

**Molekulare und biochemische Untersuchungen zu Komponenten der D-Prolin-Reduktase und Glycin-Reduktase von *Clostridium sticklandii* :
Analyse der Pyruvyl-bildenden Proenzyme GrdE und PrdA der Glycin und D-Prolin-Reduktase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Brit Eversmann

geb. am 01.12.1975 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. J.R. Andreesen
2. Prof. Dr. H. Bahl
3. Prof. Dr. W. Buckel

Verteidigung: 01. September 2004, Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000007551

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007551>]

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden	7
2.1.1 Organismen und Plasmide	7
2.1.2 Medien und Stammhaltung	10
2.1.3 Medienzusätze	13
2.1.4 Anzucht von <i>C. sticklandii</i> im 100-l-Fermenter	14
2.1.5 Zellernte	14
2.1.6 Zentrifugation	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	15
2.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	15
2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren	16
2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-DNA (BERTRAM & DÜRRE 1989, mod.)	16
2.2.3.2 Plasmid-DNA-Präparation	16
2.2.3.3 Reinigung von DNA-Fragmenten	17
2.2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA	17
2.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA	18
2.2.4.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	18
2.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (SAMBROOK et al. 1989, mod.)	18
2.2.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.2.5 Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	18
2.2.6 Übertragung von DNA	18
2.2.6.1 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation	18
2.2.6.2 Transformation von <i>C. sticklandii</i> - und <i>E. acidaminophilum</i> -Zellen durch Elektroporation	19
2.2.6.3 Konjugation zwischen <i>E. coli</i> und <i>C. sticklandii</i> nach PURDY et al. (2002)	20
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.2.8 Zielgerichtete Mutagenese	21
2.2.8.1 Cycle-PCR-Mutation	21
2.2.8.2 <i>overlap-extension</i> -PCR	21
2.2.9 DNA-Sequenzierung	22

2.2.10	RT-PCR	22
2.2.11	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch <i>primer extension</i>	23
2.3	Proteinchemische Methoden	23
2.3.1	Herstellung von Proteinrohextrakt	23
2.3.2	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)	24
2.3.3	Elektrophoretische Methoden zu Proteintrennung	24
2.3.3.1	SDS-PAGE (LAEMMLI 1970)	24
2.3.3.2	Native Gradienten-PAGE	25
2.3.4	Färben und Trocknen von Polyacrylamidgelen	26
2.3.5	Transfer von Proteinen auf Membranen (TOWBIN et al. 1979, mod.)	26
2.3.6	Dialyse und Einengen von Proteinlösungen	26
2.3.7	Chloroform-Methanol-Fällung (WESSEL & FLÜGGE 1984)	27
2.3.8	Fällung mit Trichloressigsäure	27
2.3.9	Chemische Modifikation von Proteinen	27
2.3.9.1	Markierung mit Fluorescein-Thiosemicarbacid (FTSC)	27
2.3.9.2	Modifikation durch o-Phenylendiamin (DIXON & FIELDS 1972)	27
2.3.10	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	28
2.3.11	Bestimmung von Kofaktoren	28
2.4	Überexpression von Proteinen	28
2.4.1	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	28
2.4.2	Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt	29
2.4.4	Affinitätschromatografie an <i>StrepTactin</i> ®-Sephrose	29
2.5	<i>In vitro</i> Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE	30
2.6	Methoden zur Anreicherung von Proteinen der D-Prolin-Reduktase	30
2.6.1	Aktivitätsmessung der D-Prolin-Reduktase	30
2.6.2	Messung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität mittels Mikrotiterplattentest	31
2.6.3	Messung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität im nativen Gel	31
2.6.4	PrdC-Nachweis	31
2.6.5	Voraussetzungen für die Anreicherung Sauerstoff-empfindlicher Proteine	31
2.6.6	Säulenchromatographie	32
2.6.7	Anreicherung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase	32
2.6.8	Anreicherung von PrdC	33
2.7	Immunologische Methoden	34
2.7.1	Herstellung von PrdC zur Immunisierung	34
2.7.2	Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen PrdC	35
2.7.3	Aufreinigung von Antikörpern (SAMBROOK et al., 1989)	35
2.7.4	PrdC-Proteinnachweis durch Doppelimunpräzipitation (BLAKE et al. 1984)	35
2.7.5	Immunpräzipitation	36

2.8	Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität	37
2.8.1	Zellanzucht	37
2.8.2	Aktivitäts-Bestimmung (MILLER 1992, mod.)	37
2.9	Materialien, Chemikalien und Enzyme	38
3	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	40
3.1	Einfluss von Mutationen konservierter Aminosäuren auf die <i>in vitro</i> Spaltung von GrdE	40
3.1.1	Einführung von Mutationen	40
3.1.2	<i>In vitro</i> Spaltung der GrdE-Mutanten	41
3.1.3	Einfluss der Proteine GrdA, TrxA und TrxB aus <i>E. acidminophilum</i> auf die <i>in vitro</i> Spaltung von GrdE	42
3.2	Bestimmung der Spaltdomäne	44
3.2.1	Konstruktion der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine	44
3.2.2	Expression und Reinigung der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine	45
3.2.3	<i>In vitro</i> Spaltung der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine	46
3.3	Koexpression von PrdA und GrdE mit anderen Proteinen des Prolin- und Glycin-Reduktase-Operons	48
3.3.1	Versuche zur Expression des gesamten Proproteins PrdA	48
3.3.2	Expression von PrdA und GrdE mit PrdBDE und GrdAB	48
3.3.2.1	Klonierung der <i>prdAB</i> -, <i>prdABDE</i> -, <i>prdAD</i> - und <i>prdDE</i> -Gene in pASK-IBA 5	49
3.3.2.2	Klonierung der <i>grdEB</i> - und <i>grdEAB</i> -Gene in pASK-IBA 5	51
3.3.2.3	Expression der PrdABDE-Konstrukte als <i>Strep</i> -tag II-Fusion	53
3.3.2.4	Expression der GrdEAB-Konstrukte als <i>Strep</i> -tag II-Fusion	54
3.4	Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins der D-Prolin-Reduktase	55
3.4.1	Anreicherung von PrdC durch Säulenchromatografie mit Hilfe von polyklonalen α PrdC-Antikörpern	55
3.4.1.1	Vorversuche mit polyklonalen α PrdC Antikörpern	55
3.4.1.2	Vorversuche zur Anreicherung von PrdC durch Säulenchromatographie	56
3.4.1.3	Anreicherung von PrdC	57
3.4.2	Messung der D-Prolin-Reduktase mit PrdC als Elektronentransferprotein	58
3.4.3	Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums	59
3.4.4	Weitere Versuche zur Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins	60
3.4.4.1	Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins durch Messung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase- und der NADH-DH-Aktivität	60
3.4.4.2	Anreicherung von PrdC durch Immunpräzipitation	61

3.5 Untersuchungen zur Transkription der <i>prdXR</i>-Gene	62
3.5.1 <i>primer extension</i> -Analysen der <i>prdXR</i> -Gene	62
3.5.2 Nachweis eines gemeinsamen Transkriptes durch RT-PCR	64
3.6 Untersuchungen zur Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons	65
3.6.1 Konstruktion der <i>lacZ</i> -Fusionen	65
3.6.2 β -Galactosidase-Aktivitäten der Fusions-Konstrukte	66
3.7 Transformationsexperimente mit <i>C. sticklandii</i>	68
3.7.1 Untersuchung der Antibiotika-Sensitivität von <i>C. sticklandii</i>	69
3.7.2 Reinheitskontrolle mittels PCR bzw. Nachweis von Plasmiden in <i>C. sticklandii</i>	70
3.7.3 Elektroporationsexperimente	70
3.7.4 Elektropermeabilitätsmessungen mit elektroporierten <i>C. sticklandii</i> -Zellen	72
3.7.5 Konjugationsexperimente	73
4 DISKUSSION	75
4.1 Analyse von GrdE-Mutanten	75
4.2 GrdE und PrdA in der Gruppe der Pyruvyl-Enzyme	79
4.3 Expression und <i>in vitro</i> Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE	85
4.4 Analyse der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine	87
4.5 Reinigung des elektronentransferierenden Proteins PrdC der D-Prolin-Reduktase	88
4.6 Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons	95
4.7 Entwicklung eines Transformationssystems für <i>C. sticklandii</i>	100
4.8 Ausblick	105
5 ZUSAMMENFASSUNG	107
6 LITERATURVERZEICHNIS	110
ANHANG	126

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	
A	Ampere	
AHT	Anhydrotetracyclin	
Amp	Ampicillin	
APS	Ammoniumpersulfat	
L-AspDC	L-Aspartat-1-Decarboxylase	
bp	Basenpaar(e)	
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>	
BCP	Biotin-Carrier-Protein	
C	Cytosin	
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>	
Cm	Chloramphenicol	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
dest.	destilliert	
DMF	Dimethylformamid	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DSMZ	Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	
DTT	Dithiothreitol	
E	Extinktion	
<i>E.</i>	<i>Escherichia; Eubacterium</i>	
EBP	<i>enhancer binding protein</i>	
ELE	<i>enhancer like elements</i>	
Em	Erythromycin	
et al.	et alteri (und andere)	
FTSC	Fluorescein-Thiosemicarbacid	
G	Guanin	
Glc-6-P(-DH)	Glucose-6-Phosphat(-Dehydrogenase)	
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-carboxylsäure	
HisDC	Histidin-Decarboxylase	
IHF	<i>integration host factor</i>	
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid	
KP	Kaliumphosphat	
LB	Luria-Bertani	
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure	
M	Molekulargewichtsmarker	
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure	
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-phenyltetrazoliumbromid	bi-

OD	Optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galactosid
o-PDA	ortho-Phenylendiamin
PEG	Polyethylenglykol
PhSerDC	Phosphatidylserin-Decarboxylase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	resistent
RBS	Ribosomenbindestelle
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Saccharomyces; Salmonella; Staphylococcus</i>
S-AdMetDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SL	Stammlösung
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tri-(carboxyethyl)-phosphin-hydrochlorid
TE	Tris-EDTA
TED	Tris-EDTA-DTT-Puffer
TEMED	N,N,N,N,'-Tetramethylethylendiamin
Th	Thiamphenicol
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität [μ mol/min]
UE	Untereinheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactosid

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors (2004)“ des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

1 Einleitung

Die D-Prolin-Reduktase und die Glycin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii* werden der Gruppe der Pyruvyl-Enzyme zugeordnet (VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998; PERLER 1998). Die Charakteristik aller Pyruvyl-Enzyme ist eine α -Untereinheit, die aminoterminal eine Pyruvyl-Gruppe trägt. Die α -Untereinheit und die Pyruvyl-Gruppe entstehen durch die posttranslationale Spaltung eines Proproteins, der π -Untereinheit. Die Pyruvyl-Enzyme werden in Pyruvyl-haltige Decarboxylasen und Pyruvyl-haltige Reduktasen unterteilt. Erstere katalysieren Decarboxylierungen von Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten (Histidin, S-Adenosyl-Methionin, Phosphatidyl-Serin, L-Aspartat), während die Pyruvyl-haltigen Reduktasen Reduktionen von Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten (Glycin, Prolin, Sarkosin) katalysieren. Die D-Prolin-Reduktase und der Protein B-Komplex der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* gehören zur Gruppe der Pyruvyl-haltigen Reduktasen (KABISCH et al. 1999; GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001).

Das stäbchenförmige Bakterium *Clostridium sticklandii* ist Gram-positiv (STADTMAN & McCLUNG 1957), strikt anaerob und wächst auf Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle. Es wird daher den proteolytischen Clostridien zugeordnet (ANDREESEN et al. 1989; HIPPE et al. 1991; COLLINS et al. 1994). Die Aminosäuren werden paarweise in einer "Stickland-Reaktion" vergoren (STICKLAND 1934), wobei eine Aminosäure als Elektronendonator dient, d.h. oxidiert wird, und deren frei werdende Elektronen auf die zweite Aminosäure, den Elektronenakzeptor, übertragen werden, die somit reduziert wird (STADTMAN & McCLUNG 1957). *C. sticklandii* verwendet Serin, Threonin, Arginin, Lysin und Alanin als Elektronendonatoren, während als Elektronenakzeptoren nur Prolin und Glycin dienen können (UHDE 1990). Prolin wird durch die D-Prolin-Reduktase zu δ -Aminovalerat umgesetzt (STADTMAN & SETO 1976; KABISCH et al. 1999) und Glycin wird durch die Glycin-Reduktase zu Acetylphosphat und Ammonium umgesetzt (STADTMAN 1978; TANAKA & STADTMAN 1979; ARKOWITZ & ABELES 1989; ARKOWITZ & ABELES 1991; ANDREESEN 1994 & 2004). Sind beide Elektronenakzeptoren Prolin und Glycin im Medium vorhanden, läuft die Reduktion des Prolins bevorzugt ab und der Glycin-Abbau wird unterdrückt (UHDE 1990), obwohl für die Prolin-Reduktion kein energiekonservierender Schritt nachgewiesen werden konnte, die Glycin-Reduktion jedoch mit einer Energiekonservierung verbunden ist (ARKOWITZ et al. 1994). *C. sticklandii* ist nicht in der Lage, Glycin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, im Gegensatz zu den verwandten Organismen *Eubacterium acidaminophilum* und *Clostridium litorale* (ZINDEL et al. 1988; DIETRICH et al. 1991; UHDE 1990).

Die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde isoliert und charakterisiert (ABELES et al., 1994; SETO & STADTMAN 1976; SETO 1980a; KABISCH et al. 1999). Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten mit einer nativen Molekülmasse von 870 kDa. Die 45 kDa-Untereinheit (45 kDa-UE) und die 23 kDa-Untereinheit (23 kDa-UE) gehen aus dem 68 kDa PrdA-Protein, codiert durch das *prdA*-Gen, durch posttranslationale Spaltung hervor. Das 26 kDa PrdB-Protein (26 kDa-UE) enthält Selen in Form von Selenocystein und wird durch das *prdB*-Gen codiert. Die 23 kDa-UE enthält N-terminal eine Carboxyl-Funktion vermutlich in Form der Pyruvyl-Gruppe, welche das Substrat D-Prolin bindet (KABISCH et al. 1999).

Die Reduktion eines Prolin-Moleküls (Abb. 4.1) beginnt mit der Bindung des Prolins an die 23 kDa-UE in Form eines Adduktes (Schiff'sche Base) zwischen dem N-Atom des Prolins und der Pyruvyl-Gruppe. Die C-N-Bindung des Prolins wird polarisiert und der nukleophile Angriff des Selenol-Anions der 26 kDa-UE am C α -Atom des Prolins führt zur Ringspaltung. Das entstandene Intermediat zwischen PrdB und Prolin wird durch die Oxidation der gemischten Selenol-Thiol-Gruppe des PrdB gespalten, gleichzeitig wird das an die 23 kDa-UE gebundene Prolin zum δ -Aminovalerat-Addukt reduziert. Das δ -Aminovalerat wird von der Pyruvyl-Gruppe der 23 kDa-UE durch Hydrolyse freigesetzt (KABISCH et al. 1999). Der natürliche Elektronendonator für die Reduktion der gemischten Selenid-Sulfid-Gruppe von PrdB ist NADH (SETO 1980a). Gereinigte D-Prolin-Reduktase konnte nur noch DTT als Elektronendonator nutzen (KABISCH et al. 1999) und es konnte nicht geklärt werden, wie die zur Spaltung des D-Prolins nötigen Elektronen zur D-Prolin-Reduktase übertragen werden. Es gab Hinweise darauf, dass die benötigten Elektronen möglicherweise über ein im D-Prolin-Reduktase-Operon stromaufwärts von *prdA* liegendes putativ elektronentransferierendes Protein PrdC auf die D-Prolin-Reduktase übertragen werden (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999). Das Gen *prdC* codiert für ein Protein mit deutlichen Homologien zu Elektronen-transferierenden Proteinen und enthält eine NAD- sowie eine FMN-Bindestelle und weist eine theoretische Masse von 42 kDa auf.

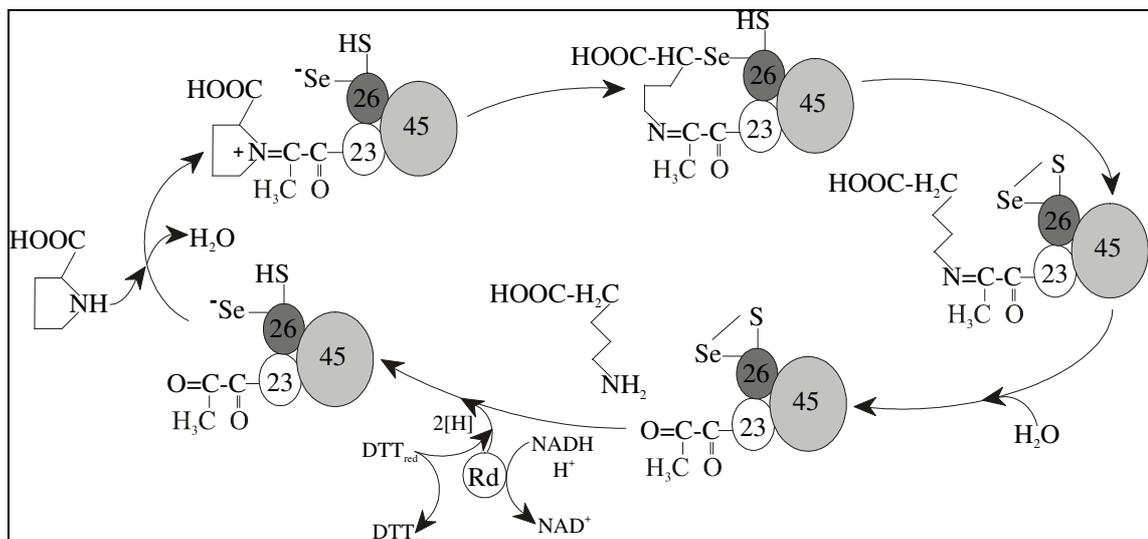


Abb. 4.1: Postulierte Reaktionsmechanismen zur reduktiven Spaltung Prolin durch die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (KABISCH et al. 1999). 26, 45 und 23: 26, 45 und 23 kDa-Untereinheiten; Rd: Reduktase.

Die Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* besteht aus dem Selenoprotein A, dem Substrat-spezifischen Protein B-Komplex und Protein C. Der Protein B-Komplex der Glycin-Reduktase weist hohe Homologien zur D-Prolin-Reduktase auf und besteht ebenfalls aus drei Untereinheiten (WAGNER et al. 1999). Die Gene *grdE* und *grdB* kodieren für das 47 kDa GrdE-Proprotein und für das 47 kDa GrdB-Protein, welches ein Selenocystein enthält (GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001). Das GrdE-Proprotein wird posttranslational in die 25 kDa-Untereinheit und die aminoterminal blockierte 22 kDa-Untereinheit gespalten. Der blockierte N-Terminus wird durch die Substrat-bindende Carbonylfunktion vermutlich in Form einer Pyruvyl-Gruppe verursacht (WAGNER 1997, WAGNER et al. 1999).

Die Reduktion von Glycin (Abb. 4.2) beginnt mit der Bindung an das 47 kDa GrdB-Protein des Protein B-Komplexes. Die N-C-Bindung des Glycins wird polarisiert und das C_{α} -Atom des gebundenen Glycins wird nucleophil durch das Selenol-Anion des Selenocysteins der 47 kDa-UE angegriffen. Die N-C-Bindung wird gespalten, und es entsteht ein Carboxymethyl-Selenoether, welcher vom Selenoprotein A in Form eines erneuten Carboxymethyl-Selenoethers übernommen und auf die Proteine C übertragen wird (WAGNER 1997). Wahrscheinlich wird der am Selenoprotein A gebundene Carboxymethyl-Rest während der Übertragung in einen Protein C-gebundenen Acetylthioester (STADTMAN 1989; ARKOWITZ & ABELES 1989; ARKOWITZ & ABELES 1990) überführt. Die dabei am Selenoprotein A oxidierte Selenid-Sulfid-Gruppierung wird durch das NADPH-abhängige Thioredoxin-System wieder reduziert (DIETRICH et al. 1991). Der an die Proteine C gebundene Acetylthioester wird phosphoroklastisch zu Acetylphosphat gespalten, welches durch die Acetat-Kinase in Acetat und ATP überführt wird (ARKOWITZ & ABELES 1989; ARKOWITZ & ABELES 1990; ARKOWITZ & ABELES 1991; STADTMAN & DAVIS 1991; SCHRÄDER & ANDREESEN 1992; KOHLSTOCK et al. 2001).

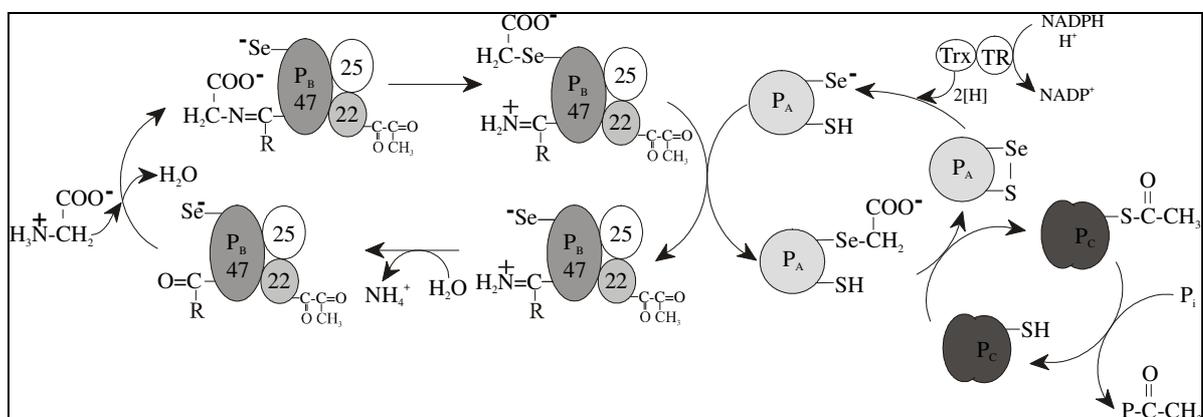


Abb. 4.2: Postulierte Reaktionsmechanismen zur reduktiven Spaltung Glycin durch die Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (WAGNER et al. 1999). P_B: 47, 25 und 22: 47, 25 und 22 kDa-Untereinheiten des Substrat-spezifischen Protein B-Komplexes; P_A: Selenoprotein A; P_C: Proteine C; Trx: Thioredoxin; TR: Thioredoxin-Reduktase.

Die beiden Pyruvyl-haltigen Reduktasen, die D-Prolin-Reduktase und die Glycin-Reduktase, aus *C. sticklandii* weisen starke Ähnlichkeiten auf. Bei den Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen erfolgt die posttranslationale Spaltung des Proproteins aminoterminal an einem Serin-Rest durch Serinolyse. Sie sind ubiquitär verbreitet und in ihrer Aminosäuresequenz sehr uneinheitlich, jedoch wird trotz der Unterschiede der gleiche Reaktionsmechanismus der Proprotein-Spaltung vermutet (VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998). Eine N-terminal verkürzte Form des PrdA-Proproteins und das GrdE-Proprotein aus *C. sticklandii* konnten *in vitro* mit 200 mM NaBH₄ gespalten werden (BEDNARSKI et al. 2001). Das GrdE-Proprotein wurde durch Cysteinolyse an dem Schlüssel-Cystein-Rest (Cys²⁴²) gespalten, jedoch fehlte die katalytisch aktive Pyruvyl-Gruppe am neu gebildeten N-Terminus. Untersuchungen mit GrdE-Proprotein-Mutanten, bei denen die Spaltstelle Cys²⁴² gerichtet zum Alanin, Serin und Threonin mutiert war, zeigten keine Spaltung der Alanin-Mutante und eine verzögerte Spaltung der Serin- und Threonin-Mutante (BEDNARSKI et al. 2001).

Zur Reduktion des Prolins durch die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* sind Reduktionsäquivalente erforderlich, welche die während der Reaktion gebildete gemischte Selenid-Sulfid-Gruppe wieder reduzieren (KABISCH et al. 1999; Abb. 4.1). Im Rohextrakt kann Prolin mit den Reduktionsmitteln NADH oder DTT reduziert werden, über einen DTT-Test angereicherte D-Prolin-Reduktase vermag Prolin nur noch mit DTT zu reduzieren, jedoch wurde NADH als natürlicher Elektronendonator nachgewiesen. Es gab Hinweise, dass flavin- und eisenhaltige Proteinkomponenten für die Elektronenübertragung vom NADH auf die D-Prolin-Reduktase verantwortlich sind (STADTMAN 1965; SCHWARTZ & MÜLLER 1979; SETO 1980a) und nicht das zur Glycin-Reduktion verwendete NADPH-abhängige Thioredoxin-System (SCHWARTZ & MÜLLER 1979; MEYER 1993). Stromaufwärts des *prdA*-Genes liegt im D-Prolin-Reduktase-Operon das Gen *prdC* (Abb. 4.3), welches eine elektronentransferierende Funktion übernehmen könnte (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999). Das *prdC*-Gen kodiert für ein Protein, für das signifikante Sequenzhomologien zum RnfC-Protein aus *Rhodobacter capsulatus* gefunden wurden. RnfC überträgt Elektronen auf die Nitrogenase (SCHMEHL et al. 1993; KUMAGAI et al. 1997).

Weitgehend unbekannt ist die Regulation der D-Prolin-Reduktase. Die stromaufwärts von *prdC* gelegenen Gene *prdX* und *prdR* (Abb. 4.3) könnten an der Regulation der Transkription der Gene beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription des D-Prolin-Reduktase-Operons von der Verfügbarkeit von Prolin im Medium abhängt (KABISCH et al. 1999) und dass die Transkription an einem σ^{54} -abhängigen Promotor vor *prdC* beginnt (LIEBMANN 1999). PrdR könnte den potentiellen Aktivator und PrdX den möglichen Repressor bilden. PrdR weist hohe Homologien zu regulatorischen Proteinen der *enhancer binding protein*-Familie (EBP) vom NifA-Typ auf (LIEBMANN

1999). PrdX zeigt schwache Homologien zu Transkriptionsregulatoren mit *helix-turn-helix*-Motiven, die vermutlich als Repressor wirken (A. PICH pers. Mitteilung).

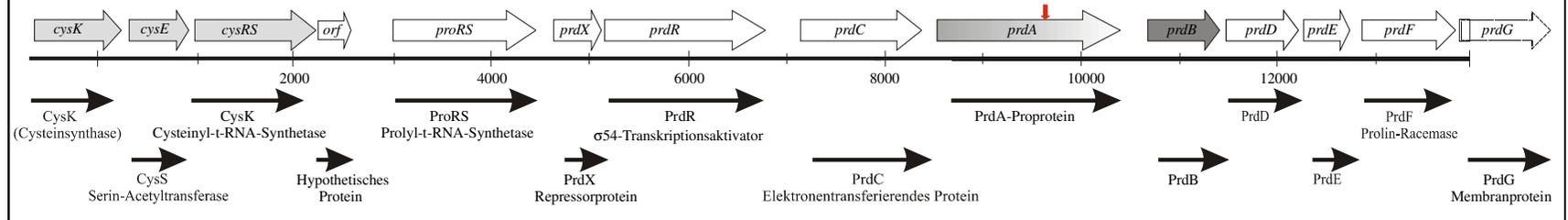
Die D-Prolin-Reduktase wurde in *C. sticklandii*, *Clostridium sporogenes* und anderen Clostridien nachgewiesen (SETO 1980; ANDREESEN 1994 & 2004), des weiteren konnte ein D-Prolin-Reduktase-Operon bei den pathogenen Bakterien *Clostridium difficile* und *Clostridium botulinum* durch die Genomsequenzierung am Sanger-Center (http://www.sanger.ac.uk:80/Projects/C_difficile; http://www.sanger.ac.uk:80/Projects/C_botulinum) identifiziert werden. Alle drei bekannten D-Prolin-Reduktase-Operone in *C. sticklandii*, *C. difficile* (Abb. 4.3) und *C. botulinum* (Abb. A1 im Anhang) weisen hohe Homologien hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Gene, der posttranslationalen Spaltung des PrdA-Proproteins sowie des Vorkommens der Proteine PrdD und PrdE auf (Abb. 4.3; Abb. A1 im Anhang). Weiterhin zeigt das PrdC-Protein aller drei Organismen hohe Homologien zu RnfC und ist wohl das elektronentransferierende Protein und das PrdR-Protein ist bei allen drei der putative Regulator der Gene der D-Prolin-Reduktase. Lediglich die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde bisher angereichert und charakterisiert (KABISCH et al. 1999)

Das Ziel dieser Arbeit war, die Proproteine PrdA der D-Prolin-Reduktase und GrdE des Protein-B-Komplexes der Glycin-Reduktase hinsichtlich des Spaltungsmechanismus der Cysteinolyse weiter zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher durch Mutanten, bei denen konservierte Aminosäuren im Bereich der Cystein-Spaltstelle mutiert sind, bezüglich der Cysteinolyse analysiert werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen zur nötigen Mindestgröße des Spaltbereiches von PrdA und GrdE unternommen werden. Aufgrund der wenigen Daten zum Elektronentransport zur D-Prolin-Reduktase über ein oder mehrere redoxaktive Proteine sowie zur Regulation der D-Prolin-Reduktase, sollten diese Parameter proteinchemisch und molekularbiologisch analysiert werden. Das elektronentransferierende Protein sollte dazu angereichert und charakterisiert werden und die Regulation mit Hilfe von Transkriptionsfusionen erforscht werden. Zudem war es Ziel der Arbeit, ein Transformationssystem für *C. sticklandii* zu entwickeln, mit dem z. B. Funktionen zur Genregulation genauer analysiert oder komplex aufgebaute Proteine, wie die D-Prolin-Reduktase von *C. sticklandii*, homolog exprimiert und analysiert werden könnten.

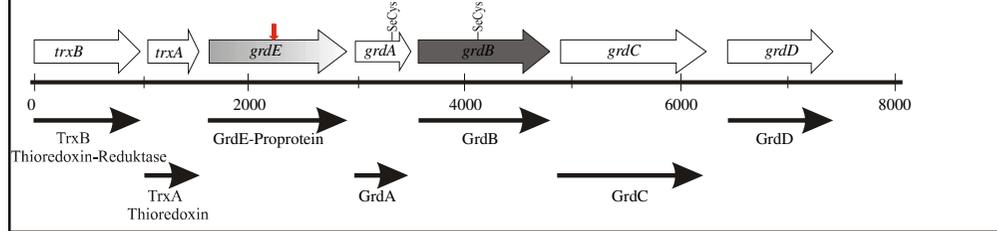
Abbildung folgende Seite:

Abb. 4.3: Operonstruktur der D-Prolin-Reduktase (A), der Glycin-Reduktase (B) aus *C. sticklandii* (Kabisch et al. 1999; Liebmann 1999; Gräntzdörffer 1997; GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001) und der D-Prolin-Reduktase (C) aus *C. difficile* (http://www.sanger.ac.uk:80/Projects/C_difficile).

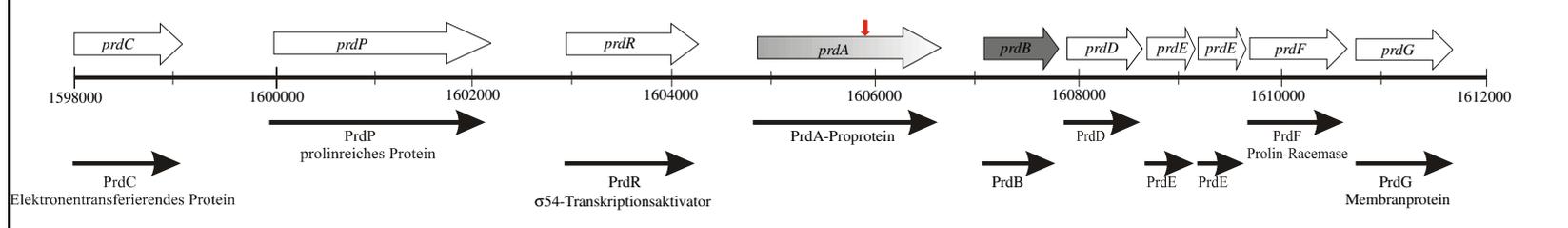
A) D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii*



B) Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii*



C) D-Prolin-Reduktase aus *C. difficile*



2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden

2.1.1 Organismen und Plasmide

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

Tabelle 2.1: Stämme für molekularbiologische Untersuchungen

Bakterienstämme	Beschreibung ¹	Referenz
<i>Eubacterium acidaminophilum</i> al-2 (DSM 3953 ^T)	Wildtyp	ZINDEL et al. 1988
<i>Clostridium sticklandii</i> HF (DSM 519 ^T)	Wildtyp	STADTMAN & MCCLUNG 1957
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q \Delta\Delta M15 Tn10 (Tc^R)]$	STRATAGENE
<i>E. coli</i> XL1 Blue	$hsdR17 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q \Delta\Delta M15 Tn10 (Tc^R)]$	STRATAGENE
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	$F' ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm^+ Tc^R gal (DE3)$	STRATAGENE
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Codon-Plus-RIL	$F' ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm^+ Tc^R gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^R]$	STRATAGENE
<i>E. coli</i> CA434	$hsdS (r_B^- m_B^-) supE44 thi-1 recAB ara-14 leuB5proA2 lacY1 galK rpsL20 (str^R) xyl-5 mtl-1 (pACYC184::Sau5)$ mit konjugativen Plasmid R702 (Tc ^R , Sm ^R , Su ^R , Hg ^R , Tra ⁺ , Mob ⁺)	PURDY et al. 2002

Tabelle 2.2: Plasmide für molekularbiologische Untersuchungen

Plasmid	Beschreibung¹	Referenz
pBluescript SK+	Amp ^R , <i>lacPOZ</i>	STRATAGENE
pUC19	Amp ^R , <i>lacPOZ</i>	YANNISCH-PERRON et al. 1985
pASK-IBA 3	f1-IG, <i>bla</i> , <i>tet</i> repressor, ori, <i>tet</i> ^{P/O} , polylinker, <i>Strep</i> -tag II, t _{ipp} ,	Institut für Bioanalytik
pASK-IBA 5	f1-IG, <i>bla</i> , <i>tet</i> repressor, ori, <i>tet</i> ^{P/O} , <i>Strep</i> -tag II, polylinker, t _{ipp} ,	Institut für Bioanalytik
pUBS520	ArgU-exprimierender Vektor mit pACYC-Origin (5,3 kb); Km ^R , <i>lacI</i> , <i>dnaY</i>	BRINKMANN 1990
pT-Trx	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trx in pACYC, T7 Promotor, Cm ^R	YASUKAWA et al. 1995
pT-GroE	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> GroESL in pACYC, T7 Promotor, Cm ^R	YASUKAWA et al. 1995
pGrdES3	<i>grdE</i> (1,2 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 3	BEDNARSKI 1999
pFUS3	<i>malE</i> (1,1 kb) von <i>E. coli</i> und <i>trxA</i> (0,3 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pFUE	<i>grdE</i> (1,2 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE1	<i>grdE</i> -Fragment (27 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE2	<i>grdE</i> -Fragment (33 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE3	<i>grdE</i> -Fragment (39 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE4	<i>grdE</i> -Fragment (42 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE5	<i>grdE</i> -Fragment (51 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE6	<i>grdE</i> -Fragment (64 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE7	<i>grdE</i> -Fragment (87 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUE8	<i>grdE</i> -Fragment (303 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUA1	<i>prdA</i> -Fragment (24 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUA2	<i>prdA</i> -Fragment (48 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUA3	<i>prdA</i> -Fragment (48 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUA4	<i>prdA</i> -Fragment (72 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUA5	<i>prdA</i> -Fragment (129 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pFUA6	<i>prdA</i> -Fragment (651 bp) von <i>C. sticklandii</i> in pFUS3	diese Arbeit
pPrdB ^(U/C) S5	<i>prdB</i> ^(U/C) (0,73 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pPrdAB ^(U/C) S5	<i>prdAB</i> ^(U/C) (2,9 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pPrdAB ^(U/C) DES5	<i>prdAB</i> ^(U/C) DE (4,2 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2.2

Plasmid	Beschreibung ¹	Referenz
pPrdA_DS5	<i>prdA</i> (2,1 kb) und <i>prdD</i> (0,76 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pPrdA_DES5	<i>prdA</i> (2,1 kb) und <i>prdDE</i> (1,25 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pPrdDS5	<i>prdD</i> (0,76 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pPrdDES5	<i>prdDE</i> (1,25 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pPrdES3	<i>prde</i> (0,47 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 3	diese Arbeit
pPrdDES3	<i>prdDE</i> (1,25 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 3	diese Arbeit
pGrdB ^(U/C) S5	<i>grdB^(U/C)</i> (1,3 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pGrdE_B ^(U/C) S5	<i>grdE</i> (1,3 kb) und <i>grdB^(U/C)</i> (1,3 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pGrdEABS5	<i>grdEAB</i> (3,1 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pASK-IBA 5	diese Arbeit
pASBC4	<i>selB</i> , <i>selC</i> aus <i>E. acidaminophilum</i> in pACYC184	GURSINSKY 2002
pUC19	Amp ^r , <i>lacPOZ</i> [*]	NEB
pLACZ	<i>lacZ</i> (3,1 kb) von <i>E. coli</i> in pUC19	diese Arbeit
pRZ	<i>prdR</i> (1,7 kb) von <i>C. sticklandii</i> in pLACZ	diese Arbeit
pS54Z	putativer σ^{54} -Promotor von <i>C. sticklandii</i> in pLACZ	diese Arbeit
pIMP1	Shuttle-Vektor (4,8 kb); Amp ^R , Em ^R , ColE1- / pIM13-Origin	MERMELSTEIN et al. 1992
pIMP1:: <i>tetL</i>	Shuttle-Vektor (6,8 kb); Amp ^R , Em ^R , Tc ^R , ColE1- / pIM13-Origin	BÖHRINGER 1997
pIMP1TH	Shuttle-Vektor (4,9 kb); Amp ^R , Th ^R , ColE1- / RepL-Origin	GREEN & BENNETT 1998
pMTL500E	Shuttle-Vektor (6,43 kb); Amp ^R , Em ^R , ColE1- / pAM β 1-Origin	OULTRAM et al. 1988
pJIR418	Shuttle-Vektor (7,36 kb); Cm ^R , Em ^R , ColE1- / pIP404-Origin	SLOAN et al. 1992
pJIR750	Shuttle-Vektor (6,57 kb); Cm ^R , ColE1- / pIP404-Origin	BANNAM & ROOD 1993
pJIR751	Shuttle-Vektor (5,95 kb); Em ^R , ColE1- / pIP404-Origin	BANNAM & ROOD 1993
pSYL2	Shuttle-Vektor (8,7 kb); Tc ^R , Em ^R , ColE1- / pCBU2-Origin	LEE et al. 1992
pSYL7	Shuttle-Vektor (9,2 kb); Tc ^R , Em ^R , ColE1- / pJU122-Origin	LEE et al. 1992

Fortsetzung Tabelle 2.2

Plasmid	Beschreibung ¹	Referenz
pMS4	Shuttle-Vektor (10,99 kb); Tc ^R , ColE1- / pAMβ1-Origin	STRÄTZ 1991
pMTL9301C	Em ^R , Cm ^R , RK2 ori T, pCD6 replicon (RepA)	PURDY et al. 2002

¹Relevante Merkmale: Amp^R: Ampicillin-Resistenz; Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz; Em^R: Erythromycin-Resistenz; Km^R: Kanamycin-Resistenz; Sm^R: Streptomycin-Resistenz; Tc^R: Tetracyclin-Resistenz; Th^R: Thiamphenicol-Resistenz; Tp^R: Trimethoprim-Resistenz

2.1.2 Medien und Stammhaltung

Alle Nährmedien oder ihre Zusätze wurden bei 121 °C für 25 min autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität sterilfiltriert. Für Nähragar-Platten wurde BACTO-AGAR (1,5 %) der Fa. DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA verwendet.

Die für die anaerobe Anzucht von *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* benötigten Medien wurden nach der Hungate-Technik (HUNGATE 1950, BRYANT 1972) hergestellt und unter einer Stickstoffatmosphäre abgekühlt.

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

Die Stammhaltung von *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* erfolgte anaerob in Hungate-Röhrchen mit Butyl-Gummi-Septen (Fa. Bellco Glass Inc. Vineland, New Jersey, USA). Kulturen im Maßstab von 50 ml bis 500 ml wurden in Schraubverschlussflaschen (Fa. Maag, Hübendorf) mit Gummisepten (Fa. Müller & Krempel, Zürich, Schweiz) kultiviert. 14tägig wurden die Kulturen 10%ig in frisches Nährmedium überimpft, bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die anaerobe Plattenkultivierung von *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* erfolgte bei 30 °C auf anaerob hergestellten Nähragarplatten unter anaeroben Bedingungen.

Stammkulturen von *E. coli* wurden durch Zugabe von Glycerin (25 %) zu logarithmisch wachsenden Kulturen hergestellt und bei -80 °C gelagert. Die Reinheit der Bakterienstämme wurde durch Ausstrich auf Nähragarplatten bzw. mikroskopisch untersucht.

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

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

Zur Herstellung von LB-Agar wurden 1,5 g Agar pro 100 ml Medium zugesetzt.

M9 Minimalmedium für *E. coli*

Glucose	5	g
Na ₂ HPO ₄	6	g
KH ₂ PO ₄	3	g
NH ₄ Cl	1	g
NaCl	0,5	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,12	g
CaCl ₂	0,01	g
Thiamin (20 mg/ml)	1	ml
H ₂ O dest	ad 1000	ml

Minimalmedium für *C. sticklandii* (UHDE 1990)

L-Serin	2,1	g	20	mM
L-Threonin	2,4	g	20	mM
L-Arginin	3,5	g	20	mM
L-Lysin-HCl	3,65	g	20	mM
L-Histidin	0,47	g	3	mM
L-Tyrosin	0,02	g	0,11	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2	g	0,81	mM
NH ₄ Cl	0,5	g	9,3	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (10 g/l)	1	ml	68	µM
Kaliumphosphat(KP)puffer (1 M; pH 7,0)	10	ml	10	mM
Aminosäure-Stammlösung 2	20	ml		
Spurenelementlösung SL A	1	ml		
Vitaminlösung ^a	5	ml		
NaHCO ₃ (84 g/l) ^a	10	ml	10	mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O (60 g/l) ^a	5	ml	1,25	mM
Resazurin (1 g/l)	1	ml		
H ₂ O dest	ad 980	ml	pH 6,8 - 6,9	

Das Medium wurde zunächst bis zum Farbumschlag des Indikators gekocht, anschließend unter Stickstoff-Begasung auf Eis abgekühlt. Danach wurde es in Serumflaschen und Hungate-Röhrchen gefüllt und autoklaviert.

^a Die Stammlösungen wurden in abgekochtem Wasser separat angesetzt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert und dem Medium nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Der pH-Wert wurde nach Zugabe dieser Bestandteile auf 7,2 - 7,4 bestimmt.

Aminosäure-Stammlösung 2

L-Valin	2,93	g
L-Leucin	3,28	g
L-Isoleucin	3,28	g
L-Prolin	2,88	g
L-Cystein	3,03	g
L-Methionin	3,73	g

L-Phenylalanin	4,13	g
L-Tryptophan	5,11	g
L-Glutamat	3,68	g
L-Glutamin	3,66	g
L-Asparagin	3,75	g
H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Bei Zugabe von 20 ml Aminosäure-Stammlösung 2 zu 980 ml Medium lagen alle in der Stammlösung enthaltenen Aminosäuren in einer Konzentration von 0,5 mM vor.

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

HCl (25 %)	10	ml		
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5	g	7,5	µM
ZnCl ₂	0,07	g	0,51	µM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1	g	0,51	µM
H ₃ BO ₃	0,006	g	0,097	µM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19	g	0,8	µM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002	g	0,012	µM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024	g	0,1	µM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036	g	0,15	µM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,033	g	0,1	µM
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,263	g	1	µM
NaVO ₃ x H ₂ O	0,014	g	0,1	µM
H ₂ O dest.	ad 1000	ml		

FeCl₂ wurde zunächst in HCl (25 %) vollständig gelöst. Danach erfolgte die Zugabe der übrigen Salze. Bei Zugabe von 1 ml auf 1 l Medium lagen die Spurenelemente in den angegebenen Konzentrationen vor.

Vitaminlösung (GENTHER et al. 1981, mod.)

Pantothersäure	50	mg
Riboflavin	50	mg
Pyridoxamin-HCl	10	mg
D-(+)-Biotin	20	mg
Folsäure	20	mg
Nicotinsäure	25	mg
Nicotinamid	25	mg
α-Liponsäure	60	mg
p-Aminobenzoesäure	50	mg
Thiamin-HCl	50	mg
Vitamin B ₁₂	50	mg
H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

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

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

^a Diese Komponente wurde dem Medium vor dem Animpfen der Zellen steril zugesetzt.

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

Medium für *E. acidaminophilum* (ZINDEL et al. 1988, mod.)

Glycin	3,76	g	50	mM
20x Salzlösung	50	ml		
Spurenelementlösung SL A	1	ml		
Resazurin (1 mg/ml)	1	ml	1	mg/l
D-(+)-Biotin (1 mg/l)	0,1	ml	0,1	mg/l
Na ₂ S x 9 H ₂ O (60 mg/ml)	10	ml	2,5	mM
NaHCO ₃ (84 g/l)	50	ml	50	mM
H ₂ O dest.	ad 1000	ml		

^a Die Stammlösungen wurden in abgekochtem Wasser separat angesetzt, autoklaviert (Biotin nur 10 min bei 121 °C) und dem Medium nach dem Autoklavieren steril zugegeben, anschließend wurde der pH-Wert mit steriler 1 N HCl zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

20x Salzlösung

KH ₂ PO ₄	4	g	1,5	mM
NaCl	20	g	17	mM
KCl	10	g	6,7	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10	g	2	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3	g	1	mM
NH ₄ Cl	5	g	3,5	mM

2.1.3 Medienzusätze

Bei Bedarf wurden den Medien die in Tabelle 2.3 angeführten Zusätze beigemischt.

Tabelle 2.3: Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung ¹	Konzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in H ₂ O dest.	125 µg/ml
Tetracyclin	25 mg/ml in 50 % Ethanol	12,5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O dest.	40 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	35 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H ₂ 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 ₂ O dest.	40 µg/ml

¹ Die Stammlösungen wurden jeweils steril angesetzt und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.1.4 Anzucht von *C. sticklandii* im 100-l-Fermenter

Für die Bereitstellung größerer Mengen an Zellmaterial von *C. sticklandii* für Proteinreinigungen kam ein 100-Liter-Fermenter (UD 100 K, B. Braun Biotech International, Melsungen) zum Einsatz. Dieser war als Vorraussetzung für den anaeroben Betrieb so umgebaut, dass er sich nach dem Autoklavieren mit Stickstoff begasen ließ.

Während der Zellanzucht bei 30 °C wurden die Kulturen mit 30 bzw. 50 Upm gerührt. Als Vorkultur für den 100-l-Fermenter diente ein 10-l-Fermenter, der 15%ig aus Serumflaschen angeimpft wurde.

2.1.5 Zellernte

Die Kulturen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Kleinere Volumina wurden in einem SS 34 Rotor in einer Sorvall-Zentrifuge 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C geerntet und direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Größere Kulturvolumina von *C. sticklandii* wurden mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge Biofuge 28 RS (Haereus, Hanau) bei 17.000 rpm geerntet (Fluss ca. 50 l/h), in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.6 Zentrifugation

Sofern nicht anders beschrieben, wurden bei Arbeiten mit Nukleinsäuren und Zellextrakten die in Tabelle 2.4 aufgeführten Zentrifugen und Rotoren genutzt.

Tabelle 2.4: Zentrifugen und Rotoren

Zentrifuge (Hersteller)	Gefäß	Rotor	Geschwindigkeit [rpm]
Universal 30 RF und	SS 34-Röhrchen	1415	11.000
EBA 12 R	Eppendorf-Reaktionsgefäß	1412	bis 15.000
(Hettich, Tuttlingen)	Greiner-Röhrchen	1424A	bis 5.000
Zentrifuge RC 5B (Sorvall, Hanau)	500-ml-Polypropylenflaschen	GS-3	8.000
	SS 34-Röhrchen	SS 34	20.000

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen für 25 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 96%igem (v/v) Ethanol behandelt oder abgeflammt, hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

<u>TE-Puffer</u> :	Tris/HCl (pH 8,0)	10	mM
	EDTA	1	mM

<u>50 x TAE-Puffer:</u> (SAMBROOK et al. 1989)	Tris/HCl, pH 7,5	242	g
	EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100	ml
	Eisessig	57	ml
	H ₂ O dest.	ad 1000	ml

<u>Stopp-Lösung:</u>	Glycerin	50	ml
	EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40	ml
	Bromphenolblau	20	mg
	H ₂ O dest.	ad 100	ml

2.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Abtrennung von Proteinen aus DNA-Lösungen erfolgte eine Extraktion mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1). Die Phasen wurden durch Schwenken gut gemischt und zur Phasentrennung für 2 min bei 12 000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde sorgfältig abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. 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 °C, nach 15-minütiger Zentrifugation (15 000 g, 4 °C) wurde das Pellet

mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und nach dem Trocknen in H₂O dest. aufgenommen.

2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

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

3 g *C. sticklandii*-Zellen wurden in 10 ml Saline-EDTA-Puffer (SE-Puffer, pH 8,0: 0,15 M NaCl; 0,1 M EDTA) suspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 10 mg Lysozym, gelöst in 1 ml SE-Puffer, zugegeben und der Ansatz mindestens 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Proteinase K-Lösung (2,5 mg/ml) in 1x Standard-Saline-Citrat-Puffer (10x SSC-Puffer, pH 7,0: 1,5 M NaCl, 0,15 M Na₃-Citrat) sowie 0,5 ml SDS (25 % [w/v]) zugegeben. Klarte die Lösung noch nicht auf, erfolgte nochmals eine Zugabe von 0,5 ml SDS. Es wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 5 M Na-Perchlorat bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugesetzt. Daran schloss sich eine zweimalige Extraktion mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) an. Zur Phasentrennung wurde jeweils 20 min bei 4 000 x g zentrifugiert. Nach der zweiten Extraktion wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1,5 Volumen 96%igem (v/v) Ethanol überschichtet. Die Probe wurde gemischt und 20 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Die ausgefallene DNA wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 ml 0,1 x SSC gelöst. Die Lösung wurde mit 0,75 ml RNase-Lösung (DNase-frei: 2 mg/ml RNase A; 1mg/ml RNase T1; 0,15 M NaCl, pH 5,0) versetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Proteinase K-Lösung und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde zunächst die SSC-Konzentration durch Zugabe von 10 x SSC auf 1 x SSC erhöht und der Ansatz nochmals einer Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen (s. o.). Die DNA wurde mit 2 Volumen Ethanol gefällt, 20 min bei 13 000 x g zentrifugiert, mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 5 ml 0,1 x SSC-Puffer gelöst. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 ml 7 M Ammoniumacetat und 0,8 Volumen Isopropanol umgefällt, 20 min bei 13 000 x g abzentrifugiert und mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und in 100 µl-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurden photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt. Ein ΔA_{260} -Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg DNA pro ml (SAMBROOK et al. 1989). Zusätzlich wurde die Qualität der DNA durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen überprüft.

2.2.3.2 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde in kleinem Maßstab (3 ml-Kulturen) mit Hilfe des „Spinprep-Kits“ oder im größeren Maßstab (25 ml-Kulturen) mit dem „Midiprep-Kits“ (beide QIAGEN, Hilden) gereinigt.

Um schnell eine große Anzahl von *E. coli*-Klonen in Bezug auf ihren Plasmidgehalt zu überprüfen wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* nach BIRNBOOM & DOLY (1979, mod.) präpariert. Das Zellsediment aus 1,5 bis 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurde in 100 µl Suspendierungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 1 % Saccharose) gelöst. Es folgten die Zugabe von 200 µl frisch angesetzter alkalischer SDS-Lösung (10 % SDS; 0,2 M NaOH), vorsichtiges Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Nach Zugabe von 100 µl Kalium-Acetat-Lösung (3 M Kalium-Acetat, pH 4,8), vorsichtigem Mischen und 5 min Inkubation auf Eis wurde bei 4 °C und 20 000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die darin befindliche DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und anschließend mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 20 bis 30 µl TE-Puffer oder H₂O dest. aufgenommen.

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration und deren Reinheit erfolgten photometrisch bei 260 und 280 nm. Ein ΔA_{260} -Wert gleich 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg DNA pro ml (SAMBROOK et al.1989). Eine grobe Abschätzung der Konzentration von Plasmiden oder PCR-Produkten konnte auch durch visuellen Vergleich der Bandenintensitäten mit zirkulärer oder linearer Plasmid-DNA bekannter Konzentration im Agarose-Gel erreicht werden.

2.2.3.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmentgemische wurden im Agarosegel elektrophoretisch getrennt, die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert.

PCR-Produkte, die z.B. für Klonierungszwecke oder zur direkten Sequenzierung eingesetzt werden sollten, wurden zur Abtrennung von Primern und Nucleotiden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden) gereinigt.

2.2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *C. sticklandii* wurde mit dem „RNeasy Total RNA KIT“ (QIAGEN, Hilden) isoliert. Die Zellen aus einer 10 ml einer *C. sticklandii*-Kultur, welche am Ende der logarithmischen Phase geerntet wurden, wurden in 100 µl Lysozymlösung (20 mg/ml TE-Puffer) suspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der angegebenen Vorschrift. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.4.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde in mindestens 10 µl pro µg DNA für 1 - 15 h bei der für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur durchgeführt. Das Spalten der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen. Es wurden pro µg DNA 1 - 10 U Enzym eingesetzt.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (SAMBROOK et al. 1989, mod.)

Um eine Selbstligation restriktionsverdauter Vektor-DNA zu vermeiden, wurde diese einer Dephosphorylierung am 5'-Ende durch Einsatz von Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) unterzogen. Die Reaktion wurde direkt im Restriktionsansatz nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligationen wurden jeweils 0,1-1 µg Vektor- und Insert-DNA eingesetzt und diese in 10 bis 20 µl-Ansätzen mit Zugabe von Ligase-Puffer (10fach, ATP-enthaltend) und 1 U T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 16 °C über Nacht ligiert. Vor dem Einsatz einer Elektroporation wurde der Ansatz einer 30-minütigen Mikrodialyse auf Membranfilter mit einer Porengröße von 0,025 µm (Millipore GmbH, Eschborn) gegen H₂O dest. unterzogen.

2.2.5 Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1 – 2%igen Agarosegelen (SAMBROOK et al.1989) in TAE-Puffer. Die Probe wurde vor dem Auftragen mit 0,3 Vol. Stopp-Lösung versetzt. Als Größenstandard kamen die DNA-Marker „*Smart Ladder*“ (Eurogentec, Seraing, Belgien) und „*GeneRuler*TM 50 bzw. 100 bp DNA Ladder“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zum Einsatz. Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in Wasser) gefärbt und nach kurzer Wässerung mit einem Videodokumentationssystem (TFX-20.M, MWG Biotech, München) fotografiert.

