch auf Gram-positive Organismen wie *E. acidaminophilum* übertragbar sind, weisen von den in diesem Organismus bisher identifizierten Selenoproteinen nur die Genprodukte von *fdhA1* und *fdhA2* eine Sequenz auf, die ein Selen-unabhängiges Durchlesen eindeutig einschränkt (s. Tab. 16): an Position -2 befindet sich wie in der *fdhF*-mRNA ein Arginin-Codon, danach folgt Leucin, dieses hat annähernd den gleichen Effekt wie das Valin-Codon in der *fdhF*-Struktur. Im *prpU*-Genprodukt hingegen tendiert die Kombination der Aminosäuren Alanin (-2) und Threonin (-1) eher zur Erhöhung der Durchleserate, ähnliches gilt auch für die Genprodukte von *grdB1*, *grdF* und *grdH* mit Serin an Position -2 und Threonin an Position -1, wobei hier der positive Effekt der vorletzten Aminosäure (Serin) deutlich geringer ist als bei *prpU* (Alanin). Einen stark gegenläufigen Einfluss weisen Phenylalanin an Position -2 und Valin an Position -1 wie im Selenprotein A (*grdA1*) und im Peroxiredoxin (*prxU*) auf. Bei dieser Kombination ist unklar, ob einer der beiden Effekte dominiert. Schwierig ist auch eine Aussage für die beiden *selD*-Gene, in deren Produkten N-terminal vom Selenocystein die Aminosäuren Serin (-2) und Glycin (-1) lokalisiert sind. Einerseits variierte der Einfluss von Glycin an dieser Position stark in Abhängigkeit von dem davor liegenden Rest, außerdem spielt in diesem Fall vermutlich nicht nur die Aminosäure selbst eine Rolle, sondern auch das entsprechende Codon bzw. durch welche Glycin-spezifische tRNA dieses erkannt wird.

Insgesamt zeigen die postulierten SECIS-Elemente der bekannten Selenoprotein-Gene aus *E. acidaminophilum* keine eindeutige Tendenz, das unspezifische, Selen-unabhängige Durchlesen des UGA-Codons zu minimieren, vorausgesetzt natürlich, dass die für *E. coli* beschriebenen Effekte der umgebenden Sequenzen auf den Gram-positiven Organismus übertragbar sind. In diesem Zusammenhang sollte nochmals erwähnt werden, dass Selenocystein in der Regel im aktiven Zentrum von Selenoproteinen lokalisiert ist, wodurch die biophysikalischen Eigenschaften der umgebenden Aminosäuren relativ starken Zwängen unterliegen können. Außerdem könnte eine Rolle spielen, dass eine adäquate Selenversorgung offensichtlich essentiell für das Wachstum von *E. acidaminophilum* ist, unabhängig von den angebotenen Substraten (WAGNER, 1997). Eine Unterdrückung des unspezifischen, Selen-unabhängigen Durchlesens von Selenocystein-Codons wäre dadurch möglicherweise von geringerer Bedeutung als für einen Organismus wie *E. coli*, der nur unter bestimmten Bedingungen die Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen exprimiert.

Auch wenn unklar ist, ob der UGA-Kontext in *E. acidaminophilum* ebenfalls die angesprochenen Effekte zeigt, so spielt er doch auf jeden Fall eine Rolle bei der heterologen Expression von Selenoprotein-Genen aus diesem Organismus in *E. coli*. Für die Translationsfusionen des SECIS-Elemente-umfassenden Bereichs der Gene *prxU* und *selD1* mit *gst* (stromaufwärts) und *lacZ* (stromabwärts) konnte in *E. coli* in Abwesenheit der Gene *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* keine auffallend hohe UGA-Durchleserate

festgestellt werden (1,6 % bzw. 3,6 %  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zur Cystein-Mutante, s. 3.10.2). Unter der Annahme, dass die beobachteten hohen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten im Falle der *gst'*-*grdB1'*-*lacZ*-Fusion hauptsächlich durch einen internen Translationsstart stromabwärts des UGA-Codons zustande kamen, lag auch hier die Durchleaserate dieses Codons (laut Western-Blot mit Anti-GST-Antikörpern, s. 3.9.3.) ungefähr in dem gleichen Bereich wie bei *selD1*.

Im Gegensatz dazu wurden bei der Expression der Gene *grdB1* und *prxU* als *Strep-tag* II-Fusionen in *E. coli* XL1-Blue MRF' Proteine der entsprechenden Größe im Western-Blot nachgewiesen (REUTER, 2000; SÖHLING *et al.*, 2001; s. 3.7.1.), obwohl keine nennenswerte Inkorporation von Selenocystein erfolgte (s. 3.7.4.). Offensichtlich wurde das UGA-Codon unter diesen Bedingungen in erheblichem Maße supprimiert. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei *prxU*, wo auch in *E. coli* WL81300 große Mengen des Genproduktes nachweisbar waren. Anders als bei den entsprechenden Fusionen mit *gst* und *lacZ* erscheint hier jedoch ein Vergleich der UGA-Durchleaserate der drei Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* wegen der nicht einheitlichen Bedingungen bei der Expression als *Strep-tag* II-Fusionsproteine wenig sinnvoll. So wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet, was wiederum eine mögliche Ursache dafür darstellte, dass selbst für die Cystein-Mutanten unterschiedliche Expressionsraten beobachtet wurden. Auch das stark abweichende Wachstumsverhalten der Kulturen nach Induktion der heterologen Genexpression steht vermutlich damit im Zusammenhang. Wie bereits erwähnt, hat die Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* einen signifikanten Einfluss auf die Inkorporation von Selenocystein, eine geringe Wachstumsrate erhöht die Effizienz dieses Prozesses im Vergleich zur Termination (MANSELL *et al.*, 2001). Da für diesen Effekt offenbar eine Verringerung des Ribosomen-assoziierten Anteils an RF 2 eine wichtige Rolle spielt (ADAMSKI *et al.*, 1994), sollte sich eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit auch auf das Selen-unabhängige Durchlesen des UGA-Codons positiv auswirken. Das könnte eine Ursache für die in dieser Hinsicht beobachteten Unterschiede zwischen den drei Genen, aber auch zwischen der Expression als *Strep-tag* II-Fusionsproteine und als *gst'*-*lacZ*-Fusionen darstellen.

## 4.5. Heterologe Expression von Selenoproteinen in *E. coli*

In den *E. coli*-Stämmen XL1-Blue MRF' und WL81300 ( $\Delta$ *selB*) konnte bei der Expression der Gene *grdB1* (Selenoprotein B der Glycin-Reduktase), *prxU* (Seleno-Peroxiredoxin) und *selD1* (Selenophosphat-Synthetase) als *Strep-tag* II-Fusion ein signifikanter Einbau von <sup>75</sup>Selen in die Genprodukte nachgewiesen werden, wenn *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* coexprimiert wurden (s. 3.7.4., Abb. 22). Das bestätigte die in den Komplementationsversuchen nachgewiesene Funktionalität des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors aus diesem Gram-positiven Organismus in *E. coli*. Ohne *E. acidaminophilum*-SelB und die entsprechende tRNA<sup>Sec</sup> konnte in *E. coli* XL1-Blue MRF' nur eine geringfügige radioaktive Markierung der oben genannten Proteine beobachtet werden. Begünstigt durch die im Western-Blot vor allem für *prxU* beobachtete, hohe SelB-unabhängige Expressionsrate

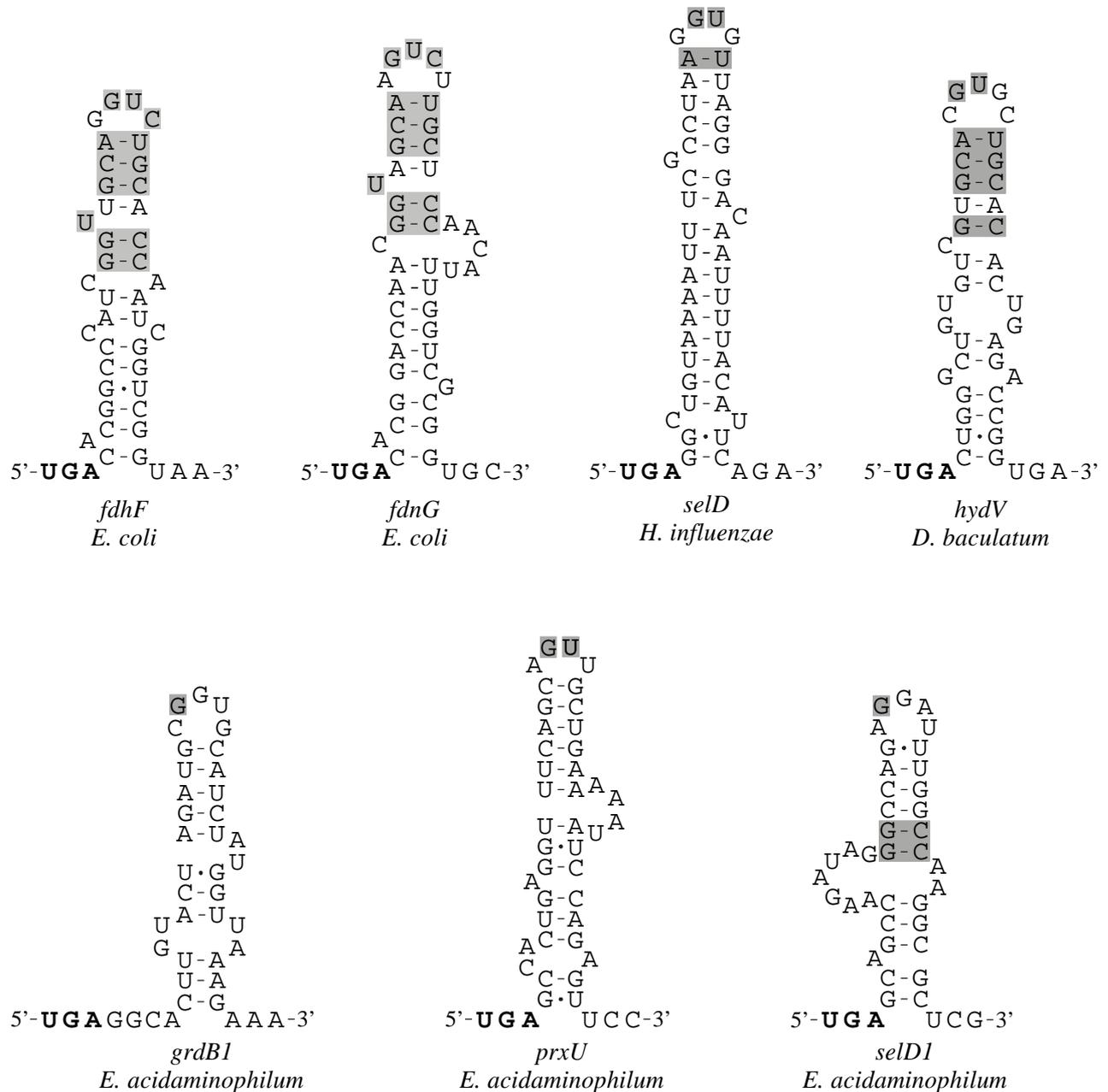
(s. 3.7.1., Abb. 17) könnte dabei trotz Zugabe von Cystein ein Teil dieser Markierung auf einen unspezifischen Einbau über den Weg der Cystein-Biosynthese (MÜLLER *et al.*, 1997) zurückzuführen sein. In Folge der geringen Sequenzhomologie zu den SECIS-Elementen der Gene *fdhF* und *fdnG* aus *E. coli* (Abb. 36) findet offensichtlich keine effektive Interaktion zwischen den mRNA-Sekundärstrukturen von *grdB1*, *prxU* sowie *selD1* und dem Elongationsfaktor SelB aus *E. coli* statt.

Analoge Versuche zur Expression der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* (*fdhA1*-Genprodukt) in *E. coli* blieben ebenfalls erfolglos (GRÄNTZDÖRFFER, 2000), obwohl hier eine Erkennung der entsprechenden mRNA-Struktur durch den Elongationsfaktor aus *E. coli* eher zu erwarten war (s. 4.3., Abb. 34). Die im Western-Blot detektierten Fragmente ließen jedoch auf eine Termination der Translation am UGA-Codon schließen (eine *in-vivo*-Markierung mit <sup>75</sup>Selen erfolgte in diesem Falle nicht).

Zu beachten ist dabei allerdings, dass in den beschriebenen Experimenten vermutlich ein ungünstiges stöchiometrisches Verhältnis zwischen der Selenoprotein-mRNA und den anderen Komponenten des quaternären Komplexes gegeben war (TORMAY *et al.*, 1996; s. 4.3.), bedingt durch die starke Transkription der Gene von einem in hoher Kopienzahl vorliegenden Expressionsvektor (pASK-IBA3- bzw. pASK-IBA5-Derivat). Eine gleichzeitige Überexpression der *E. coli*-eigenen Gene *sela*, *selB* und *selC* könnte den Anteil an Selenocystein, der eventuell durch den Elongationsfaktor aus *E. coli* spezifisch in die Genprodukte von *grdB1*, *prxU* und *selD1* inkorporiert wurde, signifikant erhöhen (ARNÉR *et al.*, 1999; s. u.).