2.2.6 Übertragung von DNA

2.2.6.1 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen von *E. coli* XL 1 Blue MRF' wurden wie bei AUSUBEL et al. (1994) beschrieben hergestellt. Die Zellen wurden in einer 10%igen Glycerinlösung

resuspendiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert. Unmittelbar vor der Transformation wurden $40\text{-}\mu\text{l}$ -Aliquots auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von $1\text{-}10\text{ }\mu\text{l}$ DNA-Lösung in gekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: $0,2\text{ cm}$; Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) überführt. Nach 1 min Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation durch einen einfachen Puls bei $25\text{ }\mu\text{F}$, $2,5\text{ kV}$, 200 W mittels Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die dabei erreichte Feldstärke betrug $12,5\text{ kV/cm}$, die Zeitkonstante $4,7\text{ ms}$. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h schüttelnd inkubiert und 10 bzw. $100\text{ }\mu\text{l}$ des Ansatzes auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert.

2.2.6.2 Transformation von *C. sticklandii*- und *E. acidaminophilum*-Zellen durch Elektroporation

Alle Schritte wurden in einer Anaeroben-Box (Coy Laboratories Inc., Vertrieb durch Toepffer, Adelberg) im Kühlraum durchgeführt. Alle benötigten Puffer und Geräte waren anaerob hergestellt bzw. behandelt und wurden vor Benutzung mindestens einen Tag in der Anaeroben-Box gelagert. Medium ($10\text{ - }50\text{ ml}$) wurde mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft, bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und in der Anaeroben-Box in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet. Das Pellet wurde zwei- bis viermal mit Elektroporationspuffer (s. 3.7.4) gewaschen, darin aufgenommen und anschließend wurden je $40\text{-}200\text{ }\mu\text{l}$ in Elektroporationsküvetten mit $1\text{-}4\text{ mm}$ Elektrodenabstand (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) gegeben, mit ca. $0,2\text{ - }1\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid versetzt und mit einem Stromstoß behandelt. Nach dem Stromstoß wurden die Zellen sofort in Minihungates (Ochs, Bovenden) mit $1,5\text{ ml}$ Regenerationsmedium (Minimal-Medium für *C. sticklandii*, Glycin-Medium für *E. acidaminophilum*) gegeben. Die elektroporierten Zellen wurden zur Ausprägung der Resistenz mindestens drei Stunden bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und schließlich auf entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen. Zur Bestimmung der Überlebensrate während der Elektroporation wurden Proben direkt nach der Zugabe des Regenerationspuffers entnommen und je $100\text{ }\mu\text{l}$ einer 10^{-4} -Verdünnung auf Medien ohne Antibiotika ausgestrichen. Zum Vergleich wurde eine Probe der nicht-elektroporierten Zellen herangezogen, die bis auf den Stromstoß exakt gleich behandelt wurde. Die Platten wurden in Wittschen Töpfen (Oxoid, Basingstoke, England) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und nach $2\text{ - }4$ Tagen ausgewertet.

Elektropermeabilitätsmessung

Die Permeabilität von Zellwänden und Membranen bei der Elektroporation ist durch ATP-Freisetzung ins Medium gekennzeichnet. Sie wurde für *C. sticklandii*- und *E. acidaminophilum*-Zellen durch eine ATP-getriebene Luziferin/Luziferase-Reaktion mit Hilfe des „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ (Roche, Mannheim) nach der Methode von Sixou et al. (1991) und Tardif et al. (2001) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen entsprechend vorbereitet und elektroporiert (s. o.). Exakt 1 min nach dem Elektropuls wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension entnommen, mit $80\text{ }\mu\text{l}$ Puffer (100 mM Tris-

Acetat-Puffer, pH 7,7) gemischt und zu 100 µl Luciferase-Reagenz gegeben. Die freigesetzte ATP-Menge wurde an einem Turner BioSystems Luminometer TD-20/20 (Promega, Mannheim) gemessen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die mit Toluol völlig aufgeschlossen waren.

2.2.6.3 Konjugation zwischen *E. coli* und *C. sticklandii* nach PURDY et al. (2002)

Für Konjugationsexperimente wurde der *E. coli*-Donorstamm CA434 mit dem zu übertragenden Plasmid pMTL9301C in LB-Medium aerob über Nacht angezogen. Ein 1 ml Aliquot wurde 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert und das Zellpellet wurde in der Anaerobenbox mit 1 ml sterilem anaeroben PBS-Puffer (1,5 mM KH₂PO₄; 4,2 mM Na₂HPO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 100 ml einer über Nacht in Minimal-Medium gewachsenen *C. sticklandii*-Kultur aufgenommen. In der Anaerobenbox wurde dieses *mating*-Gemisch auf gut getrocknete Minimal-Medium-Agarplatten in 10 µl-Tropfen verteilt und bei 30 °C 7 h anaerob inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 x 0,5 ml PBS-Puffer von der Agarplatte gewaschen. Das Konjugationsgemisch wurde auf Minimal-Medium-Platten mit Erythromycin (400 ng/ml) ausplattiert und anaerob bei 30 °C über 3 Tage inkubiert. Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe in Minimal-Medium und zur Bestimmung der Donorzellzahl in LB-Medium hergestellt. Zur Bestimmung der Rezipientenzellzahl wurde auf Minimal-Medium-Platten ohne Antibiotikum ausplattiert.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Deckelheizung (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) durchgeführt, die Oligonukleotide (Anhang, Tabelle 1) wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Ein 100 µl-Standardansatz enthielt folgende Komponenten:

10x Reaktionspuffer (inkl. MgCl ₂)	10	µl
Primer	je 10-100	pmol
dNTPs	0,2	mM
Template-DNA	30-100	ng
DNA-Polymerase	1	U

Für Standard-PCRs wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet, während für PCRs, deren Amplifikate für Klonierungen genutzt wurden, *PfuTurbo* DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt wurde, die eine *proof-reading*-Aktivität aufweist.

Zur vollständigen Denaturierung der Template-DNA wurde der Ansatz 2 min auf 95 °C erhitzt. Gleichzeitig wurden dadurch unspezifische DNA-Primer-Hybridisierungen vermieden. Es wurden 30 Zyklen mit folgenden Schritten durchgeführt:

Denaturierung	30 s bei 95 °C
Annealing	30 s bei 45 - 60 °C

Extension 1 - 4 min bei 72 °C

Abschließend wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt und die PCR-Produkte im Agarosegel analysiert, weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Die Temperatur bei der Primeranlagerung ist abhängig von deren Länge und Nukleotidzusammensetzung. Sie wurde nach BERTRAM & GASSEN (1991) so gewählt, dass sie etwa 5 °C unter der Primer-Schmelztemperatur (T_m) lag, die sich wie folgt berechnen lässt:

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

2.2.8 Zielgerichtete Mutagenese

2.2.8.1 Cycle-PCR-Mutation

Die Einführung von Mutationen (Austausch oder 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. Die 50 µl-Standardansätze hatten folgende Zusammensetzung:

10x Reaktionspuffer (inkl. MgCl ₂)	5	µl
Primer	25	pmol
dNTP's	0,2	mM
Template	100	ng
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2,5	U

Die einzelnen Komponenten wurden dabei wie für die Standard-PCR-Reaktion mit *Pfu*-DNA-Polymerase beschrieben (2.2.7) zusammengegeben. Der Ansatz wurde 2 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 50 - 60 °C
Extension	4-12 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 wurden 5 µl des Ansatzes durch Elektroporation (2.2.6.1) transformiert.

2.2.8.2 overlap-extension-PCR

Da nicht bei allen Aminosäureaustauschen die Cycle-PCR-Mutation angewandt werden konnte, wurde die Methode der *overlap-extension-PCR* angewendet. Von der zu mutie-

renden Region wurde je der forward-(mutP-f) und revers-Primer (mutP-r) abgeleitet, die in ihrer Mitte den Basenaustausch tragen. In einer ersten PCR wurde zunächst mutP-r mit einem N-terminalen und mutP-f mit einem C-terminalen Primer kombiniert und die amplifizierten Produkte mit *DpnI* verdaut. Anschließend wurden die beiden *DpnI*-behandelten PCR-Produkte durch Gel-Extraktion gereinigt und dienten als Template in einer zweiten PCR, in der nur die N- und C-terminalen Primer eingesetzt wurden. Das resultierende PCR-Produkt wurde abschließend in den gewünschten Vektor kloniert.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte durch Anwendung der von SANGER (1977) entwickelten Kettenabbruchmethode mittels "dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Langen) nach den Anweisungen des Herstellers im TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen). Die Analyse erfolgte mit Hilfe des automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers ABI PRISM 377 Version 4.0 (PE Applied Biosystems, Langen).

Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen CLONE MANAGER, Version 4.1 (Scientific & Educational Software, Durham/NC, USA) und Dnasis (Version V5.00) ausgewertet. Sequenzhomologien zu in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT aufgeführten DNA- 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. 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>). Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Protein-Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen Scan Prosite, Profile Scan und Compute pI/Mw des Expaty Molecular Biology Server (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

2.2.10 RT-PCR

Zur DNA-Entfernung wurde 1 µg RNA zunächst mit 1 U „Deoxyribonuclease (Rnase free)“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in einem Volumen von 10 µl bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die DNase wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und 10 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

Für die reverse Transkription wurde der „RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers verwendet. In der RT-Reaktion wurde entweder ein sequenzspezifischer Primer oder der random hexamer Primer verwendet. Nach beendeter cDNA-Synthese wurde eine PCR-Reaktion

mit *Taq*-DNA-Polymerase unter Standardbedingungen (2.2.7) angeschlossen, wobei 1 µl der RT-Reaktion als Template diente. Zur Kontrolle wurden RT-Ansätze mit DNase-behandelter RNA und eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von durchgeführt.

2.2.11 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *primer extension*

5'-Enden von mRNA wurde durch Kombination der Fragment-Längenbestimmung mit einer abgewandelten *primer extension*-Methode (BOORSTEIN & CRAIG 1989) bestimmt.

Die *primer extension*-Analyse wurde durch eine reverse Transkription mit dem „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei hier ein sequenzspezifischer 5'FAM-markierter Primer eingesetzt wurde. Nach abgeschlossener reverser Transkription wurde die cDNA gefällt und getrocknet.

Vor der Analyse durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, durchgeführt am ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems, Langen), wurde das Pellet in *loading buffer* aufgenommen und durch Inkubation für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Länge der cDNAs wurde mit Hilfe des internen GeneScan-500 (ROX) Größenstandards (PE Applied Biosystems, Langen) bestimmt, der den Ansätzen beigelegt wurde. Die Auswertung der Fragmentlängen-Analysen erfolgte mit GENESCAN 2.1-Software.

2.3 Proteinchemische Methoden

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

2.3.1 Herstellung von Proteinrohextrakt

Die Zellen wurden in dem jeweiligen Aufschlusspuffer aufgenommen (1 g Zellen/2 ml Puffer). Nach Zugabe von 1 mg Lysozym, 0,1 mg DNase I und 1 µl PMSF (0,1 M in 2-Propanol) pro ml Puffer wurde die Zellsuspension 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden durch zwei- bis dreimalige Passage durch eine vorgekühlte 20K- bzw. 40K-French-Press-Zelle (SLM Instruments, Inc., Silver Spring, USA) bei ~140 MPa bzw. ~280 MPa aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (s. 2.1.6). Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet. Der Rohextrakt konnte bei -20 °C eingefroren werden oder wurde sofort verwendet.

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

2.3.2 Proteinbestimmung nach 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) H₃PO₄) gegeben und gründlich gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die Extinktionsmessung bei 595 nm im Spektralphotometer (UV 1202, Fa. Shimadzu, Jena) in Plastik-Küvetten. Eine Eichgerade wurde mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0-20 µg erstellt.

2.3.3 Elektrophoretische Methoden zu Proteintrennung

2.3.3.1 SDS-PAGE (LAEMMLI 1970)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Tabelle 2.5) nach LAEMMLI (1970) in einer vertikalen Minigel-Apparatur (Biometra, Göttingen). Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit einem Drittel Volumenanteil Proben-Puffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente ein Tris-Glycin-Puffer (10 x Elektrodenpuffer: 0,25 M Tris, 1,9 M Glycin, 10 % (w/v) SDS; pH 8,8). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA pro Gel. Der Lauf wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Trenngelende erreicht hatte. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der „Protein Marker Broad Range“ (2-212 kDa) verwendet, sollte das Gel anschließend geblottet werden, wurde zusätzlich der „Prestained Protein Marker Broad Range“ (6-175 kDa) aufgetragen (beide New England Biolabs, Frankfurt/M.).

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der SDS-Gele

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	5 %
Acrylamidlösung (40 %) ¹	1,5 ml	1,8 ml	2,25 ml	0,25 ml
Trenngelpuffer ²	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	-
Sammelgelpuffer ³	-	-	-	0,625 ml
APS-Lösung (10 % w/v)	40 µl	40 µl	40 µl	17 µl
SDS (10 % w/v)	60 µl	60 µl	60 µl	25 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	3,5 µl
dest. H ₂ O	3,65 ml	3,35 ml	2,9 ml	1,56 ml

¹ Rotiphorese Gel 40: 38,6 % (w/v) Acrylamid, 1,33 % (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

² Trenngel-Puffer: 3 M Tris/HCl, pH 8,8

³ Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

2.3.3.2 Native Gradienten-PAGE

Die native Gradienten-PAGE diente der Bestimmung des Molekulargewichtes unter nicht denaturierenden Bedingungen. Es wurde das unter 2.3.3.1 beschriebene LAEMMLI-System ohne Zusatz von SDS verwendet. Das Trenngel wurde mit einem Gradientenmischer in einem Bereich von 3 % (v/v) - 27 % Acrylamid mit Hilfe einer Peristaltikpumpe hergestellt. Das Sammelgel wurde unter Verwendung der 3%igen Acrylamidlösung wie unter 2.3.3.1 beschrieben hergestellt.

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

Als Molekulargewichtsmarker wurde der HMW-KIT (Amersham-Pharmacia) verwendet. Die Proben und 5 µl Marker wurden in einem Verhältnis von 4:1 mit Beschwererlösung (40 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen des vorbereiteten Geles pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C und 100 V über Nacht durchgeführt. Als Elektrodenpuffer kam 0,1 M Tris, 0,1 M Glycin zum Einsatz.

2.3.4 Färben und Trocknen von Polyacrylamidgelen

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Färbung mit Coomassie-Blue (WEBER & OSBORN 1969, mod.) sichtbar gemacht. Das Gel wurde mindestens 30 min leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung (2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0,5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O dest.) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärbelösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure). Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O dest. aufbewahrt. Dazu wurden sie luftblasenfrei zwischen zwei zurechtgeschnittene, befeuchtete Cellophan-Folien (Biometra, Göttingen) gelegt und mittels eines Geltrockners (Gel Slab Drier GSD-4, Destainer Power Supply DPS, Amersham-Pharmacia, Freiburg) unter Anlegen eines Vakuums und einer Heizleistung von 24 W für 90 min getrocknet.

2.3.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (TOWBIN et al. 1979, mod.)

Die Übertragung von Proteinen zum Antikörpernachweis oder zur N-terminalen Aminosäuresequenzierung aus SDS-Polyacrylamidgelen (2.3.3.1) auf eine Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel, Düren) bzw. Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P Transfer-Membran, Millipore, Eschwege) erfolgte mit einer Semidry-Elektroblot-Apparatur (Biometra, Göttingen) nach TOWBIN et al. (1979, mod.).

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel 5 min in TOWBIN-Puffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) inkubiert. Anschließend wurde von der Anode aus drei Lagen Transferpuffer-getränktes Filter-Papier (Whatman-3MM-Chromatographie-Papier), die auf Gelgröße zurechtgeschnittene und 5 min in TOWBIN-Puffer getränkte Nitrocellulose-Membran bzw. 2 min in Methanol und anschließend in TOWBIN-Puffer getränkte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und drei Lagen getränktes Gel-Blotting-Papier untereinander angeordnet. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 4 °C und 250 mA.

2.3.6 Dialyse und Einengen von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden in Dialyse-Schläuchen (Visking, Serva, Heidelberg) unter ständigem Rühren für zwei bis vier Stunden bei 4 °C unter einmaligem Pufferwechsel gegen das 50- bis 1000-fache Volumen entsalzt. Die Schläuche wurden zuvor in H₂O dest. für 10 min gekocht und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Zum Einengen wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch gefüllt und in einer Schale vollständig mit PEG 20000 bedeckt. Die Konzentrierung erfolgte bei 4 °C.

Die Konzentrierung von Proteinlösungen kleinerer Volumina erfolgte in Centriprep-10-, Centricon-10- und Microcon-10-Röhrchen (Fa. Millipore, Eschborn), die eine Aus-

schlussgrenze von 10 kDa aufweisen. Die Konzentrierung erfolgte durch Zentrifugieren bei 4 °C und 3.000 - 14.000 x g nach Angaben des Herstellers.

2.3.7 Chloroform-Methanol-Fällung (WESSEL & FLÜGGE 1984)

Stark verdünnte oder salzhaltige Proteinlösungen wurden mit Chloroform-Methanol gefällt. Die Proteinlösung (100 µl) wurde mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform versetzt und gemischt. Dazu wurden 300 µl H₂O dest. gegeben, nochmals gemischt und der Ansatz 5 min bei 8 000 x g in einer Tischzentrifuge (Fa. EPPENDORF, Hamburg) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgehoben und verworfen. Die untere Phase und die Interphase wurden mit 300 µl Methanol versetzt, vorsichtig geschwenkt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das ausgefallene Protein luftgetrocknet und in Probenpuffer aufgenommen.

2.3.8 Fällung mit Trichloressigsäure

Um Proteine von Chemikalien abzutrennen erfolgte eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). Hierzu wurde die Probe mit 1 Vol. 0,6 M TCA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Zentrifugation für 10 min bei 20 000 x g und 4 °C pelletiert, mit 100 µl eiskaltem Ethanol (96 %, v/v) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

2.3.9 Chemische Modifikation von Proteinen

2.3.9.1 Markierung mit Fluorescein-Thiosemicarbacid (FTSC)

Aufgrund der Spezifität von FTSC für Carbonylgruppen wurden Proteine nach dem Prinzip von BAUMANN et al. (1981) mit dieser Verbindung umgesetzt. Dazu wurden 10 µg Protein mit 10 µl 0,3 M Kaliumacetat-Puffer, pH 4,6 und 1 µl 0,1 % w/v FTSC in DMSO versetzt und 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 80 µl H₂O dest. zugegeben und der Ansatz einer Methanol-Chloroform-Fällung (2.3.7) unterzogen. Nach einer SDS-PAGE (2.3.3.1) wurde das markierte Protein an einem PhosphorImager "Storm" (Fa. MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld) im blauen Fluoreszenzbereich detektiert.

2.3.9.2 Modifikation durch o-Phenylendiamin (DIXON & FIELDS 1972)

Proteine, deren N-Termini durch eine α -Ketocarbonsäure blockiert sind, können durch Umsatz mit o-Phenylendiamin (oPDA) und daraus resultierender Abspaltung dieser

Gruppe der aminoterminalen Sequenzierung über den Edman-Abbau zugänglich gemacht werden.

Es wurden zwei Volumina Proteinlösung (ca. 20 µg) mit einem Volumen 0,12 M oPDA in 0,75 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,8 versetzt und 17 h bei 37 °C inkubiert. Durch Chloroform-Methanol-Fällung (2.3.7) wurde das deblockierte Protein gefällt.

2.3.10 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurden die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine (2.3.5) 2 min gefärbt (0,1 % Coomassie Brilliant Blau R-250, 50 % Methanol, 7,5 % Eisessig), 2-5 min entfärbt (50 % Methanol, 7,5 % Eisessig) und an der Luft getrocknet. Zur aminoterminalen Sequenzierung wurden die Banden der zu sequenzierenden Proteinprobe aus der PVDF-Membran herausgeschnitten und durch automatischen Edman-Abbau unter Verwendung des Sequenzanalyse-Systems 476A oder Procise 492cLC (beide PE Applied Biosystems, Weiterstadt) von Dr. K. P. Rücknagel, Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft, Halle, sequenziert.

2.3.11 Bestimmung von Kofaktoren

Die Bestimmung von Kofaktoren von Enzymproben wurde am Uvikon 810 Zweistrahl-Photometer (Fa. Kontron Eching) durchgeführt durch die Aufnahme des UV-VIS-Spektrums von 230 bis 800 nm. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in Quarzküvetten aufgenommen. Als Probe wurden 500 µl des angereinigten PrdC in Puffer C ohne FMN (2.6.8), für die Aufnahme einer Basislinie wurde Puffer C ohne FMN eingesetzt.

2.4 Überexpression von Proteinen

Für die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine als N- und C-terminale *Strep*-tag II-Fusion wurden die Vektoren pASK-IBA5 und pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) genutzt. Die Expressionsvektoren pASK-IBA ermöglichen die Überexpression und Reinigung der Proteine mit einem fusioniertem *Strep*-tag II.

2.4.1 Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Für die Überexpression eines Proteins wurde zunächst dessen kodierendes Gen in den Expressionsvektor pASK-IBA kloniert. Das durch Sequenzierung überprüfte Plasmid wurde in die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) mit pUBS520 bzw. *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert.

Zur Expression der Proteine wurden die Hauptkulturen (100 ml) in LB-Medium jeweils 2%ig mit der über Nacht bei 37 °C gewachsenen Vorkultur angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 angezogen. Die Proteinüberexpression wurde durch Zugabe von 0,2 mg/l Anhydrotetracyclin (Stammlösung 2 mg/ml in DMF) induziert. Die Kultur wurde 3 h nach der Induktion 10 min auf Eis gekühlt und 12 min bei 4 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden unmittelbar weiter bearbeitet oder bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.4.2 Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakt

Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte in Abhängigkeit des überexprimierten Proteins nativ oder denaturierend. *E. coli*-Zellen aus einer 100 ml Kultur wurden in 1 ml Puffer W (100 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 2 mM DTT) aufgenommen und wie unter 2.3.1 beschrieben aufgeschlossen. Der denaturierende Aufschluss erfolgte unter Zusatz von 8 M Harnstoff im Aufschlusspuffer. Lösliche und unlösliche Bestandteile wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse auf Vorhandensein des gewünschten Proteins untersucht. Der Nachweis des *Strep*-tag II Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe des *Strep*-tag Detection-Kit (IBA, Göttingen) nach Angaben des Herstellers.

2.4.3 Affinitätschromatografie an *Strep*Tactin®-Sephharose

Die aus 100 ml-Anzucht (2.4.1) erhaltenen Rohextrakte wurden zur Reinigung der Fusionsproteine mit C- oder N-terminalem *Strep*-tag II auf mit Puffer W äquilibrierte *Strep*-Tactin®-Säulen (Bettvolumen 1 ml; IBA, Göttingen) gegeben. Die Säule wurde mit 5 x 1 ml Puffer W gewaschen und das Protein mit 5 x 1ml Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 3 x 5 ml Puffer R (Puffer W mit 1 mM Hydroxyazobenzen-2-carboxylsäure) und 2 x 4 ml Puffer W gespült. Einige Proteine wurden zusätzlich einer Chromatographie an einer MonoQ 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 Säule wurde mit 20 Vol. Puffer Q (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 2 mM DTT) äquilibriert, danach wurde das gegen Puffer Q dialysierte Protein aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten von 0-1,0 M in Puffer Q.

2.5 *In vitro* Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE

1 bis 2 μg der in *E. coli* überexprimierten und über *StrepTactin*®-Säulen gereinigten *Strep*-tag II-fusionierten Proteine, GrdE und PrdA sowie deren Mutanten und Fusionsproteine (in 100 mM Tris/HCl pH 8,0), wurden mit 200 mM NaBH_4 *in vitro* bei Raumtemperatur für 5 bis 30 min inkubiert und dabei gespalten. Die Proben wurden anschließend nach Fällung mit Chloroform-Methanol (2.3.7) bzw. TCA (2.3.8) und evtl. Modifikationen (2.3.9) mit FTSC und o-PDA in der SDS-PAGE auf Spaltung analysiert.

2.6 Methoden zur Anreicherung von Proteinen der D-Prolin-Reduktase

2.6.1 Aktivitätsmessung der D-Prolin-Reduktase (SETO 1979, mod.)

Die Bestimmung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität erfolgte photometrisch an einem Fluoreszenzphotometer SFM 25 (Kontron Instruments, Italien), indem die Menge an gebildeten δ -Aminovalerat gemessen wurde.

<u>Reaktionsansatz:</u>	KP-Puffer, pH 8,0	500 mM	50	μl
	MgCl_2	100 mM	25	μl
	DTT oder NADH	200 mM	25	μl
	D-Prolin	100 mM	25	μl
	Proteinlösung nach Q-Sepharose		10-20	μl
	H_2O dest.		ad 250	μl

Der Reaktionsansatz wurde in einem Eppendorf-Tube zusammen pipettiert, 5 min bei 30 °C vorinkubiert und durch Zugabe des Substrates, D-Prolin, wurde die Reaktion gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe 5%iger Perchlorsäure beendet. Die Proben wurden zur Abtrennung des präzipitierten Proteins 20 min bei 20 000 x g zentrifugiert, und der Überstand wurde auf Bildung von primären Amin im fluorimetrischen Test vermessen. Hierzu wurden 1,95 ml Fluoreszenz-Puffer (20 ml Boratpuffer, 0,4 M, pH 9,7; 0,2 ml o-Phthaldialdehyd 80 mg/ml in Ethanol; 0,04 ml β -Mercaptoethanol) in eine Quarzküvette gegeben, 50 μl Probe zugeben, 10 s gemischt und nach 30 s die Fluoreszenz bei 450 nm nach Anregung bei 330 nm gemessen. Durch Eichung des Fluoreszenzphotometers mit 60 nmol δ -Aminovalerat konnte die Menge des durch D-Prolin-Reduktion mit DTT oder NADH als Elektronendonator gebildeten δ -Aminovalerat berechnet werden.

Die DTT- und NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität wurde als spezifische Aktivität in U/mg errechnet. Dabei ist ein U definiert als Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute.

2.6.2 Messung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität mittels Mikrotiterplattentest

Da die NADH-abhängige Reduktase eine NADH-oxidierende Aktivität aufweisen sollte, wurde versucht, diese Komponente mit Hilfe eines NADH-Dehydrogenase Testes anzureichern. MTT wurde als Elektronenakzeptor aerob verwendet, während Benzylviologen anaerob eingesetzt wurde. In eine Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl Testmix (50 mM KP, pH 8,0; 0,2 mM MTT/5 mM Benzylviologen; 0,12 mM NADH) vorgelegt. Und dann 5-20 µl Probe in den Testmix pipettiert. Der Farbumschlag wurde visuell quantifiziert. Die genaue Messung erfolgte danach durch Bestimmung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität.

2.6.3 Messung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität im nativen Gel

Für die Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase wurden Proteinproben im nativen Gel (2.3.3.2) getrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 3-mal kurz mit 20 ml 50 mM KP-Puffer, pH 8,0 gewaschen und anschließend in 20 ml Testlösung (50 mM KP, pH 8,0; 0,2 mM MTT; 0,12 mM NADH) gegeben und bis zur gewünschten Bandenfarbintensität bei Raumtemperatur inkubiert.

2.6.4 PrdC-Nachweis

Zum Nachweis von PrdC wurde ein Antikörper hergestellt (s. 2.7.2). Proteinextrakte wurden auf eine Nitrocellulose-Membran getropft, die Membran getrocknet und nach 2.7.4 dem PrdC-Proteinnachweis unterzogen.

2.6.5 Voraussetzungen für die Anreicherung Sauerstoff-empfindlicher Proteine

Alle im Folgenden beschriebenen Methoden zur Aufreinigung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase bzw. von PrdC aus *C. sticklandii* erfolgten unter anaeroben Bedingungen. Dazu wurden alle Schritte in einer Anaeroben-Box (Coy Laboratories Inc., Vertrieb durch Toepffer, Adelberg) unter einer Formiergasatmosphäre (5 % H₂/ 95 % N₂) bei 4 °C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden ausgekocht, unter Stickstoffbegasung abgekühlt und anschließend in Schraubverschlussflaschen (Müller und Krempel, Zürich, Schweiz) mit Latex-Gummisepten (Maag, Dübendorf) abgefüllt. Fraktionen, die während der Anreicherung aus der Anaeroben-Box ausgeschleust werden mussten, wurden vorher in Hungate-Röhrchen oder Serumflaschen mit Septen überführt. Alle Geräte und Kunststoffgefäße wurden mindestens einen Tag vor der Benutzung in die Anaeroben-

Box eingeschleust. Falls eine Lagerung von Fraktionen über Nacht oder mehrere Tage notwendig war, wurden diese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.6.6 Säulenchromatographie

Abgesehen von den Vorversuchen wurden alle säulenchromatographischen Schritte an einer FPLC-Anlage, bestehend aus Pumpe P-500, der UV-Einheit Optical Unit UV1 und einem Fraktionssammler FRAC-100 (alles Pharmacia LKB, Freiburg) in einer Anaerobox bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gepackten Säulen wurden vor dem Auftragen der Proteinlösung mit dem entsprechenden anaeroben Puffer äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule zunächst mit Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend entsprechend der verwendeten Elutionsmethode eluiert.

2.6.7 Anreicherung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die Anreicherung stets die folgenden Puffer verwendet:

Puffer A: 50 mM KP-Puffer, pH 8,0
3 mM DTT
3 mM NAD⁺ ^(a)

Puffer B: Puffer A mit 1 M KCl

^a Die NAD⁺-Konzentration von 3 mM ist zur Stabilisierung der D-Prolin-Reduktase während der Anreicherung nötig.

Vorversuche

Um die Bindungsfähigkeit der NADH-abhängigen Prolin-Reduktase an den spezifischen Nukleotid-bindenden Säulenmaterialien ADP-Sepharose und Cibracron Blue (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zu testen, wurden Probesäulen mit einem Bettvolumen von 1-2 ml verwendet. Die Materialien wurden vorab mit Puffer A äquilibriert und Proteinextrakte von *C. sticklandii* auf diese Chromatographiematerialien gegeben. Die Elution der Proteine erfolgte durch Puffer A mit 20 mM AMP. Die Säulenmaterialien wurden anschließend entsprechend der Herstellerangaben regeneriert und gelagert.

Anreicherung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase

Für die Anreicherung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase wurden folgende chromatographischen Schritte durchgeführt:

- Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose Fast Flow
- Gelfiltration an einer Superdex 200 HR

- Anionenaustauschchromatographie an MonoQ HR5/5
- Gelfiltration an einer Superose6 Fertigsäule

Durch die Chromatographie an Q-Sepharose wurde die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität von der NADH-abhängigen Aktivität getrennt. Die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität bindet nicht an Q-Sepharose und wurde so beim Waschen der Q-Sepharose-Säule in Fraktionen für spätere Messungen gesammelt (s. 3.4.3.3).

Alle Materialien bzw. Säulen waren von Amersham-Pharmacia (Freiburg) und wurden nach Angaben des Herstellers benutzt und regeneriert.

2.6.8 Anreicherung von PrdC

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die Anreicherung stets die folgenden Puffer verwendet:

Puffer C: 50 mM KP-Puffer, pH 8,0
2 mM DTT
50 μ M FMN
2 mM NAD⁺

Puffer D: Puffer C mit 1 M KCl

Puffer E: Puffer C mit 0,8 M (NH₄)₂SO₄

Puffer F: 50 mM MES, pH 5,8
2 mM DTT
50 μ M FMN
2 mM NAD⁺

Puffer G: Puffer F mit 1 M KCl

Vorversuche

Um die Bindungsfähigkeit von PrdC an unterschiedlichen Säulenmaterialien zu testen, wurden die in Tabelle 2.6 aufgeführten Probesäulen mit einem Bettvolumen von 1-2 ml verwendet. Als Probe diente Extrakt von *C. sticklandii*.

Tabelle 2.6: Säulenmaterialien für Vorversuche

Gelmaterial	Äquilibriumspuffer	Elutionspuffer
Butyl- Sepharose ¹	Puffer E	Puffer C
Octyl- Sepharose ²		
Phenyl-Sepharose ¹		
Q-Sepharose ¹	Puffer C	Puffer D
	Puffer C pH 9,0	Puffer D pH 9,0
SP-Sepharose ¹	Puffer F	Puffer G
Cibacron Blue ²	Puffer C	Puffer C mit 20 mM AMP
ADP-Sepharose ¹		

¹Amersham-Pharmacia, Freiburg

²Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Anreicherung von PrdC

Für die Anreicherung von PrdC wurden folgende chromatographischen Schritte durchgeführt:

- Anionenaustauschchromatographie mit SP-Sepharose Fast Flow
- Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose Fast Flow
- Gelfiltration an einer Superdex 200 HR

Alle Materialien bzw. Säulen waren von Amersham-Pharmacia (Freiburg) und wurden nach Angaben des Herstellers benutzt und regeneriert. Zur ausführlicheren Beschreibung der Anreicherung s. 3.4.3.2.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Herstellung von PrdC zur Immunisierung

Das zur Herstellung polyklonaler Antikörper benötigte Protein PrdC aus *C. sticklandii* wurde als N-terminale *Strep*-tag II-Fusion in *E. coli* überexprimiert und durch StrepTactin Macroprep gereinigt. Da die PrdC-enthaltenden Elutionsfraktionen auch noch Verunreinigungen enthielten wurden diese vereinigt, im Centriprep-10-Röhrchen (Fa. Millipore, Eschborn) eingeeengt und in einer präoperativen SDS-PAGE getrennt. Die PrdC-Bande wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein wurde mit dem Roti®-Elutions-Kit (Roth, Karlsruhe) aus dem Gel eluiert. Die erhaltene PrdC-Proteinlösung wurde gegen PBS-Puffer (1,5 mM KH₂PO₄; 4,2 mM Na₂HPO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM

KCl) dialysiert, im Centricon-10-Röhrchen eingengt und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

2.7.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen PrdC

Die polyklonalen Antikörper gegen das Protein PrdC aus *C. sticklandii* wurden von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) nach dem 2-Monats-Standard-Immunisierungsschema von Kaninchen hergestellt.

2.7.3 Aufreinigung von Antikörpern (SAMBROOK et al., 1989)

Polyklonale Antikörper gegen PrdC wurden durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an ProteinA-Sepharose (Oncogene, Boston, USA) aufgereinigt. 10 ml des antiPrdC(α PrdC)-enthaltenden Kaninchenserums wurden tropfenweise bis 50 % (v/v) mit einer bei 4 °C gesättigten Ammoniumsulfatlösung (4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 0,1 M Natriumphosphat pH 7,0) versetzt. Die Probe wurde anschließend 30 min gerührt und danach zentrifugiert. Das α PrdC enthaltene Pellet wurde in 10 ml Wasch-Puffer (0,1 M Natriumphosphat pH 7,0; 0,15 M NaCl) aufgenommen, gegen selbigen Puffer dialysiert und auf eine mit Wasch-Puffer äquilibrierte ProteinA-Sepharosesäule (2,5 ml Bettvolumen) gegeben. Die Säule wurde mit 40 ml Wasch-Puffer gewaschen und der α PrdC-Antikörper wurde in 5 2-ml-Fractionen mit Elutions-Puffer A (0,5 M NH_4 -acetat, pH 3,0) und mit 5 2-ml Fractionen Puffer B (10 mM Glycin/HCl, pH 3,0) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden sofort mit 1 Vol. 1 M Tris/HCl, pH 9,0 zur Neutralisierung versetzt. Die α PrdC-enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt und konnten nun für immunologische Nachweise eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

2.7.4 PrdC-Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation (BLAKE et al. 1984)

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mittels Western Blot oder direkt auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (2.3.5) und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (PBS-Puffer: 1,5 mM KH_2PO_4 ; 4,2 mM Na_2HPO_4 ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl mit 5 % „SUCOFIN“-Magermilchpulver) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 3 x 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran in PBS-Puffer mit dem gegen PrdC gerichteten spezifischen 1. Antikörper (α PrdC-Antikörper aus Kaninchen, 1:5.000 in PBS-Puffer mit 0,5 % BSA verdünnt) für 1 h inkubiert. Es folgten 3 x 10 min Waschen der Membran in PBS-Puffer, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Darauf wurde die Membran mit dem „Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate“ (monoklonaler Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege, Peroxidase-gekoppelt; Biorad, München) für 1 h in-

kubiert, der 1:10.000 in PBS-Puffer mit 0,5 % BSA verdünnt zum Einsatz kam. Den darauf folgenden Waschsritten (2 x 10 min in PBS-Puffer) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunkomplexe an. Für die Nachweisreaktion wurde die Membran in Detektionslösung (45 ml PBS-Puffer mit 5 ml 0,6 % (w/v) 4-Chloro-1-naphtol in eiskaltem Ethanol und 20 µl 30 % (v/v) H₂O₂) inkubiert. Nachdem die Banden die gewünschte Farbintensität erreicht hatten, wurde die Reaktion durch Schwenken in H₂O dest. abgestoppt.

2.7.5 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden verschiedene Techniken angewandt. Als Antigenlösung wurde Rohextrakt von *C. sticklandii* (2.3.1) mit und ohne *Pre-clearing* eingesetzt. Die eigentliche Präzipitation wurde mit löslichen und an ProteinA-Sepharose gekoppelten αPrdC-Antikörpern durchgeführt. Da für PrdC eine mögliche Sauerstoffempfindlichkeit vorlag, wurden alle im Folgenden beschriebenen Schritte anaerob durchgeführt.

Pre-clearing

Zu 1 ml *C. sticklandii*-Rohextrakt wurden 50 µl „normal rabbit serum“ (Calbiochem, Darmstadt) gegeben und der Ansatz für 15 – 60 min bei 4 °C inkubiert. Zur Abtrennung der unspezifisch gebildeten Präzipitate wurde der Ansatz zu 100 µl in *C. sticklandii*-Lysispuffer (50 mM KP pH 8,0, 1 mM DTT, 1,5 mM NAD⁺) äquilibrierten „PANSORBIN® Cells“ (durch Hitze getötete, Formalin-fixierte *Staphylococcus aureus* Zellen (Cowan I Stamm); die auf ihren Zellen viel ProteinA exponieren; Calbiochem, Darmstadt) gegeben. Die ProteinA-Zellen wurden mit dem Extrakt gut gemischt, für 15 – 30 min bei 4 °C inkubiert und 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand stellt den „pre-clearing“ Rohextrakt dar und konnte unmittelbar für die Immunpräzipitation eingesetzt werden.

Kopplung von αPrdC-Antikörpern an ProteinA-Sepharose

400 µl der 50%igen ProteinA-Sepharose wurden 3-mal mit je 1 ml *C. sticklandii*-Lysispuffer gewaschen und anschließend in 400 µl *C. sticklandii*-Lysispuffer aufgenommen. Ca. 1 mg des αPrdC-Antikörpers wurde zusammen mit ProteinA-Sepharose für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schlossen sich drei Waschsritte mit *C. sticklandii*-Lysispuffer an. Das Affinitätsmaterial (ProteinA-Sepharose mit gekoppelten αPrdC-Antikörper) wurde unmittelbar für die Immunpräzipitation eingesetzt oder unter Zusatz von 0,01 % Azid bei 4 °C gelagert.

Immunpräzipitation von PrdC

Zur Immunpräzipitation des nativen PrdC aus *C. sticklandii* wurden 500 µl der Antigenlösung (mit oder ohne vorheriges Pre-clearing) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antikörper versetzt und 1h bei 4 °C leicht schüttelnd inkubiert. Lag der Antikörper löslich vor, wurden 100 µl 50%ige mit Lysispuffer äquilibrierte ProteinA-Sepharose zum Ansatz gegeben und dieser weitere 60 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugieren für 1 min bei 15.000 x g die Proteinlösung von der ProteinA-Matrix separiert. Wurde der Antikörper gekoppelt an ProteinA-Sepharose zum *C. sticklandii*-Rohextrakt gegeben, erfolgte das Abzentrifugieren bereits nach dem ersten Inkubationsschritt. Je nach Effizienz der Präzipitation wurde die Inkubation der Proteinlösung mit frischen Antikörpern bis zu 3-mal wiederholt. Die erhaltene Proteinlösung und die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Enzymmessung analysiert. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation mit Präimmenserum statt mit Antikörper.

2.8 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

2.8.1 Zellanzucht

Je 5 ml LB- oder M9-Minimal-Medium wurden mit 0,5 ml einer über Nacht in entsprechendem Medium gewachsenen Vorkultur versetzt und bei 30 bis 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 erfolgte die Induktion des zu untersuchenden Promotors durch Zugabe entsprechender Induktoren. Die Kulturen wurden weitere 1 bis 24 h bei 30 bis 37 °C inkubiert, danach 5 min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (2 min, 10 000 g) geerntet. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -20 °C.

2.8.2 Aktivitäts-Bestimmung (MILLER 1992, mod.)

Je nach zu erwartender Aktivität wurde die Zellmenge, welche 0,1-1,0 ml Kulturvolumen entsprach, in 950 µl Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl 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 µl Substratlösung (ONPG, 4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet und nach Gelbfärbung des Ansatzes mit 500 µl einer 1 M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Nach Zentrifugation der Proben (10 min, 10 000 x g) wurde die Absorption des Überstandes bei 420 nm an einem Spektralphotometer (UV 1202, Fa. Shimadzu, Jena) bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zellpellet. Die Enzymaktivität (Miller-Units) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{1000 \times A_{420}}{t \times v \times OD_{600}} \quad A = \frac{1000 \times (A_{420} - 1,75 \times A_{550})}{t \times v \times OD_{600}}$$

A = Aktivität [Miller-Units]

A₄₂₀ bzw. A₆₀₀ = Absorption des Überstandes bei 420 bzw. 550 nm

t = Reaktionszeit [min]

v = ursprüngliches Volumen der eingesetzten Probe [ml]

OD₆₀₀ = optische Dichte der Kultur unmittelbar vor der Zellernte

2.9 Materialien, Chemikalien und Enzyme

Soweit nachfolgend nicht extra aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Fluka Chemie AG (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) in handelsüblichem Reinheitsgrad bezogen. Restriktionsendonukleasen stammen von den Firmen Appligene-Oncor (Heidelberg), Roche Biochemical Diagnostics (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Roth). Stickstoff (4.0), Formiergas (95 % Stickstoff/5 % Wasserstoff) und Wasserstoff (3.0) wurde von Messer Griesheim geliefert. Darüber hinaus wurden Materialien, Chemikalien und Enzyme folgender Firmen eingesetzt:

Appligene-Oncor, Heidelberg: Lysozym, Ampicillin

Amersham-Pharmacia, Freiburg: Q-Sepharose Fast Flow, SP-Sepharose Fast Flow, Butyl-, Octyl-, Phenyl-Sepharose, MonoQ HR5/5, Superdex 200 HR10/30 Säule, Superose6 HR10/30 Säule

Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf: Elektroporationsküvetten

Eurogentec, Seraing, Belgien: Smart Ladder (DNA-Größenstandard)

Macherey-Nagel, Düren: Nitrocellulosemembranen

MBI Fermentas, St.-Leon-Rot: GeneRuler™ 50 bzw. 100 bp DNA Ladder, RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, DNase (RNase free), T4-DNA-Ligase

Millipore GmbH, Eschborn: PVDF-Membranen, Microprep-10-, Microcon-10-, Microspin-10-Röhrchen

Metabion GmbH, Martinsried: Primer

New England BioLabs, Frankfurt/M.: Protein-Größenstandards, *Bsa*I

Qiagen, Hilden: QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Mini Kit, RNeasy Total RNA Kit

PE Applied Biosystems, Weiterstadt: DNA Sequencing Kit (dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction), GeneScan-500 (ROX) Größenstandard

Roche Biochemical Diagnostics, Mannheim: ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, DNase I

Stratagene GmbH, Heidelberg: *PfuTurbo* DNA-Polymerase, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, pBluescript SK+

3 Experimente und Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit zeigt weiterführende Ergebnisse zur Funktionsweise der D-Prolin-Reduktase und des Protein B der Glycin-Reduktase von *C. sticklandii*. Im Vordergrund steht dabei die genauere Charakterisierung der posttranslationalen *in vitro* Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE aus *C. sticklandii*. Beide Proteine sind homolog und haben ähnliche Funktionsmechanismen. Die Proteine PrdA und GrdE werden als Proproteine gebildet und posttranslational in zwei Untereinheiten gespalten. Während der Spaltung wird am N-Terminus der 23- (PrdA) bzw. 22- (GrdE) kDa-Untereinheit eine Pyruvyl-Gruppe gebildet.

In weiteren Kapiteln werden die Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins PrdC aus *C. sticklandii* beschrieben, das Elektronen von NADH zur D-Prolin-Reduktase transferiert und die Untersuchungen zur Regulation der D-Prolin-Reduktase in *E. coli* dargestellt. Abschließend werden die Versuche vorgestellt, die zum Aufbau eines Transformationssystems für *C. sticklandii* durchgeführt wurden.

3.1 Einfluss von Mutationen konservierter Aminosäuren auf die *in vitro* Spaltung von GrdE

Das Cystein der Spaltstelle ist für die Spaltung der Proproteine GrdE und PrdA von entscheidender Bedeutung. Um den Spaltmechanismus der Proproteine GrdE und PrdA besser erklären zu können, wurden die konservierten Aminosäuren mutiert. Da sich das GrdE-Protein gut und stabil in *E. coli* exprimieren lässt, wurden die Experimente ausschließlich mit GrdE durchgeführt.

3.1.1 Einführung von Mutationen

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden folgende Mutationen an konservierten Aminosäureresten in der Nähe der Prozessierungsstelle von GrdE (Abb. 3.1) eingeführt: Glu²³¹Leu, Asp²³⁴Ser, Asp²³⁴Ala, Gly²³⁵Phe, Ile²³⁷Leu, Ser²³⁹Cys, Cys²⁴⁶Ala, Lys²⁴⁸Ala, Asp²³⁴Ala/Ile²³⁷Ala, Ile²³⁷Lys/Lys²⁴⁸Ala. Weiterhin wurden Mutanten hergestellt, bei denen das Cys²⁴² der Spaltstelle bis zu drei Aminosäuren zum N-Terminus bzw. zum C-Terminus verschoben wurde: Asn²⁴¹Cys/Cys²⁴²Ala, Cys²⁴²Ala/Val²⁴³Cys, Ser²³⁹Cys/Cys²⁴²Ala, Ser²³⁹Cys/Cys²⁴⁶Ala (Kontrollen: Asn²⁴¹Cys, Val²⁴³Cys) (Abb. 3.1). Bei Doppelmutanten wurde zunächst eine Aminosäure zielgerichtet mutiert. Das daraus resultierende einfach mutierte Plasmid wurde dann zur Einführung der zweiten Mutation als Template eingesetzt. Da sich die Mutanten Glu²³¹Leu, Ser²³⁹Cys/Cys²⁴²Ala nicht durch die Cycle-PCR-Mutationsmethode herstellen ließen, wurde bei diesen die *overlap-extension*-PCR zur Mutation angewandt (2.2.8.2). Dabei wurden der GrdE-*forward*- und *revers*-Primer und die Mutationsprimer eingesetzt und anschließend wur-

de das mutierte *grdE*-Gen in pASK-IBA 3 kloniert. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft, die Plasmide in *E. coli* BL21(DE3)-RIL überexprimiert und ihr Spaltverhalten *in vitro* untersucht.

			231	234/235	237	239	242	246	248																										
			P	E	V	M	D	G	A	I	L	S	G	N	-	C	-	V	S	A	C	D	K	N	P	T	Y	V	H	M	N	N	P		
GrdE	(C.s.)	228	P	E	V	M	D	G	A	I	L	S	G	N	-	C	-	V	S	A	C	D	K	N	P	T	Y	V	H	M	N	N	P	258	
GrdE	(E.a.)	228	P	E	V	M	D	G	A	I	L	S	G	N	-	C	-	V	S	S	C	D	K	N	P	T	Y	V	H	C	N	N	P	258	
PrdA	(C.s.)	410	P	L	E	V	L	D	G	G	I	H	A	L	T	-	C	-	I	G	P	A	S	K	E	N	S	R	H	Y	W	R	E	P	440

Abb. 3.1: Sequenzvergleich der Spaltstellen von GrdE des Protein B der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (C.s.) und *E. acidaminophilum* (E.a.) und von PrdA der Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (C.s.).

3.1.2 *In vitro* Spaltung der GrdE-Mutanten

Die Spaltung der an *StrepTactin*® gereinigten GrdE-Mutanten erfolgte nach den optimierten Bedingungen für die *in vitro* Spaltung des GrdE-Wildtypproteins mit 200 mM NaBH₄ bei Raumtemperatur für 5 bis 30 min (BEDNARSKI et al. 2001). Die Effizienz der Spaltung wurde im SDS-PAA-Gel anhand der Bandenintensität der verschiedenen Untereinheiten beurteilt und mit Hilfe des Programms „One-D-Scan“ errechnet. Dabei wurde festgestellt, dass die Glu²³¹Leu-, Asp²³⁴Ser, Asp²³⁴Ala-, Gly²³⁵Phe-, Ile²³⁷Leu-, Ser²³⁹Cys- und Lys²⁴⁸Ala-Mutanten unter den Spaltbedingungen des Wildtyps mit ähnlichen Effizienzen gespalten wurden, während die Asp²³⁴Ala/Ile²³⁷Ala- und Ile²³⁷Lys/Lys²⁴⁸Ala-Doppelmutanten mit etwas verringerten Effizienzen gespalten wurden. Zur Kontrolle wurden die Spaltprodukte der Lys²⁴⁸Ala-Mutante N-terminal sequenziert. Dabei wurde für ein Spaltprodukt die Aminosäuresequenz MRLEVGNIKIFK ermittelt, die dem N-Terminus von GrdE entsprach. Für das andere Spaltprodukt wurden zwei N-terminale Sequenzen, VSACDANPTYV und DANPTYVHMNN, erhalten. Die Sequenz VSACDANPTYV startet direkt hinter Cys²⁴², welches der GrdE-Spaltstelle entspricht. Die Sequenz DANPTYVHMNN wiederum startet in Anschluss an Cys²⁴⁶. Die Mutante Cys²⁴⁶Ala wurde auf ihre Spaltung *in vitro* analysiert. Es zeigte sich, dass diese unter den Spaltbedingungen des Wildtyps nicht gespalten wurde (Abb. 3.2). BEDNARSKI et al. (2001) zeigte, dass die GrdE-Protein-Mutante, bei der die Spaltstelle Cys²⁴² gerichtet zum Alanin mutiert war, nicht gespalten werden konnte. Somit sind für die *in vitro* Spaltung des GrdE-Proteins die beiden Cysteine Cys²⁴² und Cys²⁴⁶ essentiell.

Mit weiteren Mutanten, Asn²⁴¹Cys/Cys²⁴²Ala, Cys²⁴²Ala/Val²⁴³Cys, Ser²³⁹Cys/Cys²⁴⁶Ala und Ser²³⁹Cys/Cys²⁴²Ala, sollte nun untersucht werden, ob die Lage und der Abstand der beiden Cysteine für die *in vitro* Spaltung von Bedeutung sind. Die Analyse der Spaltung dieser Mutanten zeigte, dass ihre Effizienz im Vergleich zum Wildtyp sinkt, wenn Cys²⁴² zum N-Terminus verschoben wird und somit der Abstand zwischen den beiden Cysteinen größer wird (Tabelle 3.1). Die Spaltung der Kontroll-

mutanten Asn²⁴¹Cys und Val²⁴³Cys zeigte keine Unterschiede zur Spaltung des GrdE-Wildtyps.

Tabelle 3.1: Spalteffizienzen der GrdE-Mutanten

GrdE-Mutante	Spalteffizienz [%]
Mutation an konservierten Aminosäureresten	
E ²³¹ L	95
Asp ²³⁴ Ala/Ser	95
Gly ²³⁵ Phe	95
Ile ²³⁷ Lys	95
Lys ²⁴⁸ Ala	95
Ser ²³⁹ Cys	95
Cys ²⁴⁶ Ala	0
Asp ²³⁴ Ala/Ile ²³⁷ Ala	85
Ile ²³⁷ Lys/Lys ²⁴⁸ Ala	85
Mutation zur Verschiebung der Cys-Spaltstelle	
Asn ²⁴¹ Cys	95
Val ²⁴³ Cys	95
Cys ²⁴² Ala/Val ²⁴³ Cys	90
Asn ²⁴¹ Cys/Cys ²⁴² Ala	80
Ser ²³⁹ Cys/Cys ²⁴⁶ Ala	75
Ser ²³⁹ Cys/Cys ²⁴² Ala	50

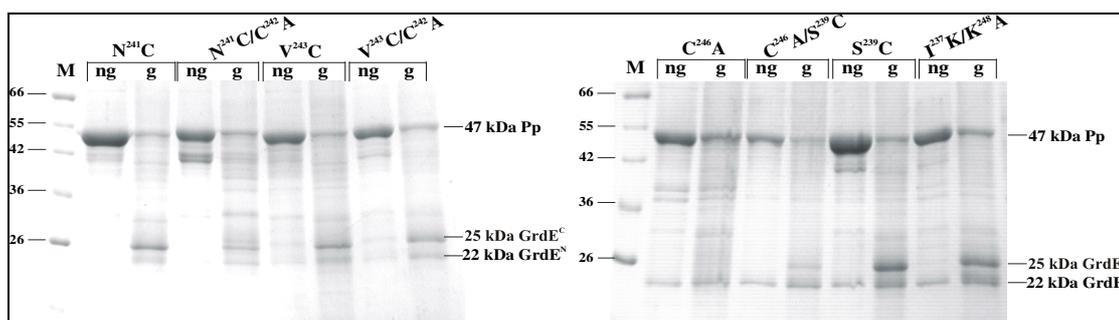


Abb. 3.2: SDS-PAA-Gel (10%) der in vitro Spaltung verschiedener GrdE-Mutanten. Spur M: Molekulargewichtsmarker [kDa]; N²⁴¹C, N²⁴¹C/C²⁴²A, V²⁴³C, V²⁴³C/C²⁴²A, C²⁴⁶A, C²⁴⁶A/S²³⁹C, S²³⁹C, I²³⁷K/K²⁴⁸A, Cys²⁴²Ala: Mutanten von GrdE; g: gespaltenes Protein (s. Text); ng: nicht gespaltenes Protein. Pp: Proprotein; GrdE^{N/C}: N- bzw. C-terminales Spaltstück der GrdE-Mutanten.

3.1.3 Einfluss der Proteine GrdA, TrxA und TrxB aus *E. acidiphilum* auf die *in vitro* Spaltung von GrdE

Bisher konnte das GrdE-Proprotein *in vitro* nur mit 200 mM NaBH₄ gespalten werden (BEDNARSKI et al. 2001). Es ist unwahrscheinlich, dass diese stark reduzierenden Bedingungen auch auf die Spaltung *in vivo* übertragbar sind. Das Protein A (GrdA) der

Glycin-Reduktase und das Thioredoxin-System (TrxA, TrxB) könnten das reduzierende System für die Spaltung von GrdE darstellen. Daher wurden *in vitro* Spaltversuche durchgeführt, bei denen GrdA und das Thioredoxin-System dem Ansatz neben GrdE zugesetzt wurden. Das *grdA*-Gen liegt in allen bekannten Genomen immer zwischen *grdE* und *grdB*. Somit erschien das GrdA-Produkt mit dem CysXXSec-Motiv ein geeigneter Kandidat für die *in vivo* Spaltung zu sein.

GrdA wurde freundlicherweise von D. GRÖBE zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um GrdA aus *E. acidiminophilum*, welches in *E. coli* als *Strep*-tag II-Fusion überexprimiert und an *StrepTactin*® gereinigt wurde. Der Selenocysteineinbau wurde durch die auf dem gleichen Plasmid codierten Gene *selB* und *selC* von *E. acidiminophilum* gewährleistet und durch MS überprüft. Die Proteine TrxA und TrxB des Thioredoxin-Systems aus *E. acidiminophilum* wurden mit Hilfe des *Strep*-tag II-Systems überexprimiert und an *StrepTactin*® gereinigt. Die Stämme zur Expression beider Proteine wurden freundlicherweise von T. PARTHER zur Verfügung gestellt. Die Aktivität des GrdA/Thioredoxin-Systems wurde anaerob in einem Ansatz mit 50 mM KP, pH 8,0; 1 mM NADPH; 10 µg TrxB; 5 µg TrxA; 10 µg GrdA und 10 mM Benzylviologen getestet (DIETRISCHS et al. 1991). Der Farbumschlag des Benzylviologens von farblos zu violett zeigt die Aktivität der Proteine GrdA, TrxB und TrxA an.

Zur GrdE-Spaltung wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Spaltansätze über Nacht anaerob bei 30 °C inkubiert. Die Zugabe der einzelnen Komponenten erfolgte unter anaeroben Bedingungen im Mini-Hungate in der angegebenen Reihenfolge, um ein reduzierendes Milieu herzustellen.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der GrdE-Spaltansätze

Spaltansatz	1	2	3	4	Kontrolle
KP pH 8,0	50 mM				
Glc-6-P-DH	0,4 µg	-	-	-	-
Glc-6-P	2,5 mM	-	-	-	-
NADPH	1 mM	1 mM	-	-	-
DTT	-	-	10 mM	10 mM	-
TrxB	20 µg	20 µg	20 µg	-	-
TrxA	10 µg	10 µg	10 µg	-	-
GrdA	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg	-
GrdE	50 µg				
H₂O	ad 200 µl				

Die Zugabe von Glc-6-P-DH und Glc-6-P erfolgte zur Regeneration des NADPH. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben nach mit Chloroform/Methanol gefällt und mit-

tels SDS-PAGE, Western Blot und *Strep*-tag II-Nachweis analysiert. Wie in Abb. 3.3 gezeigt, konnte GrdE unter diesen Bedingungen nicht gespalten werden.

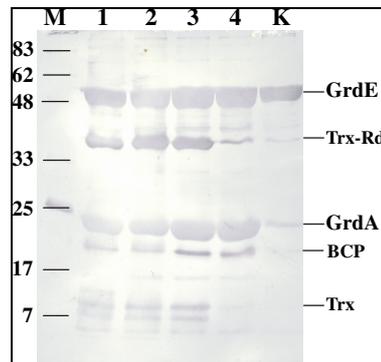


Abb. 3.3: Western Blot mit *Strep*-tag II-Nachweis verschiedener GrdE-Spaltansätze. **Spur M:** Molekulargewichtsmarker [kDa]; **1-4, K:** Spaltansätze 1-4, Kontrolle (s. Tabelle 3.2). Das lösliche Biotin-Carrier-Protein (BCP) von *E. coli*, das bei ca. 20 kDa läuft, reagiert ebenfalls positiv auf den *Strep*-tag II-Antikörper-Nachweis.

3.2 Bestimmung der Spaltdomäne

In diesem Kapitel wird die Expression und Reinigung der Proproteine PrdA und GrdE als Fusionsproteine mit N-terminalem MaleE aus *E. coli* und C-terminalem TrxA aus *C. sticklandii* beschrieben, um die Größe der Spaltdomäne bestimmen zu können. Dazu wurden verschieden große Sequenzbereiche mit der Spaltstelle zwischen die zwei Fusionsproteine kloniert.

3.2.1 Konstruktion der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine

Die Grundlage zur Konstruktion von Fusionsproteinen bildete der Expressionsvektor pASK-IBA 3. In pASK-IBA 3 wurde das mit den Primern *malES3f/malEPstIr* aus *E. coli* K12 amplifizierte *malE*-Gen ohne Stopp-Codon und das mit den Primern *trxAPstIf/trxAS3r* aus *C. sticklandii* amplifizierte *trxA*-Gen ebenfalls ohne Stopp-Codon kloniert. Das so entstandene Plasmid pFUS3 stellte die Grundlage zur Bildung der verschiedenen PrdA- und GrdE-Fusionsprotein-Varianten dar. Hierzu wurden verschieden große Fragmente des *prdA*- und *grdE*-Genes in pFUS3 kloniert (Abb. 3.4). Dabei wurden die Proteine so konstruiert, dass durch Vorliegen der Spaltstelle des PrdA- und GrdE-Proteins (bei PrdA zwischen Thr⁴²⁵ und Cys⁴²⁶, bei GrdE zwischen Asn²⁴¹ und Cys²⁴²) innerhalb des Fusionsproteins eine Spaltung möglich wäre.

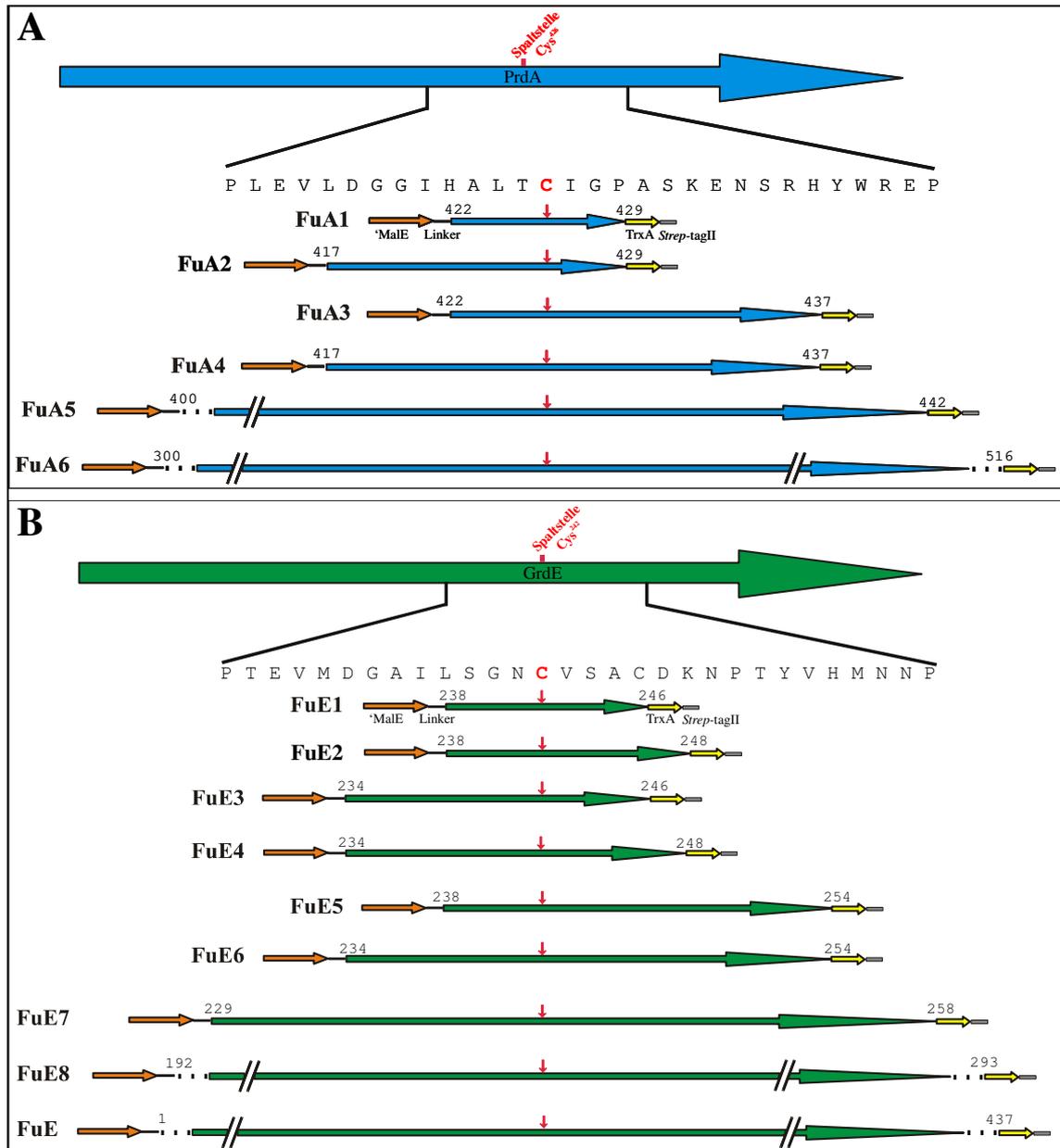


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der PrdA- (A) und GrdE-Fusionsproteinvarianten (B). FuA1 bis FuA6: PrdA-Fusionsproteinvarianten 1 bis 6; Spaltstelle Cys⁴²⁶: Spaltstelle im PrdA-Protein; FuE1 bis FuE6: GrdE-Fusionsproteinvarianten 1 bis 8; Spaltstelle Cys²⁴²: Spaltstelle im GrdE-Protein; 'MalE: MBP aus *E. coli* K12; TrxA: Thioredoxin aus *C. sticklandii*; Strep-tag II: Strep-tag II-Peptid; Linker: Verbindungspeptid. Die PrdA- und GrdE-Proteinfragmente sind mit der Nummer der startenden und endenden Aminosäure gekennzeichnet.

3.2.2 Expression und Reinigung der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine

Die aus 3.2.1 resultierenden Plasmide pFUE1 – 8 und pFUA1 – 6 (Abb. 3.4) wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3)-RIL transformiert und die Expression der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine mit C-terminalem Strep-tag II wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die Expression aller konstruierten PrdA- und GrdE-Fusionsproteine konnte gezeigt werden, und die verschiedenen PrdA- und GrdE-Fusionsproteine konn-

ten mittels Affinitätschromatographie an *StrepTactin*® gereinigt werden. Waren die Proteine nicht homogen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie an MonoQ abgeschlossen.

3.2.3 *In vitro* Spaltung der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine

Die Versuche zur *in vitro* Spaltung der Fusionsproteine konzentrierten sich auf die verschieden großen GrdE-Fusionsproteine. Die homogen gereinigten Proteine sollten sich zwischen Asn²⁴¹ und Cys²⁴² spalten lassen, wobei die N-terminale Untereinheit mit fusioniertem MalE und die C-terminale Untereinheit mit fusioniertem TrxA entstehen müssten. Die Spaltung erfolgte unter den für GrdE bestimmten Bedingungen (BEDNARSKI et al. 2001) und wurde im SDS-PAA-Gel überprüft.

Es konnten alle Fusionsproteine durch NaBH₄ gespalten werden. Deutlich zeigte sich jedoch die Abhängigkeit zwischen Spalteffizienz und Größe des GrdE-Fragmentes. Während sich die Konstrukte FuE, FuE8 und FuE7 noch deutlich spalten ließen, konnten FuE1 – 4 deutlich weniger effizient gespalten werden (Abb. 3.5).

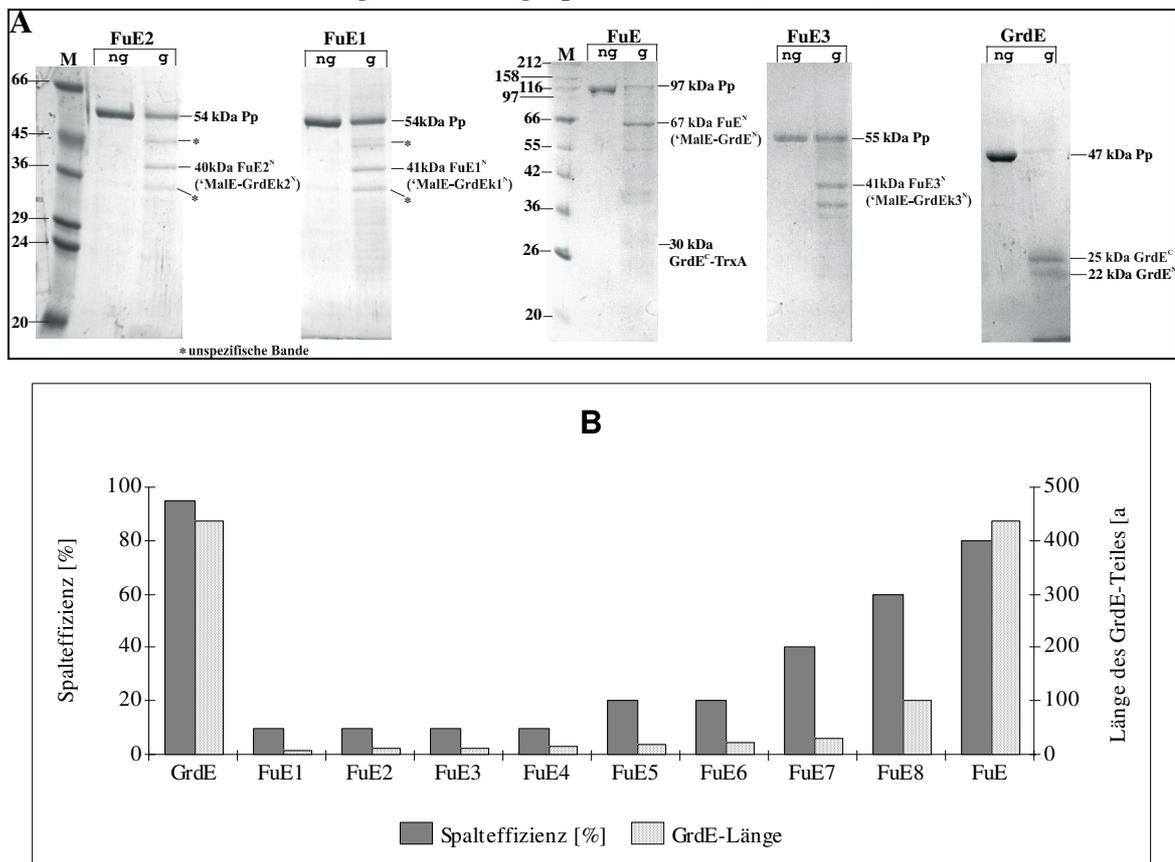


Abb. 3.5: SDS-PAA-Gel (10%) der *in vitro* Spaltung verschiedener GrdE-Fusionsproteine (A) und Diagramm mit Spalteffizienzen der GrdE-Fusionsproteine (B). A: Spur M: Molekulargewichtsmarker [kDa]; FuE, FuE1 bis 3: Fusionsproteine E, E1 bis 3; GrdE: GrdE-Protein; g: gespaltenes Protein (s. Text); ng: nicht gespaltenes Protein. Pp: Proprotein; FuE^{N/C}, FuE1-3^{N/C}, GrdE^{N/C}: N bzw. C-terminales Spaltstück von FuE, FuE1-3, GrdE.

Kontrolliert wurde die spezifische Spaltung durch Sequenzieren der 67 kDa N-terminalen FuE^{N} ($\text{MalE_GrdE}^{\text{N}}$) und der 30 kDa C-terminalen Untereinheit FuE^{C} ($\text{GrdE}^{\text{C_TrxA}}$) des Fusionsproteins FuE . Der N-Terminus der 67 kDa Bande entsprach dem von MalE . Für das C-terminale Spaltstück wurde eine N-terminale Sequenz von VSACDKNPTYV bestimmt, die mit der GrdE -Proteinsequenz übereinstimmt, jedoch der Cys^{242} -Rest fehlte wie bei der GrdE -Spaltung des unfusionierten GrdE -Proteins (BEDNARSKI et al. 2001). Weiterhin wurde die Spezifität der Spaltung durch Mutanten kontrolliert, bei denen der Cys^{242} -Rest zum Alanin mutiert war. Die Mutanten wurden durch Cycle-PCR-Mutation (2.2.8.1) hergestellt, dabei wurden die Plasmide pFu6 bis pFu8 als Template und die Primer mutgrdEAla-f und mutgrdEAla-r eingesetzt. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte keine *in vitro* Spaltung der exprimierten und an *Streptactin*® gereinigten Mutantenproteine FuE6^{Ala} bis FuE8^{Ala} , wobei die Spaltbedingungen des Wildtyps angewandt wurden (Abb. 3.6).

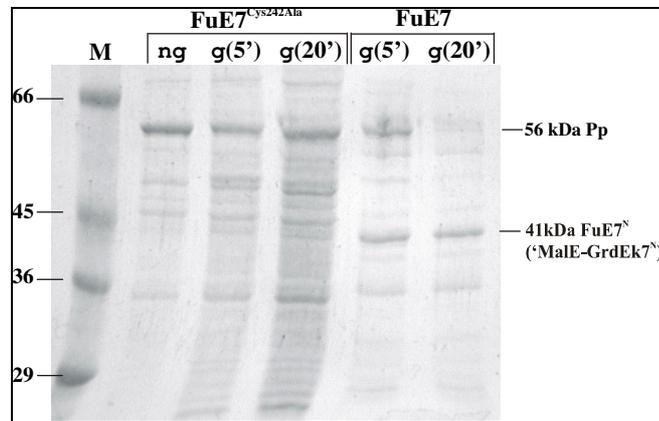


Abb. 3.6: SDS-PAA-Gel (10%) der *in vitro* Spaltung des Wildtyp-GrdE-Fusionsproteins FuE7 und der Mutante FuE7^{Ala} . Spur M: Molekulargewichtsmarker [kDa]; $\text{FuE7}^{\text{Cys242Ala}}$: Fusionsprotein FuE7 mit Mutation der Spaltstelle $\text{Cys}^{242}\text{Ala}$; FuE7 : Fusionsprotein 7; g (5'/20'): 5 bzw. 20 min gespaltenes Protein; ng: nicht gespaltenes Protein. Pp: Proprotein; FuE7^{N} : N-terminales Spaltstück von FuE7 .

In Anlehnung an die Spaltung der GrdE -Fusionsproteine wurden *in vitro* Spaltungen ebenfalls mit den PrdA -Fusionsproteinen durchgeführt. Die Spaltstelle des PrdA -Proproteins befindet sich zwischen Thr^{425} und Cys^{426} . Auch hier konnte eine Spaltung der Proteine mit NaBH_4 beobachtet werden, welche in ihrer Effizienz ebenfalls von der Länge des PrdA -Fragmentes abhängig war (Daten nicht gezeigt). Jedoch waren die PrdA -Fusionsproteine instabil und neigten zu unspezifischen Abbau während der Behandlung mit NaBH_4 (s. a. BEDNARSKI et al. 2001), so dass eine exakte quantitative Bewertung nicht möglich ist.

3.3 Koexpression von PrdA und GrdE mit anderen Proteinen des Prolin- und Glycin-Reduktase-Operons

Dieses Kapitel beschreibt die Koexpression des Proproteins PrdA mit den Proteinen PrdB, PrdD und PrdE (Abb. 1.3) in *E. coli* bzw. des Proproteins GrdE mit Koexpression der Proteine GrdB und GrdA (Abb. 1.3). Es sollte ermittelt werden ob, diese Proteine Einfluss auf die Spaltung und Stabilität der Proproteine haben.

3.3.1 Versuche zur Expression des gesamten Proproteins PrdA

Das 68 kDa große PrdA konnte in vorausgegangenen Arbeiten lediglich als ein etwa 30 kDa großes Protein mit N-terminalen *Strep*-tag II und als ein etwa 29 kDa großes Protein mit C-terminalen *Strep*-tag II überexprimiert und nur unvollständig gereinigt werden (BEDNARSKI et al. 2001). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit durch Variation der Expressionsbedingungen versucht das gesamte PrdA rekombinant zu exprimieren. Dazu wurden die Plasmide pPrdAS3 und pPrdAS5 in den *E. coli* Überexpressionsstamm BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL transformiert. 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. Es zeigte sich, dass weder in *E. coli* BL21(DE3)-Codon-Plus-RIL noch in *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pUBS520 ein Expressionsprodukt in gesamter PrdA-Größe nachweisbar war. Durch das mit den Expressionsvektoren kompatible Plasmid pUBS520 (BRINKMANN 1990) wird die in *E. coli* seltene tRNA für die Arginin-Codons AGG und AGA, die *C. sticklandii* im Gegensatz zu *E. coli* überwiegend verwendet, koexprimiert. Auch durch die Koexpression von Faltungshelfern wie die *E. coli*-Chaperone GroESL oder das *E. coli*-Thioredoxin, welche auf den mit den Expressionsvektoren kompatiblen Plasmiden pT-GroE und pT-Trx (YASUKAWA et al. 1995) kodiert sind, konnte PrdA ebenfalls nicht vollständig exprimiert werden.

3.3.2 Expression von PrdA und GrdE mit PrdBDE und GrdAB

Das Protein PrdA der D-Prolin-Reduktase konnte bisher in keiner Form als vollständiges Proprotein heterolog exprimiert werden. Die Proteine PrdD und PrdE der D-Prolin-Reduktase weisen hohe Homologien zu PrdA auf, wobei PrdD zum N-terminalen Teil von PrdA und PrdE zum C-terminalen Teil von PrdA homolog ist. Da die Funktion dieser Proteine unbekannt ist, könnten sie Chaperone für PrdA darstellen und die Reifung des Proproteins erleichtern. PARTHER (2003) zeigte, dass eine Expression von stabilem GrdB nur möglich ist, wenn GrdE oder die abgeleiteten Gensequenzen der Prozessierten UE's (22 und 25 kDa UE) auch anwesend sind.

In den nachfolgenden Experimenten wurden die Gene *prdAB*, *prdABDE*, *prdAD*, *prdA-DE* und *prdDE* sowie *grdEAB* und *grdEB* in Vektoren zur heterologen Protein-

Expression in *E. coli* kloniert, um die Expression und mögliche autokatalytische Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE zu untersuchen.

3.3.2.1 Klonierung der *prdAB*-, *prdABDE*-, *prdAD*- und *prdDE*-Gene in pASK-IBA 5

Zunächst wurde das *prdB*-Gen der D-Prolin-Reduktase mit den Primern pBXhoIRBSf und pBSalIr aus chromosomaler DNA amplifiziert und in den Expressionsstamm pASK-IBA 5 kloniert. Das Protein PrdB enthält ein Selenocystein, welches durch das TGA-Codon codiert ist. Bei der Expression in *E. coli* wird dieses nicht erkannt und die Proteinsynthese an dieser Stelle beendet. Daher wurde die Cystein-Mutante von PrdB hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pPrdBS5 als Template eingesetzt und mit den Primern mpBU/Cf und mpBU/Cr amplifiziert. Das so entstandene Plasmid pPrdB^{U/C}S5 wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Anschließend wurden die *prdA*- und *prdDE*-Gene mit den Primerpaaren pABamHIIf/pAXhoIr und pDESalIRBSf/pDENcoIr amplifiziert und in die Plasmide pPrdBS5 und pPrdB^{U/C}S5 kloniert (Abb. 3.7, Tabelle 3.3).

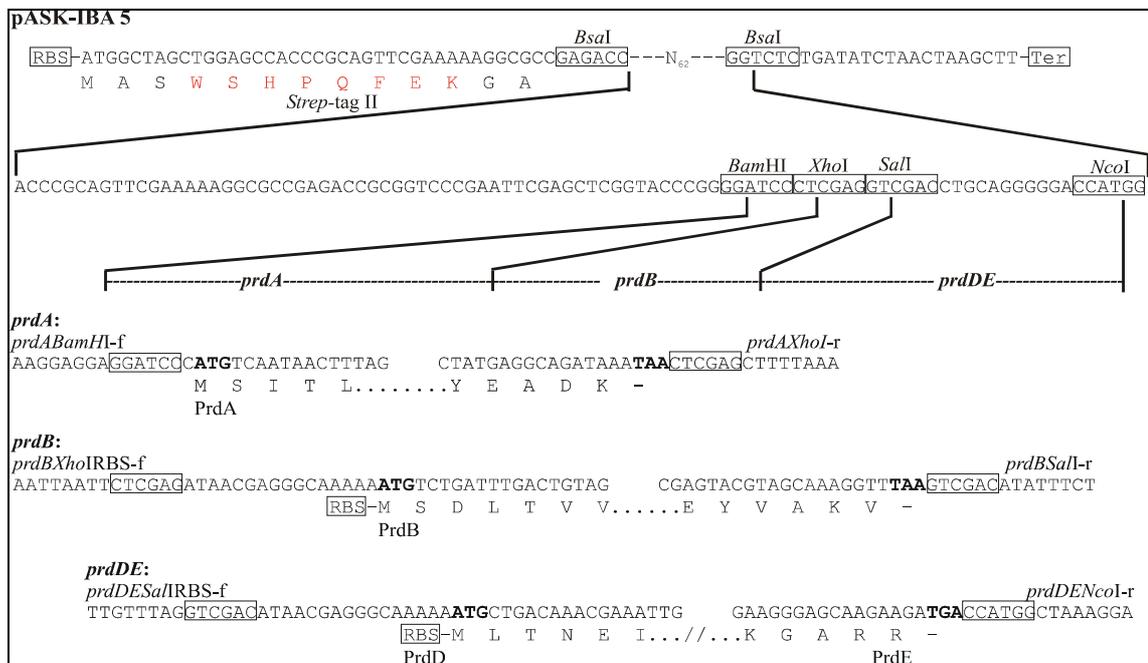
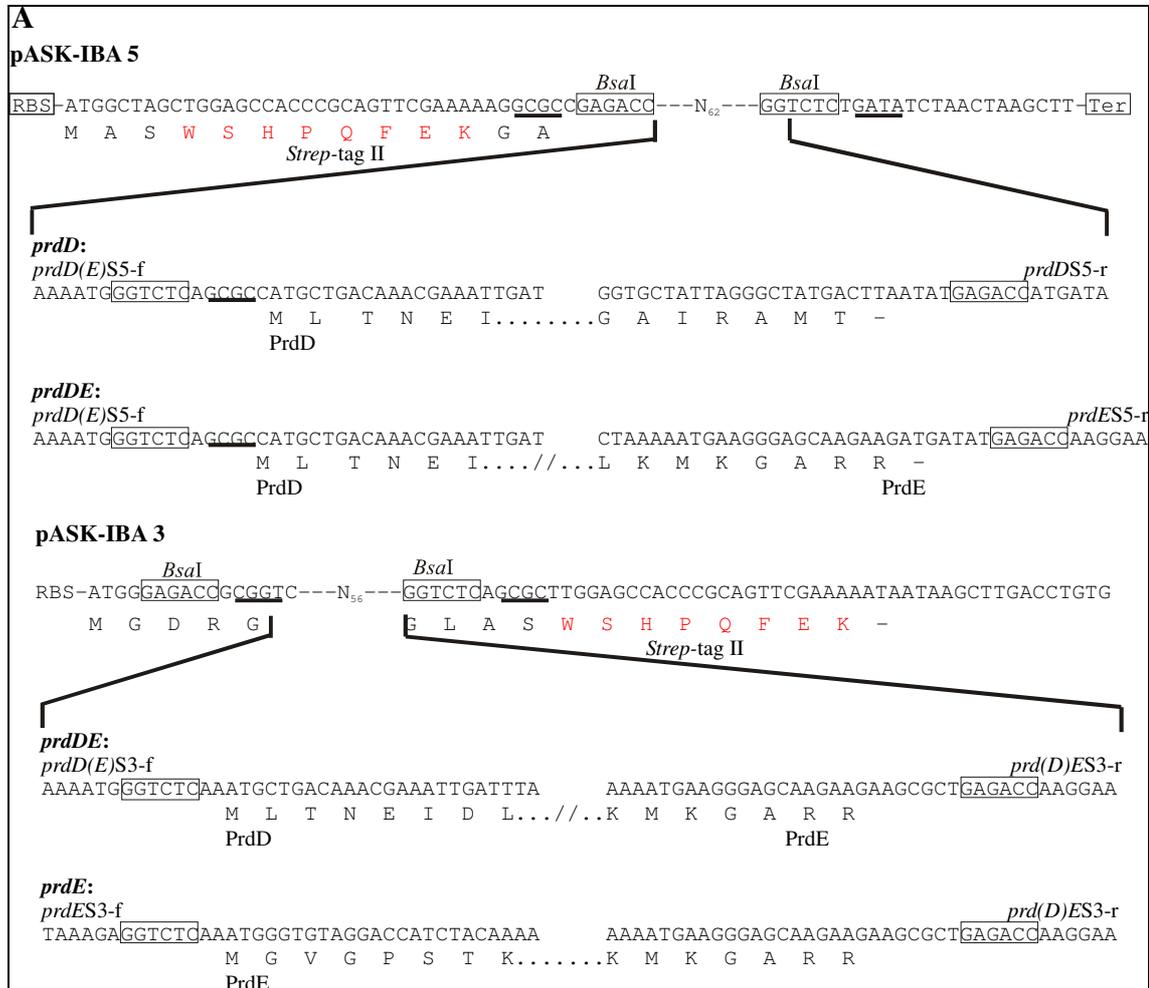


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der PrdAB^(U/C)S5- und PrdAB^(U/C)DES5-Konstrukte im Expressionsvektor pASK-IBA 5. Angegeben ist die *multiple cloning site* des Vektors sowie die Sequenz der Primer pABamHIIf, pAXhoIr, pBXhoIRBSf, pBSalIr, pDESalIRBSf und pDENcoIr, mit denen die für PrdA, PrdB und PrdDE codierenden DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Die Erkennungssequenzen der für die Klonierung genutzten BamHI-, XhoI-, Sali- und NcoI-Schnittstellen sind eingerahmt. Die Start- und Stopp-Codons der zu exprimierenden Gene wurden fett hervorgehoben. Die Sequenz des Strep-tag II ist rot hervorgehoben. RBS: Ribosomen-Bindestelle; Ter: Transkriptions-Terminator.

Des Weiteren wurden zum Test ihrer Funktion die Gene *prdD* und *prdE* unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen in die Expressionsvektoren pASK-IBA 3 und 5 kloniert (Abb. 3.8, Tabelle 3.3) und Expressionsplasmide auf der Basis von pASK-IBA 5 konstruiert, welche nur die Gene *prdA* und *prdD* bzw. *prdA* und *prdDE* kodieren.

Hierzu wurde das Gen *prdA* mit den Primern p*ABamH*if/p*AXho*Ir und die Gene *prdDE* mit den Primern p*DESa*IIif/p*DEPs*tIr amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA 5 kloniert. In einer weiteren PCR mit den Primern pAS5f/pDS5r und dem Plasmid pPrdA_DES5 als Template wurden die Gene *prdA_prdD* als Produkt amplifiziert, welches dann erneut in pASK-IBA 5 kloniert wurde (Abb. 3.8, Tabelle 3.3).



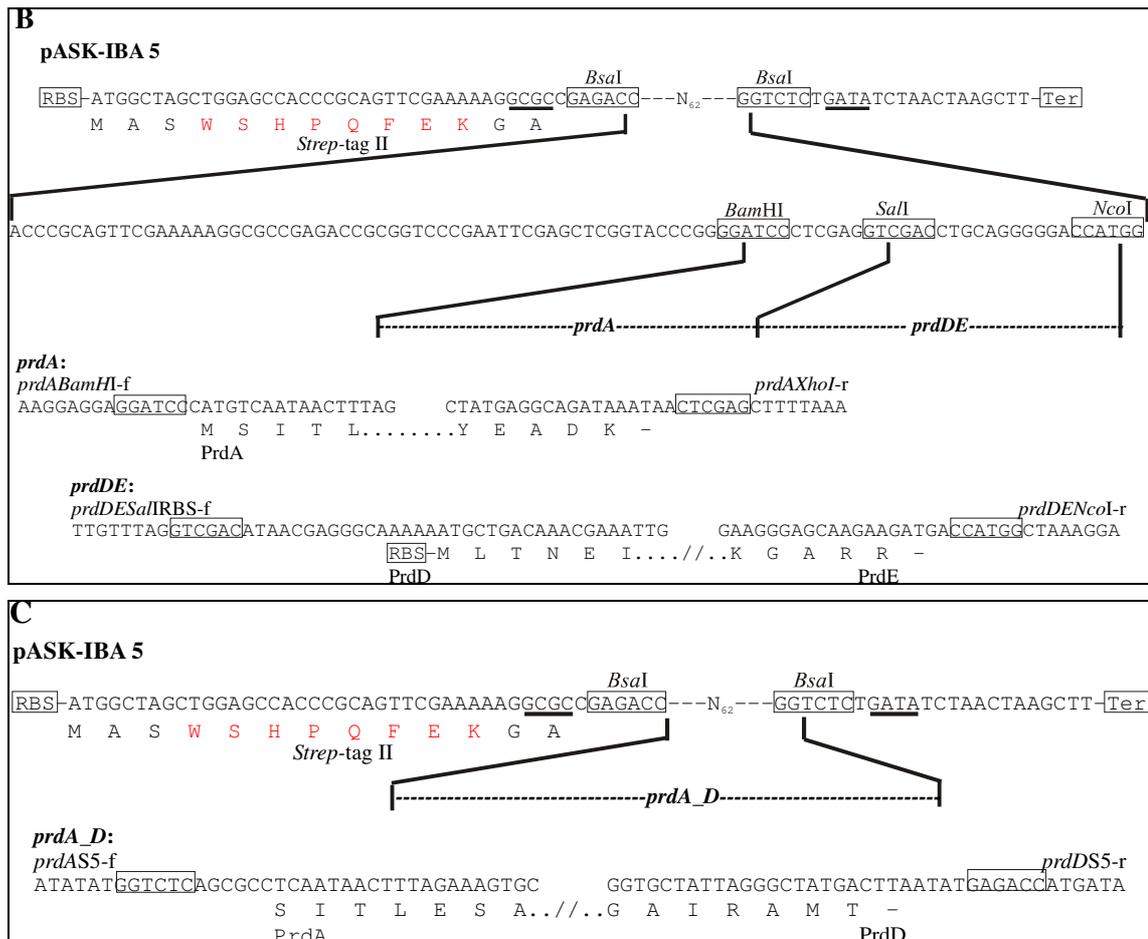


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der PrdDS5-, PrdDES5-, PrdDES3-, PrdES3-Konstrukte (A), des PrdA_{DES5}-Konstruktes (B) sowie des PrdA_{DS5}-Konstruktes (C) in den Expressionsvektoren pASK-IBA 3 bzw. 5. Angegeben ist die *multiple cloning site* des Vektors sowie die Sequenz der Primer pD(E)S5f, pDS5r, pDES5r, pDES3f, pES3f, p(D)ES3r, pABamHIf, pAXhoIr, pDESsalIRBSf und pDENcoIr, mit denen die für PrdA, PrdB und PrdDE codierenden DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Die Erkennungssequenzen der für die Klonierung genutzten *Bsa*I-, *Bam*HI-, *Xho*I-, *Sal*I- und *Nco*I-Schnittstellen sind eingerahmt, der nach Restriktionsverdau mit *Bsa*I entstehende 5'-Überhang ist unterstrichen. Die relevanten Start- und Stopp-Codons wurden fett hervorgehoben. Die Sequenz des *Strep-tag II* ist rot hervorgehoben. RBS: Ribosomen-Bindestelle; Ter: Transkriptions-Terminator.

Alle erhaltenen Gen-Konstrukte zur Koexpression von Proteinen der D-Prolin-Reduktase sind in Tabelle 3.3 zusammenfassend aufgeführt.

3.3.2.2 Klonierung der *grdEB*- und *grdEAB*-Gene in pASK-IBA 5

Nach dem Klonierungsschema für die PrdA-Konstrukte wurden analoge GrdE-Protein-Konstrukte hergestellt. Zur Konstruktion des Plasmides pGrdE_B^(U/C)S5 wurde *grdB* mit den Primern gBXhoIRBSf/gBSalIr aus chromosomaler DNA amplifiziert, in pASK-IBA 5 kloniert, durch Cycle-PCR-Mutation (2.2.8.1) mit den Primern mgBU/Cf und mgBU/Cr das Selenocystein zum Cystein mutiert und anschließend *grdE*, welches mit gEBamHIf/gEXhoIr amplifiziert wurde, in pGrdBS5 und pGrdB^(U/C)S5 kloniert (Abb. 3.9, Tabelle 3.3). Das Plasmid pGrdEABS5 entstand durch Amplifikation

von *grdEAB* mit den Primern *gES5f/gBS5r* aus chromosomaler DNA und Klonierung in *pASK-IBA 5* (Abb. 3.9, Tabelle 3.3).

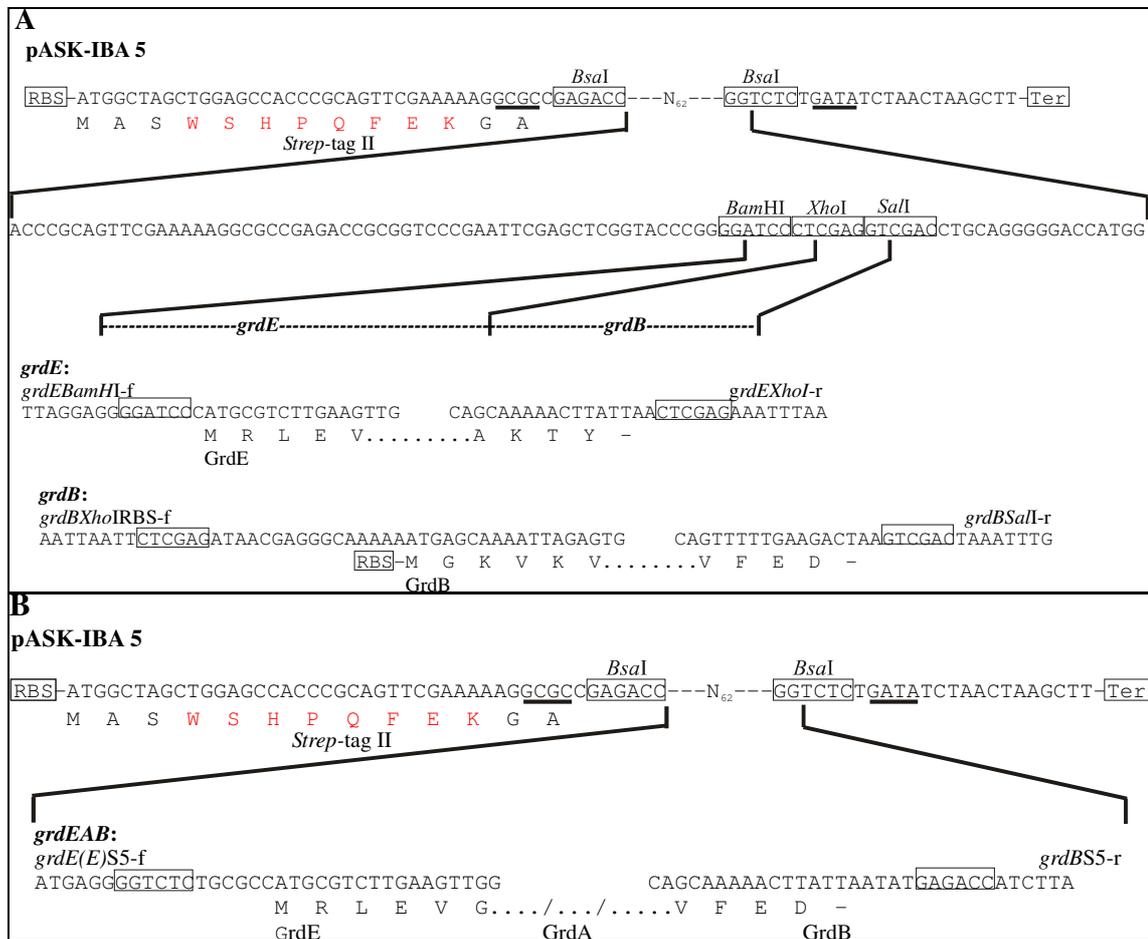


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der GrdE_BS5-(U/C)-Konstrukte (A) und des GrdEABS5-Konstruktes (B) im Expressionsvektor pASK-IBA 5. Angegeben ist die *multiple cloning site* des Vektors sowie die Sequenz der Primer *gEBamHI*f, *gEXhoI*r, *gBXhoIRBS*f, *gBSalI*r, *gES5*f und *gBS5*r, mit denen die für GrdE, GrdB und GrdEAB codierenden DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Die Erkennungssequenzen der für die Klonierung genutzten *BsaI*-, *BamHI*-, *XhoI*- und *SalI*-Schnittstellen sind eingerahmt, der nach Restriktionsverdau mit *BsaI* entstehende 5'-Überhang ist unterstrichen. Die relevanten Start- und Stopp-Codons wurden fett hervorgehoben. Die Sequenz des *Strep-tag II* ist rot hervorgehoben. RBS: Ribosomen-Bindestelle; Ter: Transkriptions-Terminator.

Die erhaltenen Gen-Konstrukte zur Koexpression von Proteinen der Glycin-Reduktase sind ebenfalls in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Konstrukte zur Koexpression von Proteinen der D-Prolin- und Glycin-Reduktase

Konstrukt	Insert	Vektor
Konstrukte der D-Prolin-Reduktase		
pPrdBS5	<i>prdB</i> (0,73 kb)	pASK-IBA5
pPrdB ^{U/C} S5	<i>prdB</i> ^{U/C} (0,73 kb)	pASK-IBA5
pPrdABS5	<i>prdAB</i> (2,9 kb)	pASK-IBA5
pPrdAB ^{U/C} S5	<i>prdAB</i> ^{U/C} (2,9 kb)	pASK-IBA5
pPrdABDES5	<i>prdABDE</i> (4,2 kb)	pASK-IBA5
pPrdAB ^{U/C} DES5	<i>prdAB</i> ^{U/C} DE (4,2 kb)	pASK-IBA5
pPrdA_DS5	<i>prdA</i> (2,1 kb) und <i>prdD</i> (0,76 kb)	pASK-IBA5
pPrdA_DES5	<i>prdA</i> (2,1 kb) und <i>prdDE</i> (1,25 kb)	pASK-IBA5
pPrdDS5	<i>prdD</i> (0,76 kb)	pASK-IBA5
pPrdDES5	<i>prdDE</i> (1,25 kb)	pASK-IBA5
pPrdES3	<i>prdE</i> (0,47 kb)	pASK-IBA3
pPrdDES3	<i>prdDE</i> (1,25 kb)	pASK-IBA3
Konstrukte der Glycin-Reduktase		
pGrdBS5	<i>grdB</i> (1,3 kb)	pASK-IBA5
pGrdB ^{U/C} S5	<i>grdB</i> ^{U/C} (1,3 kb)	pASK-IBA5
pGrdE_BS5	<i>grdE</i> (1,3 kb) und <i>grdB</i> (1,3 kb)	pASK-IBA5
pGrdE_B ^{U/C} S5	<i>grdE</i> (1,3 kb) <i>grdB</i> ^{U/C} (1,3 kb)	pASK-IBA5
pGrdEAB ^{U/C} S5	<i>grdEAB</i> (3,1 kb)	pASK-IBA5

3.3.2.3 Expression der PrdABDE-Konstrukte als *Strep*-tag II-Fusion

Die Expression von PrdA als N-terminale *Strep*-tag II-Fusion (3.3.2.1; Abb. 3.7) sollte untersucht werden. Durch Koexpression von PrdB bzw. PrdB, PrdD und PrdE könnte das vollständige 68 kDa große PrdA erhalten oder der Abbau von PrdA während der Expression verhindert werden. Die Expressionsstämme mit den pPrdABS5-, pPrdABDES5-Plasmiden wurden zusätzlich mit pASBC (GURSINSKY 2002) transformiert, welches die Expression von Selenoproteinen in *E. coli* durch gleichzeitige Expression der auf den Plasmid codierten Gene *selB* und *selC* von *E. acidaminophilum* ermöglicht. Die Zellen aller Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, einer SDS-PAGE unterworfen und geblottet. Die *Strep*-tag II-Fusionsproteine wurden mit dem „*Strep*-tag II detection Assay“ nachgewiesen.

In Ansätzen mit den Plasmiden pPrdABDES5, pPrdABDE-U/C konnte wiederum nur ein verkürzt exprimiertes oder bereits abgebautes PrdA-Proprotein (ca. 50 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 3.10).

Die verschiedenen *prdD*- und *prdE*-*Strep*-tag II-Konstrukte (3.3.2.1; Abb. 3.8) wurden auf ihre Expression untersucht und konnten mit der molaren Masse von 28 kDa (PrdD)

und 18 kDa (PrdE) exprimiert werden. Die Expression beider Proteine erfolgte nur mit dem pPrdDES5-Konstrukt, d.h. nur wenn beide Proteine gleichzeitig auf dem Expressionsplasmid kodiert vorliegen und PrdD N-terminal *Strep*-tag II-fusioniert ist. Die zusammen exprimierten Proteine konnten mittels Affinitätschromatographie an *Strep*Tactin® gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Proteine PrdD und PrdE werden somit durch eine starke Protein-Protein-Interaktion zusammen gehalten.

Da es möglich ist, PrdD und PrdE heterolog in *E. coli* zu exprimieren und PrdD zum N-terminalen Teil bis zur Spaltstelle von PrdA homolog ist, jedoch nicht zu den ersten 165 Aminosäuren von PrdA, und PrdE zum C-terminalen Teil von PrdA homolog ist, sollte PrdA mit PrdD und PrdE exprimiert werden. Dazu sollten die, wie unter 3.3.2.1 beschrieben, in den pASK-IBA 5-Expressionsvektor klonierten *prdA*- und *prdB*- bzw. *prdDE*-Gene als PrdA-Protein mit N-terminal fusioniertem *Strep*-tag II exprimiert werden. Die Expression der pPrdA_DS5 und pPrdA_DES5 enthaltenden Expressionsstämme wurde durchgeführt und eine vollständige Expression von PrdA durch das pPrdA_DES5- und pPrdA_DS5-Konstrukt erhalten. Im Ansatz mit pPrdA_DES5 konnte zusätzlich ein verkürzt exprimiertes oder bereits abgebautes PrdA-Protein (ca. 30 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Das vollständig exprimierte PrdA ließ sich jedoch nicht durch Chromatographie an *Strep*Tactin® reinigen.

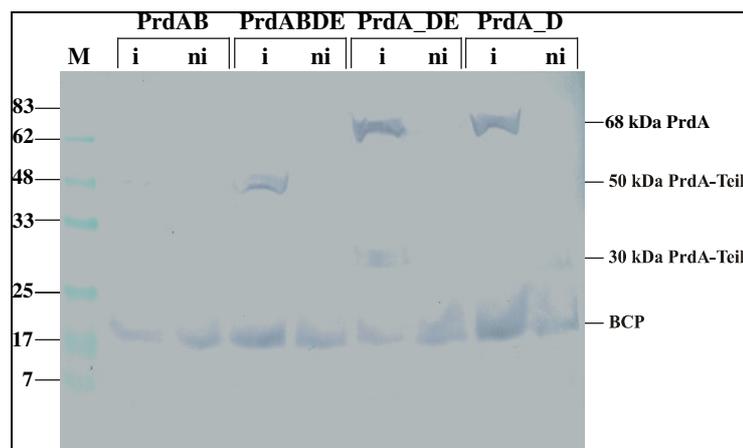


Abb. 3.10: Nachweis der Expression verschiedener PrdA-Varianten mittels Western-Blot. Spur M: Prestained Molekulargewichtsmarker [kDa]; i: SDS-Lysat von Zellen nach der Induktion mit AHT; ni: SDS-Lysat von Zellen vor der Induktion mit AHT; PrdAB, PrdABDE, PrdA_DE; PrdA_D: N-terminal *Strep*-tag II-fusioniertes PrdA-Protein in Kombination mit PrdBDE, PrdDE, PrdD. Die Größe der exprimierten Varianten ist rechts angegeben. Das lösliche Biotin-Carrier-Protein (BCP) von *E. coli*, das bei ca. 20 kDa läuft, reagiert ebenfalls positiv auf den *Strep*-tag II-Antikörper-Nachweis.

3.3.2.4 Expression der GrdEAB-Konstrukte als *Strep*-tag II-Fusion

Die konstruierten Plasmide pGrdE_BS5, pGrdE_B-U/C und pGrdEAB (3.3.2.2; Abb. 3.9) lagen in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-RIL zur Expression von N-terminal *Strep*-tag II fusioniertem GrdE gleichzeitig mit GrdB bzw. GrdA und GrdB vor. Die Analyse der Proben mit dem „*Strep*-tag II detection Assay“ zeigte jeweils das N-terminal *Strep*-tag II fusionierte GrdE-Protein. Jedoch konnte das GrdE-Protein

wiederum nur in Form von *inclusion bodies* exprimiert werden. Auch die gleichzeitige Expression des Proteins GrdB in den verschiedenen Varianten führte zur Bildung des vollständigen GrdE-Proteins als *inclusion bodies* (Daten nicht gezeigt).

3.4 Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins der D-Prolin-Reduktase

Die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* konnte von KABISCH et al. (1999) homogen gereinigt werden. Zur Messung des Enzyms wurde DTT als Reduktionsmittel eingesetzt, um das gemischte Selenid-Sulfid zu reduzieren, das in der Reaktion gebildet wird, nachdem das Substrat reduziert ist. NADH ist der natürliche Elektronendonator der D-Prolin-Reduktase (SETO 1980, KABISCH et al. 1999), weil im Rohextrakt von *C. sticklandii* NADH aber nicht NAPPH, wie bei der Glycin-Reduktase, zur Messung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität verwendet werden kann. Da während der Anreicherung die NADH-abhängige Aktivität verloren geht, muss eine weitere Proteinkomponente in *C. sticklandii* an der Elektronenübertragung beteiligt sein (SCHWARTZ & MÜLLER 1979, SETO 1980, KABISCH et al. 1999). Im Operon der D-Prolin-Reduktase liegt stromaufwärts des *prdA*-Genes das *prdC*-Gen (Abb. 1.3), welches für ein putativ elektronentransferierendes Protein codiert (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999). PrdC zeigt Sequenzhomologien zum RnfC-Protein aus *Rhodobacter capsulatus*, welches in die Elektronenübertragung auf die Nitrogenase involviert ist (SCHMEHL et al. 1993; KUMAGAI et al. 1997), und besitzt zwei besonders hoch konservierte Bereiche, welche potentielle NADH- und FMNH₂-Bindestellen darstellen (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999).

Versuche mit heterolog in *E. coli* exprimierten und gereinigten PrdC zeigten nicht eindeutig, dass nach PrdC-Zugabe zur D-Prolin-Reduktase-Messung NADH als Elektronendonator fungieren kann (BEDNARSKI et al. 2001). Daher sollte das elektronentransferierende Protein für die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* angereichert werden. Für die Anreicherung wurden Zellen von *C. sticklandii* verwendet, die auf Minimal-Medium mit 50 mM Prolin im 100 l-Fermenter gewachsen waren, da diese die höchste spezifische DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität aufwiesen (64 U/mg).

3.4.1 Anreicherung von PrdC durch Säulenchromatografie mit Hilfe von polyklonalen α PrdC-Antikörpern

3.4.1.1 Vorversuche mit polyklonalen α PrdC Antikörpern

Von den „Sequence Laboratories“ (Göttingen) wurden polyklonale α PrdC-Antikörper hergestellt. Zur Immunisierung wurde in *E. coli* als N-terminale *Strep*-tag II-Fusion exprimiertes und an *StrepTactin*® gereinigtes PrdC eingesetzt (2.7.1). Die α PrdC-Antikörper wurden zunächst an ProteinA-Sepharose aus dem Kaninchenserum gereinigt (2.7.3). Die Spezifität der Antikörper wurde durch Western Blot-Verfahren und anschließender Doppelimmunpräzipitation getestet (2.7.4).

Es zeigte sich, dass der α PrdC-Antikörper sowohl mit dem heterolog exprimierten PrdC als auch mit PrdC aus dem Rohextrakt von *C. sticklandii* spezifisch reagiert. Die erwartete molekulare Masse von PrdC sind 42 kDa, jedoch lief das aus dem Rohextrakt von *C. sticklandii* nachgewiesene PrdC-Protein im SDS-PAA-Gel bei einer höheren Masse. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass PrdC auch exprimiert wurde, wenn die Zellen in Minimalmedium ohne Prolin bzw. in Komplexmedium gewachsen waren (Abb. 3.11 A). Am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase wurde PrdC am stärksten exprimiert, da PrdC hier quantitativ in größeren Mengen nachweisbar war. Mit fortschreitender exponentieller Wachstumsphase sank die Menge an PrdC (Abb. 3.11 A). Des Weiteren konnte PrdC heterolog im Rohextrakt von *Clostridium difficile*, jedoch nicht im Rohextrakt von *E. acidaminophilum* nachgewiesen werden (Abb. 3.11 B). Somit konnten erstmals Komponenten der D-Prolin-Reduktase von *C. difficile* auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

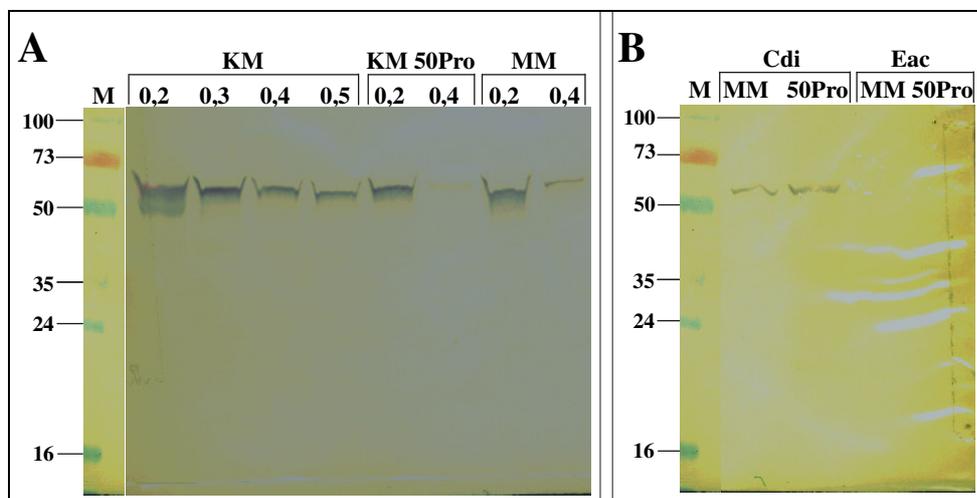


Abb. 3.11: Western Blot und PrdC-Nachweis in verschiedenen *C. sticklandii*-Rohextrakten (A) und PrdC-Nachweis in Rohextrakten von *C. difficile* und *E. acidaminophilum* (B). **A:** Spur M: Prestained Molekulargewichtsmarker [kDa]: Die *C. sticklandii*-Zellen der verschiedenen Medien (MM: Minimalmedium; MM 50 Pro: Minimalmedium mit 50 mM Prolin; KM: Komplexmedium) wurden bei verschiedenen OD₆₀₀-Werten (0,2-0,6) geerntet, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE, Western Blot und *Strep*-tag II-Nachweis analysiert. **B:** Spur M: Prestained Molekulargewichtsmarker [kDa]: Die auf Medien ohne und mit Prolin gewachsenen *C. difficile*- (Cdi) und *E. acidaminophilum*-Zellen (Eac) wurden am Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE, Western Blot und *Strep*-tag II-Nachweis analysiert.

Da der PrdC-Antikörper spezifisch mit PrdC reagiert sollte PrdC während der Anreicherung aus *C. sticklandii* durch Dot-Blot-Nachweis gemessen werden.