In früheren Studien zur heterologen Expression von Selenoprotein A der Glycin-Reduktase aus dem mit *E. acidaminophilum* sehr eng verwandten Organismus *Clostridium sticklandii* konnte zwar gezeigt werden, dass ca. 10 % des in *E. coli* synthetisierten Proteins in enzymatisch aktiver Form vorlagen, allerdings wurde dieser Anteil einer tRNA<sup>Cys</sup>-vermittelten, unspezifischen Inkorporation von Selenocystein zugeschrieben (GARCIA und STADTMAN, 1992). Aus der Sequenz des entsprechenden Gens (*grdA*) konnte zudem 3' vom Selenocystein-codierenden UGA keine stabile mRNA-Sekundärstruktur mit Homologien zum SECIS-Element der *fdhF*-mRNA aus *E. coli* abgeleitet werden.

Die erfolgreiche heterologe Expression eines Selenoproteins in *E. coli* wurde dagegen für die Selenophosphat-Synthetase aus *H. influenzae* beschrieben (WILTING *et al.*, 1998). Die stromabwärts vom UGA-Codon der *selD*-mRNA postulierte Sekundärstruktur zeigt zwar einen ähnlichen Aufbau wie das SECIS-Element des *fdhF*-Gens, weicht von diesem aber in der Sequenz in vielen Positionen ab (Abb. 36), wobei die meisten dieser Unterschiede, isoliert betrachtet, eine korrekte Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor SelB aus *E. coli* verhindern würden (HEIDER *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1998; s. 4.4.)



**Abb. 36:** Vergleich der *fdhF*- und *fdnG*-SECIS-Elemente aus *E. coli* (HÜTTENHOFER *et al.*, 1996b; HÜTTENHOFER und Böck, 1998a) mit den postulierten mRNA-Sekundärstrukturen der Gene *selD* aus *H. influenzae* (WILTING *et al.*, 1998) und *hydV* aus *D. baculatum* (TORMAY und BÖCK, 1997) sowie *grdB1*, *prxU* und *selD1* aus *E. acidaminophilum*. In Analogie zum *fdnG*-Element aus *E. coli* wurden die Strukturen von *grdB1* und *selD1* hier im Gegensatz zu Abb. 2 (3.1.) mit fünf ungepaarten Nukleotiden in der oberen Haarnadelschleife dargestellt. Hellgrau unterlegte Basen sind im apikalen Bereich beider *E. coli*-Strukturen identisch. Nukleotide, die in den apikalen Haarnadelstrukturen der (putativen) SECIS-Elemente aus *H. influenzae*, *D. baculatum* und *E. acidaminophilum* an vergleichbaren Positionen wie in den *fdhF*- und *fdnG*-Strukturen auftreten, sind ebenfalls grau markiert. Das Selenocystein-codierende UGA ist fett hervorgehoben. Gezeigt ist nur der Bereich der mRNA-Sekundärstrukturen stromabwärts vom UGA-Codon, mögliche Strukturen stromaufwärts von diesem sind nicht berücksichtigt.

Auch die mRNA-Sekundärstruktur des *fdhF*-Gens aus *Enterobacter aerogenes* ermöglichte in *E. coli* die Inkorporation von Selenocystein an dem entsprechenden UGA-Codon (HEIDER *et al.*, 1991), was allerdings auf Grund der äußerst großen Homologie zum *fdhF*-SECIS-Element aus *E. coli* auch zu

erwarten war. Die apikale Haarnadelstruktur, bestehend aus 17 Nukleotiden, ist bei beiden Sequenzen sogar völlig identisch, der Abstand zum UGA-Codon beträgt auch bei *E. aerogenes* elf Nukleotide (HÜTTENHOFER und BÖCK, 1998a).

Verglichen mit dem postulierten SECIS-Element der *selD*-mRNA aus *H. influenzae* weist die entsprechende mRNA-Sekundärstruktur des *hydV*-Gens aus *D. baculatum*, welches für die große Untereinheit einer periplasmatischen Hydrogenase codiert, deutlich größere Homologien zum *fdhF*-SECIS-Element auf (Abb. 36). Dennoch konnte in *E. coli* keine Inkorporation von Selenocystein in ein *hydV*'-'*lacZ*-Fusionsprotein nachgewiesen werden, obwohl *in vitro* eine Bindung von *E. coli*-SelB an den entsprechenden Bereich der *hydV*-mRNA erfolgte, allerdings mit 5-10-fach geringerer Affinität als an das *fdhF*-SECIS-Element (TORMAY und BÖCK, 1997).

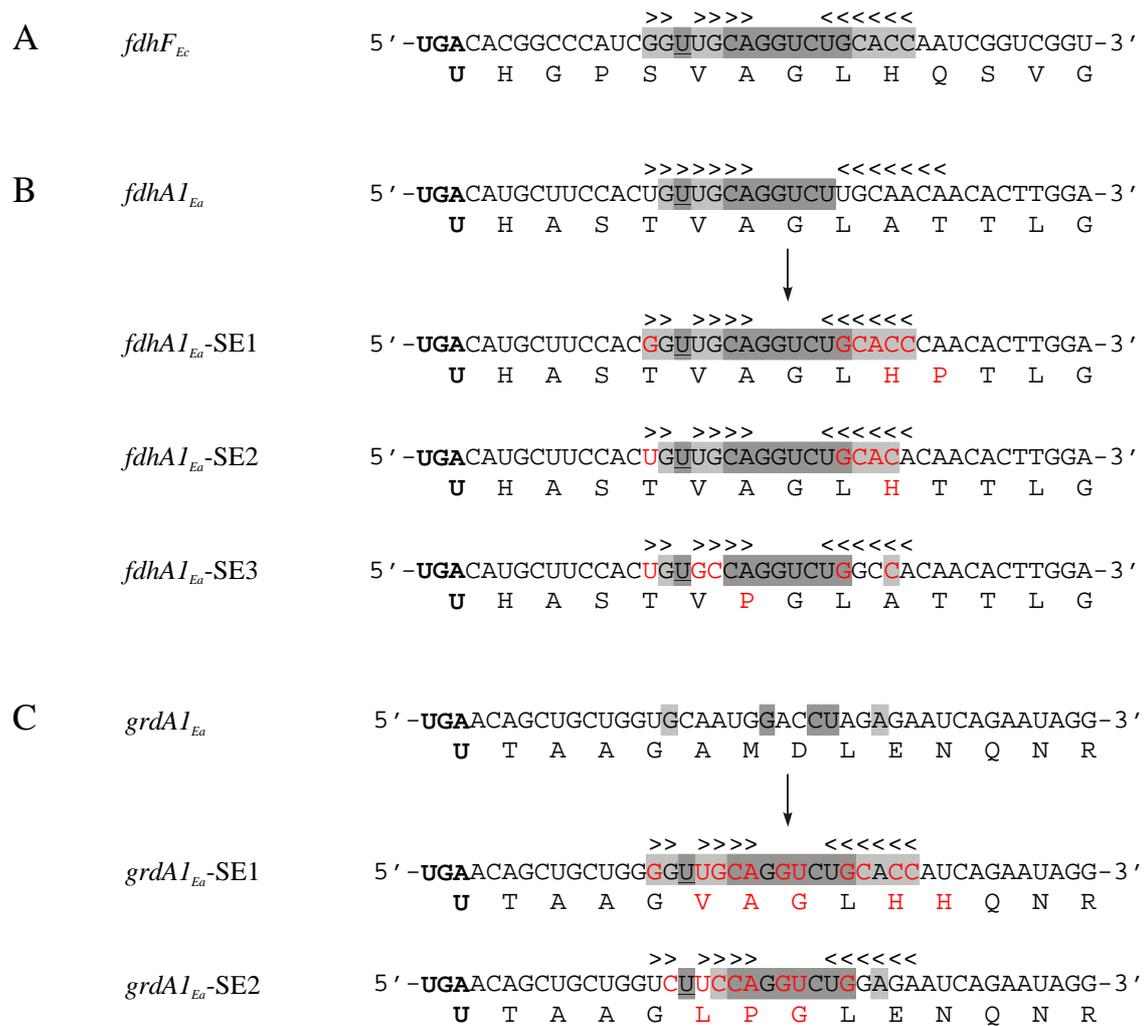
Im Gegensatz zur heterologen Expression von Selenoprotein-Genen aus *E. acidaminophilum* konnte in *E. coli* auch durch die Coexpression von *selB* und *selC* aus *D. baculatum* kein Einbau von Selenocystein in das *hydV*-Genprodukt erreicht werden. Da die Bildung des quaternären Komplexes zwischen SelB, GTP, Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und *hydV*-mRNA nachgewiesen wurde, könnte die Ursache für die nicht erfolgte Inkorporation von Selenocystein darin bestehen, dass der heterologe Elongationsfaktor nicht korrekt mit dem *E. coli*-Ribosom interagiert (TORMAY und BÖCK, 1997).

Abgesehen von der erfolgreichen Expression des Gens der Selenophosphat-Synthetase aus *H. influenzae* erfolgte die Produktion fremder Selenoproteine in *E. coli* zumeist durch Einführung des *fdhF*-SECIS-Elements in das entsprechende Gen. Auf diese Weise konnte eine Inkorporation von Selenocystein in die  $\alpha$ -Untereinheit der F<sub>420</sub>-reduzierenden Formiat-Dehydrogenase aus *Methanobacterium formicium* erreicht werden (HEIDER und BÖCK, 1992). Dieses Enzym, codiert vom Gen *fdhA*, zeigt deutliche Homologien zum *fdhF*-Genprodukt aus *E. coli*, enthält aber an Stelle des Selenocysteins ein Cystein. Nach Mutation des entsprechenden TGC-Codons zu TGA erfolgte in *E. coli* der Einbau von Selenocystein an dieser Position, wenn die Sequenz stromabwärts davon so geändert wurde, dass eine mRNA-Sekundärstruktur ausgebildet werden konnte, die in ihrem oberen Bereich identisch mit dem *fdhF*-SECIS-Element war. Bedingt durch die hohe Homologie des Enzyms zur Formiat-Dehydrogenase H aus *E. coli* änderte die Einführung dieser Struktur die Aminosäure-Sequenz nur an zwei Positionen.

Analog erfolgte in *E. coli* die Expression einer pflanzlichen Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (cit-PHGPx), welche im Gegensatz zum Säuger-Enzym Cystein statt Selenocystein im aktiven Zentrum enthält, als Selenoprotein, nachdem ebenfalls das Cystein-Codon (TGT) zu TGA mutiert und eine mRNA-Sekundärstruktur mit hoher Homologie zum *fdhF*-SECIS-Element in das Gen eingefügt wurde (HAZEBROUCK *et al.*, 2000). Letzteres war in diesem Fall allerdings nur auf Kosten deutlicher Änderungen der Proteinsequenz zu erreichen: sieben Aminosäuren wurden ausgetauscht, eine sogar deletiert.

Auch ARNÉR *et al.* (1999) beschrieben die erfolgreiche Expression eines eukaryotischen Selenoproteins, der Thioredoxin-Reduktase der Ratte, in *E. coli*. Eine Besonderheit dieses Proteins ist die Lokalisation des Selenocysteins direkt vor der C-terminalen Aminosäure. Dadurch war es möglich, ein nur unwesentlich modifiziertes *fdhF*-SECIS-Element stromabwärts vom Selenocystein-codierenden TGA in das Gen einzufügen, ohne wie bei der oben erwähnten Expression der cit-PHGPx die Aminosäure-Sequenz des Proteins zu verändern. Auf diese Weise konnten unter aeroben Bedingungen große Mengen an enzymatisch aktivem Protein exprimiert und gereinigt werden, die höchste spezifische Aktivität wurde bei gleichzeitiger Überexpression der *E. coli*-eigenen Gene *selA*, *selB* und *selC* erreicht, sie betrug 22 % der Aktivität des nativ gereinigten Enzyms. Durch Massenspektroskopie konnte gezeigt werden, dass neben dem gewünschten Produkt auch C-terminal verkürztes und somit inaktives Protein, welches durch Termination am UGA-Codon entstand, isoliert wurde. Die Präsenz dieses Abbruch-Produktes war vermutlich für die geringere spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms verantwortlich.

Bei Selenoproteinen aus *E. acidaminophilum* bietet sich eine Anwendung der genannten Strategie vor allem für die Formiat-Dehydrogenase-Gene *fdhA1* und *fdhA2* an, da hier bereits eine hohe Homologie zur *E. coli*-Sequenz besteht. Die Einführung des apikalen Teils des *fdhF*-SECIS-Elements wäre hier mit dem Austausch von zwei Aminosäuren verbunden: Ala(359)→His und Thr(360)→Pro im *fdhA1*-Genprodukt. Werden nur die Nukleotide U<sub>17</sub> sowie C<sub>20</sub>-G<sub>27</sub> (UGA = +1), die spezifisch für die Wechselwirkung mit *E. coli*-SelB sind (HEIDER *et al.*, 1992; KLUG *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; s. 4.4.) exakt übernommen und die Ausbildung von Basenpaarungen N<sub>15</sub>-N<sub>31</sub>, N<sub>16</sub>-N<sub>30</sub>, N<sub>18</sub>-N<sub>29</sub> und N<sub>19</sub>-N<sub>28</sub> analog zur *fdhF*-Struktur ermöglicht, so lassen sich die Veränderungen in der Proteinsequenz auf einen Aminosäure-Austausch reduzieren, entweder Ala(359)→His oder Ala(356)→Pro (Abb. 37 B).



**Abb. 37: Mögliche Varianten von *fdhA1* (B) und *grdA1* (C) mit Elementen der *fdhF*-SECIS-Struktur (A).** Gezeigt sind das Selenocystein-Codon und die 39 stromabwärts lokalisierten Nukleotide der *fdhF*-mRNA aus *E. coli* sowie die entsprechenden Sequenzen von *fdhA1* und *grdA1*. Die Nukleotide der apikalen Haarnadelstruktur des *fdhF*-SECIS-Elements sind grau unterlegt, dunkel hervorgehobene Basen weisen eine hohe Spezifität für die Wechselwirkung mit *E. coli*-SelB auf. Das ungepaart vorliegende U<sub>17</sub> wurde unterstrichen. Pfeilspitzen (> bzw. <) bezeichnen gepaart vorliegende Nukleotide. Die Mutationen, die in *fdhA1* und *grdA1* notwendig sind, um die essentiellen Elemente einer *fdhF*-SECIS-Struktur einzuführen sowie die sich daraus ergebenden Änderungen auf Protein-Ebene (Aminosäuren jeweils unter der dritten Base des entsprechenden Codons) wurden rot dargestellt.

Bei den übrigen Selenoprotein-Genen aus *E. acidaminophilum* wäre die Einführung des *fdhF*-SECIS-Elements mit deutlich größeren Veränderungen der Aminosäuresequenz verbunden. Als Beispiel sei hier *grdA1* genannt, da für dieses Gen an Hand der DNA-Sequenz stromabwärts des UGA-Codons keine Sekundärstruktur mit den typischen Merkmalen eines SECIS-Elements identifiziert werden konnte (s. 3.1., Abb. 2). Falls sich in weiteren Untersuchungen herausstellen sollte, dass im Gegensatz zu *grdB1*, *prxU* und *selD1* durch Coexpression von *selB*<sub>Ea</sub> in *E. coli* keine Inkorporation von Selenocystein in das *grdA1*-Genprodukt zu erreichen ist, könnte die hier angesprochene Strategie zur Anwendung kommen (Abbildung 37 C). Die exakte Übernahme des apikalen Teils der *fdhF*-Struktur wäre mit einem Austausch von fünf Aminosäuren verbunden: Ala(49)→Val, Met(50)→Ala, Asp(51)→Gly, Glu(53)→His und

Asn(54)→His. Durch Veränderung unspezifischer Nukleotide unter Beibehaltung der Basenpaarung lassen sich diese Abweichungen auf drei Positionen reduzieren: Ala(49)→Leu, Met(50)→Pro und Asp(51)→Gly.

#### 4.6. Selen-modifizierte tRNA(s) in *E. acidaminophilum*

Während der Anzucht von *E. acidaminophilum* in Gegenwart von [<sup>75</sup>Se]-Selenit wurde radioaktives Selen in ein Makromolekül inkorporiert, welches sich als resistent gegenüber Proteinase K-Verdau erwies und sensitiv auf RNase A-Behandlung reagierte (s. 3.10.). Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um eine Selen-haltige tRNA. Ein Kandidat für eine Markierung ist natürlich die mit Selenocystein beladene tRNA<sup>Sec</sup>, allerdings ist anzunehmen, dass die alkalischen Bedingungen während der Proben-Behandlung (s. 2.3.) und der anschließenden Elektrophorese (s. 2.13.2.) zur Hydrolyse der Esterbindung zwischen Aminosäure und tRNA führten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass bei der <sup>75</sup>Se-Markierung von *E. coli*-Zellen, die das *selC*-Gen aus *E. acidaminophilum* auf einem Plasmid enthielten, im Vergleich zu Zellen ohne dieses Plasmid keine zusätzliche Bande detektiert wurde. Auch die Position der hier detektierten Bande bei ca. 21 kDa im Polyacrylamid-Gel spricht eher für eine kleinere tRNA-Spezies, so dass es sich bei dem hier markierten Makromolekül wahrscheinlich um eine tRNA mit einem Selen-modifizierten Nukleosid handelt.

Seleno-tRNAs wurden bisher sowohl in Eukaryoten (CHING, 1984; CHEN *et al.*, 1985; MIZUTANI *et al.*, 1999), als auch in verschiedenen Prokaryoten wie *M. vannielii* (POLITINO *et al.*, 1990), *E. coli* (WITTEWER, 1983), *S. typhimurium* (KRAMER und AMES, 1988; VERES *et al.*, 1990) und *C. sticklandii* (CHEN und STADTMAN, 1980; CHING und STADTMAN, 1982) nachgewiesen, in erster Linie handelt es sich dabei um Lysin-, Glutamat- oder Glutamin-spezifische tRNAs. Das dominierende Selenonukleosid ist 5-Methylaminomethyl-2-selenouridin (mnm<sup>5</sup>Se<sup>2</sup>U), vermutlich treten aber noch andere Selen-modifizierte Nukleoside auf (WITTEWER *et al.*, 1984). Die Biosynthese von mnm<sup>5</sup>Se<sup>2</sup>U erfolgt durch Austausch des Schwefels im modifizierten Nukleosid 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin (mnm<sup>5</sup>S<sup>2</sup>U) gegen Selen (WITTEWER und STADTMAN, 1986; VERES und STADTMAN, 1994). Zumindest in *E. coli* scheint diese Substitution jedoch nicht vollständig zu verlaufen, d. h. beide Formen der tRNA existieren nebeneinander. Wie bei der vom *selA*-Genprodukt katalysierten Umwandlung von Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> in Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> dient Selenophosphat, welches vom *selD*-Genprodukt gebildet wird, als Selen-Donor (EHRENREICH *et al.*, 1992; VERES *et al.*, 1992; GLASS *et al.*, 1993; VERES *et al.*, 1994).

Für die Selen-enthaltenden Glutamat- bzw. Lysin-spezifischen tRNAs aus *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass mnm<sup>5</sup>Se<sup>2</sup>U an der ersten Position des Anticodons (*wobble position*) die Codon-Anticodon-Wechselwirkung beeinflusst. Während das Schwefel-Analogon mnm<sup>5</sup>S<sup>2</sup>U jeweils eine deutliche Bevorzugung des Codons GAA gegenüber GAG (tRNA<sup>Glu</sup>) bzw. des Codons AAA gegenüber AAG (tRNA<sup>Lys</sup>) bewirkte, trat diese Differenzierung nicht oder nur in wesentlich schwächerer Form auf, wenn

die gleichen tRNA-Spezies das entsprechenden Seleno-Nukleosid enthielten (WITTEWER und CHING, 1989).

Die Selen-Modifizierung kann aber auch für die Interaktion mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase von Bedeutung sein. Für die Seleno-tRNA<sup>Glu</sup> aus *C. sticklandii*, die ebenfalls mnm<sup>5</sup>Se<sup>2</sup>U in der *wobble position* enthält (CHING *et al.*, 1985), erwies sich dieses Nukleosid als notwendig für die Acylierung mit Glutamat (CHING und STADTMAN, 1982). Neben dem Auftreten essentieller Selenoproteine könnte die Abhängigkeit der Reaktion einer oder mehrerer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von der Selen-Modifizierung einer tRNA natürlich auch die Ursache dafür sein, dass für das Wachstum eines Organismus unter allen Bedingungen eine adäquate Selen-Versorgung erforderlich ist, wie es z. B. für *E. acidaminophilum* der Fall zu sein scheint (WAGNER, 1997).

## 5. Zusammenfassung

1. Für alle bisher identifizierten Selenoprotein-codierenden Gene aus *E. acidaminophilum* können unmittelbar stromabwärts vom UGA-Codon mRNA-Sekundärstrukturen formuliert werden. Mit einer Ausnahme (*grdA*, Selenoprotein A der Glycin-Reduktase) ähneln sie im Aufbau den SECIS (*selenocysteine insertion sequence*)-Elementen, die in *E. coli* für den spezifischen Einbau von Selenocystein in Proteine essentiell sind. Allerdings zeigten die postulierten Strukturen aus *E. acidaminophilum* untereinander keine signifikanten Sequenzhomologien.
2. Aus einer partiellen *EcoRI*-Genbank konnte durch Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde das für die Selenocystein-Synthase codierende *selA*-Gen aus *E. acidaminophilum* vollständig kloniert werden. Damit wurde die im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit isolierte DNA-Region, welche neben dem größten Teil von *selA* auch die Gene *selB* (Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor), *selC* (tRNA<sup>Sec</sup>) und *ackA'* (Acetat-Kinase A) aufwies, um ca. 0,7 kb erweitert. Stromaufwärts von *selA* konnte der 3'-Bereich eines Gens (*selD1*), welches für eine Selenophosphat-Synthetase codiert, identifiziert werden. In *E. acidaminophilum* liegen die Gene für den cotranslationalen Einbau von Selenocystein in Proteine somit in einem Cluster der Form *selDIABC* vor.
3. Mittels Northern-Hybridisierung wurde die Transkription der *sel*-Gene untersucht. Die detektierten Signale deuteten auf monocistronische Transkripte für *selD1* und *selC* sowie auf eine *selDIAB*- und eine *selAB*-mRNA hin. Die Existenz eines Transkripts, welches *selD1*, *selA* und *selB* umfasst, konnte durch RT-PCR bestätigt werden. Unmittelbar stromaufwärts der Gene *selD1* und *selC* wurde durch *primer extension* ein Transkriptions-Startpunkt nachgewiesen. Für ein zweites Selenophosphat-Synthetase-Gen (*selD2*), welches nicht mit dem *selDIABC*-Cluster assoziiert ist, wurde eine monocistronische mRNA nachgewiesen.
4. Die Funktionalität der Produkte der *E. acidaminophilum*-Gene *selA*, *selB* und *selC* in *E. coli* konnte durch Komplementation des Defektes entsprechender Mutanten gezeigt werden. Als Maß für die Fähigkeit zur spezifischen, cotranslationalen Inkorporation von Selenocystein diente die Aktivität des vom *fdhF*-Gen codierten, *E. coli*-eigenen Selenoproteins Formiat-Dehydrogenase H im Rohextrakt.
5. *E. acidaminophilum*-SelB sowie die Domänen 4 und 4b des Proteins wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und als *Strep-tag* II-Fusionen (alle drei Proteine) sowie als His-*tag*-Fusionen (nur die beiden Domänen) gereinigt. Im Gegensatz zu den C-terminalen Bereichen erfolgte eine nachweisbare Synthese des vollständigen Proteins nur, wenn gleichzeitig die Gene der in *E. coli* in geringer Menge

- auf tretenden tRNA<sub>4</sub><sup>Arg</sup>, tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> und tRNA<sub>3</sub><sup>Leu</sup> überexprimiert wurden. Ein Vergleich der Codon-Nutzung im Genom von *E. coli* und in *E. acidaminophilum-selB* deutete darauf hin, dass das gehäufte Auftreten des Isoleucin-Triplets AUA im Gen des Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktors für die geringe Expressionsrate verantwortlich war.
6. Durch *in-vitro*-Transkription wurden mRNA-Fragmente synthetisiert, welche die postulierten Sekundärstrukturen stromabwärts des UGA-Codons der Selenoprotein-Gene *grdB1* (Selenoprotein B der Glycin-Reduktase), *prxU* (Peroxiredoxin) und *selD1* (Selenophosphat-Synthetase) aus *E. acidaminophilum* umfassten. Von jeder der drei Strukturen wurde auch eine mutierte Form hergestellt, bei der jeweils zwei Nukleotide in der apikalen Schleife der Haarnadelstruktur verändert waren. Nach 5'-Markierung mit <sup>32</sup>P wurden diese Transkripte in Gelretardations-Experimenten mit gereinigtem SelB bzw. den SelB-Domänen 4 und 4b eingesetzt. Im Falle der SelB-Präparation konnte zwar eine Interaktion mit den mRNA-Fragmenten beobachtet werden, diese trat allerdings erst bei sehr hohem Überschuss an Protein auf und war nicht spezifisch für die Wildtyp-Struktur. Die gereinigten Domänen 4 und 4b zeigten keine Bindung an die untersuchten mRNAs.
  7. Mittels *in-vivo*-Markierung mit <sup>75</sup>Selen konnte nachgewiesen werden, dass eine Coexpression der Gene *selB* und *selC* aus *E. acidaminophilum* die heterologe Expression der Gene *grdB1*, *prxU* und *selD1* als Selenoproteine in *E. coli* ermöglicht. Ohne den Elongationsfaktor und die tRNA<sup>Sec</sup> aus *E. acidaminophilum* wurden in *E. coli* nur äußerst geringe Mengen an Selen in die Proteine eingebaut, so dass davon auszugehen ist, dass *E. coli*-SelB eventuell vorhandene SECIS-Elemente in den entsprechenden Selenoprotein-mRNAs nicht effektiv erkennt.
  8. Um zu überprüfen, ob die postulierten mRNA-Sekundärstrukturen stromabwärts des UGA-Codons von *grdB1*, *prxU* und *selD1* für den Einbau von Selenocystein essentiell sind, wurden verschiedene Mutationen in diesem Bereich eingeführt und die Gene in Gegenwart von SelB und tRNA<sup>Sec</sup> aus *E. acidaminophilum* in einer *selB*-Defektmutante von *E. coli* exprimiert. Sowohl die Veränderung von zwei benachbarten Nukleotiden in der apikalen Schleife (s. o.) als auch von drei aufeinander folgenden Nukleotiden im Stamm führten in allen drei Fällen zu einer signifikanten Verringerung der Menge an <sup>75</sup>Selen-markiertem Protein. Durch kompensierende Mutationen auf der anderen 'Seite' des Stammes (d. h. Wiedereinführung einer Basenpaarung an den entsprechenden Positionen) konnte die Funktionalität der jeweiligen Struktur größtenteils wiederhergestellt werden.
  9. Es wurden Translationsfusionen aus dem Gen der Glutathion-S-Transferase (*gst*), gefolgt von einem 63 Basenpaare umfassenden Fragment von *grdB1*, *prxU* bzw. *selD1* (je zehn Nukleotide stromaufwärts und 50 stromabwärts vom Selenocystein-Codon UGA) und dem  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) hergestellt. In Gegenwart von SelB und tRNA<sup>Sec</sup> aus *E. acidaminophilum* konnte in *E. coli* für