3.4.1.2 Vorversuche zur Anreicherung von PrdC durch Säulenchromatografie

Zunächst wurden verschiedene Säulenmaterialien darauf getestet, ob sie PrdC zu binden vermögen. Für die Vorversuche und auch für die spätere erste Anreicherung wurde nach 2.3.1 hergestelltes Rohextrakt von *C. sticklandii* verwendet. Dieser wurde auf die Probensäulen (1-2 ml Bettvolumen) mit den verschiedenen Säulenmaterialien gegeben. Dabei zeigte sich, dass PrdC bei 0,8 M Ammoniumsulfat an die hydrophoben Materialien

Butyl- und Octyl-Sepharose bindet und mit salzfreiem Puffer wieder eluiert werden kann. Von Phenyl-Sepharose konnte das gebundene PrdC mit 20 % Ethylenglycol eluiert werden. Q-Sepharose vermochte sowohl bei pH 8 als auch bei pH 9 PrdC nur schwach zu binden, PrdC eluierte jeweils in den späten Waschfraktionen und bei 0,1 M KCl im Elutionspuffer. Weiterhin zeigte sich, dass PrdC an SP-Sepharose bindet und bei 0,3 M Salz im Elutionspuffer wieder von der Säule eluiert. Cibacron Blue und ADP-Sepharose sind Nukleotid-imitierenden Säulenmaterialien, die PrdC zu binden vermochten. Allerdings fand sich auch hier im Durchlauf PrdC und das Protein „schmierte“ über die gesamten Elutionsfraktionen. DTT, welches für die D-Prolin-Reduktase-Aktivität dem Puffer zugesetzt werden sollte, stört die Bindung an Nukleotid-imitierenden Säulenmaterialien (GRANDERATH 1993; MEYER 1993; HARMS 1995). In den Vorversuchen zeigte sich weiterhin, dass 50 μ M FMN im Reinigungs-Puffer die Aktivität stimulieren.

3.4.1.3 Anreicherung von PrdC

Die Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins PrdC wurde in einer Anaerobox bei 4 °C durchgeführt. Als anaerober Basis-Puffer diente Puffer C (2.6.8). Nach den Chromatographien wurde zunächst jede zweite bis vierte Fraktion durch Dot-Blot und anschließenden PrdC-Nachweis auf Vorhandensein von PrdC getestet. Am Ende der Anreicherung wurden dann die PrdC-enthaltenden Fraktionen spezifisch auf Stimulierung einer NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität durch Zugabe der DTT-abhängigen D-Prolin-Reduktase vermessen.

Die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität wurde aus *C. sticklandii* mittels Chromatographie an Q-Sepharose isoliert (89 U/mg) (2.6.7) (Daten nicht gezeigt).

Für die Anreicherung von PrdC wurde als erstes Chromatographiematerial SP-Sepharose gewählt. Der Extrakt wurde auf eine mit dem Puffer F äquilibrierte SP-Sepharose-Säule (50 ml Bettvolumen) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 120 ml Puffer F wurde ein KCl-Gradient in Puffer F mit 700 ml von 0 bis 1 M angelegt. PrdC eluierte in einem Peak zwischen 0,2-0,3 M KCl. Fraktionen, die PrdC enthielten, wurden vereinigt und auf Puffer C umpuffert. Die Proteinlösung wurde anschließend auf eine mit Puffer C äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (50 ml Bettvolumen) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 120 ml Puffer C wurde ein KCl-Gradient in Puffer F mit 700 ml von 0 bis 1 M angelegt. PrdC eluierte im Durchlauf und in den ersten Elutionsfraktionen bis 0,15 M KCl. PrdC-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und zur weiteren Aufreinigung gegen Puffer C dialysiert und eingengt. Die Proteinlösung wurde anschließend auf eine Superdex 200 HR Gelfiltrations-Säule (ca. 90 ml Bettvolumen) aufgetragen, welche zuvor mit 0,1 M KCl in Puffer C äquilibriert wurde. PrdC eluierte zwischen 81,5 und 121,5 ml. Fraktionen mit PrdC wurden vereinigt, gegen Puffer C dialysiert und eingengt. Die Analyse der aktiven und der umliegenden Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte eine Anreicherung von PrdC (Abb. 3.12). PrdC konnte jedoch nicht elektrophoretisch homogen angereichert werden, da es in dieser Form sehr instabil war und bei weiteren chromatografischen Schritten proteolytisch abgebaut wurde.

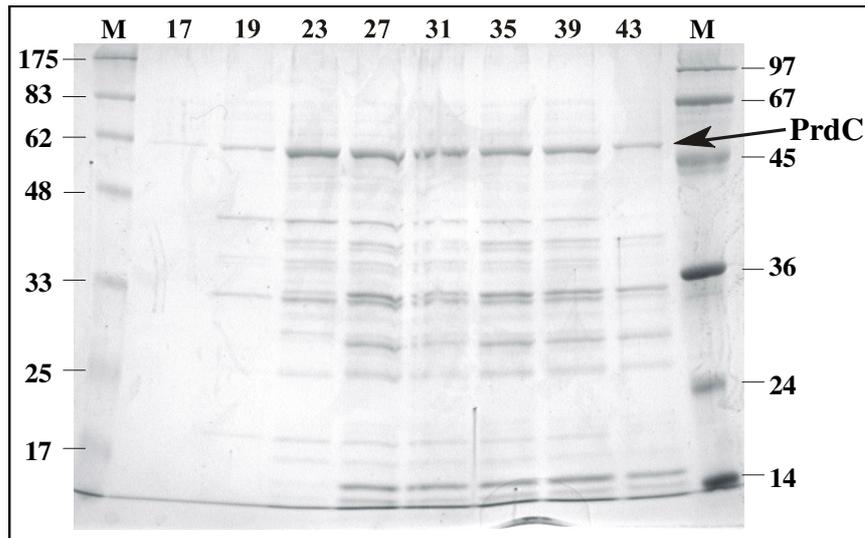


Abb. 3.12: SDS-PAA-Gel (10%) der Aufreinigung des elektronentransferierenden Proteins PrdC aus *C. sticklandii*. Spur: M, Marker; 17; 19; 23; 27; 31; 35; 39; 43, entspricht der Nummer der Fraktionen nach der Trennung an der Superdex 200 HR Gelfiltrations-Säule.

3.4.2 Messung der D-Prolin-Reduktase mit PrdC als Elektronentransferprotein

Um Rückschlüsse auf die elektronentransferierenden Eigenschaften von PrdC ziehen zu können, wurde die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität mit NADH als Elektronendonator mit und ohne gereinigtem PrdC gemessen (Abb. 3.13).

Durch Zusatz von PrdC konnte die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität um Faktor 7,5 gesteigert werden (Abb. 3.13). Hierzu wurde PrdC mit der DTT-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität und 50 μM FMN 30 min anaerob bei 4 $^{\circ}\text{C}$ vorinkubiert und anschließend die DTT- und NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität bestimmt (2.6.1). Somit konnte gezeigt werden, dass die gereinigten PrdC-Fractionen den Elektronentransport von NADH zur D-Prolin-Reduktase stimulieren. Der PrdC-Zusatz stimulierte auch die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität, jedoch nur um Faktor 2,7 (Abb. 3.13). Unter den untersuchten Bedingungen wurden durch Zusatz von 50 μM FAD und 50 μM Fe^{2+} keine höheren Aktivitäten erreicht.

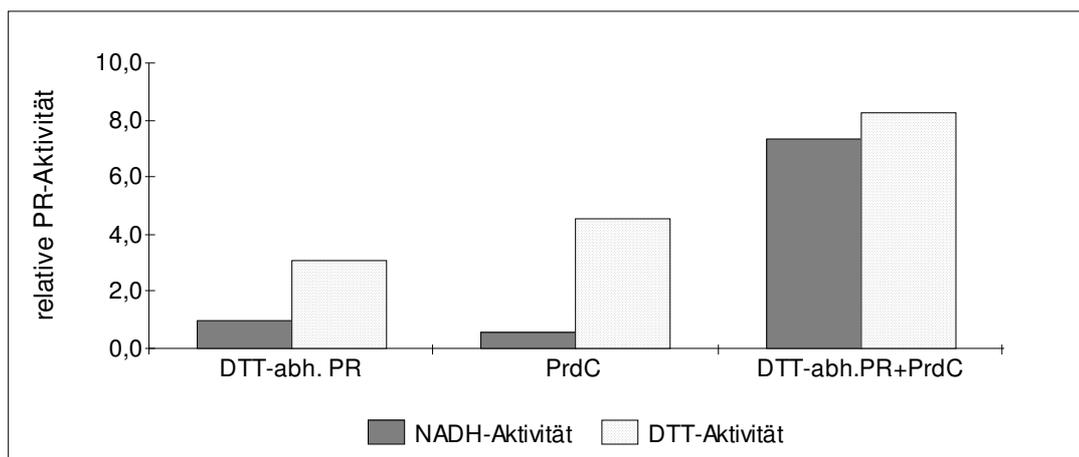


Abb. 3.13: Diagramm der DTT- und NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivitäten mit PrdC als elektronentransferierendes Protein. Die dargestellten Werte der DTT- und NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität beziehen sich auf die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität der DTT-abhängigen D-Prolin-Reduktase (erster Balken von links), welcher gleich eins gesetzt wurde. 1,0 entspricht 12 U/mg Protein. DTT-abh. PR: Vermessung der DTT-abhängigen D-Prolin-Reduktase; PrdC: Vermessung des angereicherten elektronentransferierenden Proteins PrdC, PrdC-Pool aus Fraktionen 23-40 von Abb. 12; DTT-abh. PR+PrdC: Vermessung der DTT-abhängigen D-Prolin-Reduktase mit dem angereicherten PrdC (s. Text).

PrdC hatte eine hohe Spezifität für NADH, Elektronendonoren wie NADPH oder FADH_2 (jeweils 20 mM im Test) stimulierten die D-Prolin-Reduktase-Aktivität nicht (Daten nicht gezeigt). Das pH-Optimum von PrdC konnte grob mit pH 7,0 bestimmt werden, bei pH 8 hatte die durch PrdC stimulierte NADH-abhängige Aktivität nur 60 %, bei pH 6 nur 18 % der Aktivität des pH-Optimums (Daten nicht gezeigt). Nach mehr als 24 h Lagerung bei 4 °C bzw. mehr als 4 Wochen bei -20 °C zeigte PrdC kaum noch Aktivität, was auf eine hohe Instabilität des Proteins deutete. Zur genaueren Charakterisierung des elektronentransferierenden Proteins PrdC sind weitere Untersuchungen erforderlich.

3.4.3 Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums

Die vereinigten Fraktionen der Gelfiltration wurden in der Anaerobenbox gegen Puffer C ohne FMN dialysiert und auf 500 μl eingengt. Zur Aufnahme des reduzierten Spektrums wurde die Probe in der Küvette 10 min. inkubiert, anschließend aus der Box herausgeschleust und das Spektrum von 230 bis 800 nm aufgenommen. Um störende Effekte durch Pufferbestandteile, wie FMN-Reste, auszuschließen, wurde eine Basislinie aufgenommen. Anschließend wurde die Küvette geöffnet und ab und zu geschüttelt und ein weiteres Spektrum aufgenommen. Das Spektrum der angereinigten PrdC-Probe zeigte keine Peaks, die auf Bindung von Kofaktoren wie Eisen-Schwefel-Zentren, Chinone oder Cytochrome hindeuten.

3.4.4 Weitere Versuche zur Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins

3.4.4.1 Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins durch Messung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase- und der NADH-DH-Aktivität

Für die Anreicherung des elektronentransferierenden Proteins PrdC zusammen mit der D-Prolin-Reduktase wurde *C. sticklandii* Rohextrakt verwendet. Als anaerober Basis-Puffer diente Puffer A (2.6.7). Alle Schritte, soweit nicht gesondert erwähnt, wurden in einer Anaerobenbox bei 4 °C durchgeführt. Nach den Chromatographien wurde zunächst jede zweite bis vierte Fraktion per Mikrotiterplattentest mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor in der Anaerobenbox bzw. mit MTT als Elektronenakzeptor außerhalb auf NADH-DH-Aktivität getestet. In Fraktionen mit Aktivität wurde dann die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase gemessen.

Als erstes Chromatographiematerial wurde Q-Sepharose gewählt. Der Extrakt wurde auf eine mit dem Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule wurde mit einem KCl-Gradienten eluiert. NADH-DH-Aktivitäten eluierten in mehreren Peaks. Die höchste NADH-DH-Aktivität eluierte mit den ersten Waschfraktionen. Die weiteren NADH-DH-Aktivitäts-Peaks waren deutlich schwächer und eluierten zwischen 0,5 und 0,6 M KCl. Fraktionen, die die höchste NADH-DH-Aktivität zeigten, hatten auch die größte NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität und wurden zur weiteren Aufreinigung vereinigt und eingengt. Die Proteinlösung wurde anschließend mit einer Superdex 200 HR Gelfiltrations-Säule getrennt. Die NADH-DH-Aktivität eluierte in den ersten Fraktionen nach dem Ausschlussvolumen. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer A dialysiert. Nach Äquilibrierung einer MonoQ HR5/5-Säule mit dem gleichen Puffer, wurde die Enzym-Lösung aufgetragen, die Säule mit Puffer A gewaschen und mit einem ansteigenden KCl-Gradienten eluiert. Die NADH-DH-Aktivität eluierte zwischen 0,35 und 0,45 M KCl.

Die Analyse der aktiven Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte deutlich, dass in allen aktiven Fraktionen drei Proteinspezies mit 45, 26 und 23 kDa enthalten waren (Abb. 3.14). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich auch aus einem Gemisch aus D-Prolin-Reduktase und PrdC. Die Messung der D-Prolin-Reduktase-Aktivität in dieser Fraktion ergab höhere Aktivitäten für die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase (96 mU), die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität war nur noch schwach messbar (0,7 mU).

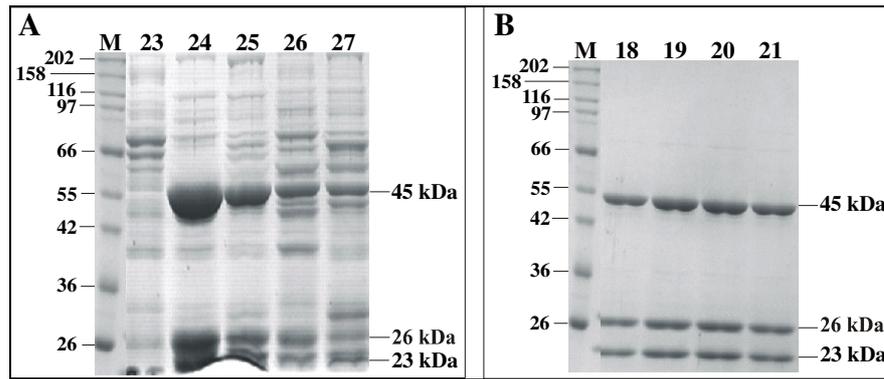


Abb. 3.14: SDS-PAA-Gel (10%) des Aufreinigungsversuches des elektronentransferierenden Proteins PrdC aus *C. sticklandii*. **A:** SDS-PAA-Gel nach Superdex 200 HR Gelfiltrations-Säule. Spur: 23; 24; 25; 26; 27; 28, entspricht der Nummer der Fraktionen nach der Trennung an der Superdex 200 HR Gelfiltrations-Säule. **B:** SDS-PAA-Gel nach MonoQ HR5/5-Säule Säule. Spur: 17; 18; 19; 20; 21; 22, entspricht der Nummer der Fraktionen nach der Trennung an der Superdex 200 HR Gelfiltrations-Säule. 45, 26 und 23 kDa UE: Untereinheiten der angereicherten D-Prolin-Reduktase.

Auch die Zugabe von bis zu 100 μM FAD bzw. FMN konnte die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität nicht erhöhen. Die N-terminale Sequenzierung der 45 kDa-Bande ergab die Sequenz SITLESA, welche der 45 kDa-Untereinheit der D-Prolin-Reduktase entspricht, und keine Sequenz, die auf PrdC hindeuten konnte. Des Weiteren wurde das angereicherte Protein im nativen Gel (2.3.3.2) getrennt und analysiert. Die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität, jedoch kaum NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität, war in den oberen Gelabschnitten nachweisbar war. Gleichzeitig konnte die D-Prolin-Reduktase-Bande im nativen Gel aktiv gefärbt werden (2.6.3), welches auf die Fähigkeit des Elektronentransfers schließen lässt. Auch eine Trennung des Proteins in einem denaturierenden Gradientengel zeigte keine Bande, die dem elektronentransferierenden Protein PrdC entsprach. Somit konnte PrdC mit dieser Methode nicht angereichert werden, sondern nur die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase.

3.4.4.2 Anreicherung von PrdC durch Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation sollte PrdC spezifisch aus dem Rohextrakt von *C. sticklandii* entfernt werden. In dem verbleibenden Rohextrakt müsste dann nur noch eine DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität messbar sein. Gleichzeitig sollte PrdC als Komplex mit den PrdC-Antikörpern gekoppelte an ProteinA-Sepharose angereichert werden.

Die Immunpräzipitation erfolgte anaerob unter Einsatz von 50 – 600 μg PrdC-Antikörper und 100 μl 10%iger ProteinA-Sepharose (2.7.5). Als Proteinlösung wurde Rohextrakt von *C. sticklandii* eingesetzt. Der Antikörper lag dabei löslich oder an ProteinA-Sepharose gekoppelt vor. Als Kontrollen diente eine Probe mit Rohextrakt ohne Antikörper und eine Probe mit Rohextrakt unter Zusatz von Präimmenserum. Nach Abtrennung der Immunkomplexe erfolgte die D-Prolin-Reduktase-Messung mit DTT und NADH als Elektronendonator. Das Absinken beider Aktivitäten mit steigender PrdC-Antikörper-Konzentration deutete auf eine Immunpräzipitation nicht nur spezifisch von

PrdC, sondern des gesamten D-Prolin-Reduktase-Komplexes hin. Außerdem kam es ebenfalls zum Absinken beider Aktivitäten in der Kontrolle mit Rohextrakt und Präimmunserum, welches auf eine unspezifische Immunpräzipitation schließen lässt. Die Analyse der Immunkomplexe und der verbleibenden Extrakte durch SDS-PAGE, Western Blot und immunologischen PrdC-Nachweis zeigte, dass auch durch mehrmaligen Zusatz von PrdC-Antikörpern das PrdC aus dem Rohextrakt nicht vollständig entfernt werden konnte und dass die Immunkomplexe sich aus einer Vielzahl von Proteinen (>30) zusammensetzten (Daten nicht gezeigt). In folgenden Experimenten wurde daher versucht, PrdC effizienter aus dem Rohextrakt von *C. sticklandii* zu fällen.

Hierzu wurde Rohextrakt verwendet, der zuvor einem *pre-clearing* (2.7.5) unterzogen wurde. Mit dem *pre-clearing* wurden unter Zusatz „normal rabbit serum“ und „PANSORBIN® Cells“ zunächst die im Rohextrakt unspezifisch gebildete Präzipitate abgetrennt. Weiterhin wurden bis zu 1 M KCl oder bis zu 0,01 % SDS (w/v) zum Rohextrakt gegeben, um unspezifische Proteininteraktionen zu vermeiden. Jedoch konnte weder durch diese Maßnahmen noch durch Variation der Inkubationszeiten und der Inkubationstemperatur sowie der Rohextrakt- und Antikörper-Konzentrationen PrdC spezifisch aus dem Rohextrakt von *C. sticklandii* durch Immunpräzipitation entfernt werden (Daten nicht gezeigt).

3.5 Untersuchungen zur Transkription der *prdXR*-Gene

Die Transkription der *prdXR*-Gene wurde durch Northern-Blot-Analyse von LIEBMANN (1999) untersucht. Dabei ließen sich keine Transkripte durch Northern-Blot-Analysen nachweisen. RT-PCR lieferte ebenfalls keine eindeutigen Aussagen.

3.5.1 *primer extension*-Analysen der *prdXR*-Gene

In dieser Arbeit wurde versucht, potentielle Transkriptionsstartpunkte zu identifizieren. Dazu wurden *primer-extension*-Experimente mit FAM-markierten Oligonukleotiden aus dem Bereich der Gene *prdX* und *prdR* durchgeführt. Anschließend wurden die *primer extension*-Reaktionen mittels Fragmentlängenanalyse ausgewertet (Tabelle 3.4). Gesamt-RNA aus *C. sticklandii*, die aus in Minimal-, Prolin-Minimal- (50 mM), Komplex- und Prolin-Komplexmedium (50 mM) gewachsener Zellen isoliert worden war, wurde als Template eingesetzt.

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes vor *prdX* wurden vier verschiedene *prdX*-spezifische Primer eingesetzt, mit denen verschiedene Fragmente erhalten wurden. Als Transkriptionsstart wurden daher mehrere Basen (von 173 bis 392 bp) stromaufwärts des ATG-Startcodons von PrdX bestimmt. Die Sequenzen stromaufwärts der potentiellen Transkriptionsstartpunkte zeigten keinerlei Ähnlichkeit zu Konsensus-Sequenzen bekannter Promotoren (YOUNG et al. 1989; WÖSTEN 1998, Tabelle 3.4). Lediglich der 173 bp stromaufwärts gelegene Transkriptionsstart zeigt im 5'-Bereich Homologien zu bekannten Promotoren. Im Abstand von sechs Nukleotiden befand sich die

Sequenz 5'-TTGTCA_{-18bp}-TAAGCAT-3'. Die Übereinstimmung mit der -10-Region der Konsensus-Sequenz beträgt fünf, mit der -35-Region vier Basen, der Abstand zwischen diesen beiden Motiven wäre für einen Promotor optimal.

Alle *primer extension*-Reaktionen wurden mehrfach wiederholt und mit verschiedenen RNA-Präparationen aus unterschiedlich gewachsenen Zellen durchgeführt. Dabei wurden stets die gleichen potentiellen Transkriptionsstartpunkte erhalten (Tabelle 3.4; Abb. 3.15).

Mit einem *prdR*-spezifischen Primer wurde 111 Nukleotide stromaufwärts von PrdR ein möglicher Startpunkt des Transkriptes identifiziert. Im 5'-Bereich befand sich als mögliche Promotorregion die Sequenz 5'-TTGAAA_{-16bp}-TGGTAAT-3'. Die Übereinstimmung der -10-Region und der -35-Region mit der Konsensus-Sequenz beträgt jeweils fünf Basen, der Abstand zwischen den beiden Regionen wäre für einen Promotor optimal (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Ermittelte Transkriptionsstartpunkte und putative Promotorstrukturen

Nr.	TS ^a	-35	-10	+1	bp vor ATG	Primer ^b			
					-Start von				
					PrdX				
1)		CTAGATACAGTGCATACTGATATGCTT	GAAAGAGCTAGAGC	TCATAGA	392	<i>prdXPE1</i>			
2)		TAGAGACAGTAAAACATTTTACATTCAAGGATTATGAGGAGT	TCAAGAG		348	<i>prdXPE3</i>			
3)		AAAGGAATGTGGTGC GGAGAAGAAGAGTGTGAGGCTAAGAT	TAAGAA		272	<i>prdXPE2</i>			
4)		AAGAGTGTGAGGCTAAGATTAAGAAGATACAGGAGTAACA	ATTCGTT		250	<i>prdXPE2,3</i>			
5)		TAAGATTAAGAAGATACAGGAGTAACAATTCGTTGTATTCC	TTTTTGT		237	<i>prdXPE4</i>			
6)		AAGAAAATCTTGGAGAGACTTGTTCAGTTCTGCGGAAAGCCA	GCTAAGC		187	<i>prdXPE4</i>			
7)		GAGAC	TTGTCA	GTTCTGCGGAAAGCCAGC	TAAGCAT	ATGGT	ATATCTA	173	<i>prdXPE2</i>
					PrdR				
		TTCGTATGAGGATC	TTGAAA	AAAATAGTCAAGGCAAAT	TGGTAAT	ACTTTTA	111	<i>prdRPE1</i>	
					Konsensus ^c				
		TTGACA	-----17N-----	TATAAT					

^a Nr. TS: Nummerierung der potentiell ermittelten Transkriptionsstarts von PrdX.

^b Die Liste mit den verwendeten Primern befindet sich im Anhang.

^c Konsensus-Sequenz für σ^{70} Promotoren in Clostridien (YOUNG et al. 1989; WÖSTEN 1998). Konservierte Basen in der Konsensussequenz sind fett gedruckt.

Anhand der ermittelten Daten liegen vermutlich mehrere verschiedene Transkripte mit unterschiedlichen Startpunkten vor. Ob die Transkriptmenge bzw. -länge von Prolin im Medium beeinflusst wird, konnte mit den durchgeführten Experimenten nicht gezeigt

chromosomaler DNA wurden ebenfalls die erwarteten Produkte erhalten, bei PCR-Kontrollreaktion mit RNA wurden keine Produkte erhalten.

Dieses Resultat bestätigte die an Hand der *primer extension*-Daten vermutete Existenz mehrerer verschiedener *prdX*- und *prdR*-Transkripte. Diese können auftreten, wenn z.B. die mRNA abgebaut wird. Es ist daher keine definitive Aussage zur Transkription von PrdX und PrdR möglich, wahrscheinlich werden jedoch die Promotoren genutzt, die zu den bekannten Konsensus-Sequenzen Homologien aufweisen.

Stromaufwärts vor *prdX* befindet sich zwischen den Startpunkten für Transkription und Translation eine *inverted repeat*-Struktur. PrdX könnte somit einen Repressor darstellen, der durch Bindung an die *inverted repeat*-Struktur die Transkriptmenge von *prdX* und *prdR* kontrolliert (A. PICH pers. Mitteilung). Außerdem führen Sekundärstrukturen im 5'-Bereich zu einer erhöhten Stabilität der mRNA (BECKHOFFER 1993).

3.6 Untersuchungen zur Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons

Stromaufwärts von *prdC* wurde im D-Prolin-Reduktase-Operon das Gen *prdR* identifiziert (Abb. 1.3). Der Intergenbereich vor *prdC* weist sowohl eine σ^{54} -abhängige als auch eine σ^{70} -abhängige Promotorstruktur auf (LIEBMANN 1999). Außerdem wurde eine Bindestelle für den *integration host factor* (IHF) identifiziert. PrdR hat hohe Homologien zu regulatorischen Proteinen der *enhancer binding protein*-Familie (EBP) vom NifA-Typ, so dass PrdR ein potentieller Regulator für das D-Prolin-Reduktase-Operon ist (LIEBMANN 1999). In weiteren Studien wurde stromaufwärts von *prdR* das Gen *prdX* identifiziert (Abb. 1.3), welches schwache Homologien zu Transkriptionsregulatoren mit *helix-turn-helix*-Motiven zeigt, die vermutlich als Repressor wirken (A. PICH pers. Mitteilung).

Um den Regulationsmechanismus des D-Prolin-Reduktase-Operons zu untersuchen, wurden Fusionen der postulierten Regulations-Elemente mit dem *lacZ*-Gen hergestellt. Da *C. sticklandii* genetisch nicht zugänglich ist, sollten die plasmidcodierten *lacZ*-Fusionen durch die in *E. coli* messbaren β -Galactosidase-Aktivitäten Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen liefern. Voraussetzung hierfür ist, dass die potentiellen Regulator-Elemente des D-Prolin-Reduktase-Operons aus *C. sticklandii* in *E. coli* erkannt werden und wie in *C. sticklandii* funktionieren. Da diese Systeme hochgradig konserviert sind, wurde davon ausgegangen.

3.6.1 Konstruktion der *lacZ*-Fusionen

Zunächst wurde das *lacZ*-Gen von *E. coli* mit den Primern *lacZBamHI*f und *lacZKpnI*r aus chromosomaler DNA amplifiziert und in den Vektor pUC19 kloniert (pLACZ). Anschließend wurde das *prdR*-Gen mit den Primerpaaren pR*SalI*f und pR*BamHI*r aus chromosomaler DNA von *C. sticklandii* amplifiziert und in das Plasmid pLACZ direkt vor das *lacZ*-Gen kloniert (pRZ). Als Kontrolle für die Funktionstüchtigkeit des σ^{54} -Promotor aus *C. sticklandii* in *E. coli* wurde der Intergenbereich zwischen *prdR* und

prdC ebenfalls in das Plasmid pLACZ kloniert. Hierzu wurde der Intergenbereich mit den Primern *s54-SalI-F* und *s54-BamHI-r* aus chromosomaler DNA von *C. sticklandii* amplifiziert und in das Plasmid pLACZ direkt vor das *lacZ*-Gen kloniert (pS54Z). Die so erzeugten Plasmide (pRZ, pS54Z) trugen eine Fusion zwischen dem *prdR*-Gen bzw. dem Intergenbereich zwischen *prdR* und *prdC* aus *C. sticklandii* und dem β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (Abb. 3.16).

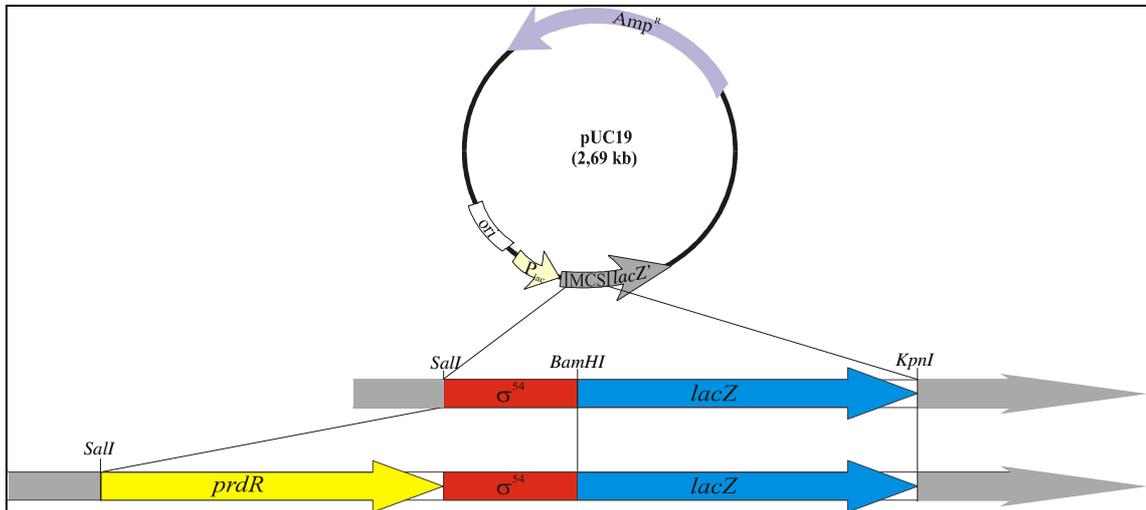


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der konstruierten *prdR*'/*s54*'-*lacZ*-Fusionen. pUC19: pUC19-Klonierungsvektor, Amp^R: Ampicillin-Resistenz; ori: Replikationsursprung; P_{lac}: Promotor für das *lacZ*-Gen; *lacZ*: Gen des α -Peptides der β -Galactosidase; MCS: *multiple cloning site*; *prdR*: Gen des Regulator-Proteins PrdR; σ^{54} : konservierte σ^{54} -Promotor-Region; *lacZ*: Gen der β -Galactosidase; *SalI*, *BamHI*, *KpnI*: für die Klonierung genutzte Restriktionsschnittstellen.

3.6.2 β -Galactosidase-Aktivitäten der Fusions-Konstrukte

Die durch Sequenzierung überprüften Plasmide, pRZ und pS54Z, wurden in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pLACZ und als Negativkontrolle wurde das Plasmid pASK-IBA 3 ebenfalls in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Zur Induktion wurde IPTG, 20 mM D-, L- oder D,L-Prolin zu den Kulturen gegeben. Die ermittelten β -Galactosidase-Aktivitäten sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst und in Abb. 3.17 grafisch dargestellt.

Tabelle 3.5: β -Galactosidase-Aktivitäten der *prdR*'/s54'-*lacZ*-Fusionen in *E. coli* XL1 Blue

Plasmid	Medium + Induktor	Miller-Units	[%] der Aktivität
pS54Z	LB	10610	256
pRZ	LB	439	11
pLACZ	LB	471	11
pASK-IBA 3	LB	66	2
pS54Z	LB + IPTG	6831	164
pRZ	LB + IPTG	4813	116
pLACZ	LB + IPTG	4152	100
pASK-IBA 3	LB + IPTG	290	7
pS54Z	LB + 20 mM D,L-Pro	6912	166
pRZ	LB + 20 mM D,L-Pro	335	8
pLACZ	LB + 20 mM D,L-Pro	570	14
pASK-IBA 3	LB + 20 mM D,L-Pro	95	2
pS54Z	M9	13101	554
pRZ	M9	1485	63
pLACZ	M9	392	17
pASK-IBA 3	M9	89	4
pS54Z	M9 + IPTG	14040	594
pRZ	M9 + IPTG	2117	90
pLACZ	M9 + IPTG	2364	100
pASK-IBA 3	M9 + IPTG	58	3
pS54Z	M9 + 20 mM D,L-Pro	13527	572
pRZ	M9 + 20 mM D,L-Pro	1228	52
pLACZ	M9 + 20 mM D,L-Pro	491	21
pASK-IBA 3	M9 + 20 mM D,L-Pro	103	4

Um die Werte der verschiedenen Gene vergleichen zu können, wurden die Aktivitäten jeweils ins Verhältnis zum entsprechenden voll induzierten *lacZ*-Gen (LB + IPTG und M9 + IPTG) gesetzt.

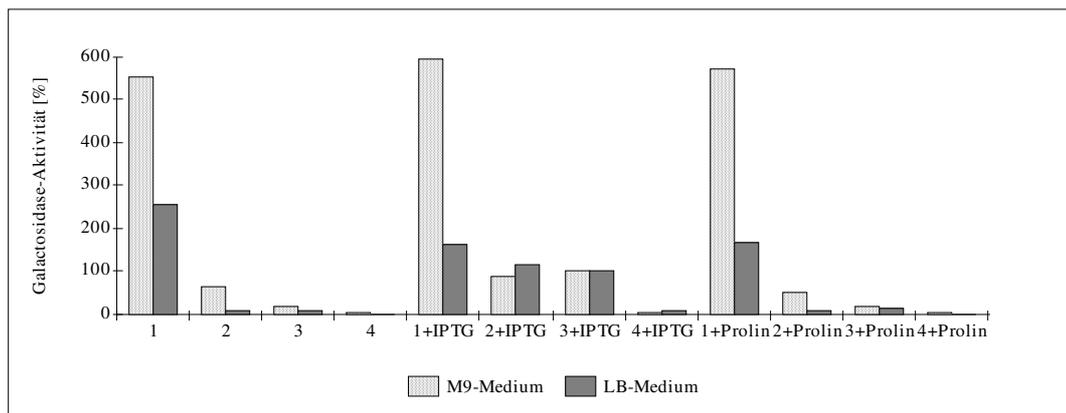


Abb. 3.17: Diagramm der β -Galactosidase-Aktivitäten verschiedener *lacZ*-Genkonstrukte. *lacZ*-Genkonstrukte: 1: pS54Z; 2: pRZ; 3: pLACZ; 4: pASK-IBA 3 (s. Text).

Anhand der gewonnenen Daten war zu erkennen, dass die höchsten β -Galactosidase-Aktivitäten mit dem Konstrukt in Plasmid pS54Z erhalten wurden. Der Wert lag stets auf gleichem Niveau, auch dann, wenn keine Induktion mit IPTG oder Prolin erfolgte. Bei Zellen, die in M9-Medium gewachsen waren, lag die β -Galactosidase-Aktivität des pS54Z-Konstruktes bis zu 6fach höher im Vergleich zur Aktivität der mit IPTG vollständig induzierten β -Galactosidase-Kontrolle (pLACZ). Das Konstrukt aus *prdR* und *lacZ* (pRZ) zeigte die höchste β -Galactosidase-Aktivität bei IPTG-Induktion. In LB-Medium ohne Induktor oder mit Prolin als Induktor zeigten Zellen mit dem pRZ-Konstrukt keine β -Galactosidase-Aktivität, während diese in M9-Medium jeweils eine β -Galactosidase-Aktivität von 50 % im Vergleich zur vollständig induzierten β -Galactosidase aufwiesen. Mit den Kontrollen pLACZ und pASK-IBA 3 wurde die Funktionstüchtigkeit der β -Galactosidase-Messung bestätigt.

Somit ist anzunehmen, dass der Intergenbereich zwischen *prdR* und *prdC*, wo u. a. die Bindestelle für den σ^{54} -Faktor der RNA-Polymerase liegt, eine mehrfache Induktion des *lacZ*-Genes in *E. coli* bewirkt. Dabei hat Prolin als möglicher Induktor keinen Einfluss. Ist zusätzlich das *prdR*-Gen vor diesen Bereich kloniert, wird das *lacZ*-Gen nur noch schwach induziert. PrdR könnte an diese *site* binden und verhindert die Bindung des *E. coli*-eigenen Aktivators. Mit dem gebundenen PrdR konnte das *lacZ*-Gen nicht mehr induziert werden, PrdR war vermutlich inaktiv. Auch hier konnte kein Einfluss des Prolins auf die Expression gezeigt werden und daher PrdR als potentieller Regulator nicht bestätigt werden.

3.7 Transformationsexperimente mit *C. sticklandii*

Viele Enzymsysteme aus *C. sticklandii*, wie z. B. die D-Prolin-Reduktase, sind in *E. coli* nicht exprimierbar. Zur Untersuchung solcher Enzymsysteme und zur Untersuchung der Funktionen unbekannter Gene oder von Regulationsmechanismen, ist die genetische Manipulierbarkeit des Organismus eine unumgängliche Notwendigkeit. Weiterhin könnten

dadurch komplex aufgebaute Proteine überexprimiert oder über Mutanten analysiert werden. Weder für *C. sticklandii* noch für verwandte Organismen wie *E. acidaminophilum* oder *C. litorale* sind molekulargenetische Techniken bekannt. Erste Transformationsexperimente mit *E. acidaminophilum* wurden von GRÄNTZDÖRFFER (2000) durchgeführt. Da die im Laufe dieser Arbeit unternommenen Versuche zur Transformation von *E. acidaminophilum* mit verschiedenen Plasmiden durch Elektroporation erfolglos blieben, sollten nun mit dem nah verwandten Organismus *C. sticklandii* Transformationsexperimente durchgeführt werden.

Für *C. sticklandii* existieren keinerlei Kenntnisse über verwendbare Resistenzen gegenüber Antibiotika oder über in diesen Organismen replizierfähige Plasmid-Origins.

Zunächst sollte die Elektroporation als die eleganteste und praktisch am einfachsten durchführbare Transformationsmethode getestet werden. Zuvor wurde *C. sticklandii* auf bestehende Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet.

3.7.1 Untersuchung der Antibiotika-Sensitivität von *C. sticklandii*

Die Sensitivität von *C. sticklandii* gegenüber verschiedenen Antibiotika wurde in Flüssigkulturen und auf festen Medien bestimmt. Zuvor konnte beobachtet werden, dass *C. sticklandii* nach Ausplattieren geeigneter Verdünnungen einer *C. sticklandii*-Kultur auf Komplex- und Minimalmedium-Agarplatten zu Kolonien unterschiedlicher Morphologie nach 2-tägiger Inkubation bei 30 °C in einer Anaerobenbox heranwächst. Die Überprüfung der Kolonien im Mikroskop und durch PCR (3.7.2) zeigte, dass es sich sowohl bei den kleineren weißen Kolonien als auch bei den größeren gelben um *C. sticklandii* handelte.

Die Sensitivität von *C. sticklandii* wurde gegenüber Erythromycin, Chloramphenicol und Tetracyclin getestet, da Shuttle-Vektoren mit Erythromycin-, Chloramphenicol oder Tetracyclin-Resistenzdeterminanten zur Verfügung standen.

Hierzu wurde das Wachstum der Zellen in Hungate-Röhrchen mit Minimalmedium und dem Antibiotikum in unterschiedlichen Konzentrationen über 1 Tag verfolgt. Für den Test auf festen Medien wurde ebenfalls Minimalmedium verwendet, welche die zu untersuchenden Antibiotika in den verschiedenen Konzentrationen enthielten.

Tabelle 3.6: Antibiotika-Sensitivitäten von *C. sticklandii*

Antibiotika	Sensitivität ¹ in Flüssigkultur	Sensitivität ¹ auf festen Medium
Erythromycin	0,5 ng/ml	100 pg/ml
Chloramphenicol	2 µg/ml	100 ng/ml
Tetracyclin	20 ng/ml	25 ng/ml

¹ als Sensitivität wird hier die Konzentration an Antibiotika angegeben, bei der *C. sticklandii* noch normal wachsen konnte und es bei höherer Konzentration zu keinem oder einem stark verzögerten Wachstum kam.

In Selektivmedien wurde die 10fache Menge der ermittelten Werte eingesetzt.

3.7.2 Reinheitskontrolle mittels PCR bzw. Nachweis von Plasmiden in *C. sticklandii*

Da steriles Arbeiten in einer Anaerobenbox nur bedingt möglich ist, wurden neben mikroskopischen Kontrollen für *C. sticklandii* auch spezifische PCR's mit gegen das *prdA*-Gen gerichteten Primern durchgeführt. Zellmaterial wurde mittels Zahnstocher in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 30 µl H₂O überführt und zum Zellaufschluss 3 min bei 96 °C inkubiert. Anschließend wurden die übrigen auf ein Volumen von 50 µl berechneten Bestandteile in weiteren 20 µl zugesetzt und die PCR durchgeführt.

Auf diese Weise wurden auch potentiell positiv-transformierte Klone auf die Anwesenheit eines Plasmides überprüft. Primerpaare liegen gegen die Erythromycin-Determinanten MLS^R (MLSA/B) und *ermBP* (*ermBP1/2*), sowie gegen *catP* (*catP1/P2*) und gegen *tetM* (*tetM-f/tetM-r*) vor. Weiterhin konnte durch eine PCR unter Verwendung dieser Primer und des *C. sticklandii*-Wildtyps das natürliche Vorkommen dieser Resistenzdeterminanten in *C. sticklandii* ausgeschlossen werden.

3.7.3 Elektroporationsexperimente

Für die Transformation von *C. sticklandii* empfiehlt sich die Anwendung von Shuttle-Vektoren, die sowohl einen in *E. coli* replizierbaren ColE1-Origin als auch einen zweiten in Gram-positiven Bakterien replizierbaren Origin besitzen, da die Klonierungen in *E. coli* durchgeführt werden können, bevor die Übertragung durch Elektroporation erfolgt. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist eine ausreichende Transformationseffizienz (Anteil der überlebenden Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben), die durch die Replizierbarkeit des Plasmids in dem Bakterium, sowie durch die Selektierbarkeit gegenüber den nicht-transformierten Zellen in Form einer Antibiotika-Resistenz bestimmt wird. Die Elektroporation wird für verschiedene *Clostridium*-Species wie *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium perfringens* bereits standardmäßig angewandt (OULTRAM et al. 1988; DÜRRE 1993; GREEN & BENNETT 1997; NAKOTTE et al. 1998; TYRIN et al. 2000; YOUNG et al. 1989; HEBERT et al. 2003). Daher sollten zunächst diese Protokolle auf *C. sticklandii* übertragen werden, wobei die Daten der Transformationsexperimente mit *E. acidaminophilum* (GRÄNTZDÖRFFER 2000) berücksichtigt wurden. Verwendet wurden zunächst auch Plasmide, die in *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* erfolgreich transformiert wurden. Es wurden Plasmide verwendet, die am „C“ in der Sequenz 5'-GATC-3' methyliert und so vor Abbau durch Restriktionsendonukleasen geschützt waren.

Für erste Elektroporationsversuche wurde das für *C. acetobutylicum* DSM 792 entwickelte Versuchsprotokoll (NAKOTTE et al. 1998) als Grundlage verwendet. Bei der Durchführung der Elektroporation wurden die in Tabelle 3.7 aufgeführten verschiedenen Parameter entsprechend variiert und dazu die in Tabelle 3.8 aufgeführten Plasmide verwendet.

Tabelle 3.7: Variation verschiedener Parameter bei Transformationsversuchen mit *C. sticklandii*

Parameter	Variation
Elektroporationspuffer	0,3 M Saccharose 0,3 M Saccharose, 5 mM MES pH 7,0 0,3 M Saccharose, 10 % Glycerin 0,3 M Saccharose, 2 µg/ml Lysozym 0,3 M Saccharose, 0,5 mg/ml Lysozym 1. H ₂ O und 2. 0,3 M Saccharose 1. 20 mM Tris/HCl pH 7,8 bzw. pH 8,3 und 2. 0,3 M Saccharose 10 % Glycerin 10 % Glycerin, 50 mM Tris/HCl pH 7,5 30 % Glycerin 30 % Glycerin, 0,5 mg/ml Lysozym 30 % Glycerin, 0,5 mg/ml Lysozym 1. H ₂ O und 2. 30 % Glycerin 1. 20 mM Tris /HCl pH 7,8 und 2. 30 % Glycerin
Feldstärke	je nach angelegter Spannung 1 – 2,5 kV und eingesetzter Küvette Küvetten-Elektrodenabstand [cm] 0,1 0,2 0,4 Feldstärke [kV/cm] 10 - 25 5 – 12,5 2,5 – 6,25
Widerstand	200 Ω - ∞ Ω
Plasmid	Siehe
Inkubationszeit im Regenerationsmedium	3 – 48 h, dann Aufbringen auf Selektionsmedium

Tabelle 3.8: Plasmide, die bei der Elektroporation von *C. sticklandii* verwendet wurden

Plasmid	Resistenzgen (<i>E. coli</i>)	Resistenzgen (Gram-Positiv)	Origin (<i>E. coli</i>)	Origin (Gram-positiv)	Größe [kb]	Referenz
pIMP1	<i>bla</i> (Amp ^R)	MLS (Em ^R)	ColE1 (pUC9)	pIM13 (<i>Bacillus subtilis</i>)	4,8	(1)
pIMP1:: <i>tetL</i>	<i>bla</i> (Amp ^R)	MLS (Em ^R) <i>tetL</i> (Tc ^R)	ColE1 (pUC9)	pIM13 (<i>Bacillus subtilis</i>)	6,9	(2)
pIMP1TH	<i>bla</i> (Amp ^R)	catP (Th ^R)	ColE1 (pUC9)	RepL (<i>Bacillus subtilis</i>)	4,9	(3)
pMTL500E	<i>bla</i> (Amp ^R)	<i>ermC</i> (Em ^R)	ColE1	pAMb1 (<i>Enterococcus faecialis</i>)	6,43	(4)

Fortsetzung Tabelle 3.8

Plasmid	Resistenzgen (<i>E. coli</i>)	Resistenzgen (Gram-Positiv)	Origin (<i>E. coli</i>)	Origin (Gram-positiv)	Größe [kb]	Referenz
pJIR418	<i>ermBC</i> (Em ^R) <i>catP</i> (Cm ^R)	<i>ermBC</i> (Em ^R) <i>catP</i> (Cm ^R)	ColE1 (pUC18)	pIP404 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	7,36	(5)
pJIR750	<i>catP</i> (Cm ^R)	<i>catP</i> (Cm ^R)	ColE1 (pUC18)	pIP404 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	6,57	(6)
pJIR751	<i>ermBC</i> (Em ^R)	<i>ermBC</i> (Em ^R)	ColE1 (pUC18)	pIP404 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	5,95	(6)
pSYL2	Tc ^R	MLS (Em ^R)	ColE1	pCBU2 (<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i>)	8,7	(7)
pSYL7	Tc ^R	MLS (Em ^R)	ColE1	pJU122 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	9,2	(7)
pMS4	<i>tetM</i> (Tc ^R)	<i>tetM</i> (Tc ^R)	ColE1	pAMb1 (<i>Enterococcus</i> <i>faecialis</i>)	10,99	(8)
pMS4	Cm ^R	<i>tetM</i> (Tc ^R)	ColE1	HB101 (<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>)	12,9	(8)

¹ MLS: Resistenzdeterminante gegen Makrolide, Lincosamide und Streptogramin B auf pIM13

² *tetL*: aus Plasmid pMV158 aus *Streptococcus agalactiae*

³ *tetM*, von Tn916 aus *Enterococcus faecalis*

(1) MERMELSTEIN et al. 1992; (2) BÖHRINGER 1997; (3) Green & BENNETT 1998 ; (4) OULTRAM et al. 1988; (5) SLOAN et al. 1992; (6) BANNAM & ROOD 1993; (7) LEE et al. 1992; (8) STRÄTZ 1991

Es konnten in keinem Fall positive Transformanten erhalten werden. Die Überlebensrate nach der Elektroporation lag für *C. sticklandii* bei 50 %. Dieser Wert war sehr hoch, so dass anzunehmen ist, dass diese Bedingungen noch nicht ausreichen, um genügend Plasmide in die Zelle zu transformieren.

C. sticklandii besitzt eine quadratische *Surface-Layer* (*S-Layer*) (GRÄNTZDÖRFFER 2000). *S-Layer* umhüllen Zellen komplett und bilden den äußersten Abschluss der Zelle zu ihrer Umgebung. Es ist bekannt, dass die *S-Layer* durch Waschen mit 20 mM Tris/HCl pH 7,8 abgelöst werden können. In den Elektroporationsversuchen wurden daher die Zellen in einem ersten Waschschritt mit diesem Puffer gewaschen und anschließend entsprechend des Elektroporationsprotokolls weiter behandelt. Leider konnten mit dieser Methode auch keine Transformanten erhalten werden.

Da aus technischen Gründen keine weiteren Elektroporationsexperimente durchgeführt werden konnten, sollte die genetische Manipulierbarkeit von *C. sticklandii* nun durch Konjugationsexperimente versucht werden.

3.7.4 Elektroporabilitätsmessungen mit elektroporierten *C. sticklandii*-Zellen

Bei einer Elektroporation werden durch den Elektroschock die Zellhüllen permeabler für DNA. Durch das elektrische Feld wird die Membran destabilisiert, Poren entstehen,

die die DNA in die Zelle gelangen lassen und sich dann wieder schließen. Die erhöhte Permeabilität der Zellen führt zur Freisetzung von ATP aus den Zellen ins Medium. Die ATP-Menge im Medium lässt Rückschlüsse auf die Membrandestabilisierung zu und erlaubt Bedingungen zu finden, unter denen Zellen optimal DNA aufnehmen können.

Zur Messung wurden *C. sticklandii*- und *E. acidaminophilum*-Zellen entsprechend dem Transformationsprotokoll vorbereitet und elektroporiert (3.7.3). Exakt 1 min nach dem Elektropuls erfolgte die ATP-Messung wie in 2.2.6.2 beschrieben. Dabei wurden verschiedene Parameter entsprechend variiert, wie in 3.7.3 aufgeführt ist.

Die Menge an freigesetzten ATP war bei *C. sticklandii* am höchsten, wenn die Zellen mit H₂O und anschließend mit 0,3 M Saccharose als Elektroporationspuffer gewaschen wurden und der Elektropuls in Küvetten mit 0,2 oder 0,1 cm Elektrodenabstand bei einer angelegten Spannung von 2,5 kV und einem Widerstand von 500 oder 700 Ω durchgeführt wurde. Die Überlebensraten betragen dabei noch > 40 %. Bei *E. acidaminophilum* konnte am meisten freigesetztes ATP gemessen werden, wenn die Zellen mit 30 % Glycerin behandelt wurden und der Elektroschock in 0,1 cm Küvetten bei 2,5 kV und 200 Ω stattfand. Für *E. acidaminophilum* betrug die Überlebensrate 50 %. Diese Werte konnten jedoch nur mit den Werten für unbehandelte Zellen verglichen werden, da der Aufschluss aller Zellen durch Toluol keine exakten Werte lieferte. Toluol störte wahrscheinlich die ATP-Messung. Im Vergleich von unbehandelten zu elektroporierten Zellen konnte für *C. sticklandii* eine Steigerung der freigesetzten ATP-Menge von bis zu 400 %, für *E. acidaminophilum* von bis zu 50 % erzielt werden.

3.7.5 Konjugationsexperimente

Ein DNA-Transfer in Gram-positive Bakterien mittels Konjugation wurde mehrfach beschrieben. Das konjugative Transposon Tn916 konnte in viele Gram-positive Bakterien wie z. B. *C. difficile* (MULLANY et al. 1994) oder *Clostridium botulinum* (LIN & JOHNSON 1991) übertragen werden.

Bei Konjugationsexperimenten zwischen den konjugativen Stämmen *E. coli* HB101 (pAM120), *E. coli* S17/1 (pKV12) bzw. *E. faecalis* GG120 (pAM211) und *E. acidaminophilum* konnten keine Transkonjuganten erhalten werden (GRÄNTZDÖRFFER 2000). Gründe dafür könnten eine nicht erfolgte Konjugation oder eine erfolgte Konjugation, aber keine Replikation des konjugierten Plasmides sein.

Daher sollte nun die Konjugation zwischen dem konjugativen Stamm *E. coli* CA434 und *C. sticklandii* erfolgen. Der Donorstamm *E. coli* CA434 (R702, pMTL9301) trägt das konjugative Plasmid R702, wobei durch R702 die für die Konjugation nötigen Transferfunktionen mobilisiert werden (HEDGES & JAKOB 1974). Das Plasmid pMTL9301 trägt neben den Replikationsursprüngen ColE1 (*E. coli*-Origin) und RepA (*Clostridium sp.*-Origin) auch den Initiationspunkt des Transfers (ori T) des Inc-P-Plasmids RK2, zur Selektion dient die Erythromycin- oder Thiamphenicol-Resistenz (PURDY et al. 2002).

Die Konjugation zwischen *E. coli* und *C. sticklandii* wurde wie in 2.2.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Transkonjuganten wurden gegen Erythromycin oder Thiamphenicol selektiert. Gegen den *E. coli*-Donor wurde durch Zusatz von Colistin selektiert, was spezifisch auf *E. coli* wirken soll. *C. sticklandii* wächst auf festem Medium bis zu einer Colistin-Konzentration von 5 µg/ml normal.

Es wurden keine Transkonjuganten erhalten.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen zu zwei Aminosäure-Reduktasen, D-Prolin- und Glycin-Reduktase (GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001), aus *C. sticklandii*. Diese Enzyme enthalten neben Selenocystein eine katalytisch aktive Pyruvyl-Gruppe, die aus der Spaltung eines Proproteins hervorgeht. Die *in vitro* Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE der D-Prolin-Reduktase bzw. des Protein B der Glycin-Reduktase (BEDNARSKI et al. 2001) wurde anhand von GrdE-Mutanten sowie von GrdE- und PrdA-Fusionsproteinen weiterführend charakterisiert. Die D-Prolin-Reduktase konnte von KABISCH et al. (1999) zur Homogenität gereinigt werden, jedoch blieb offen, wie die zur Spaltung des D-Prolins nötigen Elektronen zur D-Prolin-Reduktase übertragen werden. Es gab Hinweise darauf, dass die benötigten Elektronen möglicherweise über ein im D-Prolin-Reduktase-Operon kodiertes putativ elektronentransferierendes Protein (PrdC) auf die D-Prolin-Reduktase übertragen werden (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zur Spaltung des D-Prolins nötigen Elektronen wohl über PrdC zur D-Prolin-Reduktase übertragen werden und anhand dieser gewonnenen Daten konnte der Reaktionsmechanismus der D-Prolin-Spaltung zu δ -Aminovalerat vervollständigt werden. Außerdem wurden Versuche zur Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons und zur Etablierung eines Transformationsystems für *C. sticklandii* durchgeführt.

4.1 Analyse von GrdE-Mutanten

Das Protein GrdE gehört zum Protein B-Komplex der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii*. Dieser Komplex bindet das Substrat, Glycin, und reduziert es zusammen mit den Proteinen A und C zu Acetylphosphat und Ammoniak (STADTMAN 1978; ARKOWITZ & ABELES 1991; ANDREESEN 1994; WAGNER et al. 1999). Mindestens eine Komponente des Protein B-Komplexes trägt eine für die Glycin-Bindung und -Aktivierung essentielle Carbonyl-Gruppe (TANAKA & STADTMAN 1978; MEYER et al. 1995). Der Protein B-Komplex der Glycin-Reduktase besteht aus drei Untereinheiten (WAGNER et al., 1999). Die Gene *grdE* und *grdB* kodieren für das 47 kDa GrdE-Proprotein und für das 47 kDa GrdB-Protein, welches ein Selenocystein enthält (GRÄNTZDÖRFFER 1997; GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001). Das GrdE-Proprotein wird posttranslational in die 25 kDa-Untereinheit und die aminoterminal blockierte 22 kDa-Untereinheit gespalten. Der blockierte N-Terminus wird durch eine Carbonyl-Funktion vermutlich in Form einer Pyruvyl-Gruppe verursacht (MEYER et al. 1995; WAGNER 1997; HARMS et al. 1998; WAGNER et al. 1999).

Die Spaltung des GrdE-Proproteins durch Cysteinolyse konnte *in vitro* durch hohe NaBH_4 -Konzentrationen herbeigeführt werden. Die Analyse der GrdE-Spaltprodukte belegte, dass das Proprotein an dem Schlüssel-Cystein-Rest (Cys²⁴²) gespalten wird,

jedoch fehlten von der Pyruvyl-Gruppe am neu gebildeten N-Terminus die C-Atome nach einer *in vitro* Spaltung mit NaBH₄. Untersuchungen mit GrdE-Protein-Mutanten, bei denen die Spaltstelle Cys²⁴² gerichtet zum Alanin, Serin und Threonin mutiert war, zeigten keine Spaltung der Alanin-Mutante und eine verzögerte Spaltung der Serin- und Threonin-Mutante (BEDNARSKI et al. 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere GrdE-Protein-Mutanten hergestellt werden. Hierbei wurden Mutanten erzeugt, bei denen v. a. die konservierten Aminosäuren in der Umgebung der Spaltstelle ausgetauscht waren. Das GrdE-Protein der Glycin-Reduktase von *C. sticklandii* weist hohe Homologien um die Spaltstelle zu den Proteinen GrdE der Glycin-Reduktase, GrdG der Sarkosin-Reduktase und GrdI der Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (MEYER et al. 1995; WAGNER 1997; WAGNER et al. 1999; SONNTAG 1998), zu GrdE weiterer Glycin-Reduktasen aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* (LI et al. 2002), *Photobacterium profundum* (VEZZI et al. 2004), *Treponema denticola* (SESHADRI et al. 2004), *Carboxydotherrhus hydrogenofomans* (http://tigrblast.tigr.org/ufmg/index.cgi?database=c_hydrogenofomans/ seq), *Clostridium difficile* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile) und *Clostridium botulinum* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_botulinum) sowie zu PrdA der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (KABISCH et al. 1999), *Clostridium difficile* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile) und *Clostridium botulinum* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_botulinum) auf (Abb. 4.1). Das GrdI-Protein weist an der Spaltstelle keinen Cysteinrest, sondern einen Phenylalaninrest auf, da Betain als quartäres Amin nicht über eine Carbonyl-Gruppe, sondern wahrscheinlich über ionische Wechselwirkungen (WAGNER et al. 1999) gebunden wird.

			↓		
GrdE (C.s.)	224	P TLIY P TEVMD G A I LSGNCV S ACD K NPTYVHMNN P		258	
GrdE (E.a.)	224	P TILY P TEVMD G A I LSGNCV S SCD K NPTYVHCNN P		258	
GrdE (T.t.)	224	P TFIY P TEVMD G A I IVSGNCV S ACD K NTTYVHMNN P		258	
GrdE (P.p.)	230	P TLMY P TEVMD G A I ISGNCV S ACD K NTSYVHQNS P		264	
GrdE (T.d.)	225	P TMMY P TEVMD G A I IVSGNCV S ACD K NPTYVHQNS P		259	
GrdE (C.h.)	224	P TLIS P TEV F D G A I IVSGNCV S ACD K NTTYVHMNN P		258	
GrdE (c.b.)	224	P TFIY P TEV F D G A I IVSGNCV S ACD K NPSYVHMNH P		258	
GrdE (C.d.)	224	P TLLY P TE L M D G A I V SGNCV S ACD K NPSYVHIN G		258	
GrdG (E.a.)	224	P TFMY P TE I M D G A I L SGNCV A PCD K VTTTFHHLNN P		258	
GrdI (E.a.)	230	P TYNH P NEV L D G A I ISGSF M PCSS K WSTYDFQNF P		264	
PrdA (C.s.)	408	P VVLS P LEV L D G G I HALT C IGP A S K ENSRHYWRE P		442	
PrdA (C.d.)	403	P VVLS P LEV L D G G I HALT C IGP A S K EMSRHYWRE P		437	
PrdA (C.b.)	483	I VML A PTEV L D G G I HALT C IGP A S K ECSRHYFRE P		517	

Abb. 4.1: Sequenzvergleich im Bereich der Spaltstellen der Proproteine GrdE der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (C.s.), *E. acidaminophilum* (E.a.), *T. tengcongensis* (T.t.), *P. profundum* (P.p.), *T. denticola* (T.d.), *C. hydrogenoformans* (C.h.), *C. difficile* (C.d.) und *C. botulinum* (C.b.), GrdG der Sarkosin-Reduktase und GrdI der Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* (E.a.) und PrdA der Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (C.s.), *C. difficile* (C.d.) und *C. botulinum* (C.b.). Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind fett dargestellt. In den GrdE-Protein-Mutanten ausgetauschte Aminosäuren sind grau unterlegt.

Aus den Spaltungsuntersuchungen mit den Mutanten ging hervor, dass ein einfacher Austausch der konservierten Aminosäuren Glu²³¹, Asp²³⁴, Gly²³⁵, Ile²³⁷, Ser²³⁹ und Lys²⁴⁸ keinen Effekt auf die *in vitro* Spaltung hat. Waren zwei Aminosäuren mutiert, z.B. Asp²³⁴ und Ile²³⁷ bzw. Ile²³⁷ und Lys²⁴⁸, so konnte eine Spaltung mit reduzierter Effizienz im Vergleich zum GrdE-Wildtyp beobachtet werden. Bei den Doppelmutanten könnte die stärker veränderte Raumstruktur im Vergleich zu den Einfachmutanten die reduzierte Spaltung erklären. Die veränderte Raumstruktur führt zu einer erschwerten Cysteinolyse des mutierten GrdE-Proteins.

Der Mechanismus der GrdE-Protein-Spaltung N-terminal vor einem Cystein-Rest wird in Anlehnung an die Serinolyse (HACKERT & PEGG 1998; PERLER 1998; ALBERT et al. 1998) der Mechanismus der Cysteinolyse postuliert (BEDNARSKI et al. 2001). Sie sollte analog der Serinolyse in drei Stufen verlaufen (s. 4.2, Abb. 4.3), wobei aus dem Cystein-Rest die Pyruvyl-Gruppe gebildet wird. Im Schritt I greift die deprotonierte Thiol-Gruppe des Cysteins nukleophil die Carbonyl-Gruppe der vorherigen Peptidbindung unter Bildung des intermediären Thioesters an (Abb. 4.2, I). Durch β -Eliminierung wird das C $_{\alpha}$ -Atom des Cysteins im Schritt II deprotoniert und der Thioester wird in die N-terminale β -Untereinheit, welche am C-Terminus eine Thiocarboxyl-Gruppe trägt, und in die C-terminale α -Untereinheit, welche am N-Terminus das Dehydroalanin trägt, gespalten (Abb. 4.2, II). Im Schritt III hydrolysiert die Thiocarboxyl-Gruppe zur Carboxyl-Gruppe unter H₂S-Freisetzung (Abb. 4.2, IIIa), während das Dehydroalanin zur Pyruvyl-Gruppe hydrolysiert wird (Abb. 4.2, IIIb). Experimentell bedarf dieser Mechanismus, z.B. durch den Nachweis intermediärer Produkte, der Bestätigung.

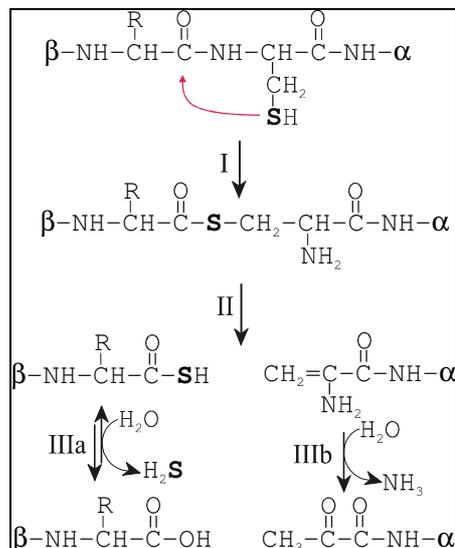


Abb. 4.2: Reaktionsmechanismus der Cysteinolyse. Vorgeschlagener Mechanismus der Cysteinolyse von GrdE (BEDNARSKI et al. 2001).

In vitro läuft die Cysteinolyse in abgewandelter Form ab, da am N-Terminus der α -Untereinheit keine Pyruvyl-Gruppe generiert wird und auch das Cystein als Vorläufer der Pyruvyl-Gruppe abgespalten wird (BEDNARSKI et al. 2001). Dies mag auf den zur GrdE-Spaltung nötigen Einsatz des sehr starken Reduktionsmittels NaBH_4 zurückzuführen sein. Über den Verbleib des Cys^{242} , welches zur Pyruvyl-Gruppe generiert werden bzw. weiter reduziert vorliegen sollte können nur hypothetische Aussagen gemacht werden. Es könnte postuliert werden, daß durch die Einwirkung von NaBH_4 wird eine mögliche Disulfidbrücke zwischen Cys^{242} und Cys^{246} (s. u.) gespalten, und das Protein könnte sich auch an der Spaltstelle spalten. Nachfolgend könnte das Cystein mit dem sehr reaktiven NaBH_4 zum Lactat weiter reagieren und schließlich von der 22 kDa α -Untereinheit abgetrennt werden. Die spezifische Spaltung *in vitro* konnte durch die Analyse bewiesen werden, jedoch ist dieser Mechanismus nicht *in vivo* übertragbar, da hier die Pyruvyl-Gruppe am N-Terminus der α -Untereinheit verbleibt, da sie absolut essentiell für die Glycin-Reduktion ist.

Zur Cysteinolyse sind auch *in vitro* verschiedene Deprotonierungs- (Deprotonierung der angreifenden Thiol-Gruppe) und Protonierungsreaktionen (Protonierung des Thioesters zur Thiocarboxyl-Gruppe) nötig. Man könnte eine Beteiligung konservierter Aminosäuren, wie z.B. Glu^{231} , Asp^{234} , Lys^{248} , an Protonen-Transfer-Reaktionen vermuten. Bei den vorliegenden Doppelmutanten ($\text{Asp}^{234}\text{Ala}/\text{Ile}^{237}\text{Ala}$ und $\text{Ile}^{237}\text{Lys}/\text{Lys}^{248}\text{Ala}$) könnten die Deprotonierungs-/Protonierungsreaktionen durch eine veränderte Struktur oder durch ein verändertes Milieu infolge anderer Aminosäureseitengruppen verzögert werden. Dieser Effekt hat bei der *in vitro* Spaltung der Einfachmutanten kaum einen Einfluss. Es muss andererseits vermerkt werden, dass die konservierten Aminosäuren auch in dem nicht gespaltenen GrdI-Protein des Protein B-Komplexes der Betain-Reduktase vorhanden sind (WAGNER 1997; WAGNER et al. 1999; SONNTAG 1998). Betain kann nicht in Form einer Schiff'schen Base an eine Carbonyl-Gruppe gebunden werden, daher könnten die hoch konservierten Aminosäuren in der Nähe der GrdE-Spaltstelle eine andere wichtige Funktion z. B. bei der Katalyse der Glycin-Reduktion erfüllen.

Eine Analyse der $\text{Lys}^{248}\text{Ala}$ -Mutante zeigte, dass das Cys^{246} eine entscheidende Rolle bei der *in vitro* Spaltung hat. Die daraufhin untersuchte Mutante $\text{Cys}^{246}\text{Ala}$ konnte *in vitro* mit 200 mM NaBH_4 nicht gespalten werden. Es könnte postuliert werden, dass die Thiol-Gruppe des Cys^{246} für die *in vitro* Spaltung essentiell ist, weil sie (deprotoniert) als weiteres Nukleophil in den Spaltungsmechanismus eingreift. Auf dieses Ergebnis aufbauend wurden die Mutanten $\text{Asn}^{241}\text{Cys}/\text{Cys}^{242}\text{Ala}$, $\text{Cys}^{242}\text{Ala}/\text{Val}^{243}\text{Cys}$, $\text{Ser}^{239}\text{Cys}/\text{Cys}^{246}\text{Ala}$ und $\text{Ser}^{239}\text{Cys}/\text{Cys}^{242}\text{Ala}$ hergestellt, um den Einfluss der Lage und des Abstand der beiden nötigen Cysteine zu klären. Es konnte festgestellt werden, dass die Spalteffizienz mit größer werdendem Abstand beider Cysteine sinkt. Zudem lag bei der Spaltung neben den erwarteten α - und β -Untereinheiten ein zusätzliches Spaltprodukt vor, welches mit Asp^{247} beginnt. Bei einer *in vitro* Spaltung wird somit die Proteinkette an Cys^{242} und Cys^{246} unter Verlust beider Cysteinreste gespalten.

Untersuchungen mit Mutanten menschlicher S-AdMetDC (s. 4.2; Tabelle 4.1) zeigten, dass zur Spaltung der S-AdMetDC eine zweite Hydroxyl-Gruppe essentiell ist (XIONG & PEGG 1999). Die S-AdMetDC des Menschen wird N-Terminal des Ser⁶⁸-Restes durch Serinolyse gespalten. Mutationen an Ser²²⁹, welcher nach der Kristallstruktur in der Nähe der Ser⁶⁸-Spaltstelle liegt, beeinflusste die Spaltung *in vitro* stark. Die Ser²²⁹Ala-Mutante blieb ungespalten, die Ser²²⁹Cys-Mutante konnte nur sehr langsam gespalten werden, während die Ser²²⁹Thr-Mutante ganz normal gespalten wurde. Daher wurde geschlussfolgert, dass für die *in vitro* Proprotein-Spaltung der S-AdMetDC die Hydroxyl-Gruppe am Rest 229 neben der am Rest 68 essentiell ist (XIONG & PEGG 1999). Für die GrdE-Proprotein-Spaltung *in vitro* könnte analog zur S-AdMetDC das Vorhandensein einer zweiten Thiolgruppe essentiell für die Spaltung mit NaBH₄ sein.

4.2 GrdE und PrdA in der Gruppe der Pyruvyl-Enzyme

Alle Pyruvyl-Enzyme besitzen eine α -Untereinheit, die aminoterminal eine Pyruvyl-Gruppe trägt. Die α -Untereinheit und die Pyruvyl-Gruppe gehen aus der posttranslationalen Spaltung eines Proproteins, π -Untereinheit, hervor. Aufgrund dieser Eigenschaft bilden die Pyruvyl-Enzyme eine eigenständige Gruppe. Die Pyruvyl-Enzyme werden in zwei Untergruppen unterteilt. Die Enzyme der ersten Untergruppe – die Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen - katalysieren Decarboxylierungen von Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten (Histidin, S-Adenosyl-Methionin, Phosphatidyl-Serin, L-Aspartat), die posttranslationale Spaltung erfolgt aminoterminal an einem Serin-Rest durch Serinolyse. Diese Enzyme sind ubiquitär verbreitet (VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998; Tabelle 4.1). Die Enzyme der zweiten Untergruppe – die Pyruvyl-haltigen Reduktasen - katalysieren Reduktionen von Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten (Glycin, Prolin, Sarkosin), die posttranslationale Spaltung erfolgt aminoterminal an einem Cystein-Rest durch Cysteinolyse, sie kommen vor allem im Cluster der Clostridien vor (VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998) und besitzen eine dritte Selenocystein-haltige Untereinheit (WAGNER 1997; SONNTAG 1998; HACKERT & PEGG 1998; PERLER 1998; Tabelle 4.1). Die Substrate werden in Form einer Schiff'schen Base an eine Carbonyl-Gruppe gebunden. Der Protein B-Komplex der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii* (GRÄNTZDÖRFFER 1997; GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001) und die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* (KABISCH et al. 1999) gehören zur Gruppe der Pyruvyl-haltigen Reduktasen. Während die Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen und ihr Spaltmechanismus, die Serinolyse, schon vielfältig untersucht wurden, so ist über den Spaltmechanismus (Cysteinolyse) und über die Struktur der Pyruvyl-Reduktasen noch vergleichsweise wenig bekannt. In Tabelle 4.1 sind alle bisher bekannten Pyruvyl-Enzyme und ihre wesentlichen Merkmale zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Übersicht der Pyruvyl-Enzyme

Enzym	Herkunft	Untereinheiten- Struktur ^{a)} Molekülmasse [kDa]	Sequenz der Spaltstelle ^{b)}
<i>I. Decarboxylasen</i> ¹⁾			
1. Histidin- Decarboxylase (HisDC)	<i>Lactobacillus</i> 30a ^{2,3)}	($\alpha\beta$) ₆ / $\alpha=25$; $\beta=9$	-NMTTAS- S FTGVQ-
	<i>Clostridium perfringens</i>	($\alpha\beta$) ₃ / $\alpha=25$; $\beta=9$	-NMLTAS- S FCGVA-
2. S-Adenosyl- methionin- Decarboxylase (S-AdMetDC)	<i>Escherichia coli</i> ⁴⁾	($\alpha\beta$) ₄ / $\alpha=18$; $\beta=13$	-VAHLDK- S HICV-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁵⁾	($\alpha\beta$) ₂ / $\alpha=36$; $\beta=11$	-AFLLSE- S SLEFV-
	Pflanzen ⁶⁾ Säugetiere ⁷⁾	($\alpha\beta$) ₂ / $\alpha=32$; $\beta=8$ ($\alpha\beta$) ₂ / $\alpha=31$; $\beta=8$	-SYVLSE- S SLEFVL- -AYVLSE- S SMEFV-
3. Phosphatidyl- serin- Decarboxylase (PhSerDC)	<i>Escherichia coli</i> ⁸⁾	($\alpha\beta$) _x / $\alpha=7$; $\beta=29$	-GRFKLG- S TVINLF-
	<i>Bacillus subtilis</i>	($\alpha\beta$) _x / $\alpha=4-7$;	-GYFSFG- S TVILVF-
	<i>Haemophilus influenza</i>	($\alpha\beta$) _x / $\beta=26-29$	-GWFQLG- S TVINLF-
	Säugetiere	($\alpha\beta$) _x / $\alpha=4$; $\beta=32$	-GEFNLG- S TIVLIF-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PSD1)	($\alpha\beta$) _x / $\alpha=4$; $\beta=52$	-GGFELG- S TVVLCF-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PSD2)	($\alpha\beta$) _x / $\alpha=10$; $\beta=122$	-YFKFGG- S TIIIIIP-	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	($\alpha\beta$) _x / $\alpha=15$; $\beta=30$	-YFKFGG- S TIVLFL-	
4. L-Aspartat 1-	<i>Escherichia coli</i> ⁹⁾	($\alpha\beta$) ₄ / $\alpha=11$; $\beta=3$	-DLHYEG- S CAIDQD-
5. Arginin- Decarboxylase	<i>Methanococcus jannaschii</i> ¹¹⁾	($\alpha\beta\beta\alpha$) ₃ / $\alpha=5$; $\beta=12$	-NLIRIS- S IMPPEA-

Fortsetzung Tabelle 4.1

Enzym	Herkunft	Untereinheiten- Struktur ^{a)} Molekülmasse [kDa]	Sequenz der Spaltstelle ^{b)}
II. Reduktasen¹⁾			
1. D-Prolin- Reduktase	<i>C. sticklandii</i> ¹²⁾	$(\alpha\beta\gamma)_{10} / \alpha=23; \beta=45$	-GIHALT-CIGPASK-
	<i>C. difficile</i> ¹³⁾		-GIHALT-CIGPASK-
	<i>C. botulinum</i> ¹⁴⁾		-GIHALT-CIGPASK-
2. Glycin- Reduktase Protein B-Komplex	<i>C. sticklandii</i> ¹⁵⁾	$\alpha_2\beta_2\gamma_2 / \alpha=22; \beta=25$	-AILSGN-CVSSCDK-
	<i>E. acidaminophilum</i> ^{16, 17)}	$\alpha_2\beta_2\gamma_2 / \alpha=22; \beta=25$	-AILSGN-CVSACDK-
	<i>T. tengcongensis</i> ¹⁸⁾		-AIVSGN-CVSACDK-
	<i>P. profundum</i> ¹⁹⁾		-AIISGN-CVSACDK-
	<i>T. denticola</i> ²⁰⁾		-AIVSGN-CVSACDK-
	<i>C. hydrogenoformans</i> ²¹⁾		-AIVSGN-CVSACDK-
	<i>C. difficile</i> ¹³⁾		-AIVSGN-CVSACDK-
3. Sarkosin- Reduktase Protein B-Komplex	<i>E. acidaminophilum</i> ¹⁷⁾	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	-AITSGN-CVAPCDK-
	<i>Tisserella creatinophila</i> ²²⁾		

^{a)} α : Pyruvyl-haltige Untereinheit, β : nicht Pyruvyl-haltige Untereinheit. ^{b)} Die Spaltstelle ist durch einen Bindestrich (-) in der Sequenz gekennzeichnet. Die Pyruvyl-Gruppe wird bei einer Spaltung aus den dick hervorgehobenen Serin- (S) bzw. Cystein-Rest (C) generiert.

¹⁾ VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998; PERLER 1998 ²⁾ RESCEI et al. 1983; ³⁾ VANDERSLICE et al. 1987; ⁴⁾ MARKHAM et al. 1982; TABOR & TABOR 1987; ⁵⁾ YONG et al. 2001; ⁶⁾ BENNETT et al. 2002; ⁷⁾ XIONG et al. 1997; XIONG et al., 1999; ⁸⁾ LI & DOWHAN 1989; ⁹⁾ RAMJEE et al. 1997; ALBERT et al. 1998; ¹⁰⁾ KUNST et al. 1997; ¹¹⁾ GRAHAM et al. 2002; TOLBERT et al. 2003; ¹²⁾ KABISCH et al. 1999; ¹³⁾ http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile; ¹⁴⁾ http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_botulinum; ¹⁵⁾ GRÄNTZDÖRFFER 1997; GRÄNTZDÖRFFER et al. 2001 ¹⁶⁾ MEYER et al., 1995; ¹⁷⁾ WAGNER 1997; SONNTAG 1998; WAGNER et al. 1999; ¹⁸⁾ LI et al. 2002; ¹⁹⁾ VEZZI et al. 2004; ²⁰⁾ SESHADRI et al. 2004; ²¹⁾ http://tigrblast.tigr.org/ufmg/index.cgi?database=c_hydrogenoformansseq; ²²⁾ HARMS et al. 1998

Die D-Prolin-Reduktase und die Glycin-Reduktase wurden schon aufgrund früherer Untersuchungen (HODGINS & ABELES 1967, 1969; SETO & STADTMAN 1976) in die Gruppe der Pyruvyl-Enzyme (VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998; PERLER 1998) eingeordnet. Weiterführende Untersuchungen auf genetischer und proteinchemischer Ebene konnten dies bestätigen (KABISCH et al. 1999; WAGNER 1997; SONNTAG 1998; WAGNER et al. 1999). In der Tabelle 4.1 ist gezeigt, dass die Pyruvyl-Enzyme in ihrer Struktur sehr uneinheitlich sind. Die Primärstruktur der Pyruvyl-Enzyme weist keinerlei Homologien auf, insbesondere sind rund um die Spaltstelle der Pyruvyl-Enzyme in der Aminosäuresequenz kaum homologe Sequenzen aufzuzeigen. Innerhalb der Gruppe der Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen ist nur der Serin-Rest kon-

serviert. Lediglich Pyruvyl-haltige Decarboxylasen, die das gleiche Substrat umsetzen, weisen einige Übereinstimmungen auf. Die derzeit bekannten Pyruvyl-haltigen Reduktasen weisen stärkere Übereinstimmungen untereinander auf, unterscheiden sich aber in ihren Substraten. Bei den Pyruvyl-haltigen Reduktasen sind sicher konservierte Strukturen für die Katalyse gleichartiger Reaktionen (reduktive Spaltung von Glycin oder Prolin) und für die Interaktion mit dem Selenocystein-haltigen Reaktionspartner (GrdB bzw. PrdB) essentiell.

Auch konnten innerhalb der Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen weder Homologien noch Ähnlichkeiten in der Tertiär- und Quartärstruktur festgestellt werden. Dies zeigt ein Vergleich der Kristallstrukturen der menschlichen S-AdMetDC (EKSTROM et al. 1999), der HisDC aus *Lactobacillus* 30a (HACKERT et al. 1981; GALLHAGER et al. 1993; PARKS et al. 1985) und der L-AspDC (ALBERT et al. 1998) aus *E. coli*. Die menschliche S-AdMetDC bildet ein Dimer, die HisDC aus *Lactobacillus* 30a ein Hexamer und die L-AspDC aus *E. coli* ein Tetramer. Unterschiede sind auch in der relativen topologischen und strukturellen Position der Pyruvyl-Gruppe zu verzeichnen. Während das aktive Zentrum der His- und L-AspDC an der Schnittstelle der α -/ β -Untereinheiten liegt, ist das aktive Zentrum der S-AdMetDC in einem *loop* innerhalb einer β -Faltblattstruktur lokalisiert (EKSTROM et al. 1999). Aufgrund der fehlenden homologen Sequenzbereiche und strukturellen Ähnlichkeiten wird vermutet, dass die Pyruvyl-Enzyme durch konvergente Evolution ihre ähnlichen katalytischen Funktionen entwickelt haben (EKSTROM et al. 1999).

Für alle bisher bekannten Pyruvyl-Enzyme wird trotz der Strukturunterschiede der gleiche Reaktionsmechanismus der Proprotein-Spaltung vermutet. Dieser ist bei den Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen in Form der Serinolyse beschrieben und wurde bereits eingehend analysiert. Bei der HisDC aus *Lactobacillus* 30a (RESCEI et al. 1983; VANDERSLICE et al. 1987; VAN POELJE & SNELL 1990; HACKERT & PEGG 1998), der L-AspDC aus *E. coli* (RAMJEE et al. 1997; ALBERT et al. 1998), der pflanzlichen und menschlichen S-AdMetDC (XIONG et al. 1997; EKSTROM et al. 1999) und bei der PhSerDC aus *S. cerevisiae* (VOELKER 1997) konnte der Mechanismus der Serinolyse anhand der Analyse von Mutanten und Kristallstrukturen bestätigt werden. Während der Spaltungsreaktion wird durch den nukleophilen Angriff der deprotonierten Hydroxylgruppe des Serinrestes ein Esterintermediat gebildet (Abb. 4.3, I). Das Esterintermediat konnte in einer Röntgenstrukturanalyse der L-AspDC aus *E. coli* nachgewiesen werden (ALBERT et al. 1998). Der intermediäre Ester wird durch β -Eliminierung am C_{α} -Atom des Serins unter Abspaltung des Protons gespalten. Am C-Terminus der β -Untereinheit (aminoterminaler Teil des ehemaligen Proenzym) entsteht eine Carboxyl-Gruppe und am N-Terminus der α -Untereinheit (C-terminaler Teil des ehemaligen Proenzym) befindet sich ein Dehydroalanin (Abb. 4.3, II). Das Dehydroalanin wird durch Hydrolyse in den Pyruvyl-Rest überführt (Abb. 4.3, III; HACKERT & PEGG 1998; PERLER 1998; ALBERT et al. 1998). Mit dem Nachweis des Esterintermediats in einer der vier Untereinheiten des L-AspDC-Tetramers konnte die Serinolyse bestätigt werden.

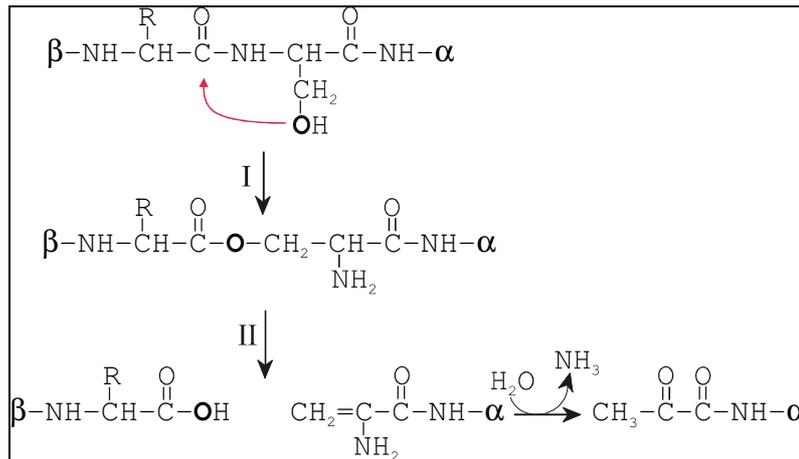


Abb. 4.3: Reaktionsmechanismus der Serinolysen. Mechanismus der Serinolysen der HisDC aus *Lactobacillus* 30a (HACKERT & PEGG 1998).

Für die Spaltung der Proproteine GrdE und PrdA wird in Anlehnung an die Serinolysen der Mechanismus der Cysteinolysen postuliert (s. 4.1, Abb. 4.2; BEDNARSKI et al. 2001).

Die autokatalytische Spaltreaktion der Proproteine der bekannten Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen konnte *in vitro* untersucht werden. Hierbei wurden verschiedenste Bedingungen gefunden, unter denen die Proenzyme *in vitro* gespalten werden. Die HisDC aus *Lactobacillus* 30a benötigt für eine Spaltung monovalente Kationen. Die S-AdMetDC höherer Organismen (Mensch, *Caenorhabditis elegans*) benötigt Putrescin für ihre Spaltung (EKSTROM et al. 2001; NDJONKA et al. 2003), die pflanzliche und die S-AdMetDC niederer Organismen (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crassa*, *Bacillus subtilis*, *Methanococcus jannaschii*, *Trypanosoma cruzi*) spalten sich ohne Zusätze (BENNETT et al. 2002; LI et al. 2001; HOYT et al. 2000; SEKOWSKA et al. 2000; KIM et al. 2000; CLYNE et al. 2002). Die L-AspDC von *E. coli* konnte *in vitro* durch Temperaturerhöhungen auf 50 bzw. 70 °C gespalten werden (RAMJEE et al. 1997). Die PhSerDC konnte nur *in vivo* effizient gespalten werden (LI & DOWHAN 1990). Für die Spaltung könnten hier „aktivierende Faktoren“, wie sie *in vivo* vorhanden sind, nötig sein. Untersuchungen mit Mutanten der Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen, bei denen der Schlüssel-Serin-Rest zum Threonin, Cystein und Alanin mutiert wurde, zeigten, dass die Spaltung der Threonin- und Cystein-Mutante sehr stark eingeschränkt und die der Alanin-Mutante vollständig inhibiert wurde (HisDC: VANDERSLICE et al. 1988; S-AdMetDC: XIONG et al. 1999; PhSerDC: LI & DOWHAN 1990). Die verlangsamte Spaltungsrate der Cystein-Mutante der HisDC wird mit der nicht optimalen Übereinstimmung zwischen dem Nukleophil (deprotonierte Thiol- statt Hydroxyl-Gruppe) und der elektronischen Umgebung erklärt, während die verlangsamte Spaltungsrate der Threonin-Mutante aus sterischen Einschränkungen resultiert (VANDERSLICE et al. 1988).

Autokatalytische Spaltungen in einer Polypeptidkette an Serin- oder Cystein-Resten kommen ebenfalls beim *splicing* von Proteinen vor (SHAO et al. 1996; PETROWSKI 1998; PERLER 1998; NOREN et al. 2000). Beim *splicing* wird eine interne Sequenz (Intein) aus

einer im Inneren eines Vorläuferproteins liegenden Stelle herausgeschnitten und die beiden angrenzenden Polypeptide (Exteine) werden zum reifen Protein verknüpft. Alle für die Spaltung nötigen Informationen sind in der Polypeptidkette des Inteins und der ersten Extein-Aminosäure der C-terminalen *splicing*-Stelle enthalten. Der Mechanismus des *splicing* ist ähnlich der Proprotein-Spaltung. Er verläuft ebenfalls autokatalytisch und es kommt auch hier im ersten Schritt zu einem nukleophilen Angriff der deprotonierten Thiol- bzw. Hydroxyl-Gruppe auf die Carbonyl-Gruppe des in der Sequenz unmittelbar vorhergehenden Aminosäurerestes, wodurch eine (Thio)Esterbindung entsteht. Die (Thio)Esterbindung wird jedoch hier durch den Angriff eines weiteren Nucleophils, weitere deprotonierte Thiol- bzw. Hydroxyl-Gruppe der ersten C-Extein-Aminosäure, umgeestert. Die Exteine sind durch eine (Thio)Esterbindung verknüpft, welche spontan in die stabilere Peptidbindung umgelagert wird (PERLER 1998; NOREN et al. 2000). Weitere Beispiele für Autoprozessierungen von Proteinen findet man bei der autokatalytischen Spaltung der Vorstufen von N-terminal nucleophil angreifenden Amidohydrolasen (Glycosyl-Asparaginase, Penicillin-Acylase, Proteasom etc.), beim Prozessieren von embryonalen Hedgehog-Signalproteinen, bei der RecA-unterstützten autokatalytischen Spaltung des LexA-Proteins oder des Lambda-Repressors sowie bei der Aktivierung von Plasmaproteinen (PERLER et al. 1997; PERLER 1998). Bei all diesen Prozessen einschließlich *splicing* und Proprotein-Spaltung der Pyruvyl-Enzyme wird ein intermediärer (Thio)Ester gebildet. In einigen Beispielen können die intermediären Thioesterbindungen durch den nukleophilen Angriff z. B. von Hydroxylamin oder kleiner Thiolverbindungen, wie DTT, umgeestert werden, wodurch das Protein gespalten wird (NOREN et al. 2000). Thioesterbindungen in Proteinen sind bei neutralen pH-Wert viel empfindlicher gegenüber einer Hydroxylamin-Spaltung. Die Ser⁸²Cys-Mutante der HisDC war gegenüber der Hydroxylamin-Spaltung empfindlich im Unterschied zum Wildtyp-Enzym (VANDERSLICE et al. 1988).

Prozessierungen von Proteinen an Cystein-Resten sind anhand der genannten Beispiele durchaus bekannt. Daher ist die Proprotein-Spaltung der Pyruvyl-Reduktasen an einem Cystein-Rest nicht ungewöhnlich. Das PrdA- und GrdE-Proprotein sowie deren Mutanten konnten *in vitro* nur unter sehr drastischen, abnormen Bedingungen gespalten werden. Eine Ursache dafür könnte in der Konformation begründet sein. Bei Prozessierungen von Proteinen ist eine native Konformation essentiell, da die Informationen für die Spaltung darin liegen. Die PhSerDC aus *E. coli* konnte *in vitro* nicht gespalten werden, welches auch auf eine inkorrekte Faltung des in *E. coli* überexprimiertes Proteins schließen ließ (LI & DOWHAN 1990; HACKERT & PEGG 1998). PrdA, GrdE und die GrdE-Mutanten konnten daher wahrscheinlich nicht in ihrer nativen Konformation in *E. coli* exprimiert werden. Die native Konformation wäre jedoch für weitere aufschlussreiche Spaltungsuntersuchungen sehr wichtig. Zusätzlich könnten auch andere Komponenten an der Proprotein-Spaltung der Pyruvyl-Reduktasen beteiligt sein (GrdB bzw. PrdB, Chaperone; s.4.3).

4.3 Expression und *in vitro* Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE

Die D-Prolin-Reduktase besteht aus drei Untereinheiten mit einer nativen Molekülmasse von 870 kDa. Das Enzym wird als cytoplasmatisches Protein beschrieben, es enthält Selen in Form von Selenocystein und eine Carbonyl-Funktion vermutlich in Form der Pyruvyl-Gruppe (KABISCH et al. 1999). Die codierenden Gene sind *prdA* und *prdB*, welche das 68 kDa PrdA-Proprotein und das 26 kDa PrdB-Protein, welches das Selenocystein enthält, bilden. Das Protein besitzt eine Identität von 20,9 % zum GrdE-Proprotein (s. 4.1) und ist N-terminal 180 Aminosäuren länger. Das PrdA-Proprotein wird posttranslational in die 45 kDa-Untereinheit und die aminoterminal blockierte 23 kDa-Untereinheit gespalten. Die 23 kDa-Untereinheit ist zu 22 % identisch zur 22 kDa Untereinheit von GrdE und am N-Terminus durch eine α -Ketocarbonsäure-Funktion blockiert (KABISCH et al. 1999). Es gab mehrere Hinweise, dass die aminoterminal kovalent gebundene α -Ketocarbonsäure-Gruppe vermutlich eine Pyruvyl-Gruppe ist (KABISCH et al. 1999), welche das Substrat D-Prolin bindet. Eine N-terminale Pyruvyl-Gruppe wurde auch schon in früheren Untersuchungen postuliert (HODGINS & ABELES 1967, 1969; SETO & STADTMAN 1976; SETO 1980a).

Die posttranslationale Spaltung der Proproteine PrdA und GrdE erfolgt *in vivo* autokatalytisch an einem Cystein-Rest. Eine N-terminal verkürzte Form des PrdA-Proproteins und das GrdE-Proprotein aus *C. sticklandii* konnten *in vitro* überexprimiert, gereinigt und durch Cysteinolyse mit 200 mM NaBH₄ bei pH 7,4 gespalten werden (BEDNARSKI et al. 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals das PrdA-Proprotein in seiner Gesamtlänge von 68 kDa heterolog in *E. coli* als N-terminale *Strep*-tag II-Fusion exprimiert werden. Dies gelang nur bei gleichzeitiger Expression der Gene *prdD* bzw. *prdDE* in Konstrukten mit den Transkriptionsfusionen *prdA_D* bzw. *prdA_DE*. In einer Transkriptionsfusion mit den Genen *prdAB* oder *prdABDE* konnten nur ein etwa 55 bzw. 30 kDa großes PrdA-Proprotein exprimiert werden. Dabei war es nicht entscheidend, ob das Selenocystein von PrdB mittels gerichteter Mutagenese durch ein Cystein ersetzt wurde, ob PrdB verkürzt vorlag, da *E. coli* die Proteinsynthese am Selenocystein-Codon (TGA) abbricht oder ob PrdB als Selenoprotein vorlag. Der Einbau von Selenocystein in PrdB konnte in *E. coli* durch die Koexpression der auf dem Plasmid pASBC kodierten Gene *selB* und *selC* von *E. acidaminophilum* erreicht werden (GURSINSKY 2002). Das vom *prdA*-Gen stromabwärts gelegene Gen *prdB* (Abb. 1.3) hat im heterologen Expressionssystem von *E. coli* weder Einfluss auf die Bildung des PrdA-Proproteins noch auf die posttranslationale Spaltung. Die Gene *prdD* und *prdE* liegen stromabwärts von *prdB* (Abb. 1.3) und werden mit den Strukturgenen der D-Prolin-Reduktase transkribiert (LIEBMANN 1999). PrdD und PrdE sind homolog zu PrdA. PrdD ist zum N-terminalen Teil von Aminosäure 165 von PrdA bis zur Prozessierungsstelle und PrdE zum C-terminalen Teil nach der Prozessierungsstelle von PrdA homolog. Die Funktion beider Proteine ist bislang jedoch unbekannt. Die Koexpression von PrdD und PrdA ist im von *E. coli*-System bewirkt, dass ein vollständiges PrdA-Proprotein gebildet wird. PrdD

oder PrdE konnten nur in einer Transkriptionsfusion von *prdDE* in *E. coli* exprimiert werden. PrdD könnte den hydrophoben Bereich der ersten 180 Aminosäuren von PrdA stabilisieren, weil PrdA nur ohne diesen N-terminalen Bereich in *E. coli* stabil exprimiert wurde (BEDNARSKI et al. 2001). Da PrdA bei keiner Transkriptionsfusion in die 45 und 23 kDa-Untereinheiten gespalten wurde, ist anzunehmen, dass weder PrdB noch PrdD und PrdE an der posttranslationalen Spaltung des PrdA-Proteins in *E. coli* beteiligt sein sollten. Das vollständig gebildete PrdA-Proprotein mit N-terminalen *Strep*-tag II konnte jedoch nicht durch Affinitätschromatografie an *StrepTactin*® gereinigt werden, da es nur in sehr geringen Mengen exprimiert wurde und nach der Aufreinigung nicht mehr als 68 kDa großes Protein vorhanden war. Es war daher nicht möglich die Proteinspaltung des vollständigen PrdA-Proteins mit diesem System *in vitro* zu untersuchen.

Das GrdE-Proprotein wurde in der Transkriptionsfusion *grdEAB* mit den stromabwärts liegenden Genen *grdAB* koexprimiert (Abb.1.3). Dabei lagen GrdA und GrdB durch die Koexpression der auf dem Plasmid pASBC kodierten Gene *selB* und *selC* von *E. acidaminophilum* (GURSINSKY 2002) als Selenoproteine vor. Die Expression der Transkriptionsfusion *grdE_B* in *E. coli* zeigte, dass das GrdE-Proprotein ebenfalls ungespalten mit N-terminalen *Strep*-tag II gebildet wurde. Auch hier war es nicht entscheidend, ob das Selenocystein von GrdB mittels gerichteter Mutagenese durch ein Cystein ersetzt wurde, ob es verkürzt vorlag oder ob GrdB durch das Plasmid pASBC als Selenoprotein vorlag. Mit allen Transkriptionsfusionsvarianten wurde GrdE ungespalten in Form von *inclusion bodies* exprimiert. Somit sind in *E. coli* die Selenoproteine GrdA und GrdB weder an der Bildung von nativem GrdE-Proprotein noch an der posttranslationalen Spaltung des GrdE-Proteins beteiligt. Das GrdE-Proprotein wurde unter denaturierenden Bedingungen an *StrepTactin*® gereinigt und konnte wiederum nur mit 200 mM NaBH₄ bei pH 7,4 gespalten werden. Die zur *in vitro* Spaltung des GrdE-Proteins nötigen stark reduzierenden Bedingungen sind vermutlich nicht auf die Spaltung *in vivo* übertragbar. In einem weiteren *in vitro* Spaltversuch von GrdE mit GrdA des Protein A-Komplexes der Glycin-Reduktase und dem Thioredoxin-System (TrxA, TrxB) von *E. acidaminophilum*, die ein natürlich reduzierendes System für die GrdE-Proteinspaltung darstellen könnten, konnte die Spaltung des GrdE-Proteins ebenfalls nicht erreicht werden. Das *grdA*-Gen liegt in allen bekannten Genomen immer zwischen *grdE* und *grdB*. Jedoch bewirkte das GrdA-Produkt mit dem CysXXSec-Motiv als geeigneter Kandidat für die *in vivo* Spaltung keine *in vitro* Spaltung von GrdE. GrdE wird wahrscheinlich bei der Überexpression nicht richtig gefaltet, auch nicht bei gleichzeitiger Expression von GrdB bzw. GrdA und GrdB. Daher ermöglicht eine veränderte Struktur die Proprotein-Spaltung *in vitro* nur unter den gefundenen artifiziellen Bedingungen. Die Bildung von unlöslichem GrdE-Proprotein in Form von *inclusion bodies* trotz Koexpression von GrdB bzw. GrdA und GrdB unterstreicht, dass das rekombinante Protein möglicherweise eine andere Raumstruktur im Vergleich zum nativen GrdE-Proprotein aufweist. Ähnliches wurde bei den Pyruvat-Enzymen aus der Gruppe der Decarboxylasen beobachtet. Die Pro-HisDC aus *Lactobacillus* 30a konnte in *E. coli* als

rekombinantes Protein überexprimiert werden (VAN POELJE 1988). Dabei kam es zu einer verzögerten Aktivierung des Proenzymes, welches auf eine inkorrekte Faltung des Proteins im rekombinanten Wirt *E. coli* schließen lässt (VAN POELJE 1988). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass bei der Proprotein-Spaltung der N-terminal fusionierte *Strep*-tag II die Spaltungsreaktion und somit die Spaltungsbedingungen beeinflussen könnte.

4.4 Analyse der PrdA- und GrdE-Fusionsproteine

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten mit verschiedenen großen Domänen vom PrdA- und GrdE-Proprotein 6 PrdA-Fusionsproteine und 9 GrdE-Fusionsproteine generiert werden (Abb. 3.5). Hierzu wurde ein immer stärker eingegrenzter Bereich aus dem *prdA*- bzw. *grdE*-Gen herausgeschnitten und im gleichen Leseraster mit den Genen *malE* aus *E. coli* und *trxA* aus *C. sticklandii* fusioniert. Da die PrdA- und GrdE-Spaltstelle (bei PrdA zwischen Thr⁴²⁵ und Cys⁴²⁶, bei GrdE zwischen Asn²⁴¹ und Cys²⁴²) innerhalb der PrdA- und GrdE-Proproteinindomänen vorlagen, war eine Spaltung des Fusionsproteins möglich. Die erhaltenen Fusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer *in vitro* Spaltung mit 200 mM NaBH₄ bei pH 7,4 analysiert. Diese Versuche konzentrierten sich vor allem auf die GrdE-Fusionsproteine, da diese stabiler waren. Eine Analyse in der SDS-PAGE zeigte, dass die Fusionsproteine FuE, FuE8 und FuE7, deren GrdE-Fragment insgesamt bis zu 30 Aminosäuren umfasst, gut spaltbar waren. Die Spaltung von FuE6 und FuE5, deren GrdE-Fragment insgesamt 21 bzw. 17 Aminosäuren umfasst, war nur noch mit stark reduzierten Raten möglich. Bei der Spaltung von FuE1-4 konnte nur eine sehr stark eingeschränkte spezifische Spaltung beobachtet werden (Abb. 3.6). Die GrdE-Spaltdomäne der Fusionsproteine FuE1-4 umfasst im Gesamten 9-14 Aminosäuren. Es wurden Kontrollen durch Proteinsequenzierung und Mutanten, bei denen die Cys²⁴²-Spaltstelle zum Alanin mutiert wurde, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Fusionsproteine, deren Spaltprodukte im SDS-PAA-Gel eindeutig erkennbar waren, auch spezifisch am Cys²⁴² gespalten wurden. Somit kann ein für eine effiziente GrdE-Proteinspaltung nötiger Bereich von mindestens 30 Aminosäuren definiert werden, wobei die Cys²⁴²-Spaltstelle in der Mitte von diesem Bereich lag. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den PrdA-Fusionsproteinen erzielt. Da jedoch die Spalteffizienzen dieser Fusionsproteine nur mit der Effizienz der *in vitro* Spaltung von PAK4 (BEDNARSKI et al. 2001), einem N-terminal verkürzten PrdA-Proprotein, vergleichbar sind, können diese Werte nur bedingt ausgewertet werden. Erkennbar war dennoch, dass die PrdA-Spaltdomäne insgesamt größer als 20 Aminosäuren sein muss und die Cys⁴²⁶-Spaltstelle im Zentrum davon, damit es zu einer effizienten Proteinspaltung kommen kann.

Mit der Untersuchung der Fusionsproteine kann eine Proteindomäne von mindestens 30 Aminosäureresten, die auf jeden Fall Cys²⁴² (und Cys²⁴⁶) enthält, postuliert werden, damit GrdE *in vitro* noch effizient gespalten werden kann. Einschränkend sollte jedoch vermerkt werden, dass dies wiederum nur auf eine Spaltung *in vitro* mit 200 mM NaBH₄ zutrifft, die sich bestimmt von den Bedingungen für die *in vivo* Spaltung unter-

scheiden. Auch die Fusionsproteine wurden nur unlöslich in Form von *inclusion bodies* exprimiert, so dass die GrdE- und PrdA-Domänen innerhalb der Fusionsproteine wahrscheinlich nicht die native Struktur aufwiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Spalt-domäne nicht genau zugeordnet werden kann. Möglicherweise sind weitere Aminosäurereste aus unterschiedlichen Bereichen des Proproteins beteiligt oder ein spezifisches strukturelles Motiv des Proteins ist für die Spaltung wichtig, das sich nur über kristallographische Analysen klären ließe.

4.5 Reinigung des elektronentransferierenden Proteins PrdC der D-Prolin-Reduktase

Zur Reduktion des D-Prolins durch die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* sind Reduktionsäquivalente erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass NADH der natürliche Elektronendonator der D-Prolin-Reduktase ist (SETO 1980a). Im Rohextrakt kann Prolin mit den Reduktionsmitteln NADH oder DTT reduziert werden, angereicherte D-Prolin-Reduktase aber vermag D-Prolin nur noch mit DTT zum δ -Aminovalerat zu reduzieren (KABISCH et al. 1999). Bisher war unbekannt, welche Komponenten am Elektronentransfer beteiligt sind, jedoch ist dies im Gegensatz zur Glycin-Reduktase nicht das NADPH-abhängige Thioredoxin-System (SCHWARTZ & MÜLLER 1979). In früheren Untersuchungen gab es Hinweise, dass flavin- und eisenhaltige Proteinkomponenten für die Elektronenübertragung vom NADH auf die D-Prolin-Reduktase verantwortlich sind (STADTMAN 1965; SCHWARTZ & MÜLLER 1979; SETO 1980a).

Stromaufwärts des *prdA*-Genes liegt im D-Prolin-Reduktase-Operon das Gen *prdC* (Abb. 1.3), welches eine elektronentransferierende Funktion übernehmen könnte (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999). Das *prdC*-Gen kodiert für ein Protein, für das signifikante Sequenzhomologien zum RnfC-Protein aus *Rhodobacter capsulatus* (Abb. 4.4) und anderen RnfC-ähnlichen Proteinen aus z.B. *Pseudomonas stutzeri* A15 und *Haemophilus influenzae* KW20 gefunden wurden. Das RnfC-Protein ist Bestandteil eines Komplexes aus sechs Proteinen, welcher Elektronen auf die Nitrogenase überträgt (SCHMEHL et al. 1993; KUMAGAI et al. 1997). PrdC besitzt zwei hoch konservierte Bereiche, welche die potentiellen Bindestellen für NADH und FMN darstellen, das RnfC-Protein weist zudem konservierte Nukleotidbindestellen der Form **GXGXXG** auf (Abb. 4.4). Die PrdC-Sequenz enthält jedoch keine Motive für typische [4Fe-4S]-Cluster, wie z. B. **CXXCXXCXXXCP**. Sowohl PrdC als auch RnfC zeigen Homologien zu bakteriellen und mitochondrialen NADH-Ubichinon-Oxidoreduktasen und zu bakteriellen NAD-abhängigen Hydrogenasen (KUMAGAI et al. 1997). Bei Untersuchungen von NADH-DH-Aktivitäten aus *Clostridium tetanomorphum* und *Fusobacterium nucleatum* konnten für die verantwortlichen Enzyme ebenfalls Sequenzhomologien zu Rnf-Proteinen gefunden werden. Die NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Clostridium tetanomorphum* zeigt hohe Sequenzhomologien zu RnfC und RnfG und die Bande mit der stärksten NADH-DH-Aktivität aus *F. nucleatum* zeigt Homologien zu RnfC (W. BUCKEL pers. Mitteilung; BRÜGEL et al. 2004). Daher ist anzunehmen, dass Rnf-

eine elektronentransferierende Komponente der D-Prolin-Reduktase darstellt. Zu vermerken ist jedoch, dass PrdC nicht elektrophoretisch homogen zur Messung eingesetzt werden konnte und daher noch weitere Proteine am Elektronentransport beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zu den Messungen mit heterolog exprimierten PrdC (BEDNARSKI 1999), konnte hier keine Fe^{2+} -Abhängigkeit beobachtet werden. Es könnte sich für den Elektronentransport zur D-Prolin-Reduktase folgendes in Abb. 4.5 A zusammengefasstes Schema ergeben.

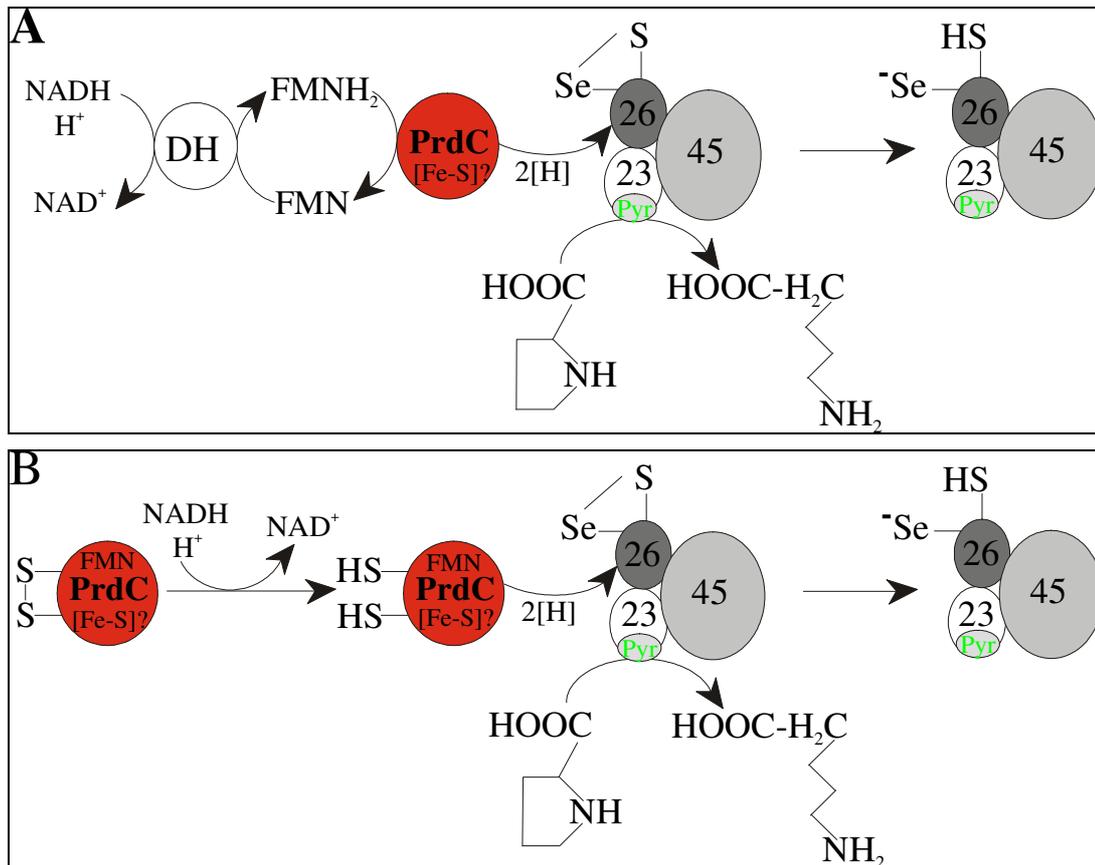


Abb. 4.5: Schematische Darstellung möglicher Elektronentransporte zur reduktiven Spaltung von D-Prolin durch die D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii*. **A:** Möglicher Elektronentransport über eine FMN-abhängige NADH Dehydrogenase. **B:** Möglicher Elektronentransport nur über PrdC. DH: FMN-abhängige NADH Dehydrogenase; PrdC: Elektronentransferprotein zur D-Prolin-Reduktase; 26, 23, 45: 26, 23 und 45 kDa UE der D-Prolin-Reduktase; Pyr: Pyruvyl-Gruppe.