diese Konstrukte eine hohe UGA-Durchleaserate beobachtet werden. Die ermittelten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten entsprachen 60,4 % (*grdB1*-Fusion), 63,9 % (*prxU*) bzw. 35,5 % (*selD1*) des Wertes, der mit der jeweiligen Cystein-Mutante, in der das TGA-Codon gegen TGC ausgetauscht war, erreicht wurde. Die Präsenz der postulierten mRNA-Sekundärstrukturen im hier klonierten Bereich der drei Selenoprotein-Gene war offensichtlich ausreichend, um UGA als Selenocystein-Codon zu spezifizieren.

10. Nach Anzucht von *E. acidaminophilum* in Gegenwart von [<sup>75</sup>Se]-Selenit konnte ein markiertes Makromolekül detektiert werden, das sich als resistent gegen Proteinase K-Behandlung erwies, durch RNase A jedoch abgebaut wurde. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um eine tRNA mit einem Selen-modifizierten Nukleosid.

## 6. Literaturverzeichnis

- ABAIBOU, H., POMMIER, J., BENOIT, S., GIORDANO, G., MANDRAND-BERTHELOT, M.-A. (1995) Expression and characterization of the *Escherichia coli* *fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 177: 7141-7149
- ADAMSKI, F. M., MCCAUGHAN, K. K., JØRGENSEN, F., KURLAND, C. G., TATE, W. P. (1994) The concentration of polypeptide chain release factors 1 and 2 at different growth rates of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 238: 302-308
- ALEXANDER, F. W., SANDMEIER, E., MEHTA, P. K., CHRISTEN, P. (1994) Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific **a**, **b** and **g** families. *Eur. J. Biochem.* 219: 953-960
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- AMBERG, R., MIZUTANI, T., WU, X.-Q., GROSS, H. J. (1996) Selenocysteine synthesis in mammalia: an identity switch from tRNA<sup>Ser</sup> to tRNA<sup>Sec</sup>. *J. Mol. Biol.* 263: 8-19
- ANDERSSON, S. G., KURLAND, C. G. (1995) Genomic evolution drives the evolution of the translation system. *Biochem. Cell Biol.* 73: 775-787
- ANDREESSEN, J. R., WAGNER, M., SONNTAG, D., KOHLSTOCK, M., HARMS, C., GURSINSKY, T., JÄGER, J., PARTHER, T., KABISCH, U., GRÄNTZDÖRFFER, A., PICH, A., SÖHLING, B. (1999) Various functions of selenols and thiols in anaerobic Gram-positive, amino acid-utilizing bacteria. *BioFactors* 10: 263-270.
- ARNÉR, E. S. J., SARIOGLU, H., LOTTSPREICH, F., HOLMGREN, A., BÖCK, A. (1999) High-level expression in *Escherichia coli* of selenocysteine-containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterial-type SECIS elements and co-expression with the *selA*, *selB* and *selC* genes. *J. Mol. Biol.* 292: 1003-1016
- AXLEY, M. J., BÖCK, A., STADTMAN, T. C. (1991) Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8450-8454
- AXLEY, M. J., GRAHAME, D. A., STADTMAN, T. C. (1990) *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component *J. Biol. Chem.* 265: 18213-18218

- BAENA, S., FARDEAU, M.-L., WOO, T. H. S., OLLIVIER, B., LABAT, M., PATEL, B. K. C. (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 *Thermanaerovibro acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 969-974
- BAO, Q., TIAN, Y., LI, W., XU, Z., XUAN, Z., HU, S., DONG, W., YANG, J., CHEN, Y., XUE, Y., XU, Y., LAI, X., HUANG, L., DONG, X., MA, Y., LING, L., TAN, H., CHEN, R., WANG, J., YU, J., YANG, H. (2002) A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res.* 12: 689-700
- BARNETT, M. J., FISHER, R. F., JONES, T., KOMP, C., ABOLA, A. P., BARLOY-HUBLER, F., BOWSER, L., CAPELA, D., GALIBERT, F., GOUZY, J., GURJAL, M., HONG, A., HUIZAR, L., HYMAN, R. W., KAHN, D., KAHN, M. L., KALMAN, S., KEATING, D. H., PALM, C., PECK, M. C., SURZYCKI, R., WELLS, D. H., YEH, K.-C., DAVIS, R. W., FEDERSPIEL, N. A., LONG, S. R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9883-9888
- BARON, C., BÖCK, A. (1991) The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA<sup>Sec</sup> of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. *J. Biol. Chem.* 266: 20375-20379
- BARON, C., HEIDER, J., BÖCK, A. (1990) Mutagenesis of *selC*, the gene for the selenocysteine-inserting tRNA-species in *E. coli*: effects on *in vivo* function. *Nucleic Acids Res.* 18: 6761-6766
- BARON, C., (1993) RNA-Strukturen und RNA-Protein-Interaktionen im Selenocystein-Stoffwechsel. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- BARON, C., HEIDER, J., BÖCK, A. (1993b) Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4181-4185
- BARON, C., STURCHLER, C., WU, X.-Q., GROSS, H. J., KROL, A., BÖCK, A. (1994) Eukaryotic selenocysteine inserting tRNA species support selenoprotein synthesis in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 22: 2228-2233
- BARON, C., WESTHOF, E., BÖCK, A., GIEGE, R. (1993a) Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA<sup>Sec</sup> from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA<sup>Ser</sup>. *J. Mol. Biol.* 231: 274-292
- BARRELL, B. G., BANKIER, A. T., DROUIN, J. (1979) A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282: 189-194.
- BEGG, Y. A., WHYTE, J. A., HADDOCK, B. A. (1977) The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2: 47-50

- BEHNE, D., KYRIAKOPOEULOS, A., WEISS-NOWAK, C., KALCKLOESCH, M., WESTPHAL, C., GESSNER, H. (1996) Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 55: 99-110
- BERCHTOLD, H., RESHETNIKOVA, L., REISER, C. O. A., SCHIRMER, N. K., SPRINZL, M., HILGENFELD, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* 365: 126-132
- BERG, B. L., LI, J., HEIDER, J., STEWART, V. (1991) Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. *J. Biol. Chem.* 266: 22380-22385
- BERRY, M. J., BANU, L., CHEN, Y., MANDEL, S. J., KIEFFER, J. D., HARNEY, J. W., LARSEN, P. R. (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in Type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353: 273-276
- BESHO, Y., OHAMA, T., OSAWA, S. (1992) Planarian mitochondria. II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *J. Mol. Evol.* 34: 331-335
- BIRKMANN, A., ZINONI, F., SAWERS, G., BÖCK, A. (1987) Factors affecting transcriptional regulation of the formate-hydrogen-lyase pathway of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 148: 44-51
- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523
- BJÖRNSSON, A., MOTTAGUI-TABAR, S., ISAKSSON, L. A. (1996) Structure of the C-terminal end of the nascent peptide influences translation termination. *EMBO J.* 15: 1696-1704
- BLATTNER, F. R., PLUNKETT III, G., BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B., SHAO, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1474
- BÖCK, A., STADTMANN, T. C. (1988) Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism. *BioFactors* 1: 245-250
- BOURNE, H. R., SANDERS, D. A., MCGORMICK, F. (1991) The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127
- BOYINGTON, J. C., GLADYSHEV, V. N., KHANGULOV, S. V., STADTMAN, T. C., SUN, P. D. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster. *Science* 275: 1305-1308

- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol. Med.* 27: 951-965
- BRINKMANN, U., MATTES, R. E., BUCKEL, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85:109-114
- BULT, C. J., WHITE, O., OLSEN, G. J., ZHOU, L., FLEISCHMANN, R. D., SUTTON, G. G., BLAKE, J. A., FITZGERALD, L. M., CLAYTON, R. A., GOCAYNE, J. D., KERLAVAGE, A. R., DOUGHERTY, B. A., TOMB, J.-F., ADAMS, M. D., REICH, C. I., OVERBEEK, R., KIRKNESS, E. F., WEINSTOCK, K. G., MERRICK, J. M., GLODEK, A., SCOTT, J. L., GEOGHAGEN, N. S. M., WEIDMANN, J. F., FUHRMANN, J. L., NGUYEN, D., UTTERBACK, T. R., KELLEY, J. M., PETERSON, J. D., SADOW, P. W., HANNA, M. C., COTTON, M. D., ROBERTS, K. M., HURST, M. A., KAINE, B. P., BORODOVSKY, M., KLENK, H.-P., FRASER, C. M., SMITH, H. O., WOESE, C. R., VENTER, J. C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073
- BURK, R. F., HILL, K. E. (1999) Orphan selenoproteins. *BioEssays* 21: 231-237
- BURKARD, U., SÖLL, D. (1988) The unusually long amino acid acceptor stem of *Escherichia coli* selenocysteine tRNA results from abnormal cleavage by RNase P. *Nucleic Acids Res.* 16: 11617-11624
- CASTELLANO, S., MOROZOVA, N., MOREY, M., BERRY, M. J., SERRAS, F., COROMINAS, M., GUIGÓ, R. (2001) *In silico* identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *EMBO Reports* 2: 697-702
- CHAMBERS, I., FRAMPTON, J., GOLDFARB, P., AFFARA, N., MCBAIN, W., HARRISON, P. R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* 5: 1221-1227
- Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156
- CHEN, C.-S., STADTMAN, T. C. (1980) Selenium-containing tRNAs from *Clostridium sticklandii*: Cochromatography of one species with L-prolyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1403-1407
- CHEN, C.-S., WEN, T.-N., CHANG, J.-H. (1985) Selenium-containing tRNA of a higher plant. *Curr. Top. Cell. Regul.* 27: 509-516

- CHEN, G.-F. T., FANG, L., INOUE, M. (1993) Effect of the relative position of the UGA codon to the unique secondary structure in the *fdhF* mRNA on its decoding by selenocysteinyl tRNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 23128-23131
- CHING, W.-M. (1984) Occurrence of selenium-containing tRNAs in mouse leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3010-3013
- CHING, W.-M., ALZNER-DEWEERD, B., STADTMAN, T. C. (1985) A selenium-containing nucleoside at the first position of the anticodon in seleno-tRNA<sup>Glu</sup> from *Clostridium sticklandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 347-350
- CHING, W.-M., STADTMAN, T. C. (1982) Selenium-containing tRNA<sup>Glu</sup> from *Clostridium sticklandii*: Correlation of aminoacylation with selenium content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 374-377
- COMMANS, S., BÖCK, A. (1999) Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 335-351
- CONE, J. E., MARTÍN DEL RÍO, R., DAVIS, J. N., STADTMAN, T. C. (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: Identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2659-2663
- COPELAND, P. R., FLETCHER, J. E., CARLSON, B. A., HATFIELD, D. L., DRISCOLL, D. M. (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *Embo J.* 19: 306-314
- COX, J. C., EDWARDS, E. S., DEMOSS, J. A. (1981) Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenases from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 145:1317-1324
- DECKERT, G., WARREN, P. V., GAASTERLAND, T., YOUNG, W. G., LENOX, A. L., GRAHAM, D. E., OVERBEEK, R., SNEAD, M. A., KELLER, M., AUJAY, M., HUBER, R., FELDMAN, R. A., SHORT, J. M., OLSEN, G. J., SWANSON, R. V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358
- DIRHEIMER, G., KEITH, G., DUMAS, P., WESTHOF, E. (1995) Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. In: Söll, D., RajBhandary, U. (Hrsg.) *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. S. 93-126, ASM Press, Washington DC
- DONG, H., NILSSON, L., KURLAND, C. G. (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.* 260: 649-663
- DÖRING, V., MOOTZ, H. D., NANGLE, L. A., HENDRICKSON, T. L., DE CRÉCY-LAGARD, V., SCHIMMEL, P., MARLIÈRE, P. (2001) Enlarging the amino acid set of *Escherichia coli* by infiltration of the valine coding pathway. *Science* 292: 501-504