Die Aktivität des angereicherten PrdC's reagierte auf Lagerungen relativ empfindlich, so waren z. B. nach 24 h Lagerung bei 4 °C bzw. mehr als 4 Wochen bei -20 °C nur noch 20 % Restaktivität zu verzeichnen. Verschiedene Parameter können für diesen Aktivitätsverlust verantwortlich sein. Die Ursache könnte in dem nicht optimalen Puffer liegen. Der pH-Wert von 8,0, der für die Anreicherung und Lagerung von PrdC gewählt wurde, stellt das Optimum für die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität dar (KABISCH et al. 1999). Die Messungen zum pH-Optimum von PrdC deuten jedoch darauf hin, dass bei pH 7,0 die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität mit PrdC-Zusatz optimal ist. Die Abhängigkeit der Stabilität des Enzyms vom pH-Wert dagegen wurde nicht bestimmt. Weiterhin ist anzunehmen, dass PrdC nur bei einer Interaktion

mit weiteren Komponenten stabil bzw. aktiv ist. Hinweise darauf sind, dass PrdC bei weiteren säulenchromatografischen Reinigungsschritten leicht zerfiel oder dass bei dem Versuch der Immunpräzipitation von PrdC stets mehrere Proteine kopräzipitierten. Für RnfC ist bekannt, dass es nur im Komplex mit anderen Proteinen des *rnfABCDGEH*-Operons aus *R. capsulatus* stabil ist. So stabilisieren sich RnfB und RnfC gegenseitig, RnfA stabilisiert RnfB und RnfC und in Abwesenheit von RnfD, RnfG oder RnfE sind RnfC und RnfB sehr instabil (KUMAGAI et al. 1997, JOUANNEAU et al. 1998). Weiterhin wird RnfC als potentiell Eisen-Schwefel-Protein beschrieben, es besitzt ein Eisen-Schwefel-Cluster vermutlich in der [4Fe-4S]-Form und ist ohne Fe²⁺ sehr instabil (JOUANNEAU et al. 1998).

Das PrdC-Protein enthält im N-terminalen Bereich vermutlich ein [Fe-S]-Cluster, welches jedoch nicht durch bereits bekannte konservierte Motive (Tabelle 4.2) gebunden wird. Bei PrdC liegen in homologen Bereichen der zwei [4Fe-4S]-Cluster von RnfC (Motiv: -C-X₂-C-X₂-C-X₃-C-P-) konservierte Cysteinreste mit Abständen von einem (-C-X-C-) bzw. fünf (-C-X₅-C-) Aminosäuren vor. Diese könnten am Aufbau von [Fe-S]-Zentren beteiligt sein. Möglich wäre aber auch die Ligandierung eines [Fe-S]-Clusters durch bisher nicht bekannte Sequenzmotive. PrdC besitzt insgesamt 10 Cysteine der Struktur -CX₁₀₁CX₅₂CX₉₉CX₅₁CXCX₂₃CX₁₁CX₅CX₂₂C-. Die HdrD-Untereinheit der Heterodisulfid-Reduktase verschiedener *Methanosarcina* species und aus *Archeoglobus fulgidus* besitzt neben zwei [4Fe-4S]-Clustern 10 zusätzliche Cysteine in dem hoch konservierten Sequenzmotiv -CX₃₁₋₃₈CCX₃₃₋₃₄CXXC-. Diese Cystein-Reste könnten ein zusätzliches [Fe-S]-Cluster ligieren und ein redoxaktives Disulfid bilden (HEDDERICH et al. 1998, MANDER et al. 2002). Die pflanzliche Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase ist ein Eisen-Schwefel-Protein mit einem [4Fe-4S]-Cluster. Das Eisen des [4Fe-4S]-Clusters wird hier durch das Sequenzmotiv CXCX₁₆CXCX₈CXC ligandiert (Cluster-Liganden sind unterstrichen). Die zwei verbleibenden Cysteine bilden ein redoxaktives Disulfid (DAI et al. 2000). Die möglichen redoxaktiven Disulfide von PrdC, (-C-X-C-) und (-C-X₅-C-), könnten die Elektronen vom NADH übernehmen und auf die Selenol-Thiol-Gruppe des Proteins PrdB übertragen. Die Sequenzbereiche zeigen allerdings keine Ähnlichkeiten zu bekannten Konsensussequenzen redoxaktiver Dithiole, wie z.B. -GCVPC- des Thioredoxins bzw. -CLNVGC- der Dihydrolipoamid-Dehydrogenasen (HOLMGREN & BJÖRNSTEDT 1995; LÜBBERS & ANDREESEN 1993; KREIMER et al. 1997, HARMS et al. 1998), die zur Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen (PNDOR) gehören.

Tabelle 4.2: Sequenz und Lage der Cysteine von verschiedenen [Fe-S]-Clustern

Enzym	Lage im Protein ^{a)}	Eisen-Gehalt	Sequenz
Typ 1 Cysteine von [4Fe-4S]-Clustern			
DmsB	I	4 Fe	18 RCTGCKTCELACK
NarH	I	4 Fe	20 KCIGCHTCSVTCK
Typ 2 Cysteine von [4Fe-4S]-Clustern			
DmsB	II	4 Fe	71 SCNHCEDPACTKVCP
NarH	II	4 Fe	188 LCEHCLNPACVATCP
Typ 3 Cysteine von [4Fe-4S]- und [3Fe-4S]-Clustern			
DmsB	III	4 Fe	103 VCIGCRYCHMACP
FrdB	II	4 Fe	153 GCINCGLCYAACP
FrdB	III	3 Fe	209 SCTFVGYCSEVCP
NarH	III	3 Fe	221 KCRGWRMCITGCP
SdhB	II	4 Fe	153 ECILCACCSTSCP
SdhB	III	3 Fe	210 RCHSIMNCVSVCP
RnfC	III	4 Fe	380 PCIRCGRCVQGCP
RnfC	IV	4 Fe	422 DCLACGCCSYNCP
Typ 4 Cysteine von [4Fe-4S]-Clustern			
DmsB	IV	4 Fe	130 KCDGCV-9-ICVESCP
NarH	IV	4 Fe	248 KCIFCV-9-VCSETCP
Cysteine von [2Fe-2S]-Clustern			
FrdB	I	2 Fe	62 SCRMAICGSCG-8-ACK
SdhB	I	2 Fe	59 SCREGVCGSDG-8-ACI
Aminoterminal Cysteine in Molybdoprotein-Untereinheiten			
DmsA	A		38 ACTVNCGRCP-30-ACL
FdhF	A		12 VCPY-CASGCK-24-LCL
FdnG	A		54 TCTY-CSVCGG-32-LCP
NarG	A		54 THGVNCTGSCS-32-GCP
NasA	A		7 TCPY-CGVCGG-25-LCV
PhsA	A		52 LCEM-CSFRCP-25-ICA

^{a)} Die Nummern kennzeichnen die Lage der [Fe-S]-Cluster innerhalb der Proteinsequenz (Gruppe I: Lage mehr aminoterminal; Gruppe II, III: Lage zwischen I und IV; Gruppe IV: Lage mehr C-terminal; Gruppe A: Lage am Aminoterminus von Molybdoproteinen).

Konservierte Cystein-Reste sind grau unterlegt. Dms: DMSO-Reduktase; Frd: Fumarat-Reduktase; Fdh: Formiat-Dehydrogenase H; Fdn: Formiat-Dehydrogenase N; Nar: Nitrat-Reduktase A; Nas: assimilatorische Nitrat-Reduktase; Phs: Thiosulfat-Reduktase; RnfC: *Rhodobacter* Stickstoff-Fixierung; Sdh: Succinat-Dehydrogenase

Da die Cysteine von PrdC zu keinem typischen [Fe-S]-Cluster und zu keiner bekannten Konsensussequenz für redoxaktive Dithiole zugeordnet werden können, könnten diese unbekannt Strukturen bisher unentdeckte oder neuartige enzymatische Funktionen ausführen. So könnten in der Kristallstruktur von PrdC zwei Cysteine so angeordnet

sein, dass diese ein redoxaktives Disulfid bilden. Bei den typischen 2-Cys-Peroxiredoxinen liegen die redoxaktiven Cysteine ebenfalls in keiner bekannten Konsensussequenz für redoxaktive Dithiole vor (CHAE et al. 1993). Im N-terminalen Bereich der Polypeptidkette befindet sich ein Cystein und ein zweiter Cystein-Rest ist im C-terminalen Abschnitt des Proteins lokalisiert (CHAE et al. 1993; JACOBSON et al. 1989). Im N-terminalen Bereich von FdhA1 und FdhA2 der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* befinden sich neben den an der Ausbildung der Eisen-Schwefel-Zentren beteiligten Cysteinen zwei weitere konservierte Cysteine (FdhA1: Cys²³ und Cys¹¹⁵; GRÄNTZDÖRFFER et al. 2003). GRÄNTZDÖRFFER et al. (2003) postuliert hierfür eine Dithiolgruppe, die Thioredoxin oder die Thioredoxin-Reduktase reduzieren vermag. Daher könnte sich für den Elektronentransport zur D-Prolin-Reduktase auch das in Abb. 4.5 B zusammengefasste Schema ergeben. PrdC überträgt dabei die Elektronen direkt vom NADH auf die gemischte Selenid-Sulfid-Gruppe von PrdB über das eigene redoxaktive Disulfid.

Das Absorptionsspektrum des angereinigten PrdC lieferte keine Hinweise auf die Bindung von Kofaktoren wie Eisen-Schwefel-Zentren, Chinone oder Cytochrome, da PrdC nicht homogen vorlag und des weiteren noch Reste von FMN im Puffer vorlagen. Es wäre möglich, dass die Elektronen von PrdC direkt an die Selenid-Sulfid-Gruppe von PrdB weitergegeben werden. Bereits SETO (1980a) hatte ein 56 kDa Flavoprotein für den Elektronentransfer vom NADH zur D-Prolin-Reduktase postuliert. Gleichwohl kann auch eine Beteiligung weiterer elektronentransportierender Proteine nicht ausgeschlossen werden. SCHWARTZ & MÜLLER (1979) konnte die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität durch die Kombination von drei Fraktionen rekonstituieren. Eine Fraktion enthielt die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität, eine weitere eine NADH-DH-Aktivität und die Dritte vermutlich ein elektronentransferierendes Protein, welches die Elektronen von der NADH-DH auf die D-Prolin-Reduktase überträgt. Bislang konnten Ferredoxin, Rubredoxin oder andere NADH-Oxidoreduktasen als beteiligte Elektronentransport-Proteine nicht nachgewiesen werden. PrdC konnte jedoch auch nicht homogen erhalten werden, um somit den Elektronentransfer direkt von NADH über PrdC auf die D-Prolin-Reduktase nachzuweisen.

RnfC ist aufgrund der Aminosäuresequenz eher hydrophil und somit ein lösliches Protein (SCHMEHL et al. 1993). Jedoch konnte RnfC als membranassoziiertes Protein an der peripheren Membran der Chromatophore lokalisiert werden (KUMAGAI et al. 1997, JOUANNEAU et al. 1998). Die Aminosäuresequenz von PrdC lässt eine Membranassoziation nahezu ausschließen, lediglich der Sequenzbereich Ala⁸¹-Leu¹⁰¹ innerhalb der NADH-Bindestelle wird als hydrophobe Region postuliert (LIEBMANN 1999). Die cytoplasmatische Lokalisation von PrdC konnte bei den Anreicherungsversuchen aus *C. sticklandii* bestätigt werden.

Ein D-Prolin-Reduktase-Operon konnte bei dem pathogenen Bakterium *C. difficile* durch die Genomsequenzierung am Sanger-Center (http://www.sanger.ac.uk:80/Projects/C_difficile) identifiziert werden (KABISCH et al.

1999). Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörpern gegen PrdC konnte erstmals die D-Prolin-Reduktase von *C. difficile* auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 3.11 B). Im Rahmen der derzeit erfolgenden Genomsequenzierung des pathogenen Bakteriums *Clostridium botulinum* (http://www.sanger.ac.uk:80/Projects/C_botulinum) konnte bei Sequenzvergleichen ein weiteres putatives D-Prolin-Reduktase-Operon identifiziert werden. Alle drei bekannten D-Prolin-Reduktase-Operone in *C. sticklandii*, *C. difficile* und *C. botulinum* weisen hohe Homologien hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Gene, der posttranslationalen Spaltung des PrdA-Proteins sowie des Vorkommens von den Proteinen PrdD und PrdE auf (Abb. 1.3; Abb. A1 im Anhang). Im putativen D-Prolin-Reduktase-Operon von *C. botulinum* kommen die Gene *prdC* 4-fach, *prdA*, *prdB* und *prdG* doppelt, und die ersten 137 bis 212 des aus dem *prdA*-Gen abgeleiteten Proteins ebenfalls doppelt vor (Abb. A1 im Anhang). Dies könnten Fehler sein, die bei der Zusammensetzung der DNA-Sequenzen zum vollständigen, vorläufigen Genom von *C. botulinum* auftreten oder *C. botulinum* besitzt einen zweiten unvollständigen Gensatz der D-Prolin-Reduktase. Weiterhin zeigt das PrdC-Protein von allen drei Organismen hohe Homologien zu RnfC und ist somit das elektronentransferierende Protein und das PrdR-Protein ist bei allen drei der putative Regulator der Gene der D-Prolin-Reduktase. Lediglich die DTT-abhängige D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wurde bisher angereichert und charakterisiert (KABISCH et al. 1999) und mit der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass PrdC das Elektronentransferprotein der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* ist. Bei den Enzymen aus *C. difficile* und *C. botulinum* wird aufgrund der hohen Homologien zur D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* der gleiche Aufbau und Reaktionsmechanismus vermutet. Weiterhin konnten mit Hilfe der Antikörper gegen PrdC Rückschlüsse auf die Expression der D-Prolin-Reduktase gezogen werden. Das Vorkommen bzw. die Menge von PrdC ist gleich zu setzen mit dem Vorkommen bzw. der Menge der D-Prolin-Reduktase, da im 3'-untranslatierten Bereich von *prdC* keine Terminatorstrukturen sowie vor dem *prdA*-Gen keine Promotorsequenzen identifiziert wurden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die D-Prolin-Reduktase auch bei geringen Prolin-Mengen im Medium (0,5 mM Prolin im Minimalmedium) exprimiert wird. Die spezifische Aktivität der D-Prolin-Reduktase von Zellen, die in Komplexmedium mit 50 mM Prolin gewachsen waren, ist am Ende der exponentiellen Wachstumsphase am größten und verbleibt bis zum Ende des Wachstums auf diesem Niveau (KABISCH et al. 1999). Im Gegensatz zur Aktivität ist die D-Prolin-Reduktase am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten exprimiert. Mit fortschreitender exponentieller Wachstumsphase sinkt die Menge an exprimierter D-Prolin-Reduktase. Somit wurde auf Proteinebene die ebenfalls gezeigt, dass bei gleichzeitigem Angebot der beiden Elektronenakzeptoren Glycin und Prolin der Glycin-Abbau unterdrückt wird, und die Reduktion des Prolins läuft bevorzugt ab (UHDE 1990).

4.6 Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons

Zur Regulation der D-Prolin-Reduktase konnten bisher nur hypothetische Aussagen getroffen werden. Die Transkription des D-Prolin-Reduktase-Operons hängt von der Verfügbarkeit von Prolin im Medium ab (KABISCH et al. 1999). LIEBMANN (1999) zeigte, dass die Transkription an einem σ^{54} -abhängigen Promotor vor *prdC* beginnt. Es ließen sich drei Transkripte in Northern-Blot-Analysen nachweisen. Eine 0,8 kb-mRNA umfasst nur *prdB*, die 4,5 kb-mRNA umfasst die Region von *prdC* bis einschließlich *prdB* und die 7,5 kb-mRNA reicht bis hinter *prdB* hinaus und könnte auch *prdB* umfassen (KABISCH 1999; LIEBMANN 1999; A. PICH pers. Mitteilung; Abb. 1.3). Die stromaufwärts von *prdC* gelegenen Gene *prdx* und *prdr* könnten bei Expression den potentiellen Aktivator PrdR und den möglichen Repressor PrdX bilden. PrdR weist bei Aminosäure-Sequenzvergleichen hohe Homologien zu regulatorischen Proteinen der *enhancer binding protein*-Familie (EBP) vom NifA-Typ auf (LIEBMANN 1999). Auf Proteinebene konnte die Expression von PrdR über eine Kreuzreaktion mit gegen NifA gerichteten Antikörpern gezeigt werden (LIEBMANN 1999). PrdX zeigt schwache Homologien zu Transkriptionsregulatoren mit *helix-turn-helix*-Motiven, die vermutlich als Repressor wirken (A. PICH pers. Mitteilung). Im untranslatierten Bereich zwischen *prdx* und *prdr* wurde keine Promotorstruktur identifiziert, jedoch vor *prdx*. Im Promotorbereich vor *prdx* weist die Sequenz eine *inverted repeat*-Struktur auf. PrdX könnte bei Bindung an die *inverted repeat*-Struktur die Transkriptmenge von *prdx* und *prdr* kontrollieren und daher als Repressor agieren (A. PICH pers. Mitteilung). Die Transkription der *prdxR*-Gene wurde durch Northern-Blot-Analyse untersucht, jedoch ließen sich keine Transkripte nachweisen und RT-PCR lieferte ebenfalls keine eindeutigen Aussagen (LIEBMANN 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei *primer extension*-Untersuchungen zur Transkription von *prdxR* verschiedene Transkriptionsstartpunkte erhalten. Dabei konnten vor *prdx* sieben Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Vermutlich wird der 173 bp stromaufwärts von *prdx* gelegene Transkriptionsstart genutzt, da dieser Homologien zu σ^{70} -Promotoren aufweist (YOUNG et al. 1989; WÖSTEN 1998; Abb. 4.6). Vor *prdr* konnte ebenfalls ein Transkriptionsstart identifiziert werden. Dieser liegt 111 bp stromaufwärts von *prdr* und weist ebenfalls Homologien zu σ^{70} -Promotoren auf (YOUNG et al. 1989; WÖSTEN 1998; Abb. 4.6). Bei RT-PCR-Untersuchungen der *prdxR*-Gene zeigte sich mit verschiedenen Primerkombinationen ebenfalls die Existenz mehrerer verschiedener *prdx*- und *prdr*-Transkripte. Diese Ergebnisse wurden auch bei mehrmaligen Kontrollen bestätigt, und es ist deshalb anzunehmen, dass die Promotoren genutzt werden, die zu den bekannten Konsensus-Sequenzen Homologien aufweisen (Abb. 4.6).

Gen	-35	-10	+1
<i>prdx</i>	GAGACT TTGTC AGTTCTGCGGAAAGCCAGC TAAGCAT ATGGT A TATCTA		
<i>prdr</i>	GGATC TTGAAA AAATAGTC-AAGGCAAA TGGTAAT ----- A CTTTTA		
σ^{70} -Konsensus	TTGACA -----17N----- TATAAT		

Abb. 4.6: Putative σ^{70} -Promotor-Strukturen für *prdX* und *prdR*. σ^{70} -Konsensus: Sequenz für σ^{70} Promotoren in Clostridien (YOUNG et al. 1989; WÖSTEN 1998). Konservierte Basen in der Konsensussequenz sind fett gedruckt.

Die Expression der *prdXR*-Gene erfolgte sowohl bei Anzucht von *C. sticklandii* in Minimalmedium mit der essentiellen Prolinkonzentration von 0,5 mM, in Minimalmedium mit 20 mM Prolin als auch bei Anzucht in Komplexmedium, da jeweils Transkripte durch RT-PCR nachgewiesen werden konnten. Dabei waren die Transkript-Intensitäten von auf Komplex- und Minimalmedium mit Zugabe von 20 mM Prolin gewachsenen Zellen größer als die Transkript-Intensitäten von nur auf Komplex- und Minimalmedium gewachsenen Zellen. Somit wird die Expression der *prdXR*-Gene wohl nicht allein durch Prolin geregelt, sondern es sind vermutlich noch weitere Faktoren daran beteiligt. Es wurde eine substratabhängige Induktion des D-Prolin-Reduktase-Operons anhand von Northern-Blot-Analysen postuliert, da die Expression der Gene *prdCAB* nur bei Anzucht von *C. sticklandii* in Minimalmedium mit 20 mM Prolin erfolgte (KABISCH et al. 1999; LIEBMANN 1999). Die Aktivität der D-Prolin-Reduktase hängt ebenfalls von Prolin im Medium ab, ohne Prolin im Medium war keine Aktivität messbar (KABISCH et al. 1999). Jedoch konnte auf Proteinebene die Expression von PrdC mit gegen PrdC gerichteten Antikörpern ebenfalls auf Minimalmedium mit der essentiellen Prolinkonzentration von 0,5 mM und auf Komplexmedium gezeigt werden (s. 4.5). Bei *C. sporogenes* und *C. sticklandii* konnte gezeigt werden, dass Prolin im Medium die Reduktion von Glycin hemmt und Prolin bevorzugt reduziert wird (Venugopalan et al. 1980; Uhde 1990). Somit kann vermutet werden, dass die Prolin-Reduktase entsprechend der Prolin-Menge im Medium reguliert wird.

Stromaufwärts vor *prdC* weist die Sequenz sowohl eine σ^{54} -abhängige als auch eine σ^{70} -abhängige Promotorstruktur auf (LIEBMANN 1999). Das Vorkommen eines σ^{54} - und eines σ^{70} -abhängigen Promotors vor *prdC* könnte auf eine induzierbare, regulierte Expression durch die σ^{54} -RNA-Polymerase (σ^{54} -RNAP) neben einer konstitutiven Genexpression durch die σ^{70} -RNA-Polymerase (σ^{70} -RNAP) hinweisen. Im Bereich vor *prdC* wurden weitere regulatorischen Sequenzen gefunden, die Bindestelle für den *integration host factor* (IHF) und die *enhancer*-Strukturen (ELE-Elemente). Daraus resultierend ist die Expression von *prdC* durch Aktivierung der σ^{54} -RNA-Polymerase über DNA-gebundene Regulatorproteine wahrscheinlich. Gleichzeitig kann aber auch eine konstitutive Expression über den σ^{70} -abhängigen Promotor in Betracht gezogen werden. Dies würde erklären, dass das D-Prolin-Reduktase-Operon induzierbar ist, aber PrdC auch konstitutiv auf Proteinebene nachweisbar war.

Zur Untersuchung des Regulationsmechanismus des D-Prolin-Reduktase-Operons wurden Fusionen der Regulations-Elemente, das *prdR*-Gen mit der σ^{54} -abhängigen Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* und nur die σ^{54} -abhängige Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC*, mit dem *lacZ*-Gen getestet. Die plasmidcodierten *lacZ*-Fusionen zeigten in *E. coli* messbare β -Galactosidase-Aktivitäten. Aussagen zu möglichen Regulationsmechanismen konnten jedoch nicht abgeleitet werden. Die höchsten β -Galactosidase-Aktivitäten wies das Konstrukt aus der σ^{54} -abhängigen Promotorstruktur

stromaufwärts vor *prdC* und *lacZ* auf und dies auch ohne die Zugabe eines Induktors wie IPTG oder Prolin. Diese Aktivität lag vielfach höher im Vergleich zur Aktivität der mit IPTG vollständig induzierten β -Galactosidase. Diese starke Induktion der β -Galactosidase-Aktivität wird allein durch die σ^{54} -abhängige Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* hervorgerufen. In *E. coli* sind wahrscheinlich Aktivatoren vorhanden, die an die σ^{54} -abhängige Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* binden, somit die starke Induktion der Reportergene hervorriefen und den potentiellen Regulator PrdR nicht mehr binden ließen. Das Konstrukt aus *prdR* mit der σ^{54} -abhängigen Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* und *lacZ* zeigte die höchste β -Galactosidase-Aktivität bei IPTG-Induktion. In LB-Medium ohne Induktor oder mit Prolin als Induktor zeigten Zellen mit dem Konstrukt aus *prdR*, σ^{54} -Promotor und *lacZ* keine β -Galactosidase-Aktivität, während diese in M9-Medium jeweils eine β -Galactosidase-Aktivität von 50 % im Vergleich zur vollständig induzierten β -Galactosidase aufwiesen. Somit kann vermutet werden, dass das *prdR*-Gen vor der σ^{54} -abhängigen Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* durchaus einen regulierenden Effekt auf die D-Prolin-Reduktase ausübt, weil das *lacZ*-Gen nur noch schwach induziert wird. Aussagen zu den Elementen, die diese Regulation bewirken, können jedoch nicht getroffen werden. Prolin als möglicher Induktor hatte in diesem System keinen Einfluss. Da der Intergenbereich zwischen *prdR* und *prdC*, wo die Bindestelle für den σ^{54} -Faktor der RNA-Polymerase (RNAP) liegt, eine mehrfache Induktion des *lacZ*-Genes in *E. coli* bewirkt, werden vermutlich die potentiellen Regulator-Elemente des D-Prolin-Reduktase-Operons aus *C. sticklandii* in *E. coli* nicht so wie in *C. sticklandii* erkannt und funktionieren wahrscheinlich auch nicht so wie in *C. sticklandii*. Daher wurden auch keine weiteren Untersuchungen mit dem möglichen Repressor PrdX durchgeführt. Somit können keine spezifischen Aussagen zur Regulation des D-Prolin-Reduktase-Operons getroffen werden und PrdR kann als potentieller Regulator in diesem System nicht bestätigt werden.

Die Regulation der Expression infolge veränderter Wachstumsbedingungen erfolgt durch Initiation der Transkription. Für den Ablauf dieses komplexen Prozesses wird die spezifische DNA-Promotorsequenz und die RNAP benötigt, welche mit einem löslichen σ -Faktor das Holoenzym bildet (BUCK et al. 2000). Der σ -Faktor erkennt und bindet die doppelsträngige DNA-Promotorsequenz, ist involviert in das Schmelzen der DNA-Doppelstränge am Promotor, inhibiert unspezifische Transkriptionsinitiationen, ist Bindestelle für Aktivatoren und kontrolliert die frühe Transkription durch Promotor-clearance und Trennung von der RNAP (BUCK et al. 2000). Die σ -Faktoren der σ^{70} -Gruppe sind vor allem in die Expression der meisten Gene während des exponentiellen Wachstums involviert (DOVE et al. 2003). Die σ^{54} -abhängige RNAP reguliert nur Gene unter Stress und speziellen Wachstumsbedingungen und ist daher für das Überleben nicht essentiell (BUCK et al. 2000; ZHANG et al. 2002). Die Expression der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wird u. a. wahrscheinlich durch eine σ^{54} -abhängige RNAP reguliert. Für die σ^{54} -RNAP ist neben dem σ^{54} -Faktor und der RNAP zusätzlich ein Aktivatorprotein nötig (WÖSTEN 1998; BUCK et al. 2000; ZHANG et al. 2002). PrdR könnte dieses Aktivatorprotein darstellen, da es typische Merkmale der EBP aufweist

(Abb. 4.7). EBP's gliedern sich strukturell in drei konservierte Bereiche mit charakteristischen Motiven. Die Region I besteht aus einem variablen N-terminalen Teil, die Region II besitzt eine hochkonservierte zentrale Domäne (ATP-Bindung und -Hydrolyse, σ^{54} -Interaktion) und die Region III im C-terminalen Teil dient der Bindung an Enhancer-Strukturen (ELE-Elemente) und zeichnet sich durch das *helix-turn-helix*-Motiv (HTH) aus (MORETT & SEGOVIA 1993) (Abb. 4.7). Die Regulation des σ^{54} -RNAP-Komplexes erfordert die Bindung des oligomerisierten Aktivators, welcher strukturelle Transformationen im Komplex bewirkt. Dazu ist die ATP-Bindung und -Hydrolyse durch das Aktivatorprotein essentiell (ZHANG et al. 2002).

C.s. PrdR	MFFNQTKRLKVKKEIMSKDFIVFDSDSLRRRCVEHIALNNLKEVIVRHHEKLTGYIKFDDI	60
K.p. NifA	-----MIHKSDSDTTVRRFDLSQQFTAMQRISVVLRSRTEASKTLQEV	43
	. *** ..** *	
C.s. PrdR	IKISLSQSFSEKKLFDIRANKPFYLNVEDTVLMAKDIMRENQVDRVFLDDEKLVGLVLR	120
K.p. NifA	LSVLHNDAFMQHGMICLYDSQQEILSIEALQQTEDQTLPGSTQIRYRPGEGLVGTVLAQG	103
* *..* *	
PAS-Domäne		
C.s. PrdR	QDIVYKLYPKIQANEDLYELLWNVHEGICIIDNKGMCVCIWGRGSEKLYGIKKSEIIGKK	180
K.p. NifA	QSLVLPVAVDDQRFDRLSLYDYDLFFIAVPLMG-----	137
 * * . *	
C.s. PrdR	LEEFFPTALLLDVLKSKEPVENIHSRPNKTYVNISALPLIKNGKLVVSTERDVSEIT	240
K.p. NifA	-----PHSRPIGVLAHAHAMAQEERLPACTRFLETVANLIAQTIRLMILPASAQAQQAQ	192
	* . . . ** * * . . . *	
C.s. PrdR	NLSRELEFTKEKLDYLQVEVRKMNEKDFSGNIVGKSKIMTHTIDRAYQVASTTSSVLIS	300
K.p. NifA	-----PRIERPRACTPSRGFGLNMGKSPAMRQIMDIIRQVSRWDTTVLVR	239
 *.. *..** * . . . *	
ATP-bindende Domäne A σ^{54}-bindende Domäne		
C.s. PrdR	GESGTGKEVFARAIHQSSG-REGAFVAINCSAIPESLFESEMFGYESGAFTGALSCKGKIG	359
K.p. NifA	GESGTGKELIANAIHHNSPRAAAAFVKFNCAALPDNLLESELFGHEKGAFTGAVRQ-RKG	298
	*****..*..**..* *..* *..* *..* *	
ATP-bindende Domäne B ATP-Hydrolyse-Domäne		
C.s. PrdR	KIEIANGGTLFLDEIGDMPLHMQAQLLRVLQERQLMRVGGDKSISLDVVRVISATHRNLED	419
K.p. NifA	RFELADGGTLFLDEIGESSASFQAKLLRILQEGEMERVGGDETLRVNVRIIAATNRHLEE	358
	..*..*****. . . *****.*** . . *****. *..* *	
C.s. PrdR	MVKSQGFREDLYRNLNVNIKPLSLSDRIEDVPLFVKLFIEEFCRENHMKVPNISPEILN	479
K.p. NifA	EVRLGHFREDLYRNLNVMPIALPPLRERQEDIAELAHFLVRKIAHS-QGRTLRI SDG AIR	417
	* . * ***** . * ** . * * * ** . .	
Nukleotid-bindende Domäne		
C.s. PrdR	MLMYSWPGNIRELKNMVEHLVVFVSKNNEIQIDTLPEYINNKEKDTINIKNEKSLTDLIR	539
K.p. NifA	LLMEYSWPGNVRELENCLESAVLSSEGLIDRDVILFNHRDNPPKALASSGPAEDGWLDN	477
	..*..*****.***. * . * . * . . . * . * * * *	
HTH		
C.s. PrdR	-KTEIKAIHDAMKECGNKKQAAKLLDIPRSTLYKIKFYDLNQYL-	584
K.p. NifA	SLDERQRLIAALEKAGWVQAKAARLLGMTPRQVAYRIQIMDITMPRL	524
	* . . * . . . * . . . * * * *	

Abb. 4.7: Homologievergleich der Proteine PrdR aus *C. sticklandii* (C.s.) (LIEBMANN 1999) mit dem Protein NifA aus *Klebsiella pneumoniae* (K. p.). Die der PAS-Domäne ähnliche Struktur im N-Terminus und das HTH-ähnliche Motiv im C-Terminus von PrdR sind einfach unterstrichen. Die ATP- und Nukleotid-bindenden Domänen sowie die σ^{54} -Interaktionsdomäne sind grau unterlegt. (*): konservierte Aminosäuren, (.) : ähnliche Aminosäuren, (-): eingefügte Lücken.

Die N-terminale Domäne enthält eine PAS-Domäne und zeigt signifikante Homologien zu Sensor- oder Signal-Transduktions-Histidin-Kinasen (LIEBMANN 1999) (Abb. 4.7). PAS-Domänen sind Signalmodule, welche veränderte Lichtverhältnisse, Redoxpotentiale, Sauerstoffgehalte, kleine Liganden oder Energiezustände wahrnehmen. Sie enthalten eine variable Region zwischen zwei oder mehreren Sensor-Boxen (TAYLOR & ZHULIN 1999). Diese S-Boxen reagieren auf die veränderten Verhältnisse innerhalb der Zelle (ZHULIN et al. 1997). Gewöhnlich wird das Signal von einem Rezeptor, der die PAS-Domäne enthält, wahrgenommen. Dieser leitet das Signal über mindestens ein Protein weiter, bis es zu einer Aktivierung oder Inhibierung von Genen oder Proteinen kommt (TAYLOR & ZHULIN 1999). PrdR könnte das Redoxpotential oder die Prolinkonzentration in der Zelle messen (LIEBMANN 1999). Durch das Vorhandensein der PAS-Domäne könnte PrdR ein Signal wahrnehmen und gleichzeitig durch das Vorhandensein des HTH-Motives darauf reagieren. LIEBMANN 1999 diskutiert eine Dimerisierung des aktivierenden Regulators PrdR. Die PrdR-Homodimere könnten an die im DNA-Bereich vor *prdC* befindlichen drei ELE-Sequenzen binden (NORTH et al., 1993) und somit den σ^{54} -RNAP-Komplex aktivieren.

Der Regulationsmechanismus für das D-Prolin-Reduktase-Operon in *C. sticklandii* wurde von LIEBMANN (1999) anhand seiner gewonnenen Erkenntnisse postuliert und kann durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht weiter spezifiziert werden:

Das Eingangssignal in Form von Prolin oder einer Änderung des Redoxpotentials der Zelle könnte über eine Signal-Transduktions-Kaskade die Aktivierung von PrdR bewirken. PrdR bindet an die DNA und induziert die Konformationsänderung der DNA, welche wiederum die Bindung von PrdR auch an die σ^{54} -RNAP ermöglicht. Die Hydrolyse eines Nukleosid-Triphosphates würde die Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen Promotorkomplex und die Transkription der nachfolgenden Gene des D-Prolin-Reduktase-Operons ermöglichen (Abb. 4.8).

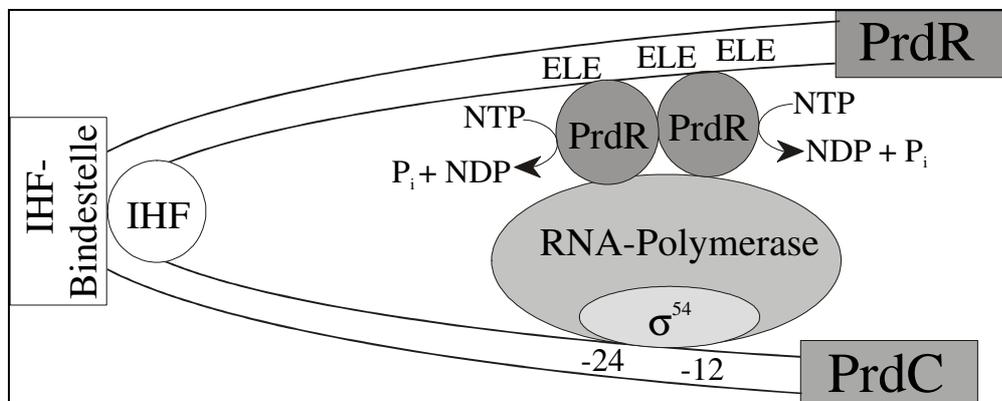


Abb. 4.8: Schematische Darstellung des postulierten Regulationsmechanismus für das D-Prolin-Reduktase-Operon aus *C. sticklandii* (LIEBMANN 1999). IHF: *integration host factor*; ELE: *enhancer like element*; (-24, -12): konservierte σ^{54} -Promotor-Region; PrdR: Regulator-Protein; *prdR*: Gen des Regulator-Proteins; *prdC*: Gen des potentiellen elektronenübertragenden Proteins; NTP: Nukleosid-Triphosphat; NDP: Nukleosid-Diphosphat; P_i: anorganisches Phosphat.

4.7 Entwicklung eines Transformationssystems für *C. sticklandii*

Mit der genetischen Manipulierbarkeit eines Organismus können Strukturen und Wirkungen verschiedener Enzyme oder Funktionen zur Genregulation genauer analysiert werden. Die breitere Charakterisierung von komplex aufgebauten Proteinen, wie z.B. der D-Prolin-Reduktase von *C. sticklandii*, zu deren vollständiger nativer Überexpression bisher kein System vorliegt, würde durch die Transformierbarkeit des Organismus erleichtert. Zur weiteren Untersuchung könnten gezielt Mutationen in Proteine eingeführt werden, um deren Auswirkungen auf die Aktivität oder Stabilität des Proteins zu untersuchen. Auch zur Klärung der Funktion unbekannter Gene kann ein Transformationssystem genutzt werden. Gene könnten deletiert werden und somit Hinweise auf ihre Funktion liefern. Es könnten ebenso Promotoren der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii*, deren Sequenzbereiche keine Ähnlichkeiten zu Konsensus-Sequenzen bekannter Promotoren aufweisen (WÖSTEN 1998) oder deren Regulation ungeklärt ist, durch Promotorstudien auf Basis eines Genexpressions-Reportersystems charakterisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit blieben alle durchgeführten Versuche zur Transformation von *C. sticklandii* durch Elektroporation oder Konjugation erfolglos. Aufbauend auf die ersten Transformationsexperimente mit dem nah verwandten Organismus *E. acidaminophilum* (GRÄNTZDÖRFFER 2000) konnten für die Transformation von *C. sticklandii* wichtige Ergebnisse erzielt werden.

C. sticklandii weist eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Erythromycin auf, gegenüber Chloramphenicol zeigt *C. sticklandii* wiederum eine relativ hohe natürliche Resistenz. Zur Selektion von transformierten gegenüber nicht-transformierten Zellen sollte sowohl Tetracyclin als auch Erythromycin und Chloramphenicol verwendet werden. Die Resistenzdeterminante gegenüber einem Antibiotikum ist auf dem Shuttle-Vektor kodiert. Bei einer erfolgreichen Transformation ist die Expression des entsprechenden kodierenden Resistenzgens, sowie die Funktionalität der Resistenzdeterminante in dem neuen Wirt die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Selektion.

Das ursprünglich aus *Enterococcus faecalis* isolierte konjugative Transposon Tn916 (FRANKE & CLEWELL 1981) vermittelt Tetracyclin-Resistenz durch die *tetM*-Determinante. Die Klasse der TetM-Proteine verleiht Resistenz durch reversible Bindung an das Ribosom. Die *tetM*-Determinante konnte sowohl auf Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien übertragen werden, da sie einen sehr weiten Wirtsbereich besitzt (BERTRAM et al. 1991). Die Resistenz gegenüber Chloramphenicol wird durch die Chloramphenicol-Transferase bewirkt, welche das Chloramphenicol inaktiviert und auf dem Chloramphenicol-Resistenzgen (*catP*) codiert ist. Das *cat*-Gen aus *E. coli* kann

nicht in Gram-positiven Organismen exprimiert werden, jedoch kann das *cat*-Gen von Clostridien in *E. coli* exprimiert werden (ROBERTS et al. 1988). Das *cat*-Resistenzgen aus *C. perfringens* konnte sowohl auf Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien übertragen werden, und ist stabiler als andere Resistenzen (KIM & BLASCHEK 1989). In einigen Clostridien wird Chloramphenicol durch Reduktion der Aryl-Nitro-Gruppe inaktiviert. Als Selektionsmarker konnte jedoch Thiamphenicol eingesetzt werden, da dieses von Clostridien nicht inaktiviert wird (O'BRIEN & MORRIS 1971). Die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Erythromycin erfolgt bei Gram-positiven Organismen durch die Ausbildung der *ermC*-Determinante oder der Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B (MLS)-Determinante (MAHLER & HALVORSON 1980; GRYCZAN et al. 1982; MONOD et al. 1986). Beide Determinanten haben hohe Homologien zueinander. Die *ermC*-Determinante ist ursprünglich auf dem Plasmid pE194 aus *Staphylococcus aureus*, die MLS-Determinante auf dem Plasmid pIM13 aus *Bacillus subtilis* codiert (MAHLER & HALVORSON 1980; GRYCZAN et al. 1982; MONOD et al. 1986). Die Resistenzdeterminanten *ermC* und MLS bilden eine rRNA-Methylase, welche die Resistenz gegenüber Erythromycin bewirkt (SHIVAKUMAR & DUBNAU 1981). In Clostridien, wie z.B. *C. perfringens*, *C. acetobutylicum* oder *C. difficile*, konnten mit Tn916 bzw. verwandten Transposons, sowie mit dem Chloramphenicol-Resistenzgen und der *ermC*- bzw. MLS B-Resistenzdeterminante gute Erfolge erzielt werden (*C. perfringens*: ABRAHAM & ROOD 1985; ROBERTS et al. 1988; KIM & BLASCHEK 1989; *C. acetobutylicum*: OULTRAM et al. 1988; DÜRRE 1993; GREEN & BENNETT 1997; NAKOTTE et al. 1998; TYRIN et al. 2000; oder *C. difficile*: YOUNG et al. 1989; HEBERT et al. 2003).

Eine weitere Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist die Replizierfähigkeit des transformierten Plasmides in dem neuen Wirt. Der Vektor benötigt einen Replikationsursprung (*origin*), der eine autonome Replikation des Plasmides in diesem Falle in *C. sticklandii* ermöglicht. In *C. sticklandii* konnten keine Plasmide nachgewiesen werden und somit muss auf *origins* von Plasmiden anderer, möglichst verwandter Bakterien zurückgegriffen werden. Die meist verwendeten Shuttle-Vektoren weisen zwei Resistenzdeterminanten, sowie zwei *origins* auf, um die Replikation und Selektion in *E. coli* sowie dem Gram-positiven Plasmid-Empfänger zu gewährleisten. In *C. acetobutylicum* konnten autonom replizierende Plasmide übertragen werden, die *origins* von verwandten Clostridien, Bacilli oder Strepokokken besaßen. Die Übertragung des Plasmides erfolgte sowohl durch Elektroporation als auch durch Konjugation (YOUNG et al. 1989; DÜRRE 1993). Für die Transformationsexperimente mit *C. sticklandii* wurden daher Vektoren mit Replikationsursprüngen von Plasmiden von *C. perfringens*, *C. butyricum*, sowie *B. subtilis* und *E. faecalis* (Tabelle 3.8) verwendet. Die verwendeten Plasmide wiesen eine Resistenzdeterminante auf, deren Expression oder Funktionstüchtigkeit in *C. sticklandii* nicht bekannt ist, des weiteren wiesen sie Replikationsursprünge auf, über deren Replizierfähigkeit in *C. sticklandii* ebenfalls keine Aussage gemacht werden kann. Die *origins* der clostridiellen Plasmide besitzen einen relativ eingeschränkten Wirtsbereich, der Wirtsbereich des Plasmidreplikons von pAM β 1 aus *E. faecialis* umfasst einen weiteren Wirtsbereich, die Gattungen *Acetobacterium*, *Bacillus*,

Clostridium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* (STRÄTZ 1991; SWIENFIELD et al. 1990; TRIEU-CUOT et al. 1987; LEBANC & LEE 1984).

Mit Hilfe von Elektropermeabilitätsmessungen konnten für *C. sticklandii* Bedingungen gefunden werden, welche eine Aufnahme des zu transformierenden Plasmides ermöglichen sollten. Bei den Elektropermeabilitätsmessungen deutete die Steigerung der freigesetzten ATP-Menge von 400 % im Vergleich von elektroporierten zu nicht elektroporierten *C. sticklandii*-Zellen auf eine Schädigung der Cytoplasmamembran hin. Die Cytoplasmamembran sollte somit porös genug sein, um die DNA aufzunehmen. Jedoch waren die Überlebensraten für die gewählten Elektroporationsbedingungen noch relativ hoch (> 40 %), trotz einer angelegten Feldstärke von 12,5 bis 25 kV/cm. Die angelegte Feldstärke von 25 kV/cm ist die technisch maximal erreichbare Feldstärke. Dieses anliegende Feld sollte in der Cytoplasmamembran Poren entstehen lassen, durch die ein Plasmid in die Zelle aufgenommen werden kann. Je höher die Feldstärke ist, desto mehr Poren entstehen und die Effizienz der Transformation steigt. Gleichzeitig nimmt die Überlebensrate der Zellen ab, da die Membran mancher Zellen irreparabel geschädigt wird und die Zelle stirbt.

Für *C. acetobutylicum* wurde lediglich eine Feldstärke von 5 kV/cm bei einer Kapazität von 25 µF empfohlen (MERMELSTEIN et al. 1992). Bei einer Feldstärke von 6,25 kV/cm betrug die Überlebensrate für *C. perfringens* nur noch 18 % (ALLEN & BLASCHEK 1988). Bei Elektropermeabilitätsmessungen mit *Clostridium cellulolyticum* konnten optimierte Bedingungen für die Elektrotransformationen gefunden werden. Bei 7 - 7,5 kV/cm Feldstärke während 5 ms auf eine Mischung von 10:1 aus dem methylierten Plasmid und der *C. cellulolyticum*-Zellsuspension konnten hohe Transformationsraten erreicht werden (TARDIF et al. 2001). Bei *E. acidaminophilum* reichten 12,5 kV/cm Feldstärken nicht aus, um die Zellzahl zu dezimieren (GRÄNTZDÖRFFER 2000). Bei den Elektropermeabilitätsmessungen mit elektroporierten Zellen konnte bestätigt werden, dass selbst Feldstärken von 25 kV/cm bei *E. acidaminophilum* nur eine 50 %ige Steigerung der freigesetzten ATP-Menge im Vergleich zu nicht elektroporierten Zellen bewirkten. Weitere Elektroporationsversuche mit *C. sticklandii* und den verschiedenen Plasmiden (Tabelle 3.8) unter optimierten Bedingungen nach den Elektropermeabilitätsmessungen lieferten ebenfalls keine Transformanten. Somit ist nicht bekannt, ob die ungenügende Schädigung der Zellhüllen, die Replizierbarkeit des Vektors oder die Funktionstüchtigkeit der Resistenzdeterminante in *C. sticklandii* für die erfolglose Transformierbarkeit verantwortlich sind.

Ein Elektroporations- und Konjugationshindernis können wirtsspezifische Restriktionsendonukleasen sein, da sie die Transformationseffizienz wesentlich beeinflussen oder eine Transformation gänzlich verhindern können. Plasmide können vor Restriktionsendonukleasen durch *in vivo*- oder *in vitro*-Methylierung vor Abbau geschützt werden. Verwandte Organismen wie *E. acidaminophilum* oder *C. difficile* weisen derartige Restriktionsendonukleasen auf (GRÄNTZDÖRFFER 2000; YOUNG et al. 1989; PURDY et al. 2002). Es wurden daher Plasmide verwendet, die aus *E. coli* XL1 Blue isoliert wur-

den. Diese sind am „C“ in der Sequenz 5'-GATC-3' durch die *dam*-Methylase methyliert und so vor Abbau durch viele Restriktionsendonukleasen geschützt.

Ein weiteres mögliches Elektroporationshindernis können *surface layer* (*S-Layer*) sein. Eine *surface layer* ist eine zweidimensionale parakristalline Schicht, die die Zelle komplett umhüllt, und den äußersten Abschluss der Zelle zu ihrer Umgebung darstellt. Sie sind aus nur einer Sorte (Glyko-)Protein aufgebaut und kommen bei den meisten aus ihrer natürlichen Umgebung isolierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie Archeen vor (Reviews: SÅRA & SLEYTR 2000; SLEYTR & BEVERIDGE 1999; BOOT & POWELS 1996; BEVERIDGE & GRAHAM 1991; SLEYTR & MESSNER 1988). Bei Gram-positiven Organismen ist die *S-Layer* der Peptidoglycan-Schicht aufgelagert und vermutlich durch ionische Wechselwirkungen an sekundäre Zellwandpolymere geknüpft. Bei *C. sticklandii* konnte eine quadratische *S-Layer*-Schicht mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (GRÄNTZDÖRFFER 2000). Neben der quadratischen konnten noch schräge und hexagonale *S*-Schicht-Gitter als Grundtypen identifiziert werden (Abb. 4.9). Überspiralisierte Plasmide, wie sie für Elektroporationen eingesetzt werden, sind vermutlich zu voluminös, um durch die Poren (je nach Porendurchmesser – Ausschlussgrößen zwischen 15 und 40 kDa) einer intakten *S-Layer* an die Cytoplasmamembran zu gelangen.

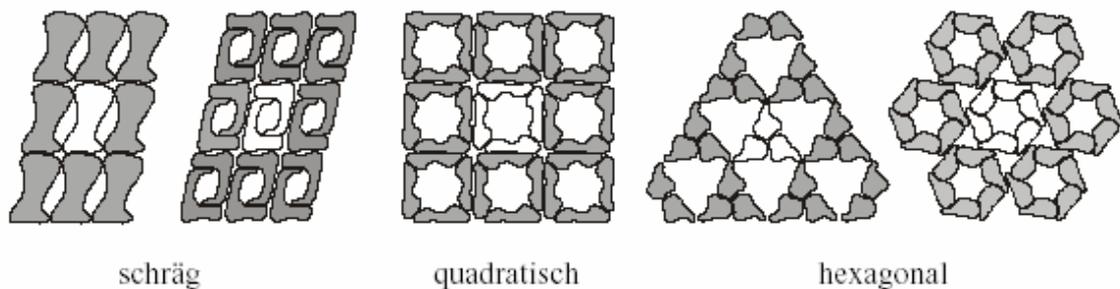


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der drei Grundtypen von *S-Layer*-Schichten (GRÄNTZDÖRFFER 2000). Jeweils eine Gittergrundeinheit ist hervorgehoben.

Auch eine stromableitende Funktion der *S-Layer* wird postuliert (GRÄNTZDÖRFFER 2000). Der Strom erreicht die Cytoplasmamembran nicht oder nur abgeschwächt, wodurch sich auch die nötigen sehr hohen Feldstärken für eine ATP-Freisetzung bei den durchgeführten Elektropermeabilitätsmessungen für *C. sticklandii* und auch *E. acidaminophilum* erklären ließen (s. 3.7.3). *E. acidaminophilum* weist eine hexagonale *S-Layer* auf (GRÄNTZDÖRFFER 2000), und auch der verwandte Organismus *Clostridium litorale* besitzt eine *S-Layer* (FENDRICH et al. 1990). Bei Elektroporationsexperimenten mit dem Gram-negativen *Caulobacter crescentus* konnten mit einer *S-Layer*-defizienten Mutante 10fach gesteigerte Transformationseffizienzen im Vergleich zum Wildtyp erreicht werden (GILCHRIST & SMIT 1991). Dies unterstützt die Hypothese, dass die *S-Layer* einen inhibierenden Einfluss auf die Transformation besitzt. Eine erfolgreiche Transformation wäre daher mit einer *S-Layer*-defizienten Mutante denkbar. Bei dem nah verwandten Organismus *E. acidaminophilum* wurde daher für die Herstellung einer *S-Layer*-

defizienten Mutante mit der Klonierung und Sequenzierung des entsprechenden Gens begonnen (GRÄNTZDÖRFFER 2000; TALKE 2001).

Die Protoplasten-Transformation oder die Konjugation stellen weitere Möglichkeiten zum DNA-Transfer in dar. Es wurden Versuche mit *C. sticklandii* durchgeführt, um eine Protoplasten-Transformation zu etablieren. Hierbei sollten die durch verschiedene Methoden erzeugten Protoplasten elektroporiert und somit die DNA übertragen werden. Insbesondere für Organismen mit *S-Layer* ist diese Methode geeignet. Sowohl *Bacillus brevis* 47 als auch *Clostridium thermohydrosulfuricum* konnten durch die PEG-vermittelte Protoplastenerzeugung mit Plasmid-DNA transformiert werden (TAKAHASHI et al. 1983; SOUTSCHEK-BAUER et al. 1985). Beide Stämme besitzen *S-Layer* (YAMADA et al. 1981; MESSNER & SLEYTR 1992). Verschiedene Archeae, welche meist eine *S-Layer* anstatt einer Zellwand besitzen, konnten erfolgreich durch Herstellung von Protoplasten transformiert werden (SOWERS & SCHREIER 1999). *S-Layer* lassen sich durch Waschen der Zellen mit 20 mM Tris/HCl pH 7,8 ablösen, des Weiteren können Protoplasten durch die Einwirkung von Lysozym und durch Waschen der Zellen mit Saccharose- oder Glycerin-haltigen Puffer erzeugt werden (Tabelle 3.7). Leider konnten jedoch auch mit *C. sticklandii*-Protoplasten, bei denen die *S-Layer* mit verschiedenen Methoden entfernt wurden, keine positiven Transformanten erhalten werden.

In Organismen, wie *C. difficile* und *C. botulinum*, die ebenfalls *S-Layer* aufweisen, konnte DNA mittels Konjugation übertragen werden (MULLANY et al. 1994; LIN & JOHNSON 1991). In Konjugationsexperimenten mit *E. acidaminophilum* wurde das streptokokkale konjugative Transposon Tn916 verwendet. Transkonjuganten konnten weder für eine Übertragung von einem Gram-negativen Donor auf einen Gram-positiven Rezipienten noch bei einem Transfer zwischen zwei Gram-positiven Organismen erhalten werden (GRÄNTZDÖRFFER 2000).