- EHRENREICH, A., FORCHHAMMER, K., TORMAY, P., VEPREK, B., BÖCK, A. (1992) Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur. J. Biochem.* 206: 767-773
- EIDSNESS, M. K., SCOTT, R. A., PRICKRIL, B. C., DERVARTANIAN, D. V., LEGALL, J., MOURA, I., MOURA, J. J., PECK JR., H. D. (1989) Evidence for selenocysteine coordination to the active site nickel in the (NiFeSe)hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 147-151
- ENGELHARDT, H., FORCHHAMMER, K., MÜLLER, S., GOLDIE, K. N., BÖCK, A. (1992) Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA<sup>Sec</sup>-enzyme complex. *Mol. Microbiol.* 6: 3461-3467
- ENGLER-BLUM, G., MEIER, M., FRANK, J., MÜLLER, G. A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* 210: 235-244
- FAGEGALTIER, D., HUBERT, N., YAMADA, K., MIZUTANI, T., CARBON, P., KROL, A. (2000) Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J.* 19: 4796-4805
- FLEISCHMANN, R. D., ADAMS, M. D., WHITE, O., CLAYTON, R. A., KIRKNESS, E. F., KERLAVAGE, A. R., BULT, C. J., TOMB, J.-F., DOUGHERTY, B. A., MERRICK, J. M., MCKENNEY, K., SUTTON, G., FITZHUGH, W., FIELDS, C., GOCAYNE, J. D., SCOTT, J., SHIRLEY, R., LIU, L.-I., GLODEK, A., KELLEY, J. M., WEIDMAN, J. F., PHILIPS, C. A., SPRIGGS, T., HEDBLOM, E., COTTON, M. D., UTTERBACK, T. R., HANNA, M. C., NGUYEN, D. T., SAUDEK, D. M., BRANDON, R. C., FINE, L. D., FRITCHMAN, J. L., FUHRMANN, J. L., GEOGHAGEN, N. S. M., GNEHM, C. L., MCDONALD, L. A., SMALL, K. V., FRASER, C. M., SMITH, H. O., VENTER, J. C. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512
- FLETCHER, J. E., COPELAND, P. R., DRISCOLL, D. M., KROL, A. (2001) The selenocysteine incorporation machinery: Interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. *RNA* 7: 1442-1453
- FORCHHAMMER, K., BÖCK, A. (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J. Biol. Chem.* 266: 6324-6328
- FORCHHAMMER, K., LEINFELDER, W., BÖCK, A. (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 342: 453-456
- FORCHHAMMER, K., LEINFELDER, W., BOESMILLER, K., VEPREK, B., BÖCK, A. (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (*selA*) and purification of the protein. *J. Biol. Chem.* 266: 6318-6323

- FORCHHAMMER, K., RÜCKNAGEL, K.-P., BÖCK, A. (1990) Purification and biochemical characterization of SELB, a translation factor involved in selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 265: 9346-9350
- FÖRSTER, C., OTT, G., FORCHHAMMER, K., SPRINZL, M. (1990) Interaction of a selenocysteine-incorporating tRNA with elongation factor Tu from *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 18: 487-491
- FU, L. H., WANG, X. F., EYAL, Y., SHE, Y. M., DONALD, L. J., STANDING, K. G., BEN-HAYYIM, G. (2002) A selenoprotein in the plant kingdom: mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, im Druck
- 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
- GESTELAND, R. F., ATKINS, J. F. (1996) Recoding: Dynamic reprogramming of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 741-768
- GLADYSHEV, V. N., JEANG, K.-T., WOOTTON, J. C., HATFIELD, D. L. (1998) A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 273: 8910-8915
- GLADYSHEV, V. N., KRYUKOV, G. V. (2001) Evolution of selenocysteine-containing proteins: Significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *BioFactors* 14: 87-92
- GLASS, R. S., SINGH, W. P., JUNG, W., VERES, Z., SCHOLZ, T. D., STADTMAN, T. C. (1993) Monoselenophosphate: Synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. *Biochemistry* 32: 12555-12559
- GRÄNTZDÖRFFER, A. (2000) Formiat-Stoffwechsel in *Eubacterium acidaminophilum*: Molekulare und biochemische Charakterisierung der Wolfram- und Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen sowie einer Eisen-Hydrogenase. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- GRAVES, M. C., RABINOWITZ, J. C. (1986) *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms. *J. Biol. Chem.* 261: 11409-11415
- GRIVELL, L. A. (1986) Deciphering divergent codes. *Nature* 324: 109-110
- GRÖBE, D. (2001) Analysen zur Translation von Seleno-Proteinen aus *Eubacterium acidaminophilum* in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- GRUNDNER-CULEMANN, E., MARTIN III, G. W., HARNEY, J. W., BERRY, M. J. (1999) Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes. *RNA* 5: 625-635

- GUIMARÃES, M. J., PETERSON, D., VICARI, A., COCKS, B. G., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., FERRICK, D. A., KASTELEIN, R. A., BAZAN, J. F., ZLOTNIK, A. (1996) Identification of a novel *selD* homolog from Eukaryotes, Bacteria, and Archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15086-15091
- GURSINSKY, T. (1996) Klonierung, Sequenzierung und Analyse von Genen des Selenocystein-Einbaus in Proteine von *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- GURSINSKY, T., JÄGER, J., ANDREESEN, J. R., SÖHLING, B. (2000) A *selDABC* cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* 174: 200-212
- HALBOTH, S., KLEIN, A. (1992) *Methanococcus voltae* harbors four gene clusters potentially encoding two [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases, each of the cofactor F<sub>420</sub>-reducing or F<sub>420</sub>-non-reducing types. *Mol. Gen. Genet.* 233: 217-224
- HAO, B., GONG, W., FERGUSON, T. K., JAMES, C. M., KRZYCKI, J. A., CHAN, M. K. (2002) A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* 296: 1462-1466
- HARLEY, C. B., REYNOLDS, R. P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15: 2343-2361
- HAZEBROUCK, S., CAMOIN, L., FALTIN, Z., STROSBERG, A. D., ESHDAT, Y. (2000) Substituting selenocysteine for catalytic cysteine 41 enhances enzymatic activity of plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275: 28715-28721
- HEIDER, J., BARON, C., BÖCK, A. (1992) Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* 11: 3759-3766
- HEIDER, J., BÖCK, A. (1992) Targeted insertion of selenocysteine into the  $\alpha$  subunit of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.* 174: 659-663
- HEIDER, J., FORCHHAMMER, K., SAWERS, G., BÖCK, A. (1991) Interspecies compatibility of selenoprotein biosynthesis in *Enterobacteriaceae*. *Arch. Microbiol.* 155: 221-228
- HEIDER, J., LEINFELDER, W., BÖCK, A. (1989) Occurrence and functional compatibility within enterobacteriaceae of a tRNA species which inserts selenocysteine into protein. *Nucleic Acids Res.* 17: 2529-2540
- HELMANN, J. D. (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$ -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA-polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 2351-2360

- HILGENFELD, R., BÖCK, A., WILTING, R. (1996) Structural model for the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Biochimie* 78: 971-978
- HILL, K. E., LLOYD, R. S., YANG, J.-G., READ, R., BURK, R. F. (1991) The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* 266: 10050-10053
- HIRSH, D., GOLD, L. (1971) Translation of the UGA triplet *in vitro* by tryptophan transfer RNA's. *J. Mol. Biol.* 58: 459-468
- HORMANN, K., 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
- HUANG, X., MILLER, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12: 12337-357
- HUNGATE, R. E. (1969) A role tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*, Band 3b. S. 117-132, Academic Press, New York, London
- HÜTTENHOFER, A., BÖCK, A. (1998a) RNA structures involved in selenoprotein synthesis. In: Simons, R. W., Grunberg-Manago, M. (Hrsg.) *RNA Structure and Function*. S. 603-639, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- HÜTTENHOFER, A., BÖCK, A. (1998b) Selenocysteine inserting RNA elements modulate GTP hydrolysis of elongation factor SelB. *Biochemistry* 37: 885-890
- HÜTTENHOFER, A., HEIDER, J., BÖCK, A. (1996a) Interaction of the *Escherichia coli fdhF* mRNA hairpin promoting selenocysteine incorporation with the ribosome. *Nucleic Acids Res.* 24: 3903-3910
- HÜTTENHOFER, A., WESTHOF, E., BÖCK, A. (1996b) 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
- INOKUCHI, H., YAMAO, F. (1995) Structure and expression of prokaryotic tRNA genes. In: Söll, D., RajBhandary, U. (Hrsg.) *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. S. 17-30, ASM Press, Washington DC
- IOUDOVITCH, A., STEINBERG, S. V. (1999) Structural compensation in an archaeal selenocysteine transfer RNA. *J. Mol. Biol.* 290: 365-371
- JONES, J. B., DILWORTH, G. L., STADTMAN, T. C. (1979) Occurrence of selenocysteine in the selenium-dependent formate dehydrogenase of *Methanococcus vannielii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 255-260

- KABISCH, U. C., GRÄNTZDÖRFFER, A., SCHIERHORN, A., RÜCKNAGEL, K. P., ANDREESEN, J. R., PICH, A. (1999) Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. *J. Biol. Chem.* 274: 8445-8454
- KANO, A., OHAMA, T., ABE, R., OSAWA, S. (1993) Unassigned or nonsense codons in *Micrococcus luteus*. *J. Mol. Biol.* 230: 51-56
- KEELING, P. J., DOOLITTLE, W. F. (1997) Widespread and ancient distribution of a noncanonical genetic code in diplomonads. *Mol. Biol. Evol.* 14: 895-901
- KEELING, P. J., FAST, N. M., MCFADDEN, G. I. (1998) Evolutionary relationship between translation initiation factor eIF-2 $\gamma$  and selenocysteine-specific elongation factor SELB: Change of function in translation factors. *J. Mol. Evol.* 47: 649-655
- KLUG, S. J., HÜTTENHOFER, A., FAMULOK, M. (1999) In vitro selection of RNA aptamers that bind special elongation factor SelB, a protein with multiple RNA-binding sites, reveals one major interaction domain at the carboxyl terminus. *RNA* 5: 1180-1190
- KLUG, S. J., HÜTTENHOFER, A., KROMAYER, M., FAMULOK, M. (1997) *In vitro* and *in vivo* characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6676-6681
- KNIGHT, R. D., FREELAND, S. J., LANDWEBER, L. F. (2001) Rewiring the keyboard: Evolvability of the genetic code. *Nat. Rev. Genet.* 2: 49-58
- KÖHRLE, J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1853-1863
- KOPELOWITZ, J., HAMPE, C., GOLDMAN, R., RECHES, M., ENGELBERG-KULKA, H. (1992) Influence of codon context on UGA suppression and readthrough. *J. Mol. Biol.* 225: 261-269
- KOROTKOV, K. V., NOVOSELOV, S. V., HATFIELD, D. L., GLADYSHEV, V. N. (2002) Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (sec) incorporation is supported by a new form of sec insertion sequence element. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1402-1411
- KRAMER, G. F., AMES, B. N. (1988) Isolation and characterization of a selenium metabolism mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170: 736-743
- 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

- KROMAYER, M., NEUHIERL, B., FRIEBEL, A., BÖCK, A. (1999) Genetic probing of the interaction between the translation factor SelB and its mRNA binding element in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 800-806
- KROMAYER, M., WILTING, R., TORMAY, P., BÖCK, A. (1996) Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB. *J. Mol. Biol.* 262: 413-420
- KRYUKOV, G. V., GLADYSHEV, V. N. (2000) Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells* 5: 1049-1060
- KRYUKOV, G. V., KRYUKOV, V. M., GLADYSHEV, V. N. (1999) New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem.* 274: 33888-33897
- KÜCK, U., JEKOSCH, K., HOLZAMER, P. (2000) DNA sequence analysis of the complete mitochondrial genome of the green alga *Scenedesmus obliquus*: evidence for UAG being a leucine and UCA being a non-sense codon. *Gene* 253: 13-18
- KYRIAKOPOULOS, A., BERTELSMANN, H., GRAEBERT, A., HOPPE, B., KUHbacher, M., BEHNE, D. (2002) Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 16: 57-62
- LACOURCIERE, G. M., STADTMAN, T. C. (1999) Catalytic properties of selenophosphate synthetases: Comparison of the selenocysteine-containing enzyme from *Haemophilus influenzae* with the corresponding cysteine-containing enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 44-48
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LEE, B. J., WORLAND, P. J., DAVIS, J. N., STADTMAN, T. C., HATFIELD, D. L. (1989) Identification of a selenocysteyl-tRNA<sup>Ser</sup> in mammalian cells that recognizes the nonsense codon UGA. *J. Biol. Chem.* 264: 9724-9727
- LEE, S.-R., KIM, J.-R., KWON, K.-S., YOON, H. W., LEVINE, R. L., GINSBURG, A., RHEE, S. G. (1999) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 274: 4722-4734
- LEINFELDER, W., FORCHHAMMER, K., VEPREK, B., ZEHELEIN, E., BÖCK, A. (1990) In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA<sub>UCA</sub> from seryl-tRNA<sub>UCA</sub>: Involvement and characterization of the *selD* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 543-547