Für die Konjugationsexperimente mit *C. sticklandii* wurde das konjugative Shuttle-Plasmid pMTL9301 verwendet, mit dem sehr gute Transfereffizienzen in *C. difficile* erzielt wurden. pMTL9301 besitzt ein pCD6-Replikon (*C. difficile*-*origin*), den Initiationspunkt des Transfers *oriT* sowie eine Erythromycin- und Chloramphenicol-Resistenzdeterminante (PURDY et al. 2002). Mit einem pCD6-basierten Plasmid konnte erstmals ein autonom replizierendes Plasmid auf *C. difficile* von dem Donor *E. coli* durch die *oriT*-initiierte Mobilisation übertragen werden. Das pCD6-Replikon wurde von dem ursprünglichen Plasmid, pCD6, aus *C. difficile* isoliert und codiert für ein großes Replikationsprotein (Rep A) und für eine repetitive Region von 35 bp. Der erfolgreiche Transfer wurde des Weiteren durch die Umgehung des wirtseigenen Restriktions-/Methylierungs-Systems erreicht. Daher wurde eine Konjugation zwischen dem konjugativen Stamm *E. coli* CA434 und *C. sticklandii* vorgenommen. Der Donorstamm *E. coli* CA434 (R702, pMTL9301) trägt das konjugative Plasmid R702, wobei durch R702 die für die Konjugation nötigen Transferfunktionen mobilisiert werden (HEDGES & JAKOB 1974). Bisher konnten keine Transkonjuganten erhalten werden. Möglicherweise könnten die *S-Layer* auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Effizienz einer Konjugation besitzen. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein *C. sticklandii*-

eigenes Restriktions-/Methylierungs-System, wie es bei *C. difficile* oder *E. acidaminophilum* vorkommt, einen erfolgreichen Transfer verhindert.

Mit Hilfe der Konjugation könnten gezielt Gene „ausgeknockt“ werden, indem in das besagte Gen eine Resistenzdeterminante über heterologe Rekombination eingefügt wird. Nach erfolgreicher Konjugation erhalten die Mutanten dann eine Resistenz in dem gewünschten Gen. Auch könnte mit der gleichen Methode ein induzierbarer Promotor vor das entsprechende Gen kloniert werden. Das konjugierte Plasmid könnte ebenso als Vektor für Gene genutzt werden, um z. B. fremde oder eigene Proteine zu exprimieren. Jedoch sind diese Klonierungen wesentlich schwieriger zu gestalten als mit einem Shuttle-Vektor (NORGREN et al. 1989; NATARAJAN & ORIEL 1991). Somit könnten Funktionen unbekannter Gene geklärt bzw. Funktionen und Eigenschaften bekannter Proteine weiter untersucht werden.

4.8 Ausblick

Zunächst wäre zu klären, welche Proteine am Elektronentransfer zur NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase beteiligt sind. Die Messungen der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität mit PrdC als Elektronentransfer-Protein sollten mit homogen gereinigtem PrdC oder mit PrdC und weiteren elektronentransferierenden Proteinen, die zusammen vorher aus *C. sticklandii* angereichert werden können, wiederholt werden. Bei der Anreicherung könnte verfolgt werden, welche interessanten Enzymsysteme die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität stimulierend beeinflussen.

Mit den angereicherten Elektronentransferproteinen könnten biophysikalisch-chemische Untersuchungen wie EPR- und Mössbauerspektroskopie durchgeführt werden und Redoxzentren der Proteine nachgewiesen sowie Einblicke in den intramolekularen Elektronentransport erhalten werden.

Für die Untersuchungen des Proproteins GrdE des Protein B-Komplexes der Glycin-Reduktase und des Proproteins PrdA der D-Prolin-Reduktase aus *C. sticklandii* wäre ein System sinnvoll, mit dem die Proteine in ihrer nativen Konformation exprimiert werden könnten. Weitere Spaltungsuntersuchungen, z. B. ohne NaBH₄, sollten nur mit dem richtig gefalteten GrdE- und PrdA-Proprotein unternommen werden, um mehr Rückschlüsse auf die Prozessierung *in vivo* ziehen zu können. Mit nativen GrdE könnte auch der Verbleib des Cys²⁴² nach der *in vitro* Spaltung des GrdE-Proproteins mit NaBH₄ untersucht werden.

Die GrdE-Mutanten sollten ebenfalls möglichst in nativer Konformation dargestellt werden, um ihre Konformation mit der des Wildtyps vergleichen zu können. Mit deren Spaltverhalten sollten noch mehr Rückschlüsse auf die Rolle des Cys²⁴² und weiterer hoch konservierter Aminosäuren im Bereich der Spaltstellen gezogen und somit auch Rückschlüsse auf den Spaltmechanismus abgeleitet werden. Zur Überprüfung der Konformation böten sich CD-Spektren an. Mit einer optimierten Spaltung der Mutanten könnten noch bessere Vergleiche zu den Pyruvyl-haltigen Decarboxylasen gezogen werden. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob die Spaltung der Proproteine GrdE und

und PrdA *in vivo* bzw. *in vitro* autokatalytisch oder durch Zusatz "aktivierender Faktoren" verläuft.

Nach bisher erfolglosen Untersuchungen zur Regulation der D-Prolin-Reduktase sollten zum einen Expressionsstudien unter Anwendung von z. B. semi-quantitativer RT-PCR klären, unter welchen Wachstumsbedingungen die D-Prolin-Reduktase exprimiert bzw. aktiv exprimiert wird. Transkriptionsfusionen mit dem potentiellen Regulator PrdR und dem potentiellen Repressor PrdX der D-Prolin-Reduktase sollten in einem *C. sticklandii*-verwandten System untersucht werden.

Schließlich sollten mit Vorrang die Experimente zur Entwicklung eines Transformati-onssystems für *C. sticklandii* und auch für *C. difficile* vorangetrieben werden. Bereits jetzt wären die oben genannten Versuche auch in *C. sticklandii* denkbar. Die Manipulierbarkeit des Organismus wäre so z. B. für Untersuchungen zur Regulation der Genexpression, zur näheren Charakterisierung von komplexen nicht in *E. coli* exprimierbaren Proteinen durch Mutationsstudien oder auch einfach nur zur Überexpression dieser Proteine nötig.

5 Zusammenfassung

1. Es konnten 15 verschiedene GrdE-Protein-Mutanten hergestellt werden, bei denen konservierte Aminosäuren in der Umgebung der Spaltstelle ausgetauscht waren. Das Protein GrdE gehört zum Protein B-Komplex der Glycin-Reduktase aus *C. sticklandii*. Die Spaltung des GrdE-Proteins wird *in vitro* durch Cysteinolyse durch hohe NaBH₄-Konzentrationen herbeigeführt. Alle Mutanten mit Ausnahme der Cys²⁴⁶Ala-Mutante konnten *in vitro* mit NaBH₄ bei pH 7,6 gespalten werden. Die einfache Mutation der konservierten Aminosäuren Glu²³¹, Asp²³⁴, Gly²³⁵, Ile²³⁷, Ser²³⁹ und Lys²⁴⁸ hatte keinen Effekt auf die *in vitro* Spaltung. Doppelmutationen, z.B. an Asp²³⁴ und Ile²³⁷ bzw. Ile²³⁷ und Lys²⁴⁸ bewirkten eine Spaltung mit reduzierter Effizienz im Vergleich zum GrdE-Wildtyp.
2. Das zweite Cystein an Position 246 hat auch eine entscheidende Rolle bei der *in vitro* Spaltung von GrdE. Die Mutante Cys²⁴⁶Ala konnte *in vitro* mit 200 mM NaBH₄ nicht gespalten werden. Die Mutanten Asn²⁴¹Cys/Cys²⁴²Ala, Cys²⁴²Ala/Val²⁴³Cys, Ser²³⁹Cys/Cys²⁴⁶Ala und Ser²³⁹Cys/Cys²⁴²Ala zeigten verschiedene Spalteffizienzen. Mit größer werdendem Abstand beider Cysteine sank die Spalteffizienz. Daher sind im GrdE-Protein die Lage und der Abstand der zur *in vitro* Spaltung nötigen beiden Cysteine nicht unendlich variabel.
3. Das PrdA-Protein konnte erstmals in seiner Gesamtlänge von 68 kDa heterolog in *E. coli* als N-terminale *Strep*-tag II-Fusion exprimiert werden. Dies gelang nur bei gleichzeitiger Expression von PrdD bzw. PrdD und PrdE in Konstrukten mit den Transkriptionsfusionen *prdA_D* bzw. *prdA_DE*. Die Funktion der Proteine PrdD und PrdE ist bislang nicht bekannt. Die Koexpression von PrdD ist im heterologen Expressionssystem von *E. coli* essentiell, damit ein vollständiges PrdA-Protein gebildet werden kann. PrdD und PrdE konnten nur zusammen in einer Transkriptionsfusion von *prdDE* in *E. coli* exprimiert werden.
4. Mit verschiedenen großen Domänen vom PrdA- und GrdE-Protein wurden 6 PrdA-Fusionsproteine und 9 GrdE-Fusionsproteine generiert. Dabei wurde ein immer stärker eingegrenzter Bereich aus dem *prdA*- bzw. *grdE*-Gen herausgeschnitten und im gleichen Leseraster mit den Genen *malE* aus *E. coli* und *trxA* aus *C. sticklandii* fusioniert. Mit Hilfe des C-terminalen *Strep*-tag II wurden die verschiedenen Fusionsproteine an *StrepTactin*® gereinigt. In einigen Fällen schloss sich eine weitere Aufreinigung an MonoQ an.
5. Durch Vorliegen der PrdA- und GrdE-Spaltstelle (bei PrdA zwischen Thr⁴²⁵ und Cys⁴²⁶, bei GrdE zwischen Asn²⁴¹ und Cys²⁴²) innerhalb der PrdA- und GrdE-Proteindomänen konnten die erhaltenen Fusionsproteine hinsichtlich ihrer *in vitro* Spaltung mit 200 mM NaBH₄ analysiert werden. Die Analyse in der SDS-PAGE zeigte, dass die Fusionsproteine FuE, FuE8 und FuE7, deren GrdE-Fragment

bis zu 30 Aminosäuren umfasst, gut spaltbar waren. Die Spaltung von FuE6 und FuE5, deren GrdE-Fragment 21 bzw. 17 Aminosäuren umfasst, war nur noch mit stark reduzierten Raten möglich. Bei der Spaltung von FuE1-4, deren GrdE-Spaltdomäne nur 9-14 Aminosäuren umfasst, konnte nur eine sehr stark eingeschränkte spezifische Spaltung beobachtet werden. Innerhalb der Spaltdomänen lag die Spaltstelle immer relativ mittig. Kontrollen durch Proteinsequenzierung und Mutanten, bei denen die Cys²⁴²-Spaltstelle zum Alanin mutiert wurde, zeigten die spezifische Spaltung am Cys²⁴² von den Proteinen, deren Spaltprodukte auch im SDS-PAA-Gel eindeutig erkennbar waren. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den PrdA-Fusionsproteinen erzielt. Die PrdA-Spaltdomäne muss größer als 20 Aminosäuren sein, damit es zu einer effizienten Proproteinenspaltung kommen kann.

6. Stromaufwärts des *prdA*-Genes liegt im D-Prolin-Reduktase-Operon das Gen *prdC* welches eine elektronentransferierende Funktion übernehmen könnte (KABISCH et al. 1999, LIEBMANN 1999). PrdC konnte aus *C. sticklandii* durch drei säulenchromatographische Reinigungsschritte angereichert, jedoch nicht zur Homogenität gereinigt werden. Die Messungen zeigten eindeutig eine Steigerung der NADH-abhängigen D-Prolin-Reduktase-Aktivität bei Zugabe von PrdC. Essentiell für die Aktivität von PrdC als Elektronentransferprotein war die Zugabe von FMN. Die NADH-abhängige D-Prolin-Reduktase-Aktivität konnte bis zum 7,5fachen gesteigert werden. Dies belegt, dass PrdC eine elektronentransferierende Komponente der D-Prolin-Reduktase darstellt. Eine Fe²⁺-Zugabe hatte keinen Effekt auf die Aktivität.
7. Um Aussagen zur Regulation der D-Prolin-Reduktase treffen zu können, wurde die Transkription der stromaufwärts von *prdC* gelegenen Gene *prdX* und *prdR* untersucht. PrdR könnte bei Expression den potentiellen Aktivator und PrdX den möglichen Repressor der D-Prolin-Reduktase darstellen. Mittels *primer extension*-Untersuchungen zur Transkription von *prdXR* wurden verschiedene Transkriptionsstartpunkte erhalten. Dabei konnten vor *prdX* sieben Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden, wobei vermutlich der 173 bp stromaufwärts von *prdX* gelegene Transkriptionsstart bevorzugt genutzt wird. Vor *prdR* konnte ebenfalls ein Transkriptionsstart identifiziert werden, der 111 bp stromaufwärts von *prdR* liegt. Bei RT-PCR-Untersuchungen der *prdXR*-Gene zeigte sich mit verschiedenen Primerkombinationen ebenfalls die Existenz mehrerer verschiedener *prdX*- und *prdR*-Transkripte.
8. Die Expression der *prdXR*-Gene erfolgte sowohl bei Anzucht von *C. sticklandii* in Minimalmedium mit der essentiellen Prolinkonzentration von 0,5 mM, in Minimalmedium mit 20 mM Prolin als auch bei Anzucht in Komplexmedium, da jeweils Transkripte durch RT-PCR nachgewiesen werden konnten. Dies deutet auf eine substratunabhängige Induktion der *prdXR*-Gene hin.
9. Die Transkription des D-Prolin-Reduktase-Operons beginnt an einem σ^{54} -abhängigen Promotor vor *prdC* (LIEBMANN 1999). Zur Untersuchung des Regula-

onsmechanismus des D-Prolin-Reduktase-Operons wurden Fusionen bestehend aus dem *prdR*-Gen mit der σ^{54} -abhängigen Promotorstruktur oder aus nur der σ^{54} -abhängige Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* mit dem *lacZ*-Gen generiert. Aussagen zu möglichen Regulationsmechanismen, abgeleitet von den gemessenen β -Galactosidase-Aktivitäten, können jedoch nicht getroffen werden. Es konnte eine starke Induktion der β -Galactosidase-Aktivität allein durch die σ^{54} -abhängige Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* hervorgerufen werden. Das Konstrukt aus *prdR* mit der σ^{54} -abhängigen Promotorstruktur stromaufwärts vor *prdC* und *lacZ* zeigte eine deutlich geringere β -Galactosidase-Aktivität. Aussagen zu Elementen, die eine Regulation bewirken, können somit nicht getroffen werden. D-, L- bzw. D/L-Prolin als möglicher Induktor hatte in diesem System keinen Einfluss.

10. Die Versuche zur Transformation von *C. sticklandii* durch Elektroporation oder Konjugation blieben erfolglos. Möglicherweise behindert die *surface layer* des Bakteriums eine Transformation durch Elektroporation oder auch den DNA-Transfer durch Konjugation. Ein weiteres Hindernis kann ein *C. sticklandii*-eigenes Restriktions-/Methylierungs-System sein. Nicht bekannt ist des Weiteren, ob die verwendeten Plasmide eine Resistenzdeterminante aufweisen, die in *C. sticklandii* exprimiert wird und funktioniert oder ob durch die Replikationsursprünge in *C. sticklandii* die autonome Replikation der Plasmide erreicht werden kann.

6 Literaturverzeichnis

ABRAHAM, L.J., ROOD, J.I., 1985. Molecular Analysis of Transferable Tetracycline Resistance Plasmids from *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 161: 636-640.

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

ALLEN, S.P., BLASCHEK, H.P., 1988. Electroporation-induced transformation of intact cells of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2322-2324.

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

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

ANDREESEN, J.R., 2004. Glycine reductase mechanism. Curr. Opin. Chem.Biol. 8: in press.

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

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

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

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

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (Hrsg.), 1994. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York.

BANNAM, T.L., ROOD, J.I., 1993. *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. Plasmid 229: 233-235.

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

BECKHOFFER, D., 1993. 5'-mRNA stabilizers. In: Control of messenger RNA stability. J. Belasco, Brawerman, G. (Hrsg). San Diego, California, Academic Press: 31-52.

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

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

BENNETT, E.M., EKSTROM, J.L., PEGG, A.E., EALICK, S.E., 2002. Monomeric S-adenosylmethionine decarboxylase from plants provides an alternative to putrescine stimulation. Biochemistry 41: 14509-14517.

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

BERTRAM, J., GASSEN, H.G., 1991. Gentechnische Methoden. Jena, Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag.

BEVERIDGE, T.J., GRAHAM, L.L., 1991. Surface layers of bacteria. Microbiol. Rev. 55: 684-705.

BIRNBOIM, C., DOLY, J., 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.

BLAKE, M.S., JOHNSTON, K.H., RUSSEL-JONES, G.J., GOTTSCHLICH, E.C., 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. Anal. Biochem. 136: 175-179.

BOORSTEIN, W.R., CRAIG, E.A., 1989. Primer extension analysis of RNA. Meth. Enzymol. 180: 247-369.

BOOT, H.J., POUWELS, P.H., 1996. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Mol. Microbiol.* 21: 1117-1123.

BÖHRINGER, M., 1997. Vektor-Konstruktion, Untersuchung von Antibiotika-Resistenzen und Elektrotransformation von *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Diplomarbeit, Universität Ulm.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochem. J.* 214: 687-694.

BRANNINGAN, J.A., DODSEN, G., DUGGLEBY, H. J., MOODY, P.C.E., SMITH, J.L., TOMCHIK, D.R., MURZIN, A.G., 1995. A protein catalytic framework with N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378: 416-419.

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.

BUCK, M., GALLEGOS, M.-T., STUDHOLME, D.J., GUO, Y., GRALLA, J.D., 2000. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. *J. Bacteriol.* 182: 4129-4136.

BUCKEL, W., 1990. Amino acid fermentations: Coenzyme B12-dependent and -independent pathways. In: *The molecular basis of bacterial metabolism*. G. Hauska, Thauer, R. (Hrsg.), Springer Verlag. 41: 22-30.

CHAE, HZ., KIM, I. H., KIM K., RHEE, S.G., 1993. Cloning, sequencing and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268: 16815-16821.

CHONG, S., SHAO, Y., PAULUS, H., BENNER, J., PERLER, F.B., XU, M.-Q., 1996. Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. *J. Biol. Chem.* 271: 22159-22168.

CHONG, S., WILLIAMS, K.S., WOTKOWITZ, C., XU, M.-Q., 1998. Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *J. Biol. Chem.* 273: 10567-10577.

CLYNE, T., KINCH, L.N., PHILLIPS, M.A., 2002. Putrescine activation of *Trypanosoma cruzi* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemistry* 41: 13207-13216.

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

DAI, S., SCHWENDTMAYER, C., SCHÜRMAN, P., RAMASWAMY, S., EKLUND, H., 2000. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science* 287: 655-658.

DIETRICH, D., MEYER, M., RIETH, M., ANDREESSEN, J.R., 1991. Purification of the selenoprotein P_A by interaction with the thioredoxin system, all being components of the glycine reductase complex in *Eubacterium acidaminophilum* and *Clostridium litorale*. *J. Bacteriol.* 173: 5983-5991.

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

DOVE, S.L., DARST, S.A., HOCHSCHILD, A., 2003. Region 4 of σ as a target for transcription regulation. *Mol. Microbiol.* 48: 863-874.

DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16: 387-395.

DUGAICZYK, A., BOYER, H.W., GOODMAN, H.M., 1975. Ligation of *EcoRI* endonuclease generated DNA fragments into linear structures. *J. Mol. Biol.* 96: 171-184.

DÜRRE, P., 1993. The Clostridia and biotechnology. In: Transposons in clostridia. D. R. Woods (Hrsg.). Butterworth-Heinemann, Stoneham. MA, 227-246.

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

EKSTROM, J.L., TOLBERT, W.D., XIONG, H., PEGG, A.E., EALICK, S.E., 2001. Structure of a human S-adenosylmethionene decarboxylase self-processing ester intermediate and mechanism of putrescine stimulation of processing as revealed by the H243A mutant. *Biochemistry* 40: 9495-9504.

EVANS, J.T.C., BENNER, J., XU, M.-Q., 1998. Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Science* 7: 2256-2264.

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

FIELD, L., SWEETMAN, B.J., 1969. Biologically oriented organic sulfur chemistry. I. Reactions of thiols with highly reactive carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* 34: 1799-1803.

- FRANKE, A.E., CLEWELL, D.B., 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of conjugal transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J. Bacteriol.* 145: 494-502.
- GALLHAGER, T., ROZWARSKI, D.A., ERNST S.R., HACKERT, M.L., 1993. Refined structure of the pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase from *Lactobacillus 30a*. *J. Mol. Biol.* 230: 516-528.
- GENTHER, B.R.S., DAVIS, C.L., BRYANT, C.L., 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol and H₂/CO₂ utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 12-19.
- GILCHRIST, A., SMIT, J., 1991. Transformation of freshwater and marine caulobacters by electroporation. *J. Bacteriol.* 173: 921-925.
- GRANDERATH, K., 1993. Charakterisierung der Formiat-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase als wolframhaltige Enzyme von *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Universität Göttingen.
- GRÄFE, U., 1992. Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- GRÄNTZDÖRFFER, A., 1997. Molekularbiologische Analyse von Genen der Glycin-Reduktase und des Thioredoxin-Systems aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- GRÄNTZDÖRFFER, A., 2000. Formiat-Stoffwechsel in *Eubacterium acidaminophilum*: Molekulare und biochemische Charakterisierung der Wolfram- und Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen sowie einer Eisen-Hydrogenase. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle.
- GRÄNTZDÖRFFER, A, PICH, A, ANDREESEN, JR. 2001. Molecular analysis of the grd operon coding for genes of the glycine reductase and of the thioredoxin system from *Clostridium sticklandii*. *Arch. Microbiol.* 171: 1-18.
- GRÄNTZDÖRFFER, A., RAUH, D., PICH, A., ANDREESEN, J.R. (2003). Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Arch. Microbiol.* 179: 116-30.
- GREEN, E.M., BENNETT, G.N., 1998. Genetic Manipulation of Acid and Solvent Formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnol. and Bioengin.* 58: 215-221.
- GRYCZAN, T.J., HAHN, J., CONTENTE, S., DUBNAU, D., 1982. Replication and incompatibility properties of plasmid pE194 in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 152: 722-735.

- GURSINSKY, T., 2002. Selenoprotein-codierende mRNAs aus *Eubacterium acidaminophilum*: Erkennung durch den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB und Translation in *Escherichia coli*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle.
- HACKERT, M.L., MEADOR, W.E., OLIVER, R.M., SALMON, J.R., RESCEI, P.A., SNELL, E.E., 1981. Crystallization and Subunit Structure of Histidine-Decarboxylase from *Lactobacillus 30a*. J. Biol. Chem. 256: 687-690.
- HACKERT, M.L., PEGG, A.E., 1998. Pyruvoyl-dependent enzymes. In: Comprehensive Biological Catalysis. M.J. Sinnott (Hrsg.). New York, Academic Press: 201-216.
- HANAHAH, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- HARMS, C., 1995. Anaerober Kreatin-Stoffwechsel in *Tissierella creatinophila*: Anreicherung und Charakterisierung beteiligter Proteine, besonders von verschiedenen Komponenten der Sarkosin-Reduktase. Dissertation, Universität Göttingen.
- HARMS, C., LUDWIG, U., ANDREESEN, J.R., 1998. Sarcosine reductase of *Tisserella creatinophila*: purification and characterisation of its components. Arch. Microbiol. 170: 442-450.
- HARMS, C., MEYER, M.A., ANDREESEN, J.R., 1998. Fast purification of thioredoxin reductase and thioredoxins with unusual redox-active centre from anaerobic, amino-acid-utilizing bacteria. Microbiology 144: 793-800.
- HEDDERICH, R., KLIMMECK, O., KRÖGER, A., DIRMEIER, R., KELLER, M., STETTER, K. O., 1998. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. FEMS Microbiol. Rev. 22: 353-381.
- HERBERT, M., O'KEEFFE, T. A., PURDY, D., ELMORE M., MINTON, N.P., 2003. Gene transfer into *Clostridium difficile* CD630 and characterisation of its methylase genes. FEMS Microbiol. Lett. 229: 103-110.
- HIPPE, H., ANDREESEN, J.R., GOTTSCHALK, G., 1992. The genus *Clostridium*-nonmedical. In: The Prokaryotes, Second Edition. A. Balows, Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Hrsg.). New York, Springer Verlag: 1800-1866.
- HODGINS, D., ABELES, R.H., 1969. Studies of the mechanism of action of D-proline reductase: the presence on covalently bound pyruvate and its role in the catalytic process. Arch. Biochem. Biophys. 130: 274-285.
- HOLMGREN, A., BJÖRNSTEDT, M., 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods Enzymol. 252: 199-208.

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

HOROWITZ, J.P., CHUA, J., CURBY, R.J., THOMSON, A.J., DA ROOGE, M.A., FISCHER, B.E., MAURICO J., KLUNDT, I., 1964. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl-D glycopyranosides. J. Med. Chem. 7: 547-548.

HOUBEN-WEYL, 1991. Methoden der organischen Chemie. Stuttgart New York, Georg-Thieme Verlag.

HOYT, M.A., WILLIAMS-ABBOTT, L.J., PITKIN, J.W., DAVIS, R.H., 2000. Cloning and expression of the S-adenosylmethionine decarboxylase of *Neurospora crassa* and processing of its product. Mol. Gen. Genet. 263: 664-673.

HUNGATE, R.E., 1969. A role tube method for cultivation of strict anaerobes In: Methods in Microbiology, Band 3b. J.R. Norris, Ribbons, D.W. (Hrsg.). New York, London, Academic Press: 117-132.

JACOBSON, F.S., MORGAN, R.W., CHRISTMAN, M.F., AMES, B.N. 1989. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. J. Biol. Chem. 264: 1488-1496.

JOUANNEAU, Y., JEONG, H.-S., HUGO, N., MEYER, C., WILLISON, J.C., 1998. Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus* characterization of two membrane bound iron-sulfur protein. Eur. J. Biochem. 251: 54-64.

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 identification for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue for cleavage of a proprotein. J. Biol. Chem. 274: 8445-8454.

KIM, A.Y., BLASCHEK, H.P., 1989. Construction of an *Escherichia coli*-*Clostridium perfringens* shuttle vector and plasmid transformation of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 360-365.

KIM, A.D., GRAHAM, D.E., SEEHOLZER, S.H., MARKHAM, G.D., 2000. S-Adenosylmethionine Decarboxylase from the Archeon *Methanococcus jannaschii*: Identification of a Novel Family of Pyruvoyl Enzymes. J. Bacteriol. 182: 6667-6672.

KOHLSTOCK, U.M., RUCKNAGEL, K.P., REUTER, M., SCHIERHORN, A., ANDREESEN, J.R., SOHLING, B. 2001. Cys359 of GrdD is the active-site thiol that catalyses the final step of acetyl phosphate formation by glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Eur. J. Biochem. 268: 6417-6425.

- KREIMER, S., SÖHLING, B., ANDREESEN, J.R., 1997. Two closely linked genes encoding thioredoxin and thioredoxin reductase in *Clostridium litorale*. Arch. Microbiol. 268: 328-337.
- KUMAGAI, H., FUJIWARA, T., MATSUBARA, H., SAEKI, K., 1997. Membrane localisation, topology, and mutual stabilisation of *rnfABC* gene products in *Rhodobacter capsulatus* and implications for a new family of energy-coupling NADH oxidoreductases. Biochemistry 36: 5509-5521.
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A.M., ALLONI, G., AZEVEDO, V., BERTERO, M.G., BESSIERES, P., BOLOTIN, A., BORCHERT, S., BORRIS, R., BOURSIER, L., BRANS, A., BRAUN, M., BRIGNELL, S.C., BRON, S., BROUILLET, S., BRUSCHI, C.V., CALDWELL, B., CAPUANO, V., CARTER, N.M., CHOI, S.K., CODANI, J.J., CONNERTON, I.F., DANCHIN, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390: 249-256.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LEBLANC, D.J., LEE, L.N., 1984. Physical and genetic analyses of the streptococcal plasmid pAMB1 and cloning of its replication region. J. Bacteriol. 157: 445-453.
- LEE, S.Y., BENNETT, G.N., PAPOUTSAKIS, E.T., 1992. Construction of *Escherichia coli*-*Clostridium acetobutylicum* shuttle vectors and transformation of *Clostridium acetobutylicum* strains. Biotechnol. Lett. 14: 427-432.
- LI, Q.-X., DOWHAN, W., 1990. Studies on the mechanism of formation of the pyruvate prosthetic group of phosphatidylserine decarboxylase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265: 4111-4115.
- LI, Y.-F., HESS, S., PANNELL, L.K., TABOR, C.W., TABOR, H., 2001. *In vivo* mechanism-based inactivation of S-adenosylmethionine decarboxylase from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10578-10583.
- 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.
- LIEBMANN, B., 1999. Molekularbiologische Analyse von Genen der D-Prolin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- LIN, W.-J., JOHNSON, E.A., 1991. Transposon Tn916 mutagenesis in *Clostridium botulinum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2946-2950.

- LÜBBERS, M., ANDREESEN, J.R., 1993. Components of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*: Cloning, sequencing and identification of genes for thioredoxin-reductase, thioredoxin and selenoprotein P_A. *Microbiology* 144: 793-800.
- MAHLER, I., HALVORSON, H.O., 1980. Two erythromycin-resistance plasmids of diverse origin and their effect on sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 259-263.
- MANDER, G.J., DUIN, E.C., LINDNER, D., STETTER, K.O., HEDDERICH, R., 2002. Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* 269: 1895-1904.
- MARKHAM, G.D., TABOR, C.W., TABOR, H., 1982. S-Adenosylmethionine decarboxylase of *Escherichia coli*: studies on the covalently linked pyruvate required for activity. *J. Biol. Chem.* 257: 12063-12068.
- MERMELSTEIN, L.D., WELKER, N.E., BENNETT, G.N., PAPOUTSAKIS, E.T., 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* 10: 190-195.
- MEYER, M., 1993. Beziehungen des Thioredoxin-Systems zur Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase in anaeroben, Aminosäure verwertenden Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen.
- MEYER, M., GRANDERATH, K., ANDREESEN, J.R., 1995. Purification and characterization of protein P_B of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 234: 184-191.
- MILLER, J. H., 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- MONOD, M., DENOYA, C., DUBNAU, D., 1986. Sequence and Properties of pIM13, a Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Plasmid from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 167: 138-147.
- MORETT, E., SEGOVIA, L., 1993. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* 175: 6067-6074.
- MULLANY, P., WILKS, M., PUCKEY, L., TABAQCHALI, S., 1994. Gene cloning in *Clostridium difficile* using Tn916 as a shuttle conjugative transposon. *Plasmid* 31: 320-323.

- NAKOTTE, S., SCHAFFER, S., BÖHRINGER, M., DÜRRE, P., 1988. Electroporation of, plasmid isolation from and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 564-567.
- NATARAJAN, M.R., ORIEL, P., 1991. Conjugal transfer of recombinant transposon Tn916 from *Escherichia coli* to *Bacillus stearothermophilus*. Plasmid 26: 67-73.
- NDJONKA, D., DA'DARA, A., WALTER, R.D., LÜERSEN, K., 2003. *Caenorhabditis elegans* S-adenosylmethionine decarboxylase is highly stimulated by putrescine but exhibits low specificity for activator binding. Biol. Chem. 384: 83-91.
- NOREN, C.J., WANG, J., PERLER, F.B., 2000. Protein-Spleißen: Mechanismus und Anwendungen. Angew. Chem. 112: 458-476.
- NORGEN, M., CAPARON, M.G., SCOTT, J.R., 1989. A method for allelic replacement that uses the conjugative transposon Tn916: deletion of the emm6.1 allele in *Streptococcus pyogenes* JRS4. Infect. Immun. 57: 3846-3850.
- O'BRIEN, R.W., MORRIS, J.G., 1971. The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*. J. Gen. Microbiol. 67: 265-271.
- OULTRAM, J.D., LOUGHLIN, M., SWINFELD, T.-J., BREHM, J.K., THOMPSON, D.E., MINTON, N.P., 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 56: 83-88.
- PARKS, E.H., ERNST, S.R., HAMLIN, R., XUONG, N.H., HACKERT, M.L., 1985. Structure determination of histidine decarboxylase from *Lactobacillus 30a* at 3.0 Å resolution. J. Mol. Biol. 182: 455-465.
- PERLER, F.B., XU, M.Q., PAULUS, H., 1997. Protein splicing and autoproteolysis mechanisms. Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 292-299.
- PERLER, F.B., 1998. Breaking up is easy with esters. Nat. Struct. Biol. 5: 249-252.
- PIETROWSKI, S., 1998. Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains. Protein Science 7: 64-71.
- PURDY, D., O'KEEFFE, T.A.T., ELMORE, M., HERBERT, M., MCLEOD, A., BOKORIBROWN, M., OSTROWSKI, A., MINTON, N.P. 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. Mol. Microbiol. 46: 439-452.
- RAMJEE, M.J., GENSCHEL, U., ABELL, C., SMITH, A.G., 1997. *Escherichia coli* L-aspartate-decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry. Biochem. J. 323: 661-669.

- RESCEI, P.A., HUYNH, Q.K., SNELL, E.E., 1983. Conversion of prohistidine decarboxylase to histidine decarboxylase: peptide chain cleavage by nonhydrolytic serinolysis. *Biochemistry* 80: 973-977.
- RESCEI, P.A., SNELL, E.E., 1984. Pyruvoyl enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 357-387.
- ROBERTS, I., HOLMES, W.M., HYLEMON, P.B., 1988. Development of a New Shuttle Plasmid System for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*: 268-270.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- SANGER, F., NICKLER, S., COULSEN, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SÅRA, M., SLEYTR, U.B., 2000. S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* 182: 859-868.
- SCHMEHL, M., JAHN, A., MEYER ZU VILSENDORF, A., HENNECKE, S., MASEPOHL, B., SCHUPPLER, M., MARXER, M., OELZE, J., KLIPP, W., 1993. Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*; a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Mol. Gen. Genet.* 241: 602-615.
- SCHNAPPINGER, D., HILLEN, W., 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 165: 359-369.
- SCHRÄDER, T., ANDREESEN, J.R., 1992. Purification and characterisation of protein PC, a component of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 206: 79-85.
- SCHWARTZ, A.C., MÜLLER, W., 1979. NADH-dependent reduction of D-proline reductase in *Clostridium sticklandii*. Reconstitution from three fractions containing NADH-Dehydrogenase, D-proline reductase, and a third protein factor. *Arch. Microbiol.* 123: 203-208.
- SEEMÜLLER, E., LUPAS, A., BAUMEISTER, W., 1996. Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* 382: 468-470.
- SEKOWSKA, A., COPPEE, J.-Y., LE CAER, J.-P., MARTIN-VERSTRAETE, I., DANCHIN, A., 2000. S-adenosylmethionine decarboxylase of *Bacillus subtilis* is closely related to archaeobacterial counterparts. *Mol. Microbiol.* 3: 1135-1147.
- SESHADRI, R., MYERS, G.S., TETTELIN, H., EISEN, J.A., HEIDELBERG, J.F., DODSON, R.J., DAVIDSEN, T.M., DEBOY, R.T., FOUTS, D.E., HAFT, D.H., SELENGUT, J., REN, Q., BRINKAC, L.M., MADUPU, R., KOLONAY, J.F., DURKIN, A.S., DAUGHERTY, S.C., SHETTY, J., SHVARTSBEYN, A., GEBREGEORGIS, E., GEER, K., TSEGAYE, G., MALEK, J.A.,

AYODEJI, B., SHATSMAN, S., MCLEOD, M.P., MAJS, D., HOWELL, J.K., PAL, S., AMIN, A., VASHISTH, P., MCNEILL, T.Z., WEINSTOCK, G.M., NORRIS, S.J., FRASER, C.M., PAULSEN, I.T., Submitted (29-JAN-2004). Comparison of the genome of the oral pathogen, *Treponema denticola*, with other spirochete genomes.

SETO, B., STADTMAN, T.C., 1976. Purification and properties of proline reductase from *Clostridium sticklandii*. J. Biol. Chem. 251: 2435-2439.

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

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

SETO, B., 1980a. The Stickland reaction. In: Diversity of bacterial respiratory systems. C.J. Knowles (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton. Vol. II: 49-64.

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

SHAO, Y., XU, M.-Q., PAULUS, H., 1996. Protein splicing: evidence for an N-O acyl-rearrangement as the initial step in the splicing process. Biochemistry 35: 3810-3815.

SHAO, Y., PAULUS, H., 1997. Protein splicing: estimation of the rate of N-O and N-S acyl rearrangements, the last step of the splicing process. J. Peptide Res. 50: 193-198.

SHIVAKUMA, A.G., DUBNAU, D., 1981. Characterisation of a plasmid-specified methylase associated with macrolide resistance. Nucl. Acids Res. 9: 2549-2562.

SLEYTR, U.B., MESSNER, P., 1988. Crystalline surface layers in procaryotes. J. Bacteriol. 170: 2891-2897.

SLEYTR, U.B., BEVERIDGE, T.J., 1999. Bacterial S-layers. Trends Microbiol. 7: 253-260.

SLOAN, J., WARNER, T.A., SCOTT, P.T., BANNAM, T.L., BERRYMAN, D.I., ROOD, J.I., 1992. Construction of a sequenced *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle plasmid. Plasmid 27: 207-219.

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

SOUTSCHEK-BAUER, E., HARTL, L., STAUDENBAUER, W.L., 1985. Transformation of *Clostridium thermohydrosulfuricum* DSM 568 with plasmid DNA. Biotechnol. Lett. 7: 705-710.

SOWERS, K.R., SCHREIER, H.J., 1999. Gene transfer systems for the Archaea. *Trends Microbiol.* 7: 212-219.

STADTMAN, T.C., MCCLUNG, L.S., 1957. *Clostridium sticklandii* nov. spec. *J. Bacteriol.* 73: 218-219.

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

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

STADTMAN, T.C., 1989. Clostridial glycine reductase: Protein C, the acetyl group acceptor, catalyses the arsenate-dependent decomposition of acetyl phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7853-7856.

STADTMAN, T.C., DAVIS, J.N., 1991. Glycine Reductase Protein C. Properties and characterization of its role in the reductive cleavage of Se-carboxymethyl-selenoprotein A. *J. Biol. Chem.* 266: 22147-22153.

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

STRÄTZ, M., 1991. Nachweis eines natürlichen DNA-Transfers zwischen Grampositiven und Gramnegativen Mikroorganismen und Etablierung eines DNA-Transfer-Systems für *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Universität Göttingen.

SWINFIELD, T.-J., OULTRAM, J.D., THOMPSON, D.E., BREHM, J.K., MINTON, N.P., 1990. Physical characterization of the replication region of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAMB1. *Gene* 87: 79-90.

TABOR, C.W., TABOR, H., 1987. The *speEspeD* Operon of *Escherichia coli*: formation and processing of a proenzyme form of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 262: 16037-16040.

TALKE, A., 2001. Surface-layer Proteine von *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.

TAKAHASHI, W., YAMAGATA, H., YAMAGUCHI, K., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S., 1983. Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a protein-secreting bacterium, by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 156: 1130-1134.

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

TARDIF, C., HAAMAR, H., BALFIN, M., BELAICH, J.P., 2001. Electrotransformation studies in *Clostridium cellulolyticum*. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.* 26: 1-4.

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

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.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Envir. Microbiol.* 49: 294-298.

TRIEU-CUOT, P., ARTHUR, M., COURVALIN, P., 1987. Transfer of genetic information between Gram-positive and Gram-negative bacteria under natural conditions. In: *Streptococcal Genetics*. J.J. Ferretti, Curtis, C. (Hrsg.). Washington DC, USA, American Society of Microbiology: 65-68.

TYRIN, M., PADDA, R., HUANG, K.-X., WARDWELL, S., CAPRETTE, D., BENNETT, G.N., 2000. Electrotransformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using high-voltage radio frequency modulated square pulses. *J. Appl. Microbiol.* 88: 220-227.

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

VAN POELJE, P.D., 1988. Kinetics and mechanism of activation of prohistidine decarboxylase. Austin, Univ. Texas, Austin.

VAN POELJE, P.D., SNELL, E.E., 1990. Pyruvoyl-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 29-59.

VANDERSLICSE, P., COPELAND, W.C., ROBERTUS, J.D., 1988. Site-directed alteration of serine 82 causes nonproduktive chain cleavage in prohistidine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 263: 10583-10586.

VENUGOPALAN, V. (1980). Influence of growth conditions on glycine reductase of *Clostridium sporogenes*. *J. Bacteriol.* 141: 386-388.

VEZZI, A., CAMPANARO, S., D'ANGELO, M., SIMONATO, F., VITULO, N., LAURO, F., CESTARO, A., MALACRIDA, G., SIMIONATI, B., CANNATA, N., BARTLETT, D., VALLE, G.,

Submitted (22-MAR-2004). Genome Analysis of *Photobacterium profundum* reveals the complexity of high pressure adaptations.

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

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

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

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

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

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.

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

WÖSTEN, M.M.S.M., 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 127-150.

XIONG, H., STANLEY, B.A., TEKWANI, B.L., PEGG, A.E., 1997. Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *J. Biol. Chem.* 272: 28342-28348.

XIONG, H., STANLEY, B.A., PEGG, A.E., 1999. Role of cysteine-82 in the catalytic mechanism of human S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemistry* 38: 2462-2470.

XU, M.-Q., PERLER, F.B., 1996. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *The EMBO J.* 15: 5146-5153.

YAMADA, H., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S., 1981. Morphological alterations of cell wall concomitant with protein release in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* 148: 322-332.

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.

YASUKAWA, T., KANEI-ISHII, C., MAEKAWA, T., FUJIMOTO, J., YAMAMOTO, T., ISHII, S., 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 270: 25328-31.

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

ZHANG, X., CHANEY, M., WIGNESSHWREERARAJ, S.R., SCHUMACHER, J., BORDES, P., CANNON, W., BUCK, M., 2002. Mechanochemical ATPases transcriptional activation. *Mol. Microbiol.* 45: 895-903.

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

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

Anhang

Tabelle A.1: Primer für PCR

Primer	Orientierung ^a	Sequenz 5'→3'	Position ^b
1. Mutationsprimer^c			
mEE231Lf	→	ATCTATCCAACA CTT GTAATGGATGGAGC	<i>grdE</i> 3567
mEE231Lr	←	TCCATCCATTAC AAG TGTTGGATAG	<i>grdE</i> 3594
mED234Af	→	ACAGAAGTAAT GCT GGAGCAATATTATC	<i>grdE</i> 3576
mED234Ar	←	TAATATTGCTCC TGC CATTACTTCTGTTG	<i>grdE</i> 3603
mEG235Ff	→	GAAGTAATGGAT TTT GCAATATTATCAGG	<i>grdE</i> 3579
mEG235Fr	←	TGATAATATTGC AAA ATCCATTACTTCTG	<i>grdE</i> 3606
mEI237Kf	→	ATGGATGGAGCA AAA TTATCAGGAAAC	<i>grdE</i> 3585
mEI237Kr	←	GTTTCCTGATA TTT TGCTCCATCCATTAC	<i>grdE</i> 3612
mEK248Lf	→	TCTGCTTG TGAC CTT AACCCAACATAC	<i>grdE</i> 3618
mEK248Lr	←	GTATGTTGGGTT AAG GCACAAGCAG	<i>grdE</i> 3645
mEC246Af	→	TGCGTATCTGCT GCT GACAAAAACCCAAC	<i>grdE</i> 3615
mEC246Ar	←	TGGGTTTTTGT AGC AGCAGATACGCAG	<i>grdE</i> 3642
mEC242A/V243Cf	→	TTATCAGGAAAC GCTTGC TCTGCTTGTGAC	<i>grdE</i> 3600
mEC242A/V243Cr	←	GTCACAAGCAGAG GCAAGC GTTTCCTGATAATATTGC	<i>grdE</i> 3630
mEV243Cf	→	TTATCAGGAAACTG TGC TCTGCTTGTGAC	<i>grdE</i> 3600
mEV243Cr	←	GTCACAAGCAGAG GCA GCAGTTTCCTGATAATATTGC	<i>grdE</i> 3630
mEC242A/N241Cf	→	ATATTATCAGGAT TGCGCT GTATCTGCTTGTG	<i>grdE</i> 3597
mEC242A/N241Cr	←	ACAAGCAGATAC AGCGCA TCCTGATAATATTGC	<i>grdE</i> 3627
mEN241Cf	→	ATATTATCAGGAT TGC TGCGTATCTGCTTGTG	<i>grdE</i> 3597
mEN241Cr	←	ACAAGCAGATACG CA TCCTGATAATATTGC	<i>grdE</i> 3627
mES439Cf	→	GGAGCAATATTAT TGCG GAAACTGCGTATC	<i>grdE</i> 3591
mES439Cr	←	TACGCAGTTTCC GCA TAATATTGCTCC	<i>grdE</i> 3619
mES239C/C242Af	→	ATATTAT TGCG GAAAC GCT GTATCTTGTGAC	<i>grdE</i> 3597
mES239C/C242Ar	←	GTCACAAGATAC AGC GTTTCC GCA TAATATTGC	<i>grdE</i> 3627
mgES239CfC242A	→	GATGGAGCAATATTAT TGCG GAAACGCTG	<i>grdE</i> 3588
mgES239CrC242A	←	TACAGCGTTTCC GCA TAATATTGCTCCATC	<i>grdE</i> 3618
mAS431Cf	→	ATAGGACCTGCAT TGT AAAAGAGAACTCTAG	<i>prdA</i> 10992
mAS431Cr	←	AGAGTTCTCTTT ACA TGCAGGTCCTATAC	<i>prdA</i> 11019
2. Primer für die Expression von GrdEAB und PrdABDE^{c,d}			
gES5f	←	ATGAGGGGTC TCT CGCCATGCGTTTAGAAATTGGA AAT	<i>grdE</i> 2889
gBS5r	→	TAAGATGGT TCT CATATCAGTCTTCAAAAAGTGGT GTC	<i>grdB</i> 6044
gEBamHI f	→	TTAGGAGGGGAT CCC ATGCGTCTTGAAGTTG	<i>grdE</i> 2889
gEXhoI r	←	TTAAATTTCTCGAGTTAATAAGTTTTTGTCTG	<i>grdE</i> 4181

Fortsetzung Tabelle A1			
Primer	Orientierung^a	Sequenz 5'→3'	Position^b
gBXhoIRBSf	→	AATTAATTCTCGAGATAACGAGGGCAAAAAATGG GAAAAG	<i>grdB</i> 4727
gBSalIr	→	CAAATTTAGTCGACTTAGTCTTCAAAAACTG	<i>grdB</i> 6047
mgBU/Cf	→	TTAACATCTACC TGT GGTACTTGTACTCG	<i>grdB</i> 5772
mgBU/Cr	→	AGTACAAGTACC ACA GGTAGATGTTAAG	<i>grdB</i> 5771
pABamHI f	→	AAGGAGGAGGATCCCATGTCAATAACTTTAG	<i>prdA</i> 9715
pAXhoIr	←	TTTAAAAGCTCGAGTTATTTATCTGCCTCATAG	<i>prdA</i> 11606
pBXhoIRBSf	→	AATTAATTCTCGAGATAACGAGGGCAAAAAATGTCT GATTTGACTGTAG	<i>prdB</i> 11890
pBSalIr	←	AGAAATATGTCGACTTAAACCTTTGCTACGTACTCG	<i>prdB</i> 12618
pDESsalIRBSf	→	TTGTTTAGTTCGACATAACGAGGGCAAAAAATGCTG ACAAACGAAATTG	<i>prdD</i> 12683
pDEPstIr	←	TCCTTTAGCTGCGATCATCTTCTTGCTCCCTTC	<i>prdE</i> 13933
pBS5r	←	TAGAAAAGGCTCTCCTATCAAACGTTTGCTACGTACTC G	<i>prdB</i> 12615
pDES5r	←	TTCTTGGTCTCATATCATCTTCTTGCTCCCTTCAT TTTTAG	<i>prdE</i> 13930
mpBU/Cf	→	CTAACAGCTGGC TGC GGTACCTGCCATCG	<i>prdB</i> 12331
mpBU/Cr	←	ATGGCAGGTACC GCA GCCAGCTGTTAGAAG	<i>prdB</i> 12328
pD (E) S5f	→	AAAAATGGGTCTCAGCGCCATGCTGACAAACGAAATT GAT	<i>prdD</i> 12683
pDES3f	→	AAAAATGGGTCTCAAATGCTGACAAACGAAATTGATT TA	<i>prdD</i> 12683
pDS5r	←	TATCATGGTCTCTTATCAAGTCATAGCCCTAATAGC ACC	<i>prdD</i> 13444
pES3f	→	TAAAGAGGTCTCAAATGGGTGTAGGACCATCTACAA AA	<i>prdE</i> 13463
p (D) ES3r	←	TTCTTGGTCTCAGCGCTTCTTCTTGCTCCCTTCAT TTT	<i>prdE</i> 13930
3. Primer für Fusionsproteine^d			
malES3f	→	AGAAATGGTCTCAAATGACCGGAATTAAGTCAC	<i>malE</i>
malEPstIr	←	CCAAGCTTGCTGCGAGTCTGACTCTAG	<i>malE</i>
trxAPstIf	→	AGGAGGAACTGCAGATGTTTCGAACTTG	<i>trxA</i> 2546
trxAS3r	←	CCTAATGGTCTCAGCGCTAATGTATTTTTTTACCAT AG	<i>trxA</i> 2860
fuEBamHI f	→	TAGGAGGTGGATCCATGCGTCTTGAAG	<i>grdE</i> 2889
fuESalIr	←	ATATATATGTCGACATAAGTTTTTGCTGTCATCTTG	<i>grdE</i> 4178
fuE1/2/5f	→	GATGGAGGATCCTTATCAGGAACTGCGTATCTG	<i>grdE</i> 3602
fuE1/3r	←	TGGGTTGTCGACACAAGCAGATACGCAGTTTCC	<i>grdE</i> 3628
fuE2/4r	←	GTATGTGTCGACTTTGTCACAAGCAGATACGCAG	<i>grdE</i> 3634
fuE3/4/6f	→	ACAGAAGGATCCGATGGAGCAATATTATCAGG	<i>grdE</i> 3588

Fortsetzung Tabelle A1			
Primer	Orientierung^a	Sequenz 5'→3'	Position^b
fuE5/6r	←	TGGGTTGTCGACATGAACGTATGTTGCGTTTTTGTGTC	<i>grdE</i> 3650
fuE7f	→	CTACATTAGGATCCCCAACAGAAGTAATGG	<i>grdE</i> 3573
fuE7r	←	AAGTCATGGTTCGACTGGGTTGTTTCATATG	<i>grdE</i> 3664
fuE8f	→	CAGTAAAAGGATCCCCTAATCTTCCTAAGG	<i>grdE</i> 3452
fuE8r	←	ATTAGGTCGTCGACTGGGTTTCCAAATCC	<i>grdE</i> 3839
fuA1/3f	→	GATGGAGGATCCCATGCACCTTACTTGTATAGGAC	<i>prdA</i> 10977
prdA1/2r	←	CTCTTTGTCGACAGGTCCTATAACAAGTAAC	<i>prdA</i> 11000
fuA2/4f	→	CCTCTTGGATCCCCTTGATGGAGGAATCCATGC	<i>prdA</i> 10962
fuA3/4r	←	CTCTCTGTCGACATGTCTAGAGTTCTCTTTTG	<i>prdA</i> 11024
fuA5f	→	TAATAGGTGGATCCCCAACCGTTGACCTTGG	<i>prdA</i> 10911
fuA5r	←	ACTTCAATGTCGACAGGCTCTCTCCAGTAATG	<i>prdA</i> 11039
fuA6f	→	TCATGTGGGGATCCCCTGAAGCTCCTG	<i>prdA</i> 10611
fuA6r	←	GACATTCCGTCGACTGGAATTCCTCTCATAACC	<i>prdA</i> 11261
4. Primer für Regulationskonstrukte^d			
propXRSalIf	→	TAATTGATGTCGACGAATGCTTCGATTAGTGTC	<i>prd</i> 5711
ProXbarev	←	GCATCCATTCTAGATCTCCTTTATAGTTCAATA	<i>prd</i> 5816
pRNcoIf	→	TGGCGTCTAGAAATGTTTTTACCCAAACTAAAC	<i>prdR</i> 6345
s54SalIf	←	ATCAATACGTCGACCCCATATGTCAAAAAATTGAC	<i>prd</i> 8100
s54pXRBamHIr	→	TCCATCATGGATCCTCCTTCAACTTTGTTTGTTA	<i>prd</i> 8390
lacZBamHI f	←	CACAGGAAGGATCCATGACCATGATTACGGATTC	<i>lacZ</i>
lacZKpnIr	→	CTGCCCGGGTACCTTATTTTTGACACCAGACCAAC	<i>lacZ</i>
lacZAA29r	←	GCAAGGGGATTAAGTTGGG	<i>lacZ</i>
5. Primer extension			
FAM_pX5904	←	CTATTTTTTCCATTTCTTCTATTG	<i>prdX</i> 5904
FAM_pX5809	←	GCATCCATGTCATTCTCCTT	<i>prdX</i> 5809
FAM_pX5821	←	CATGGATGCAAAACAAGCAGT	<i>prdX</i> 5821
FAM_pX5875	←	CACTCTTATAGAACACGATCC	<i>prdX</i> 5875
FAM_pR6377	←	CAAGGAAATAATGTCAAAGGA	<i>prdR</i> 6377
PRD5403	→	TATGCTTGAAAGAGCTAGAGC	<i>prd</i> 5403
PRD5564	→	CAATTCGTTGTATTCTTTTG	<i>prd</i> 5564
PRD5639	→	TGGTATATCTAGCAAAGCTT	<i>prd</i> 5639

^a Die Primer sind in (→) bzw. entgegen (←) der Transkriptionsrichtung orientiert.

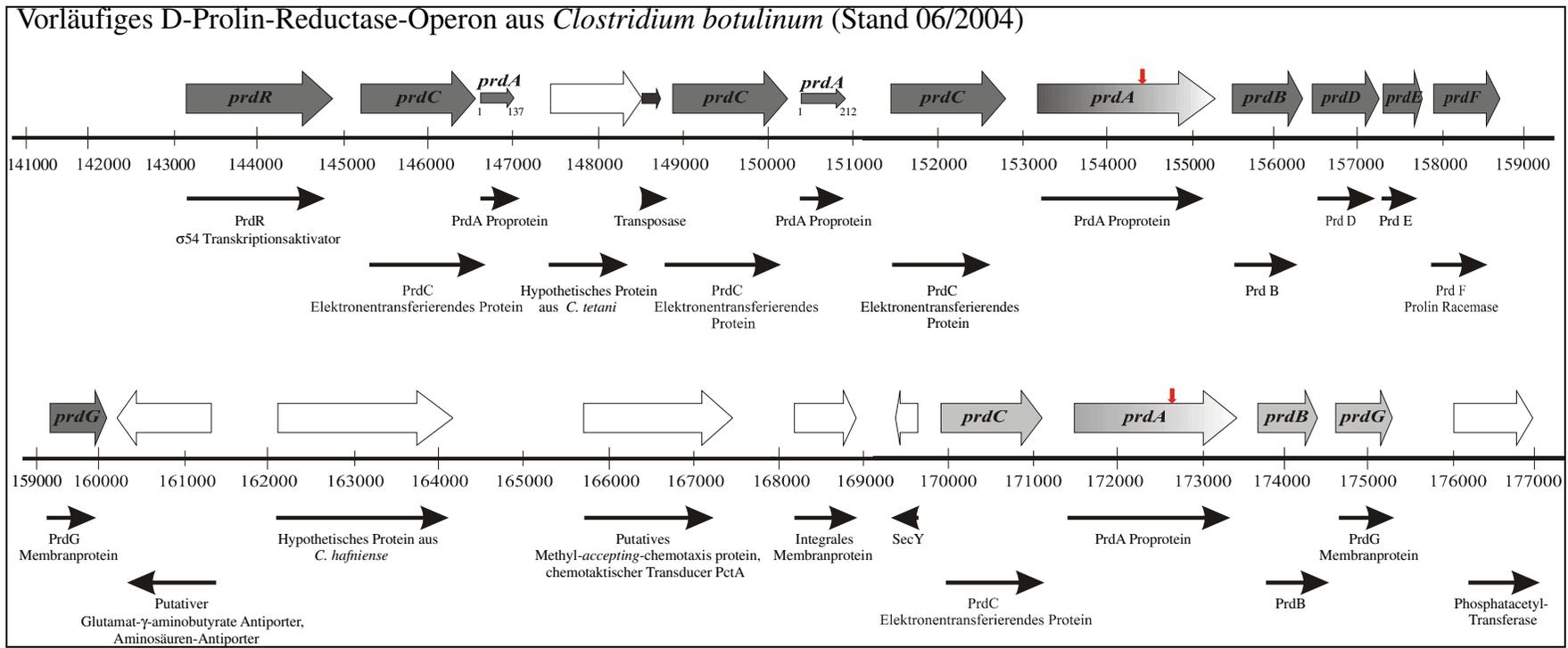
^b Angegeben sind die Positionen für die hier im Anhang angegebenen DNA-Sequenzen der Gene.