- LEINFELDER, W., FORCHHAMMER, K., ZINONI, F., SAWERS, G., MANDRAND-BERTHELOT, M.-A., BÖCK, A. (1988a) *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *J. Bacteriol.* 170: 540-546
- LEINFELDER, W., ZEHELEIN, E., MANDRAND-BERTHELOT, M.-A., BÖCK, A. (1988b) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 331: 723-725
- LESCURE, A., FAGEGALTIER, D., CARBON, P., KROL, A. (2002) Protein factors mediating selenoprotein synthesis. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 3: 143-151
- LESCURE, A., GAUTHERET, D., CARBON, P., KROL, A. (1999) Novel selenoproteins identified *in silico* and *in vivo* by using a conserved RNA structural motif. *J. Biol. Chem.* 274: 38147–38154
- LI, C., RECHES, M., ENGELBERG-KULKA, H. (2000) The bulged nucleotide in the *Escherichia coli* minimal selenocysteine insertion sequence participates in interaction with SelB: a genetic approach. *J. Bacteriol.* 182: 6302-6307
- LIU, Z., RECHES, M., ENGELBERG-KULKA, H. (1999) A sequence in the *Escherichia coli fdhf* “selenocysteine insertion sequence” (SECIS) operates in the absence of selenium. *J. Mol. Biol.* 294: 1073-1086
- LIU, Z., RECHES, M., GROISMAN, I., ENGELBERG-KULKA, H. (1998) The nature of the minimal 'selenocysteine insertion sequence' (SECIS) in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26: 896-902
- LOW, S. C., BERRY, M. J. (1996) Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *TIBS* 21: 203-208
- LOW, S. C., HARNEY, J. W., BERRY, M. J. (1995) Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 270: 21659-21664
- LOZUPONE, C. A., KNIGHT, R. D., LANDWEBER, L. F. (2001) The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr. Biol.* 11: 65-74
- MACINO, G., CORUZZI, G., NOBREGA, F. G., LI, M., TZAGOLOFF, A. (1979) Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3784-3785
- MANSELL, J. B., GUÉVREMONT, D., POOLE, E. S., TATE, W. P. (2001) A dynamic competition between release factor 2 and the tRNA<sup>Sec</sup> decoding UGA at the recoding site of *Escherichia coli* formate dehydrogenase H. *EMBO J.* 20: 7284-7293

- MARTIN-ROMERO, F. J., Kryukov, G. V., Lobanov A. V., Carlson, B. A., Lee, B. J., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (2001) Selenium metabolism in *Drosophila*. Selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J. Biol. Chem.* 276: 29798-29804
- MATHEWS, D. H., SABINA, J., ZUKER, M., TURNER, D. H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288: 911-940
- MATSUGI, J., MURAO, K., ISHIKURA, H. (1998) Effect of *B. subtilis* tRNA<sup>Tp</sup> on readthrough rate at an opal UGA codon. *J. Biochem.* 123: 853-858
- MAY, B. J., ZHANG, Q., LI, L. L., PAUSTIAN, M. L., WHITTAM, T. S., KAPUR, V. (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3460-3465
- MEYER, F. M., SCHMIDT, H. J., PLÜMPER, E., HASILIK, A., MERSMANN, G., MEYER, H. E., ENGSTRÖM, Å., HECKMANN, K. (1991) UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3758-3761
- MILLER, J. H. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- MILLIGAN, J. F., GROEBE, D. R., WITHERELL, G. W., UHLENBECK, O. C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* 15: 8783-8798
- MIZUTANI, T., GOTO, C. (2000) Eukaryotic selenocysteine tRNA has the 9/4 secondary structure. *FEBS Lett.* 466: 359-362
- MIZUTANI, T., KURATA, H., YAMADA, K., TOTSUKA, T. (1992) Some properties of murine selenocysteine synthase. *Biochem. J.* 284: 827-834
- MIZUTANI, T., WATANABE, T., KANAYA, K., NAKAGAWA, Y., FUJIWARA, T. (1999) Trace 5-Methylaminomethyl-2-selenouridine in bovine tRNA and the selenouridine synthase activity in bovine liver. *Mol. Biol. Rep.* 26: 167-172
- MOTTAGUI-TABAR, S., BJÖRNSSON, A., ISAKSSON, L. A. (1994) The second to last amino acid in the nascent peptide chain as a codon context determinant. *EMBO J.* 13: 249-257
- MÜLLER, S., HEIDER, J., BÖCK, A. (1997) The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 168: 421-427
- MYÖHÄNEN, S., WAHLFORS, J. (1993) Automated fluorescent primer extension. *BioTechniques* 14: 16-17

- NISSEN, P., KJELDGAARD, M., THIRUP, S., POLEKHINA, G., RESHETNIKOVA, L., CLARK, B. F. C., NYBORG, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, EF-Tu and a GTP analog. *Science* 270: 1464-1472
- OBA, T., ANDACHI, Y., MUTO, A., OSAWA, S. (1991) CGG: An unassigned or nonsense codon in *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 921-925
- OSAWA, S., JUKES, T. H. (1989) Codon reassignment (codon capture) in evolution. *J. Mol. Evol.* 28: 271-278
- OSAWA S., JUKES, T. H., WATANABE, K., MUTO, A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* 56: 229-264
- PECHER, A., ZINONI, F., JATISATIENR, C., WIRTH, R., HENNECKE, H., BÖCK, A. (1983) On the redox control of synthesis of anaerobically induced enzymes in enterobacteriaceae. *Arch. Microbiol.* 136: 131-136
- PLATT, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 339-372
- POLITINO, M., TSAI, L., VERES, Z., STADTMAN, T. C. (1990) Biosynthesis of selenium-modified tRNAs in *Methanococcus vannielii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6345-6348
- POOLE, E. S., BROWN, C. M., TATE, W. P. (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of *in vivo* translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14: 151-158
- POOLE, E. S., MAJOR, L. L., MANNERING, S. A., TATE, W. P. (1998) Translational termination in *Escherichia coli*: three bases following the stop codon crosslink to release factor 2 and affect the decoding efficiency of UGA-containing signals. *Nucleic Acids Res.* 26: 954-960
- RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. (1998) Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156
- REUTER, M. (2000) Funktion von Thiolen und Zink in den Untereinheiten des Proteins C der Glycin-Reduktase von *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- RINGQUIST, S., SCHNEIDER, D., GIBSON, T., BARON, C., BÖCK, A., GOLD, L. (1994) Recognition of the mRNA selenocysteine insertion sequence by the specialized translational elongation factor SELB. *Genes Dev.* 8: 376-385

- ROSENBERG, A. H., GOLDMAN, E., DUNN, J. J., STUDIER, F. W., ZUBAY, G. (1993) Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bacteriol.* 175: 716-722
- ROTHER, M., RESCH, A., GARDNER, W. L., WHITMAN, W. B., BÖCK, A. (2001) Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region. *Mol. Microbiol.* 40: 900-908
- ROTHER, M., WILTING, R., COMMANS, S., BÖCK, A. (2000) Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J. Mol. Biol.* 299: 351-358
- RUDINGER, J., HILLENBRANDT, R., SPRINZL, M., GIEGE, R. (1996) Antideterminants present in minihelix<sup>Sec</sup> hinder its recognition by prokaryotic elongation factor Tu. *EMBO J.* 15: 650-657
- SAIJOH, K., SAITO, N., LEE, M. J., FUJII, M., KOBAYASHI, T., SUMINO, K. (1995) Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. *Mol. Brain Res.* 30: 301-311
- SAITO, H., MIURA, K.-I. (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 72: 619-629
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- SANDMAN, K. E., NOREN, C. J. (2000) The efficiency of *Escherichia coli* selenocysteine insertion is influenced by the immediate downstream nucleotide. *Nucleic Acids Res.* 28: 755-761
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- SAWERS, G. (1994) The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 57-88
- SAWERS, G., HEIDER, J., ZEHELEIN, E., BÖCK, A. (1991) Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J. Bacteriol.* 173: 4983-4993
- SCHMIDT, T. G. M., KOEPKE, J., FRANK, R., SKERRA, A. (1996) Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255: 753-766
- SCHNEIDER, S. U., DE GROOT, E. J. (1991) Sequences of two *rbcS* cDNA clones of *Batophora oerstedii*: structural and evolutionary considerations. *Curr. Genet.* 20: 173-175

- SCHULTZ, D. W., YARUS, M. (1996) On malleability in the genetic code. *J. Mol. Evol.* 42: 597-601
- SEETHARAM, R., HEEREN, R. A., WONG, E. Y., BRAFORD, S. R., KLEIN, B. K., AYKENT, S., KOTTS, C. E., MATHIS, K. J., BISHOP, B. F., JENNINGS, M. J., SMITH, C. E., SIEGEL, N. R., (1988) Mistranslation in IGF-1 during over-expression of the protein in *Escherichia coli* using a synthetic gene containing low frequency codons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 518-523
- SHIMIZU, T., OHTANI, K., HIRAKAWA, H., OHSHIMA, K., YAMASHITA, A., SHIBA, T., OGASAWARA, N., HATTORI, M., KUHARA, S., HAYASHI, H. (2002) Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 996-1001
- SHINE, J., DALGARNO, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1342-1346
- SHISLER, J. L., SENKEVICH, T. G., BERRY, M. J., MOSS, B. (1998) Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science* 279: 102-105
- SÖHLING, B., PARTHER, T., RÜCKNAGEL, K. P., WAGNER, M., ANDREESEN, J. R. (2001) A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism *Eubacterium acidaminophilum*. *Biol. Chem.* 382: 979-986
- SONNTAG, D. (1998) Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Organisation und Transkription der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase-spezifischen Gensätze. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- SOUTHERN, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- SRINIVASAN, G., JAMES, C. M., KRZYCKI, J. A. (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296: 1459-1462
- STADTMAN, T. C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 101-133
- SUGITA, T., NAKASE, T. (1999) Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *System. Appl. Microbiol.* 22: 79-86
- SUN, Q.-A., WU, Y., ZAPPACOSTA, F., JEANG, K.-T., LEE, B. J., HATFIELD, D. L., GLADYSHEV, V. N. (1999) Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.* 274: 24522-24530
- SUPPMANN, S., PERSSON, B. C., BÖCK, A. (1999) Dynamics and efficiency *in vivo* of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *EMBO J.* 18: 2284-2293

- TABOR, S., RICHARDSON, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1074-1078
- TAMURA, T., STADTMAN, T. C. (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1006-1011
- TATE, W. P., MANNERING, S. A. (1996) Three, four or more: the translational stop signal at length. *Mol. Microbiol.* 21: 213-219
- TELFORD, M. J., HERNIOU, E. A., RUSSELL, R. B., LITTLEWOOD, D. T. J. (2000) Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: Two examples from the flatworms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11359-11364
- THANBICHLER, M., BÖCK, A., GOODY, R. S. (2000) Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA. *J. Biol. Chem.* 275: 20458-20466
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680
- TOMB, J.-F., WHITE, O., KERLAVAGE, A. R., CLAYTON, R. A., SUTTON, G. G., FLEISCHMANN, R. D., KETCHUM, K. A., KLENK, H. P., GILL, S., DOUGHERTY, B. A., NELSON, K., QUACKENBUSH, J., ZHOU, L., KIRKNESS, E. F., PETERSON, S., LOFTUS, B., RICHARDSON, D., DODSON, R., KHALAK, H. G., GLODEK, A., MCKENNEY, K., FITZGERALD, L. M., LEE, N., ADAMS, M. D., HICKEY, E. K., BERG, D. E., GOCAYNE, J. D., UTTERBACK, T. R., PETERSON, J. D., KELLEY, J. M., COTTON, M. D., WEIDMAN, J. M., FUJII, C., BOWMAN, C., WATTHEY, L., WALLIN, E., HAYES, W. S., BORODOVSKY, M., KARP, P. D., SMITH, H. O., FRASER, C. M. VENTER, J. C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547
- TORMAY, P., BÖCK, A. (1997) Barriers to heterologous expression of a selenoprotein gene in bacteria. *J. Bacteriol.* 179: 576-582
- TORMAY, P., SAWERS, A., BÖCK, A. (1996) Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol. Microbiol.* 21: 1253-1259
- TORMAY, P., WILTING, R., HEIDER, J., BÖCK, A. (1994) Genes coding for the selenocysteine-inserting tRNA species from *Desulfomicrobium baculatum* and *Clostridium thermoaceticum*: Structural and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 176: 1268-1274
- TORMAY, P., WILTING, R., LOTTSPEICH, F., MEHTA, P. K., CHRISTEN, P., BÖCK, A. (1998) Bacterial selenocysteine synthase. Structural and functional properties. *Eur. J. Biochem.* 254: 655-661

- TUJEBAJEVA, R. M., COPELAND, P. R., XU, X.-M., CARLSON, B. A., HARNEY, J. W., DRISCOLL, D. M., HATFIELD, D. L., BERRY, M. J. (2000) Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Reports* 1: 158-163
- VENDELAND, S. C., BEILSTEIN, M. A., YEH, J.-Y., REAM, W., WHANGER, P. D. (1995) Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8749-8753
- VERES, Z., KIM, I. Y., SCHOLZ, T. D., STADTMAN, T. C. (1994) Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *J. Biol. Chem.* 269: 10597-10603
- VERES, Z., STADTMAN, T. C. (1994) A purified selenophosphate-dependent enzyme from *Salmonella typhimurium* catalyzes the replacement of sulfur in 2-thiouridine residues in tRNAs with selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8092-8096
- VERES, Z., TSAI, L., POLITINO, M., STADTMAN, T. C. (1990) *In vitro* incorporation of selenium into tRNAs of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6341-6344
- VERES, Z., TSAI, L., SCHOLZ, T. D., POLITINO, M., BALABAN, R. S., STADTMAN, T. C. (1992) Synthesis of 5-methylaminomethyl-2-selenouridine in tRNAs: <sup>31</sup>P NMR studies show the labile selenium donor synthesized by the *selD* gene product contains selenium bounded to phosphorus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2975-2979
- VORHOLT, J. A., VAUPEL, M., THAUER, R. K. (1997) A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Mol. Microbiol.* 23: 1033-1042
- VOSKUIL, M. I., VOEPPEL, K., CHAMBLISS, G. H. (1995) The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promotor in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 17: 271-279
- VOSS, S., SKERRA, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10: 975-982
- WAGNER, M. (1997) Untersuchungen zu Proteinkomponenten der substratspezifischen Untereinheit der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- WAGNER, M., SONNTAG, D., GRIMM, R., PICH, A., ECKERSKORN, C., SÖHLING, B., ANDREESEN, J. R. (1999) Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 260: 38-49

- WEINER, M. P., COSTA, G. L., SCHOETTLIN, W., CLINE, J., MATHUR, E., BAUER, J. C. (1994) Site-directed mutagenesis of double stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151: 119-123
- WILLS, N. M., INGRAM, J. A., GESTELAND, R. F., ATKINS, J. F. (1997) Reported translational bypass in a *trpR'-lacZ'* fusion is accounted for by unusual initiation and +1 frameshifting. *J. Mol. Biol.* 271: 491-498
- 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
- WILTING, R., VAMVAKIDOU, K., BÖCK, A. (1998) Functional expression in *Escherichia coli* of the *Haemophilus influenzae* gene coding for selenocysteine-containing selenophosphate synthetase. *Arch. Microbiol.* 169: 71-75
- WITTWER, A. J. (1983) Specific incorporation of selenium into lysine- and glutamate-accepting tRNAs from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 258: 8637-8641
- WITTWER, A. J., CHING, W.-M. (1989) Selenium-containing tRNA<sup>Glu</sup> and tRNA<sup>Lys</sup> from *Escherichia coli*: purification, codon specificity and translational activity. *BioFactors* 2: 27-34
- WITTWER, A. J., STADTMAN, T. C. (1986) Biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-selenouridine, a naturally occurring nucleoside in *Escherichia coli* tRNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 248: 540-550
- WITTWER, A. J., TSAI, L., CHING, W.-M., STADTMAN, T. C. (1984) Identification and synthesis of a naturally occurring selenonucleoside in bacterial tRNAs: 5-[(methylamino)methyl]-2-selenouridine. *Biochemistry* 23: 4650-4655
- WOESE, C. R. (1967) The present status of the genetic code. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 7: 107-172
- WOLSTENHOLME, D. R. (1992) Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2: 918-925
- WYATT, J. R., CHASTAIN, M., PUGLISI, J. D. (1991) Synthesis and purification of large amounts of RNA oligonucleotides. *BioTechniques* 11: 764-769
- YAMAO, F., MUTO, A., KAWAUCHI, Y., IWAMI, M., IWAGAMI, S., AZUMI, Y., OSAWA, S. (1985) UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2306-2309
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119

- ZHAO, L., COX, A. G., RUZICKA, J. A., BHAT, A. A., ZHANG, W., TAYLOR, E. W. (2000) Molecular modeling and *in vitro* activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6356-6361
- 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 H<sub>2</sub> or formate. Description and enzymatic studies. *Arch. Microbiol.* 150: 254-266
- ZINONI, F., BIRKMANN, A., LEINFELDER, W., BÖCK, A. (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3156-3160
- ZINONI, F., BIRKMANN, A., STADTMAN, T. C., BÖCK, A. (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4650-4654
- 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

## 7. Anhang

1 TTTCGCTTTA ATCAAATAGC ACTTCAAAT AAAATGTATT TTGCTTTGAC AACATTATTT TCTATAGCAA TATTATATCA

81 GTGTATTTTT GCAGATAGAT AATTGTGATA TACTCAAATG → **seld1**  
 TGTTAGTCAA TTACGGAGGT GGAAAGATGA AAGGCAGCAA  
 M K G S

161 GGAAATAAAG CTCACACAGA TGGTTACAGC TTCGGGCTGA GCAGCCAAGA TAGGGCCAGA GGATTTGGCC AAGGCGCTTG  
 K E I K L T Q M V T A S G U A A K I G P E D L A K A L

241 TCGGTCTTCC CAAGATGTTT GATGAAAGGC TTCTTGTAGG CTTTGACACT TCTGATGATG CAGCTGTATA TAGATTGGAT  
 V G L P K M F D E R L L V G F D T S D D A A V Y R L D

321 GACGACAAGG CGCTCATTCA GACGCTCGAC TTTTTCACGC CCATGGTGGG TGATCCCTAT CTTTTCGGAC AGATAGCGGC  
 D D K A L I Q T L D F F T P M V D D P Y L F G Q I A

401 GTCAAACCTG CTTTTCGGACG TGTATGCCAT GGTGGGTAAG CCGATAGTTG CTATGAACAT AGTTTGCTTT CCTTCGTGCC  
 A S N S L S D V Y A M V G K P I V A M N I V C F P S C

481 ATGATATGTC AATACTTGGC GAGATACTAA AGGGCGGAGC CGATAAGGTA ATCGAGTCAG GCGCCATTCT TGTAGGAGGG  
 H D M S I L G E I L K G G A D K V I E S G A I L V G G

561 CACACGTCG ATGACAAGGA ACCCAAATAC GGGCTTTCG TGCAGGACT GGTGCATCCT GACAAGGTGC TTGCGAATTC  
 H T V D D K E P K Y G L S V A G L V H P D K V L A N

641 AGGAGCAAGG CCCGGAGATG CGCTGATACT TACAAAACCT ATAGGAACAG GCATAGTAAG CACAGGCATG AAAGCCGCTA  
 S G A R P G D A L I L T K P I G T G I V S T G M K A A

721 TGGTGCAAAA AAGCACTGAG GATGAGGTTG TGAAAATAAT GGCCCATCTA AACAAGTATG CAGCCGAGGC TCTGACGGT  
 M V Q K S T E D E V V K I M A H L N K Y A A E A L D G

801 TTCAATGTTA ATTCGGTTAC AGACATAACC GGCTTTGGAT TCCTGGGGCA CGCAGCTGAG ATGGCCAAGG GCTCGGGAGT  
 F N V N S V T D I T G F G F L G H A A E M A K G S G

881 GACGCTTGAA ATATCCTCAA AGGATATTCC TATAATGTCA GAGGCCGAGG AGCTCGCCAA GATGGGAATA ATCCCGGCC  
 V T L E I S S K D I P I M S E A E E L A K M G I I P A

961 GAATGTACAG GAACAAAAAA TTCATCCAGA GCGATGTGCT TTGCGAGGGT GTAAGCGAGC ACATAATGGA CATCCTGTAT  
 G M Y R N K K F I Q S D V L C E G V S E H I M D I L Y

1041 GATCCTCAGA CCTCGGGAGG CCTGCTGGTA TCAGTTCGCG AGGAGCATGC CAGGGCTCTG GCTGACAAAA TGACAAGCTG  
 D P Q T S G G L L V S V P Q E H A R A L A D K M T S

1121 TGAAGCCTT GCGGCAAAAA TTGTAGGCAG GGTACTGAGC AAGGAAGAAA AGAGCATAAT CGTAATATAA >>>>>>>>  
 C G S L A A K I V G R V L S K E E K S I I V I - GATGGGGCCT

1201 <<<<<<<< <  
 CGAGCCCAT TAGCTTTTTG CAAACGAGAA ATTTAGAGCT TTTGGTGTG GTAAGATTTT TCATGTGTTA TATAATCATA

1281 TATAAAAATA CAATATGAAT GCGAAGGGGT GCAATAAAAC **sela**  
 AAATGGATAA AAGGACGCTT TTTTCAAAC TGCCTTCTGT  
 M D K R T L F S K L P S

1361 AGACAAGATC TTAGGCAATG ACGGCATAAT AGAGCTGGAA AAGGAGTATC CAAGAAGCCT CATAGTCGAG GTCATAAGGG  
 V D K I L G N D G V I E L E K E Y P R S L I V E V I R

1441 AGCAAATAGA ACTTGCCAGA AAGAGGATAC TAGAACTTAA TGAGAGCGAC ATGGAAGGTT TTGACATAGA TGAAGACATA  
 E Q I E L A R K R I L E L N E S D M E G F D I D E D I

1521 CTTATAAACG ATATAGGCCA CCAGCTTAAG CTGAAATATG CGCTAAAAC CAAAAGGCTC ATAAATGCTA CTGGTGTGTG  
 L I N D I G H Q L K L K Y A L K L K R L I N A T G V

1601 GGTACATACG AATCTAGGCA GATCTCCAAT GGCTGAGGAG ATTAAGGAGG ATCTTTGGCT TATCGCCTCG AGATACTCAA  
 V V H T N L G R S P M A E E I K E D L W L I A S R Y S

1681 ACCTCGAATA TGACATAGAA AGTGGCAAGA GAGGCTCGAG GTATTCTCAC CTTGAGGAGA TAGTAAGAAA AATCACAGGA  
 N L E Y D I E S G K R G S R Y S H L E E I V R K I T G

1761 GCAGAAGACG TGCTGTTTGT AAACAACAAT GCGGCCGCCG TAATGCTAGT GCTTGAACA ATGGCGCAAG GCAAGGAGGT  
 A E D V L V V N N N A A A V M L V L G T M A Q G K E

1841 AATAACGTCA AGGGGAGAAC TCGTTGAAAT CGGCGGCTCC TTTAGGATAC CAAGCGTGAT GGAGCAGAGC GGGGCCAAGC  
 V I T S R G E L V E I G G S F R I P S V M E Q S G A K

1921 TTGTGGAGGT TGAACAACCC AACAAAGACGT ACGCCTCTGA TTACGAGGCT GCAATAACTG AAAACACGGG CGCGCTGCTT  
 L V E V G T T N K T Y A S D Y E A A I T E N T G A L L

2001 AAGGTGCATA CTAGCAACTT CAGGGTTGTG GGCTTTACAA ACACCTCTGA GCTGGAGGAG CTAAGGGAGA TAGGCGACAA  
 K V H T S N F R V V G F T N T P E L E E L R E I G D

2081 ATACGATATA CCAGTCATAG AGGATCTTGG AAGCGGTGTG TTCATAGATC TTTCAAAATA TGGCCTTTCA TACGAGCCTA  
 K Y D I P V I E D L G S G V F I D L S K Y G L S Y E P

2161 CTGTTATGGA TTCCCTCAGA AAGGGAGCGG ACATTGTAAC GTTCAGCGGT GACAAGATAC TCGGCGGGCC TCAGGCAGGC  
 T V M D S L R K G A D I V T F S G D K I L G G P Q A G

2241 ATAATAGTCG GAAAGAAAA ATATATAGAC AAGATGAAGA AAAACCAGCT GACAAGAGCG CTCAGGGTGG ACAAGTTCAT  
 I I V G K K K Y I D K M K K N Q L T R A L R V D K F

2321 AATATGTGCG CTTGAAGCAA CAATGAGATA CTACATCGAA GAGGAGATTG CGATAAAGAA AATACCAACG CTTAGGATGC  
 I I C A L E A T M R Y Y I E E E I A I K K I P T L R M

2401 TCACATATAA ATTAGACGAG ATTAAGAAA AGGCGCAAAG GCTAAATGAG ATGATAGGAA GGCTAGGCAT TCCGCTGAA  
 L T Y K L D E I K E K A Q R L N E M I G R L G I P A E

2481 GTCAAAATAG AAGTTGGACA TTCCAGGTA GCGGCGGCC TGCTTCCGCT CGAGAGGATA GAGAGCAGAG TGATATCCAT  
 V K I E V G H S Q V G G G L L P L E R I E S R V I S