^c Die eingeführte Mutation ist fett dargestellt.

^d Die Schnittstellen in den Primern für die spätere Klonierung der Gene sind unterstrichen.

Abbildung folgende Seite:

Abb. A.1: Vorläufige Operonstruktur (Stand 06/2004) der D-Prolin-Reduktase aus *C. botulinum* (http://www.sanger.ac.uk:80/Projects/C_botulinum).



1 GAATTTCTAAGCGTAGAAAAAGCATTAGAAACAGCTTTTGAAGAAACAGATGAGATTAAGCCATATATAAAGAAGCTCTT
 I L S V E K A L E T A F E E T D E I K A I Y K E A L
 81 AGTAAAGCAGGCATCGAAAAATGAGCAAAATAGAAGTTTCTGAACTGCACCTTAAGAGAAAATTTGAAATTCAAAAGATAAT
 S K A G I E N E Q I E V S E T A L K R K F E I Q K I
 161 AACCGAAAGTGAATAGAAGTAAAGATTCCAGTAAATTACTATGGAGATCCTTCAAAGCTTGAATTTGTAGCAAATGGAG
 I T E S G I E V K I P V N Y Y G D P S K L E F V A N G
 241 ATGGGACTGTTTCTCTAGTGATTAATAATATAGGGAATATACAAAGTTAGTAAAGATTAGATTGACAAAATCATACCAA
 D G T V S L V I K N I G N I Q S
 321 TAATATATTATTTAAATCATAGTAATCCTACTGGAATACTATGATTTTCTTTATATAGAAATAATGTTATCTAAATTTGG
 401 GTATAAAATAAAAGGTATGAACACATGTCTTAAGCTATAAATATAGCATTTTGTATATTTGCTGTATTTTATAATTACA
cysK
 481 TGTATAAGTGAAAAAATTATCTCAGGAGGTAGAATATGATTATGAAAATATCATGCAACAATAGGAAAACTCCAATA
 M I Y E N I M Q T I G K T P I
 561 GTTAAGCTTAAAAATTTAACAGATGAGAATATGGCAGAGCTTTATGTTAAAGCTGGAATTTTTTAAATCCAGGAGGTTCCAGT
 V K L K N L T D E N M A E L Y V K L E F F N P G G S
 641 AAAAGATAGAGCTGCATTAATATGATAGAAAACATGGAAAAAGAGGGTAAGCTTAAAGCTTGGTGATATTATTGTAGAGC
 V K D R A A L N M I E N M E K E G K L K L G D I I V E
 721 CTACAAGTGGAAATACTGGAATAGGAATAGCGATGGTAGGCTCGGCAAAGGCTACAAAGTAAATTTATGCATGCCAGAG
 P T S G N T G I G I A M V G S A K G Y K V I L C M P E
 801 ACTATGAGTATAGAAAGAAGAAAAATCTTAAAGCCTATGGAGCTGAGCTGGTTTTAACTGAAGGAGCTAAAGGCATGAA
 T M S I E R R K I L K A Y G A E L V L T E G A K G M
 881 AGGTGCTATAGCAAAAGCTGAAGAAATGGCACAAGAAGATGGCTATATTATCCTAAGACAGTTTGACAATAGCTATAACG
 K G A I A K A E E M A Q E D G Y I I L R Q F D N S Y N
 961 TAGATGCTCACTATAAAAAACACAGCTAAGGAAATAAAGTACCTACCTGATTTAGATGCTCTAGTCGTAGGAGTAGGA
 V D A H Y K N T A K E I I S D L P D L D A L V V G V G
 1041 ACAGGAGGAACACTTACTGGAGTTGCTAAAGCATTAAAGAAAGCTCTATAAATGCAGAAATTGTTGCTGTAGAGCCAGT
 T G G T L T G V A K A F K E S S I N A E I V A V E P
 1121 AGATTACAGCAGTTTTATCTGGAATGCTCCAGGCGCCATAAGCTTCAAGGATAGGCGCAGGATTTGTGCCTAGTATT
 V D S A V L S G N A P G P H K L Q G I G A G F V P S I
 1201 TAGATACTGAGTATATAAGCAAGATAGAACAATTCAAACGCAGGAAGCTTTTTAATGCATCTAGACTTATGGCTTCAAAA
 L D T E Y I S K I E Q I Q T Q E A F N A S R L M A S K
 1281 GAAGGAATCCTCCTTGGAAATTCAGGGGGAGCAGCATTAGAGGCTGCGATTAGAACAGCTAAACGCTTGGAAAAGGGAA
 E G I L L G I S G G A A L E A A I R T A K R L G K G
 1361 AAAAGTGCCTGTTGTTGCTCCTGATAACGGAGAAAGATATCTAAGCACAGCTTTATATGGAGATGAAATAAATCTAG
 K K V L F V A P D N G E R Y L S T A L Y G D E *
cysE
 1441 TAGGCAGCTTTATAGGCCGAAAAATAAATAGGAGAGTATAAATGCGAGAGGTGTTAAGCTTGAGAGAAAAACAAAATTA
 M R E V L S L R E K Q K L
 1521 ACCTTTATGAAAAAATTAAGAGACTATAGAAGTAGCTAGAGAAAAAGATCCTGCTGCAAAAAGGTGCAATTAATATCTT
 T F M E K I K E T I E V A R E K D P A A K G A I N I
 1601 AGTTAACACCCTGGTATTTCATGCGATTATGTTTCACAGAGTTGCTCACAGCCTATATAATAGAAAACATTTTTTTATAG
 L V N T P G I H A I M F H R V A H S L Y N R K H F F I
 1681 CTAGACTCATATCTCAATCAGCAGATTTTTAACTGGAATTGAGATTCATCCAGGGGCTCAGATAGGCAGAAGTTTTTT
 A R L I S Q I S R F L T G I E I H P G A Q I G R R F F
 1761 ATAGACCATGGTATGGGCGTTGTTATAGGCCAAAAGCTGCTGAAATAGGTGATGATGTAATGCTTTTCCATCAAGTTACT
 I D H G M G V V I G E T A E I G D D V M L F H Q V T
 1841 CGGGGAACTGAAAAAGATAAAGGAAAAAGACATCCAACCGTAGAAAAATAATGTTATAATATCAGCAGGAGTAAAGGTGC
 L G G T G K D K G K R H P T V E N N V I I S A G V K V
 1921 TTGACCTATAGTGATAGGTGAAAACTCGAAAATAGGAGCCAAATGCAGTAGTACTGCATGATATACCTAAGAATGCTACA
 L G P I V I G E N S K I G A N A V V L H D I P K N A T
 2001 GCAGTTGGAATACCAGCGAAGGTAGTTAGGCTCAATGGAGAAAAGGTCGAGCACTAAATTTTGATTTGGGAGGGAACAT
 A V G I P A K V V R L N G E K V E H *

V E V V F D K N L V G R S C V A V H P N D N S A T V
 -35 -10 →
 6241 GCTTTCGTATGAGGATCTTTGAAAAAATAGTCAAGGCAAAATGGTAATACTTTTAAGGCAATTGAGCTCTAAATTATAAATGA
 V L S Y E D L E K I V K A N G N T F K A I E L *
 prdR
 6321 TATTA AAAAGGATGGCGTTAATTAATGTTTTTAACCAAATAAACGCTTTAAAGTCAAGGAAATAATGTCAAAGGATT
 M F F N Q T K R L K V K E I M S K D
 6401 TATAGTGTGGTACTCAGACATATCTCTTAGAAGATGCGTAGAGCATATAGCTCTTAATAATCTCAAAGAGGTAATAGTAA
 F I V F D S D I S L R R C V E H I A L N N L K E V I V
 6481 GACACCATGAAAAGCTTACAGGGTATATAAAAATTTGACGATATAATAAAAATTTTCATTAAGTCAAAGCTTTTCAGAAAA
 R H H E K L T G Y I K F D D I I K I S L S Q S F S E K
 6561 AAATAATTCGATATCAGGGCTAATAAGCCCTTTTATCTTAATGTAGAAGATACAGTTCTTATGGCAAAAAGACATAATGAG
 K L F D I R A N K P F Y L N V E D T V L M A K D I M
 6641 GGAAAATCAAGTAGATAGAGTATTTGTTTTAGATGATGAAAAGCTAGTAGGGTACTTAGAACTCAGGACATAGTGTACA
 R E N Q V D R V F V L D D E K L V G V L R T Q D I V Y
 6721 AGCTATATCCATAAATCAAGCAAATGAAGATTTGTATGAGCTGTTATGGGATAACGTTTCATGAAGGCATATGCATAATA
 K L Y P K I Q A N E D L Y E L L W D N V H E G I C I I
 6801 GATAATAAAGGAATGGTTTGCAATTTGGGGTAGAGGCTCAGAAAAGCTTTACGGAATAAAAAAATCAGAAATTTATGGTAA
 D N K G M V C I W G R G S E K L Y G I K K S E I I G
 6881 AAAGCTTGAGGAATTTTTCCCTACGGCTTTGTTATTAGATGTGCTAAAAAGCAAAGAACCCTGTGGAAAACATCATCCACA
 K K L E E F F P T A L L L D V L K S K E P V E N I I H
 6961 GCCCTAGAAAAAATACTTATGTAATATAAGTGCTCTTCCACTTATAAAAATGGCAAATTAATCGGCGTAGTATCTACT
 S P R K N T Y V N I S A L P L I K N G K L I G V V S T
 7041 GAGAGAGATGTGTGAGAAATTACAAACCTATCCAGAGAAGTGAATTCAGTAAAGAGAAGCTAGACTATCTTCAAGTAGA
 E R D V S E I T N L S R E L E F T K E K L D Y L Q V
 7121 AGTTAGAAAAATGAACGAAGATAAATTTCCCTTTGGCAATATAGTTGGGAAAAGTAAATAATGACTCATACTATAGATA
 E V R K M N E D K F S F G N I V G K S K I M T H T I D
 7201 GAGCCTATCAGGTTGCATCGACGACCAGTAGTGTGCTTATCAGTGGTGAAAGTGGTACTGGTAAAGAAGTATTTGCAAGG
 R A Y Q V A S T T S S V L I S G E S G T G K E V F A R
 7281 GCTATACATCAGTCAAGTGGCAGAGAAGGAGCTTTTGTAGCTATAAACTGCAGTGTATACCTGAGAGTCTTTTTGAAAG
 A I H Q S S G R E G A F V A I N C S A I P E S L F E
 7361 TGAGATGTTTCGGCTATGAAAGTGGTGCATTTACTGGGGCTCTTAGCAAAGGAAAATAGGAAAAATGAGATAGCAAATG
 S E M F G Y E S G A F T G A L S K G K I G K I E I A N
 7441 GAGAACACTTTTTCTTGATGAAATAGGTGATATGCCTCTTCATATGCAGGCAAAGCTCCTTAGAGTACTTCAAGAAAGA
 G G T L F L D E I G D M P L H M Q A K L L R V L Q E R
 7521 CAGCTTATGAGAGTGGGTGGAGATAAGAGTATATCTCTCGATGTGAGAGTAATTTCCGCTACTCATAGAAATTTAGAAGA
 Q L M R V G G D K S I S L D V R V I S A T H R N L E
 7601 TATGGTAAAGTCGGGAACATTTAGAGAGGACCTTTACTATAGATTAATGTTGTAACATAAAGCTTCCCTAGTTTAAGCG
 D M V K S G T F R E D L Y Y R L N V V N I K L P S L S
 7681 ACAGGATAGAAGACGTTCCACTTTTTGTTAAGCTTTTTATTGAAGAATTTGTAGGAAAATCATATGAAGGTTCCAAT
 D R I E D V P L F V K L F I E E F C R E N H M K V P N
 7761 ATTTCTCTGAAATATTAATATGCTCATGAAGTATAGCTGGCCAGGAAATATAAGAGAGCTTAAAAATATGGTAGAGCA
 I S P E I L N M L M N Y S W P G N I R E L K N M V E
 7841 TTTAGTTGTTTTTCTAAAAATAATGAAATTCAAATAGATACTCTCCCTGAATATATAAATAACAAGGAAGATAAAACAA
 H L V V F S K N N E I Q I D T L P E Y I N N K E D K T
 7921 TAAACATAAAAAATGAAAAGAGTTTAAACAGACCTTATAAGAAAACTGAAATAAAAGCGATTTCATGATGCAATGAAAGAG
 I N I K N E K S L T D L I R K T E I K A I H D A M K E
 8001 TGTGGGAATAACAAGCAACAAGCGGCTAAACTGCTGGATATTCCTAGAAAGTACTCTCTACTATAAAATCAAATTTTATGA
 C G N N K Q Q A A K L L D I P R S T L Y Y K I K F Y
 8081 CTTAAATCAATACTTATAACCATATGTCAAAAAATGACATGTGTGAGAAAAGTACACAAATGCTCTGATGCATTGAT
 D L N Q Y L *
 8161 TTTAAGTTCGTTACGTTTTAATTTTAAACAAAACCTCTAAGTTAGTGTGAGAAAAGTACACATCAACATAGAGGTTTTATTT

10321 CTATTTACATTAGAGAAAATATCTGCGAAGATGCTGTAAAAGTAAGCAACCTAGTTACAGATATCAAAGTAGAAAATCATT
T I Y I R E N I C E D A V K V S N L V T D I K V E I I

10401 ACTCCAGCTGATTACGGCAAGTACAGCGAAACTATTATGGACGTTTCAGCCTATAGCTACTAAAGAAGGCGACGGAAAAAT
T P A D Y G K Y S E T I M D V Q P I A T K E G D G K

10481 AGGACAAGGTGTTACTCGTGTATCGATGGAGCTATAATTATGGTTACAGGGACTGACGAAGATGGAGTTCAAATCGGTG
I G Q G V T R V I D G A I I M V T G T D E D G V Q I G

10561 AGTTTGGTTTCATCTGAAGGTGAACCTTGATGCAAACATCATGTGGGGAAGACCTGGAGCTCCTGATAAAGGAGAAAATCCTT
E F G S S E G E L D A N I M W G R P G A P D K G E I L

10641 ATCAAGACTCAAGTTACTATAAAAAGCTGGTACTAACATGGAAGACCAGGACCACTTGGCTGCATAAAGCAACTGATTT
I K T Q V T I K A G T N M E R P G P L A A H K A T D

10721 CATCACTCAAGAAATCAGAGAAGCTCTTAAGAAGCTTGATGATTCTGAAGTAGTTGAAACTGAAGAGTTAGCTCAGTACA
F I T Q E I R E A L K K L D D S E V V E T E E L A Q Y

10801 GAAGACCTGGCAAGAAGAAAGTTGTAATCATCAAAGAAATCATGGGACAAGGCGCAATGCATGATAACCTAATCCTTCTCT
R R P G K K K V V I I K E I M G Q G A M H D N L I L P

10881 GTAGAGCCAGTAGGAGTAATAGGTGCAAAGCCAAACGTTGACCTTGGAAACGTTCCAGTTGTTCTTTTACCTCTTGAGGT
V E P V G V I G A K P N V D L G N V P V V L S P L E
pyr (23 kDa-UE nach Spaltung)

10961 ACTTGTATGGAGGAATCCATGCACTTACTTGTATAGGACCTGCATCAAAGAGAAGCTTAGACATTACTGGAGAGAGCCTC
V L D G G I H A L T C I G P A S K E N S R H Y W R E P

11041 TAGTAATTGAAGTTATGAATGACGAAGAATTTGACTTAGCAGGTGTTGATTGTTGGTTCTCCTCAGGTTAACGCTGAG
L V I E V M N D E E F D L A G V V F V G S P Q V N A E

11121 AAGTTCTACGTATCAGAAAGACTAGGTATGTTAGTTGAAACTATGGATGTAGAGGGAGCTTTCATCACAAGTGAAGGTTT
K F Y V S E R L G M L V E T M D V E G A F I T T E G

11201 CGGAAACAACCATATAGACTTTGCTAGCCACCATAGACAAGTTGGTATGAGAGGAATTCCAGTTGTTGGAATGTCATTCT
F G N N H I D F A S H H E Q V G M R G I P V V G M S F

11281 GTGCTGTTTCAGGGAGCTCTAGTTGTTGGAACAAATACATGAAATACATGGTAGATAACAATAAATCTGAGCAAGGTATA
C A V Q G A L V V G N K Y M K Y M V D N N K S E Q G I

11361 GAAATGAAATCTTTTCTAACAACACTCTTTGCCAGAAGATGCTATAAGAGCAGTTGCTATGCTTAAAGCAGCAATAGC
E N E I L S N N T L C P E D A I R A V A M L K A A I

11441 TGAAGAAGAAGTAAAAGTTGCTGAGAGAAAATTCAGCAAAAACGTTAAAGAAAACAACGTTGATTTAATCGAAGACCAAG
A E E E V K V A E R K F S K N V K E N N V D L I E E Q

11521 CAGGAAAAGAAATTAATCTACTTCCAAATGAGCAAGTTCTACCAATGAGCAAGAGAGAGAAAATCTATGAGGCAGAT
A G K E I T L L P N E Q V L P M S K R E K E I Y E A D

11601 AAAT**TAA**ACCGTTCTTTTAAAATGAAAAGGTGATTATATGAAATATGGAGACAAAATCATATATATGGAAGGAATCATTGT
K *

11681 AGATTTTGATGATTGTTCTGTATCGGTAGATTTTAAAGGAAGTTAGGCTTTCTGAAAGTCCCTAAAAGATGCTCATT
-24 -12 -35

11761 CTGACTATCCTCTTGAAT**TGGTCTAGAGGTTGCT**TATGAACATGAGTTTTATAGAAGTATTAAGTGATGAAG**TAAAT**GAA
-10 → **prdB**

11841 AAATATTTGAG**TAAATAT**CCAAAAG**A**ATAAAGATAAAAAGGAGGAAGATGA**ATG**TCTGATTTGACTGTAGTAAAAGGATTAC
M S D L T V V K G L

11921 AATCTGAAATTTATGTACCTATTACACCACCACAGTGTGGACACCAGTAACAAAAGAATTAAGACATGACTGTTGCG
Q S E I Y V P I T P P P V W T P V T K E L K D M T V A

12001 CTTGTTACAGCAGCAGGAGTTCATATGAAAGCTGACAAGAGATTTAACCTAGCAGGAGACTTTTCTTTTCAGAGTTATTCC
L V T A A G V H M K A D K R F N L A G D F S F R V I

12081 AGGAGATGCATCTGTAATGATATGATGGTATCTCAGGAGTTATGATAATGGAGATGTAACAAAAGACATCAACTGTA
P G D A S V N D M M V S H G G Y D N G D V N K D I N C

12161 TGTTCCCAATAGATCCAATGAGAACATTAGCTAAAGAAGGATTCATTAAAGCTCTAGCTCCTATAACATAGGATTCATG
M F P I D P M R T L A K E G F I K A L A P I N I G F M

12241 GGTGGTGGTGGAGACCAAAAGAAATCTCAGAAGAACTGGTCTGAGATAGCTAGACAACCTAAAGAAGAAGGCGTAGA
G G G G D Q K K F S E E T G P E I A R Q L K E E G V

12321 TGCAGTTCTTCTAACAGCTGGCTGAGGTACCTGCCATCGTTCTGCAGTTATAGTGCAGAGAGCGATTGAGGAATCGGGTA
D A V L L T A G **U** G T C H R S A V I V Q R A I E E S G

V P S L N K T I T F D I S F G G S F F A I I H A K E

14481 AGGAGTTAAAGTAGAAACTAGCCAGGTTGATGTAAGAAATTAGGTATAGAAATCAGAGATTTAATAAATGAAAAA
L G V K V E T S Q V D V L K K L G I E I R D L I N E K

14561 TCAAAGTTCAACATCCAGAGTTAGAGCATATCAAACCTGTTGATTTAGTAGAAATCTACGATGAGCCATCTAATCCTGAA
I K V Q H P E L E H I K T V D L V E I Y D E P S N P E

14641 GCTACATACAAAAACGTTGTTATCTTTGGACAAGGGCAAGTAGACCGTTCTCCTTGTGGAACCTGGAACCTAGTGCTAAGCT
A T Y K N V V I F G Q G Q V D R S P C G T G T S A K

14721 TGCAACACTTTACAAAAAAGGACATCTTAAGATAGATGAAAAATTTGTATACGAAAGCATCACTGGAACAATGTTCAAAG
L A T L Y K K G H L K I D E K F V Y E S I T G T M F K

14801 GAAGAGTTTTAGAAGAACTAAAGTTGGAGAATTTGATGCTATAATCCAGAAATTACAGGGGAGCATATATAACTGGA
G R V L E E T K V G E F D A I I P E I T G G A Y I T G

14881 TTCAATCATTTGTAATTGATCCACTTAAGTATGGATTTACAGTATTAAAAATAGTGATAATCGTTAAATATGATTTAAC
F N H F V I D P L K Y G F T V *

prdG

14961 AATCAAATTAATAATTGAGGAGCTACTATGATTACAGGGATATTAGGAGTTTTAGGCGCACTGACGGCATGGTTCA
M I T G I L G V L G A L T A W F

15041 GCTTTGAGTTTGTAAAGGATGTCGCAAAACACAAAGACAATCTAGA
S F E F V K D V A K H K D N L

Abb. A.2: DNA-Sequenz der Genregion des *prd*-Operons sowie angrenzender Bereiche von *C. sticklandii* (AJ130879; KABISCH et al. 1999; LIEBMANN 1999). Gezeigt ist der codierende Strang. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene sind unterhalb der DNA-Sequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Stopp-Codons sind mit einem *, das Selenocystein von PrdB ist mit einem fett gedruckten U markiert. Die Start- und Stoppcodons sind hervorgehoben. Potentielle Ribosomen-Bindestellen sind grau unterlegt. Potentielle Terminatorstrukturen sind durch >>> <<< gekennzeichnet. Shine-Dalgarno-Sequenzen sind einfach unterstrichen. Durch *primer extension* nachgewiesene Transkriptionsstartpunkte sind fett gedruckt, sowie mit einem kleinen Pfeil (➔) oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. In PrdC sind die postulierten NADH- und FMN- Bindedomänen kursiv gedruckt und unterstrichen sowie die potentiell am Aufbau von Eisen-Schwefel-Zentren beteiligten Cysteine einfach unterstrichen. 45 kDa-UE: 45 kDa-Untereinheit des PrdA-Proteins nach Spaltung; 23 kDa-UE: 23 kDa-Untereinheit des PrdA-Proteins nach Spaltung; *pyr*: Pyruvyl-Rest der 23 kDa-Untereinheit.

orf1

1 GAATTCAGCGAAGTTGTAAATTCAGGCAATGAAGTAATATGTATTACTATGTCATCAGCTCTTAGTGGAACTATAATAG
E F S E V V N S G N E V I C I T M S S A L S G T Y N

81 TGCATTAATCGCAAGCCGTGAATTTGACGCAATAAAATAAGAGTTATAGACTCAAAGCAATAACTCTTGGTTATGGGA
S A L I A S R E F D A N K I R V I D S K A I T L G Y G

161 TGATAGTTATTGAGGCAGCAAAAATGGCAAGTAATGGTATAGGATAGATGATATAGAATCAAGAGTTAGAGACTTAGTC
M I V I E A A K M A S N G I G I D D I E S R V R D L V

241 AATAACATGGAGTATCTGATTATTTTTGATACTCTTGAATATATATATAAAGGTGGAAGAATCAGCAAATCACAGTATAT
N N M E Y L I I F D T L E Y I Y K G G R I S K S Q Y

321 GATGAGCAACCTTTTTGAACATCAAGGTCATAATGACTATGAAAGATGGCCAAGTTGTAGCAAGGGAAAAAGTTAGAGGAA
M M S N L L N I K V I M T M K D G Q V V A R E K V R G

401 GAAAAAAGCAATAAAATATATTATTGATTACATCGAAAAAATGAATCTACTCTAGATGGAAGAGTAATCGGTATGAAT
R K K A I K Y I I D Y I E K N E S T L D G R V I G M N

481 CATGCTAATGATAAAAGCTATTTGGAAGAGTTAAAAGAGGCTGTTTTATCAAAGTATATACCATCAGAAACTATTTATTC
H A N D K S Y L E E L K E A V L S K Y I P S E T I Y

561 CGAGGTAGGGTGTACAGTAGCAGCGTATTCAGGGCTTAGTGCACTAGCTCTATATTACGAAAAACAAAAA**TA**ATTTT
S E V G C T V A A Y S G L S A V A L Y Y E K T K K *

641 ATATAGTTGAATATAAGAATTCATAAGAGGTTAAGGTAGAAAGATTATTTTTTAACAAAAATGAAAAACAATAAAAAA

721 ATGATTGATTAATTTTTAATCTATTATAGAATAAGCTTATAAAGAGTATTTAACAAATAAATAATCTGAATGAAGAGC

801 AAAAGAGAGAATCGTTTGATCGCCGAAGGGACAAGTTTATATTTGCCAAATATAAATGAAATCTCAGGCAAAAGGATTT

881 TGCTTGACAGAACTCTGATAAAACAGGGAAACAAGGCTCTATTGTTCCCTGTTTTTTTTATGTAAATATAAAAAATAT

961 TTGATGGGAATAAGATTAACCTTTGGCGAGCTCTTTTGAATATTATTTTTAAATAAGGGTAAAATGTTTATGATGGGCTA

grdX

1041 TTTTATAGCTGCTATGAGGTGACT**AATG**ATTATTATCACAAACAATAAATTTGGTAGACGAGTATTATGGTGGAAAAACG
M I I I T N N K L V D E Y Y G G K N

1121 TGGAGTTACTTGAAGGTAGTTATCAAGATGTGCTTTACAGCGTTAGAGATTACGTCCACAAGAATTATAAATTATTA
V E L L E G S Y Q D V L Y S V R D Y V H K N Y K L L T

1201 CATCCACTTTTCAGGGAGTGTAAAGCCTAATGAAACACCATTAAAAGTGTTCATTAGAAATAGGCGATAAGCTAGATTT
H P L S G S V K P N E T P F K S V A L E I G D K L D

1281 TAATTCAGTTGAGATGATTGAAAACGCTATCTACACATACTCAAAGCTACAAAACGACTCAATTACACCAAACCTGGACAG
F N S V E M I E N A I Y T Y S K L Q N D S I T P N W T

1361 AAACGTATTGGAAGATTTCAAGGTCATAGATCTTGATTTAATAAAACATGCTTTAAAAATTT**TA**ATTAAGGAGTGA
E T V L E D F K V I D L D L I K H A L K I *

trxB

1441 **ATG**TCAAAAATTTACGATTTAGTAATTATTGGCGCTGGACCAGCTGGGCTTTTCAGCGGGACTTTATGGGGCCAGAGGTAA
M S K I Y D L V I I G A G P A G L S A G L Y G A R G

1521 AATGAGTACTTTAATAATAGAAAAGGATAAACTGGAGGACAAATAGTAACAACCTGAAGAAGTTGCAAACTATCCTGGTT
K M S T L I I E K D K T G G Q I V T T E E V A N Y P G

1601 CTATTCACGACGCTTCTGGACCATCTCTTATTGCTAGAATGGCTGAACAAGCAGACGAATTTGGTACAGAAGAATTA
S I H D A S G P S L I A R M A E Q A D E F G T E R I K

1681 GATAGCATAGTTGACTTTGATTTCACTGGGAAAATCAAAATTTTAAAAGGAACAAAAGCTGAATATCAAGCTAAAGCTGT
D S I V D F D F T G K I K I L K G T K A E Y Q A K A

1761 AATAGTAGCTACAGGAGCTAGTCCAAAGAAATAGATTGCCCTGGAGAAAAAGAGTTAACAGGAAAAGGTGTGCATACT
V I V A T G A S P K K L D C P G E K E L T G K G V S Y

1841 GTGCAACTTGGCAGCAGACTTCTTCCAAGATATGGAAGTGTGGTAGTTGGTGGTGGAGATTACAGCAGTAGAAGAAGCT
C A T C D A D F F Q D M E V F V V G G G D S A V E E A

1921 ATGTATTTAACAAAATTCGCTTCTAAAGTAAGTATAGTTACAGAGAAGACAGCTTAAGAGCAGCTAAATCAATCAAGA
M Y L T K F A S K V T I V H R R D S L R A A K S I Q

2001 TAAGGCGTTTGCAAACTCTAAGATTGATTTTTAAATGGGATTCAGTTATAAAAGAAAATTAAGGTGATGGAATAGTTGAAT
D K A F A N P K I D F K W D S V I K E I K G D G I V E

2081 CTGTTGATTTGAAAACTAAAACAGGTGAGCTTTTCAGAGCATTTTCAGATGAAGAATTTGGAACCTTTTGGAAATATTC
S V V F E N T K T G E L S E H F A D E E F G T F G I F

2161 GTATTTACTGGATATATACCACAACTGATATATTCAAAGATAAAGTAGACATGAACCAATCAGGCTATTTTGTAAACAAA
 V F T G Y I P Q T D I F K D K V D M N Q S G Y F V T

2241 TCAAAATATGGAAACAAATATTCCTGGAGTATTTGCTGCTGGAGATTGTAGAGAAAAAGTATTAAGACAAGTAGTAACCTG
 N Q N M E T N I P G V F A A G D C R E K V L R Q V V T

2321 CAACTGCAGATGGAGCAATCGCTGCAATCATGGCAGAAAAGTATATTGAGCACGAAGGCTCTG**TAG**GAGTTAACAGATAGA
 A T A D G A I A A I M A E K Y I E H E G L *

2401 AAAGTCATTATAATACAACATAATTAAGAAAGCATTATTAATACGGCAATTTAAAAATACGGCAATTTAAAAAACTATT
trxA

2481 TTAATACATCAATATAGTTTTTAGTTTTAAATAAATTGAGATAATAAATCAGAGGAGGAAAACGTT**ATG**TTCCGAACCTTGAT
 M F E L D

2561 AAAGATACTTTTGAAGCTGAAGTACTTCAAGGAAGCTGGATATGTTCTTGTGATTTCTGGAGTGAAGGTTGTGAGCCTTG
 K D T F E T E V L Q G T G Y V L V D F W S E G C E P

2641 TAAAGCTTTAATGCCTGATATTCAGGAAATGGAAAAAATTATGGTGGCAAGTTAGATTTACTAACTTGACACAACCTA
 C K A L M P D I Q E M E K T Y G E Q V R F T K L D T T

2721 AAGCAAGAAGATTAGCAATAAAGGAAAAAGTCTAGGTCTTCTACTATAGCAATCTACAAAGATGGTCAAAAAATTGAC
 K A R R L A I K E K V L G L P T I A I Y K D G Q K I D

2801 GAACTTACAAAGGAAGATGCAACAGCTGCAATGTAGAAGCTATGGTAAAAAATACATTT**TAA**TTTTATTTGAATTAGGAG
 E L T K E D A T A A N V E A M V K K Y I *
grdE (25 kDa-UE)

2881 GTGACTCT**ATG**CGTCTTGAAGTTGGTAATATTTTTATAAGGATATCCAATTTGGTGACAGCACTAAAGTTGAAAATGGT
 M R L E V G N I F I K D I Q F G D S T K V E N G

2961 GTTCTTTATGTAAACAAGCAAGAAGCAACTAATCAGTGAATTATCAAGTGATGAGCATATCAAGTCAATTGATATGGAAATCGT
 V L Y V N K Q E L I S E L S S D E H I K S I D M E I

3041 TAGACCAGGAGAAAGTGTAAGAATAGCTCCGGTTAAAGATGTTATAGAACCAAGAGTCAAAGTTGAAGGTAACGGAGGAA
 V R P G E S V R I A P V K D V I E P R V K V E G N G G

3121 TTTTCCAGGTTTCCTTAGCAAAGTTGATACTGTTGGAGAAGGAAAAACAAATGTAAGGTTGACGAGTGTGATTTACA
 I F P G F L S K V D T V G E G K T N V L K G A A V V T

3201 ACTGAAAAGTTGTTGGATTCCAAGAAGGAATTATCGATATGACTGGTCCAGGAGCTGACTATACTCCATTTTCTAAAAC
 T G K V V G F Q E G I I D M T G P G A D Y T P F S K

3281 TTGCAACGTAGTTATTATAGCTGAGCCAGTTGATGGCCTTAAGCAACATGACCACGAAGCTGCTCTTAGAATGGTTGGAT
 T C N V V I I A E P V D G L K Q H D H E A A L R M V G

3361 TAAAAGCTGGAAAATACCTAGGCGAAGCTGGGAAGAACATTACTCCAGATGAAGTAAAAGTATATGAGACTAAGCCAATA
 L K A G K Y L G E A G R N I T P D E V K V Y E T K P I

3441 TTCGAATCAGTAAAAGAGTATCCTAATCTTCTAAGGTTGCGTATGTATATATGCTTCAAACCTCAAGGACTATTACATGA
 F E S V K E Y P N L P K V A Y V Y M L Q T Q G L L H

3521 TACTTATGTATATGGCGTTGATGCGAAGAAAATTATTCCTACATTAATCTATCCAACAGAAGTAATGGATGGAGCAATAT
 D T Y V Y G V D A K K I I P T L I Y P T E V M D G A I
pyr (22 kDa-UE)

3601 TATCAGGAACTGCGTATCTGCTTGTGACAAAAACCAACATACGTTTCATATGAACAACCCAGTTATCCATGACTTATAC
 L S G N **C** V S A C D K N P T Y V H M N N P V I H D L Y

3681 GAACTTACGGAAAAGAGTACAACCTTGTGGTGTAATTATAACTAACGAAAACGTATATCTAGCTGATAAAGAAAAGATC
 E L H G K E Y N F V G V I I T N E N V Y L A D K E R

3761 ATCTAACTGGACTGCAAAGATGGCTGAATACCTTGGATTAGATGGAGTTATCATATCTGAAGAAGGATTTGGAAACCCAG
 S S N W T A K M A E Y L G L D G V I I S E E G F G N P

3841 ATACTGACCTAATCATGAAGTCAAAAAGATAACTAAAAAGGTATTAACAGTTATTCTTACTGATGAGTATGCAGGT
 D T D L I M N C K K I T K K G I K T V I L T D E Y A G

3921 AGAGATGGAGCATCTCAATCACTAGCTGATGCGAGATGCTGCTGAGATGCTTGGTAACTGGTGGTAATGCCAACATGAC
 R D G A S Q S L A D A D A A A D A C V T G G N A N M

4001 AATCGTTTTACCAAAGCTTGATAAAATATTGGACATGTATCTAAGGATGTTATAGATGTTATTGCTGGAGGATTTGATG
 T I V L P K L D K I I G H V S K D V I D V I A G G F D

4081 GTTCTCTACGCGCTGATGGATCAATTGAAGTTGAAATTCAGGCTATTACTGGAGCTACTAGTGAAGTTGGATTCAACAAG
 G S L R A D G S I E V E I Q A I T G A T S E V G F N K
grdA

4161 ATGACAGCAAAAACCTTAT**TAA**TTATAAAAATTTAACCATATTATTATAAATACAATATGAAAATTTAAGGAGGAAAAT**TAT**

M T A K T Y *

4241 **G**AGCCGTTTTACTGGAAAAAATAGTTATTATCGGCGATAGACGGAATTCCTGGCCCAGCTATTGAAGAATGTCTTA
M S R F T G K K I V I I G D R D G I P G P A I E E C L

4321 AGCCTATCGATTGTGAAGTTATATTTTCATCAACAGAATGCTTTGTCTGAACTGCTGCTGGGGCTATGGACCTAGAAAAC
K P I D C E V I F S S T E C F V **U** T A A G A M D L E N

4401 CAAAAGAGAATTAAGAAGCTACTGAGAAATTCGGAGCTGAAAATCTTGTGGTTTTAATAGGTGCTGCAGAAGCCGAAGC
Q K R I K E A T E K F G A E N L V V L I G A A E A E

4481 TGCTGGTCTAGCAGCTGAAACAGTTACAGCGGGTGACCCTACTTTTGTGGTCTCTTGTCTGGTTGAGCTTGGATTAA
A A G L A A E T V T A G D P T F A G P L A G V E L G L

4561 GAGTTTATCACGCAGTTGAGCCTGAATTCAAAGATGAAGTAGATGCTCAAATCTTTGATGATCAAGTTGGAATGATGGAA
R V Y H A V E P E F K D E V D A Q I F D D Q V G M M E

4641 ATGGTTCTTAACGTTGATGAAATCATAGAAGAAATGCAAAGCATTAGAAGTCAAGTTTGTAAATTTAACGACT**TAA**ATAAGG
M V L N V D E I I E E M Q S I R S Q F C K F N D *

4721 AAGGAGCGTTTTATTG**grdB****ATGG**GAAAAAGTTAAGTTGTACACTATCTAAATCAATCTTTGTCTGGTATAGCGGAGAAGAAA
M G K V K V V H Y L N Q F F A G I G G E E

4801 AGGCAGATACTCTCCACATATTGCTGAAAGTCAACCTCCAATATCTCAACAACCTCAAAGTTAATTGAAGAAGATGCT
K A D T L P H I A E S Q P P I S Q Q L Q K L I E E D A

4881 GAGATAGTAGGAGTAGTAGTTTGTGGAGATTCAATTTCAATGAAAATCTTGAAGAAGCTAAAGCTAAAGTTTGTAGAGAT
E I V G V V V C G D S Y F N E N L E E A K A K V L E

4961 GATTAATCTTTAATCCAGATATACTAATCGCTGGCCAGCGTTTTAATGCTGGTAGATACGGAATGGCTTGGCGAACTG
M I K S F N P D I L I A G P A F N A G R Y G M A C G T

5041 TTGTTAAGATGGTTCAAGATGAATTAACCTAAAAGCTTTCACAGCTATGTATGAAGAAAATCCTGGTTTGTAGTATTT
V V K M V Q D E L N L K A F T A M Y E E N P G L D V F

5121 AGAAAAGAAGTATATGTAATTCCTACTTCTGATTACAGTGCAGGTATGAGAAAAGCTTCCAGCTGTAGCGAAATTTGC
R K E V Y V I P T S D S A A G M R K A L P A V A K F

5201 AACTAAATTAGCTAAAGGTGAAGAAATCTTTCTCCACAAGAAGATGGATACTTTGCAAGAGGAGTTTCGTGTTAACGCAT
A T K L A K G E E I L S P Q E D G Y F A R G V R V N A

5281 TCGTAGATGAAAGAGGATCTATGCGTGTCTGTTAAAAAGCTAGTTAAAAAGCTTAAAGGTGAAGAGTTTGAACCTGAGTAT
F V D E R G S M R A V K M L V K K L K G E E F E T E Y

5361 CCAATGCCAGTATTTGATAGAGTAGCTCCAATCCAGCAGTTAAAGATATTACAAAAGCAAAAATGCTTTAGTAACTTC
P M P V F D R V A P N P A V K D I T K A K I A L V T

5441 TGGTGGTATTGTACCTAAGCACAATCCTGATCATATAGAGTCACTTTCAGCTTCTAAATACGGAAGATATGATATCTCTA
S G G I V P K H N P D H I E S S S A S K Y G R Y D I S

5521 GCTTTGATAAACTATCAGAAGCTGATCATGAAACTGCACATGGTGGATATGACCCAACATATGCTAATAACGAGCCAGAC
S F D K L S E A D H E T A H G G Y D P T Y A N N E P D

5601 AGAGTCTTCCAGTTGATGACTTTCGTGATTTAGAAAAAGAAGGCCAAAATCGGAGAATTATTTAAATATTTCTATACTAC
R V L P V D V L R D L E K E G K I G E L F K Y F Y T

5681 AGTAGGTAATGGTACTTCTGTGCAAAATCTAAGCAATTTGCTCAAGAATCTCTAAGAGCTTCTTGAAAACAAAGTAG
T V G N G T S V A N S K Q F A Q E F S K E L L E N K V

5761 ATGCGGTTATCTTAACATCTACCTGAGGTACTTGTACTCGTTGCGGCGCAACGATGGTTAAAGAAATCGAGAGAGCTGGT
D A V I L T S T **U** G T C T R C G A T M V K E I E R A G

5841 ATTCCTGTAGTTATATGTGTACAGTAGTTCCAATATCTTAAACAGTTGGTCAAATAGAATAATTCCTACAATTGCTAT
I P V V H M C T V V P I S L T V G A N R I I P T I A

5921 TCCTCACCCACTTGGAAATCCTGCACTAGATGCAGCTGAAGAAAAACAGCTTCGTAGAAAGCTTGTGAAAAAGCTCTTA
I P H P L G N P A L D A A E E K Q L R R K L V E K A L

6001 AAGCTTTGAAAACGAAGTTGAAGACCAACAGTTTTTGAAGACT**TAA**GATAAATAAATTTGCTATTAAAAATTTTGTTC
K A L E T E V E D Q T V F E D *

6081 ATAAATTAGATGGGGAGAAAAACCCCATCTAATTTTAAATATAAAGTAAAATTTGGAGGCTTCTT**grdC****ATG**ACAAAACCTGTTT
M T K P V

6161 TGAAAATGCAAGTTATATTTTAGTTCATACCTGATATGATTATCCACAATGGAACAACCTACCAATGAAAAACTA
L K N A S Y I L V H T P D M I I H N G T T Y Q M E K L

6241 GGTAATCCAGACTCAGAATTCCTAAAAAATGTGGGAAATTTTATCAGAAATTATGAAGAAGTTGTGAATTACGCTCCTAA
G N P D S E F L K N V G N F I R N Y E E V V N Y A P

6321 CCAAGTATATATTGGAAACAAAAAGCCTGAAGAACTAAATGATATAGCTACTCCTTGGTTTGAAAATCCAGTCAAGGAA
N Q V Y I G N K K P E E L N D I A T P W F E N P V Q G

6401 CTAGAGAAGGTAGATTGGCGAAATCATGCCTCAGGATGAATTTATAGGTATGTTAAAAATAGCTGATTCTTTTGACCTT
T R E G R F G E I M P Q D E F I G M L K I A D S F D L

6481 GTTAAGCTTACTGCTGATTTTTCTAAAGCTGTTGTTGAGAACTAAAAGCTCATGAATTTATTCAGTGTGCTGAACTTGA
V K L T A D F S K A V V E K L K A H E L F S D A E L

6561 GAAATTTAAAGATTCTGAAGAAATTGATTCAATTAACCTTTTGTAAACGAGCATCATGCAGAAGGACTATATAACATGG
E K F K D S E E I D S I K T F V N E H H A E G L Y N M

6641 GTGAGCTAGTTGGATGCGTAAAGAGACTCATGAAGTAGATAACAGCTTAACAGCTCATATTATGTTTGAAAATCTGGTT
G E L V G C V K R A H E V D N S L T A H I M F E N L V

6721 GTTAAGGCATCAGGAGTTTTAGCAGTAAACATTTAATGAAAATCTTCTGTAAAAGCTGATGAAGTTGAATATGTTAT
V K A S G V L A V K H L M K N S S V K A D E V E Y V

6801 AGAATGTTCTGAAGAAGCTTGTGGCGATATGAACCAAAGAGGTGGAGGAACTTCGCTAAATCAATTGCTGAAGCATGCA
I E C S E E A C G D M N Q R G G G N F A K S I A E A C

6881 GCTTTACTAATGCAACTGGATCAGATACTAGAGGATTCTGCGCTGGACCTACTCATGCATTAATAATGCAGCTGCACCT
S F T N A T G S D T R G F C A G P T H A L I N A A A L

6961 GTTAAATCAGGTGTATATAAGCATGTTGTTGTTGTTGGTGGTGGAGCAACTGCTAAACTTGGTATGAATGCAAAAGACCA
V K S G V Y K H V V V V G G G A T A K L G M N A K D

7041 TATTAAGAAAAATATTCTGTCTAGAGGATGACTTGGTGGATTGTCAGTTCTAGTTTCAGAAGATGATGGAATTCAC
H I K K N I P V L E D V L G G F A V L V S E D D G I S

7121 CAGTGTTCACACTGATTTAGTGGGAAGACATACAGTAGGAACTGGCTCATCTCCTCAAGCAGTAATTACATCATTAAATC
P V F N T D L V G R H T V G T G S S P Q A V I T S L I

7201 ACAATGCCATTAGATAAAGGTGGTTTTAAAAATTACAGATATCAGTAAATACTCTGTAGAAATGCAAAATCCAGATATTAC
T M P L D K G G L K I T D I S K Y S V E M Q N P D I

7281 TAAACCTGCTGGTGTGGAGATGTTCCAGAAGCCAATAAGATGATAGCTGCTCTTGGAGTAAAAAGAGGAGATTTAG
T K P A G A G D V P E A N Y K M I A A L G V K R G D L

7361 AAAAATCTTCACTTCCAACCTTTTGGCAAGGAACACGGAATGCCAGGATTCGCTCCTACTCAAGGACATATCCCATCAGGA
E K S S L P T F G K E H G M P G F A P T Q G H I P S G

7441 GTTCCATTTATAGGTTTTGCAATTGATGAGATGAAAGAAAACAAGCTAGATAAAGTTATGATAGTTGGAAAAGGAAGTCT
V P F I G F A I D E M K E N K L D K V M I V G K G S

7521 TTTCTTAGGAAGAATGACAAACAGTTTCGATGGAGTATCGTTTGTAAATGGAGAAAAATGATGGTAAAGGTGAAGACAAAG
L F L G R M T N Q F D G V S F V M E K N D G K G E D K

7601 CACCTCAAGTTGATGAGCAGCAAATCAAATCTATGATAGCAGATGCGATGAGAAAGCTTGCTGAAAATTTGGGACAAATAA
A P Q V D E Q Q I K S M I A D A M R K L A E N L G Q *

grdD

7681 GAAGGAGGCAACGATAATGAACCTTGAATAAAGTAATAGCTGATGCCTTTCTTGAATTTGCCGATGGAATTCAAACTGGAA
M N L N K V I A D A F L E I A D G I Q T G

7761 GCTTTGGAAAACTAAAAAGGTAGCACTTACTACTTGGTAGTGAGCATGGAGAAGCTACTCTTGTAGAAGGCGCGAAG
S F G K T K K V A L T T L G S E H G E A T L V E G A K

7841 CTTGCTAAGAACTTTATCCTCAACTTAACATAGTTTTAATGTTGAGCAAAATGACTCTGGATTAGAACTATTGAAGT
L A K K L Y P Q L N I V L I G S A N D S G L E T I E

7921 AAGCTCTGAAGATGAAATGTATAAAGTAATGAAGAAAACTTGATAGCAAAGAAATCGGTGCTTGCCTTACTATGCACT
V S S E D E M Y K V M E E K L D S K E I G A C V T M H

8001 ATAACCTTCCAATAGGGGTTTCTACAGTAGGTAGAGTTGTAACACCTGCACATGGTAAAGAAATGTTCAATGCTACGACT
Y N F P I G V S T V G R V V T P A H G K E M F I A T T

8081 ACTGGAACATCGTCAGCTCAAAGAGTAGAGGCTATGGTTAAAAATGCTGTTTATGGCGTAATTGCTGCAAAAGCATCAGG
T G T S S A Q R V E A M V K N A V Y G V I A A K A S

8161 TATAGAAAAACCAACAGTTGGTATCTTGAACGTTGATGGAGCTAGAAGCGTAGAAAAGGTTTTAGTTGAGCTTCAAGCTA
G I E K P T V G I L N V D G A R S V E K V L V E L Q A

8241 AAGGCTATGATATTGCTTTTGGTGTGCTCAAGAAGTATGGCGGAAGAGTTTTAAGAGGAAATGACTTGTCTTTGGA

K G Y D I A F G E S Q R S D G G R V L R G N D L L L G
 8321 ACTGTGTGATGTGTGGTTACAGATACTCTTACAGGAAATATTTAATGAAAATGTTCTCATCTTTTACAAGCGGAGGACA
 T V D V V V T D T L T G N I L M K M F S S F T S G G
 8401 ATACGAGGTTTCTGGATATGGTTATGGTCCTGGAGTAGGCCAAGGCTATGAGCGTAATGTTCTTATATATCAAGAGCAT
 Q Y E V S G Y G Y G P G V G E G Y E R N V L I L S R A
 8481 CAGGTGCTCCAGTAATTGCGAACGCTTTAAAATATGCTCATGAAATCGCTAACAACGATATAACAGAAAATTGCTAAAGCA
 S G A P V I A N A L K Y A H E I A N N D I T E I A K A
 8561 GAGTTTAAAAAGCTTAATGCTCTGAAGTGGATGGATTAATTCCTAAGCCTGTTGAGAAAAAGCTGCTCAGGAAGAAGT
 E F K K L N A L K W M D L I P K P V E K K A A Q E E
 8641 TGTTCACAACCTGATAAAGTTGTAGTAACCTGGTTCTATTTTACAGGAATAGATATAATGGAAGTAGAAGATGCAGTTACAG
 V V P Q P D K V V V T G S I S G I D I M E L E D A V Q
 8721 TATTATGGAAAAATGGTATTTATGCTGAAAGCGGCATGGGCTGTACAGGTCCAATAGTTCTTGTCCCAGAAGACAGAGTA
 L L W K N G I Y A E S G M G C T G P I V L V P E D R V
 8801 AGCGAATGTCAACAAATTTTAGTTAAAGCTGGATTTGCAGCTGGAGAAGGCGACATCTGCT**TAG**ACAAATAACACTTGTAA
 S E C Q Q I L V K A G F A A G E G D I C *
 8881 AAAGTAAAAATTTTGTAAAAATAAAATAGAGCCTTAATTATTTTATTTGTAAGATTTTATTTTAAATTTTAGGAGGGATA
bmpA
 8961 GGAAA**ATG**AAGAAAAGAATCACAGCTTATTCTTAGCTTCTATCATGGGTATTATGACTCTTGGCTGGATGCTCTAGTGCT
 M K K R I T A L F L A S I M G I M T L A G C S S A
 9041 CCTGCAGAAACACCTGCTGAAGAGCCAGCTGCAGAAGAAACAGCAGCAGAATCACTTAAAATTAGTATGGTTACAGACGT
 P A E T P A E E P A A E E T A A E S L K I S M V T D
 9121 TGGTGGAGTTAAAGACCAATCTTTTAAACAAAGTGTCTGGGAAGGTCTTGA AAAAGCAAAGCAGATCTTGGTATTGAAA
 V G G V K D Q S F N Q S A W E G L E K A K A D L G I E
 9201 TTGGATATATCGAGTCTAAGCAAGATGCTGATTATGAGCCAAACTTAGAGACACTTGTAGATGGAGAAAACGATCTTTATT
 I G Y I E S K Q D A D Y E P N L E T L V D G E N D L I

Abb. A.3: DNA-Sequenz der Genregion des *grd*-Operons sowie des Thioredoxinsystems von *C. sticklandii* (AJ276209; GRÄNTZDÖRFFER et. al 2001). Gezeigt ist der codierende Strang. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene sind unterhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Stopp-Codons sind mit einem *, das Selenocystein von GrdA und GrdB ist mit einem fett gedruckten U markiert. Die Start- und Stoppcodons sind hervorgehoben. Shine-Dalgarno-Sequenzen sind einfach unterstrichen. 25 kDa-UE: 25 kDa-Untereinheit des GrdE-Proproteins nach Spaltung; 22 kDa-UE: 22 kDa-Untereinheit des GrdE-Proproteins nach Spaltung; *pyr*: Pyruvyl-Rest der 22 kDa-Untereinheit.

Danksagung

Als erstes gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen dafür, dass er mir das Thema überlassen, die Arbeit mit ständigem Interesse, motivierender Unterstützung und konstruktiven Diskussionen begleitet hat.

Besonders herzlich danken möchte ich auch Dr. Andreas Pich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung in Form einer guten Zusammenarbeit, aufbauenden Anregungen, konstruktiven Diskussionen, seiner steten Gesprächsbereitschaft, sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

Ute Lindenstrauß danke ich für die vielen DNA-Sequenzierungen am ABI, Dr. Karl-Peter Rücknagel für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen einiger Proteine, Dr. Margret Köck für die Nutzung ihres Luminometers in ihrem Labor, sowie der AG Prof. Rudolph am Institut für Biotechnologie der MLU Halle, die mir die Nutzung des 100 und 50 l-Fermenters ermöglichten.

Einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit durch ihre gute Zusammenarbeit und das lockere Arbeitsklima haben alle gegenwärtigen und ehemaligen Mitglieder der Labore 308 und 311 bzw. 205 und 206 geleistet, insbesondere Kathrin, David und Frau Otto.

Auch möchte ich allen Institutsangehörigen und anderen Personen, die mir bei den unterschiedlichsten Pannen mit Rat und Tat behilflich waren, sei an dieser Stelle recht herzlich gedankt.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung in den verschiedensten Lebenssituationen, ihr Vertrauen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Leo von ganzem Herzen für seine stetige liebevolle Unterstützung auch über viele Kilometer hinweg, für seine Geduld, sowie für seine tatkräftige und moralische Hilfe.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Halle(Saale), den 30. Jun. 2004

Brit Eversmann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Brit Eversmann, geb. Bednarski
Geburtsdatum: 01.12.1975
Geburtsort: Halle(Saale)
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

Sep. 1981 - Jul. 1990 Polytechnische Oberschule in Halle(Saale)
Sep. 1990 - Jul. 1994 Albert-Schweitzer-Gymnasium in Halle(Saale)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Okt. 1994 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studiengang Biochemie/Biotechnologie
Sept. 1996 Vordiplomprüfung in den Fächern Biochemie, Allgemeine und Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Naturstoffchemie, Allgemeine Biologie und Physik
Sept. 1998 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Enzymologie, Organische Chemie, Immunologie und Mikrobiologie
Okt. 1998 - Jul. 1999 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg (Molekulare Analyse der Pyruvyl-bildenden Proenzyme GrdE und PrdA der Glycin- und D-Prolin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii*)
Aug. 1999 - Jul.2000 Wissenschaftliche Angestellte bei PD Dr. M. Hatzfeld der Molekularbiologischen Gruppe der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Aug. 2000 - Okt. 2003 Anfertigung der Dissertation im Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg unter Anleitung von Prof. Dr. J. R. Andreesen

Halle(Saale), den 30. Jun. 2004