2561 AGTTCCTGAA AACATGAGCG TATCAAGGCT CGAAGAGAGC CTCAGGCTTT GTGATGACCA TATTATAGGC AGGTATACG  
 I V P E N M S V S R L E E S L R L C D D H I I G R V Y

2641 ACGAGAAATA CGTAATTGAC GTTAGGACTC TCTTTGACGA AGAATACGAA ATAATATGCA ACCAGCTGAA AAGCATCCTG  
 D E K Y V I D V R T L F D E E Y E I I C N Q L K S I L

2721 GGATAGGGAG GATTGATGA *selB* AGAATATAAT AATAGGAACG GCAGGCATA TAGACCACGG CAAGACGACT CTTATAAAG  
 G - M K N I I I G T A G H I D H G K T T L I K

2801 CCCTCACAGG AAAAGAGACG GACAGACTGA AGGAAGAAAA GAAAAGGGGA ATATCAATAG ACCTTGGCTT CACCAATTTT  
 A L T G K E T D R L K E E K K R G I S I D L G F T N F

2881 GACCTTCCAA GCGGTAAGG GCGGGCATA GTAGACGTTT CCGGGCATGA AAAGTTCATC AAAACATGC TCGCAGGTGT  
 D L P S G K R A G I V D V P G H E K F I K N M L A G

2961 CCACGGCATG GACCTGGTTC TGCTTGTGGT GTCTGCAGAT GAAGGCGTAA TGCCGCAGAC TATAGAGCAT CTTGAGATAC  
 V H G M D L V L L V V S A D E G V M P Q T I E H L E I

3041 TAAACCTCCT GGATATAAAA AAGGGGCTGA TAGTAATCAC AAAGCGACAC ACGGTCGATA CGGATTTCAA GGAGCTTGTA  
 L N L L D I K K G L I V I T K A D T V D T D F K E L V

3121 AAGGAAGACG TCATGAAAA GCTGGAAGGG ACATTCCTTG AAAATGCCGA CATAGTCGAG GTGGACTCAA TAAGCGGCAC  
 K E D V M E K L E G T F L E N A D I V E V D S I S G

3201 AGGCATAAAG GAGCTTACCG AGGAAATAGA CAGGCTCACA GACGAGGTTG AGGATAAAAA TATAGATGCA AATCCAAGAC  
 T G I K E L T E E I D R L T D E V E D K N I D A N P R

3281 TGAGCATAGA CAGGGTATTT AGCATAAAGG GCTTTGGAAC TGTAAGTACA GGCACGCTCA TCGAGGGCAA GATGAACCTT  
 L S I D R V F S I K G F G T V V T G T L I E G K M N L

3361 GACGATGACA TGATGATATA CCCTGGCGAG ATAAAGACTA AGATAAGGAG TCTCCAGGTA CACGGAGAAT CACAAAAAAT  
 D D D M M I Y P G E I K T K I R S L Q V H G E S Q K

3441 TGCATACGCA GGACAAAGGG TTGCTATAAA TCTGGCAAAC GTAAGAGTGG AGGAAATAGA AAGAGGCGAT GACTGCGCAA  
 I A Y A G Q R V A I N L A N V R V E E I E R G D V L A

3521 AGCCGAATTC AATGCAAAGC TCCATGATGA TAGATGTAAG GCTAAAGCTT ATAAAAAACC TGGACAGAGG CCTGAGATAC  
 K P N S M Q S S M M I D V K L K L I K N L D R G L R Y

3601 TGGGACAGGA TAAGACTTTA TCATGGGGCA AAGGAAATAC TCGGCAGGGT GCGGTTTCTT GACCGAGAAG AGCTTGCGCC  
 W D R I R L Y H G A K E I L G R V A F L D R E E L A

3681 GGGCGAAGAA TGTTTCTGCC AGATAAGACT CGAGGATACG ATAGTTGCAA AAAAAGACGA CAGATTTGTT ATAAGGTACT  
 P G E E C F C Q I R L E D T I V A K K D D R F V I R Y

3761 ACTCCCCTAT GATTACAGTG GGAGGAGGTG CAATAATAGA CACTAATCCA AAAAAACACA AGAGGTTTGA CGAGGATGTG  
 Y S P M I T V G G G A I I D T N P K K H K R F D E D V

3841 CTCAGCTCGC TCAACATGAA GGAAAGCGGA GACCCGAGT TTGTAGTGGA AGAAAACATA AGGACTAACT CAAAGGATTA  
 L S S L N M K E S G D P Q F V V E E N I R T N S K D

3921 TCCGGTGCTC AAGGAAATAG CCAAGTCGCT CGGAGAGAAT GAGGATATAG TGCTGGAAAA CATAAAGGGC CTTGTGGCAA  
 Y P V L K E I A K S L G E N E D I V L E N I K G L V A

```

4000 GCGGGCGAGT GATAGACATA AACGGAACCT ACATTCACCT GGAGCATTAT GACAGGCTAA GACAAAAGAT ATGCAGCACA
      S G R V I D I N G T Y I H L E H Y D R L R Q K I C S T
4081 CTGGAGGAGT TTCATAAAG CAATAGGCTT AAAAGGGGCA TGCTCAAGGA GGAGCTGCGC TCAAGAGTTG AGAGCAAGTT
      L E E F H K S N R L K R G M L K E E L R S R V E S K
4161 AAAGAGCAAG GATTTGATA TATTGCTTGA ACGGGTTGCA GCAGACAAAG AGATAAAGAT TGAAGAAAAT CTGGCTTCAA
      L K S K D F D I L L E R V A A D K E I K I E E N L A S
4241 TAAGCAGCTT TAGCGTAAAA TTCAGTGATT CTGATATTAA AATAAGGCAG GAAATAGAAG ACACAATCAG GCAGGGCGGA
      I S S F S V K F S D S D I K I R Q E I E D T I R Q G G
4321 TTTTCGCCGG AGCAGATTGA CGTTATAACA GGCGAGAGGT CCGAATATAT TCAGGTGTTC GAGTCAATGG TGGGCGAAAC
      F S P E Q I D V I T G E R S E Y I Q V F E S M V G E
4400 GCTTGTAAAG GTGTCTGAAG AACTGTATT CCATAAGGAG ATATATGAAA AGGCTCTCGA CCTGCTCAGG GATCACGTTT
      T L V R V S E D T V F H K E I Y E K A L D L L R D H V
4481 AAAAAACCG AGAAATTACG CTTGCTGAAT TCAGGGACAT GATAGGCGCC AGCAGGAAAT ACGCCATGCT TTTGCTTGAG
      Q K N G E I T L A E F R D M I G A S R K Y A M L L L E
4561 GATTTGACA GGAAGAGGAT TACAAGAAG ATAGGGGAAA AGCGGGTCCT TTCATAGGCA TGCAGTCATT AAATCAATCA
      D F D R K R I T R R I G E K R V L S -
>>>>>>>> >>>> >> << <<<<<<<<<< <<<<<
4641 GGAAAGAGGC GCGGCATCGG CATAAAGAC GCTGCGCTTC TTTCTCTATT AAAAATAATA AAGCTGCCTA CGTATGGTAT
                                                                                                     →
4721 GAAATAAATT ATAGATATTT TATATATTTA TGGGTTGAAT ATCAAAAAG CTTATGATAT AATAAGTTTT GTTCAGCAAG
      selC
4801 AGAATTTGGG AGTAGATGGG TGCTGGTGTG CCCTCTGGTC TTCAAACCA GTTCGGGGGG TTAAGAGCCT CCTGGGTGGG
                                                                                                     >>>> >>>>>>>>>> <<<< <<<<<<<<<<<
4881 TTCGATTCCC ACATATCCC GCCAATTATG TAAATTAAGG CTTTAACCAA ACAGTGTGG TTGAAGTCTT TTTTGTAA
4961 TATGAATAAA AAACATTTTG TTTTGTGTT TTCTGCGGTG TATTTGTAT AATCATAAA AAGTCTTTAT TTATTCTTCG
5041 TATTGATATA AAATTATCTT GTGCATGTAC CGAAATGAAA TTAATTAAGT AAAGCACAGT GCAACGGATA ATTTGCCGCT
5121 GAGGGTATAT AATTATGCGG AACGGTTTTT GGATTCGATT TTAATTTAT TTTTTGAAA CTGGCTCAA AATGTTATAA
5200 AATAAGTAGT GGCATCAAA AAGTCGAAA AGTTTGATTA TTTTAATTAA TCGGCTTTTA CAATAAAAA TAATACATAA
      ackA'
5281 TAATCGAGGA GGCATTATAA ATGAACGTTT TAGTAATAAA CTGCGGAAGT TCTTCGCTAA AGTACCAGCT TATCAATATG
      M N V L V I N C G S S S L K Y Q L I N M
5361 CAAAATGAAG AGGTTCTAGG AAAAGGCCTT GTAGAGAGAA TAGGAATAGA AGGCTCAAAG CTTACTCATG AGGCTGCCGG
      Q N E E V L G K G L V E R I G I E G S K L T H E A A
5441 CAAGAAAATA GTAATAGAAG ATC
      G K K I V I E D

```

**Abb. 38: DNA-Sequenz der *selDIABC*-Genregion aus *E. acidaminophilum*.** Gezeigt ist der nicht-codierende Strang in 5'-3'-Richtung. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code unter der dritten Base des entsprechenden Codons angegeben. Start-Codons und mögliche Ribosomen-Bindestellen sind fett hervorgehoben. Promotorelemente (-10-, -16- und -35-Regionen) wurden unterstrichen, durch *primer extension* identifizierte Startpunkte der Transkription durch Pfeile (→) über dem entsprechenden Nukleotid markiert. Die tRNA<sup>Sec</sup>-codierende Sequenz ist doppelt unterstrichen. Pfeilspitzen (>>> <<<) über der Sequenz kennzeichnen potentielle Rho-unabhängige Terminatorstrukturen. Beginnend mit der Ribosomen-Bindestelle des *selD1*-Gens ist die gezeigte Sequenz in der EMBL-Datenbank unter der *accession number* AJ245960 eingetragen.

# Danksagung

Dr. Brigitte Söhling möchte ich vor allem dafür danken, dass sie mein Interesse für die faszinierende Problematik der 21-ten Aminosäure, Selenocystein, geweckt hat. Ihre konstruktiven Vorschläge, die ständige Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt die zahlreichen Drittmittel-Anträge haben wesentlich zur vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. J. R. Andreesen, der mir die Tätigkeit an seinem Institut ermöglichte, die vorliegende Arbeit immer mit großem Interesse verfolgte und sich stets für seine Mitarbeiter engagierte, um ihnen den Weg zu einem gewissen Amt zu ersparen.

Die motivierende, humorvolle und stets freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor 211 half entscheidend dabei, so manche (kleine) wissenschaftliche Krise zu überwinden. Deshalb möchte ich mich hier herzlich bei Claudia Hammerschmidt, Kathrin Fritsche, Denise Sonntag, Martin Kohlstock, Tina Parther, Claudia Keil, Christoph Happe, Andre Lechel, Michael Reuter, Daniel Gröbe, Rüdiger Bos, Anja Pöhlein und Jana Jäger bedanken.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Böck sowohl für die zahlreichen *E. coli*-Mutanten, die uns von seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden, als auch für die Ermöglichung eines Gastaufenthaltes am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Bedanken möchte ich mich auch bei Michael Rother, der mir während dieser Zeit bei meinen ersten *in-vitro*-Transkriptions-Versuchen und Gelretardations-Experimenten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Grit Schleuder und Ute Lindenstrauß danke ich für die vielen Sequenzierungen, Dr. Karl-Peter Rücknagel und Dr. Angelika Schierhorn für die Bestimmung des Molekulargewichts einiger Proteine. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Erhard Jöx für die tatkräftige Unterstützung bei technischen Problemen.

Allen hier nicht genannten Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und manchen guten Ratschlag.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und vor allem bei Jana für ihre vielfältige Unterstützung und Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Halle, den 11. 07. 2002

Torsten Gursinsky

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Torsten Gursinsky  
Geburtsdatum: 29. 06. 1971  
Geburtsort: Meißen

## Schulbildung

09. 1978 - 08. 1988 allgemeinbildende polytechnische Oberschule in Radeburg und Ponickau  
09. 1988 - 08. 1990 Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Grundwehrdienst

09. 1990 - 09. 1991 Grundwehrdienst in Bautzen und Kamenz

## Studium und berufliche Tätigkeit

10. 1991 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studiengang Biochemie/Biotechnologie  
09. 1993 Vordiplomprüfung in den Fächern Biochemie, Allgemeine und Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Naturstoffchemie, Allgemeine Biologie, Physik  
09. 1995 Diplomprüfung in den Fächern Allgemeine Biochemie, Enzymologie, Organische Chemie, Genetik, Immunologie  
10. 1995-09. 1996 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema: "Klonierung, Sequenzierung und Analyse von Genen des Selenocystein-Einbaus in Proteine von *Eubacterium acidaminophilum*"  
10. 1996-11. 1999/  
03. 2000-03. 2001/  
seit 04. 2002 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der vorliegenden Dissertation

Halle, den 11. 07. 2002