

---

**Nicotinatfermentation in *Eubacterium barkeri*:  
Klonierung des kompletten Nicotinat-Locus  
und Charakterisierung der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-  
Dehydrogenase und Enamidase**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Ashraf Al Hapel  
aus Gaza

Marburg/Lahn 2005

---

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von August 2002 bis September 2005 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Dr. A. J. Pierik und Prof. Dr. W. Buckel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Zweitgutachter: Privatdozent Dr. R. Heddrich

Tag der mündlichen Prüfung \_\_\_\_\_

---

meinen Eltern und Geschwistern gewidmet

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Nicotinatabbau durch Bakterien.....	7
1.2 Nicotinatfermentation durch <i>Eubacterium barkeri</i> .....	10
1.2.1 Oxidation von Nicotinat zu 6-Hydroxynicotinat, katalysiert von der Nicotinat-Dehydrogenase .....	11
1.2.2 Reduktion des 6-Hydroxynicotinats zu 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat .....	12
1.2.3 Enamidase katalysiert die Ringöffnung von 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat (THON) .....	13
1.2.4 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (Hgd).....	14
1.2.5 Die Umwandlung von 2-(Hydroxymethyl)glutarat zu 2-Methylglutarat .....	15
1.2.6 Die Umwandlung von 2-Methylglutarat zu Acetat, CO <sub>2</sub> und Propionat.....	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Chemikalien .....	17
2.2 Geräte und Spektrometer.....	17
2.3 Bakterien, Vektoren und Bakteriophagen .....	18
2.4 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....	19
2.4.1 Kulturmedien und Wachstumsbedingungen .....	19
2.4.2 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen für die Elektrotransformation .....	23
2.4.3 Elektrotransformation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	23
2.4.4 Präparation von genomischer DNA aus <i>E. barkeri</i> .....	24
2.4.5 Phenolextraktion von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen .....	25
2.4.6 Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen .....	25
2.4.7 Phenol-Chloroform-Extraktion .....	25
2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	25
2.4.9 Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	26
2.4.10 Präparation von Plasmid-DNA mit Qiaprep Spin Plasmid Kit.....	26
2.4.11 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	27
2.4.12 Restriktion von DNA .....	27
2.4.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten.....	27

---

2.4.14 Erzeugung von A Überhängen für die TA Klonierung.....	29
2.4.15 Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter Klone.....	29
2.4.16 DNA-Transfer auf Membranen (Southern Blot-Technik) .....	30
2.4.17 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels PCR (Sonde C und T).....	30
2.4.18 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels DIG DNA Labeling Kit (Sonde K und M) .....	31
2.4.19 Hybridisierung von DNA mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonde.....	31
2.4.20 Nachweis von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden .....	32
2.4.21 Reinigung von PCR-Produkten.....	33
2.4.22 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	33
2.4.23 Ligation von DNA-Fragmenten .....	33
2.4.24 Die Mikrodialyse.....	33
2.4.25 Genome Walking.....	34
2.4.26 Herstellung einer $\lambda$ -ZAP-Express-Genbank.....	34
2.4.27 Identifizierung positiver $\lambda$ -ZAP-Express-Klone .....	35
2.4.28 Exzision des Phagemids pBK-CMV aus dem $\lambda$ -ZAP-Express-Vektor .....	36
2.4.29 DNA-Sequenzierungen .....	37
2.5 Expression und Reinigung .....	37
2.5.1 Herstellung der <i>Hgd</i> , <i>Hmd</i> , <i>Ena</i> und <i>Hnr</i> Expressionsvektoren .....	37
2.5.2 Strep-Tag Expressionssystem .....	38
2.5.3 Heterologe Expression von 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (Hgd)....	38
2.5.4 Heterologe Expression von Enamidase.....	38
2.5.5 Aufschluss der Bakterienzellen.....	39
2.6 Biochemische Methoden .....	39
2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	39
2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.6.3 Coomassie Färbung .....	40
2.6.4 Reinigung über das <i>Strep</i> -tag II Protein Reinigungssystem.....	41
2.6.5 Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membran (Westernblot).....	42
2.6.6 Bestimmung von Zink.....	42
2.6.7 Eisen Bestimmung.....	43
2.6.8 Massenspektrometrie mittels MALDI/TOF .....	43
2.7 Kristallisation von Enamidase.....	43

---

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1 Klonierung und Sequenzierung des kompletten Nicotinat-Locus.....	47
3.1.1 Klonierung der <i>EcoRI</i> Fragmente mit Sonden von den äusseren Enden des <i>PstI</i> Fragments.....	48
3.1.2 Klonierung des <i>BglII-BamHI</i> Fragments .....	52
3.1.3 Analyse der DNA-Sequenz des <i>BglII-BamHI</i> Fragments.....	53
3.1.4 Klonierung des <i>BglII - BglII</i> -Fragments .....	55
3.1.5 Analyse der DNA-Sequenz des <i>BglII-BglII</i> Fragments .....	56
3.1.6 Klonierung und analyse des 5'-Endes des <i>BglII-BglII</i> Fragments.....	57
3.1.7 Klonierung des 2,3 kb <i>EcoRI</i> Fragments .....	58
3.1.8 Analyse des 2,3 kb <i>EcoRI</i> Fragments .....	59
3.1.9 Klonierung des extremen 3'-Endes .....	60
3.1.10 Zusammenfassende Überblick über die klonierten Gene.....	61
3.2 6-Hydroxynicotinat-Reduktase enthält kovalent-gebundenes Flavin .....	62
3.3 Heterologe Überexpression der <i>N</i> -terminalen Strep-tagged <i>ena</i> , <i>hgd</i> , <i>hmd</i> und <i>hnr</i> Gene in <i>E.coli</i> .....	62
3.4 Enamidase .....	64
3.4.1 Expression des <i>ena</i> Gens in <i>E. coli</i> und Reinigung der Enamidase.....	64
3.4.2 Enamidase ist ein Metalloprotein.....	65
3.4.3 Kinetik der Enamidase .....	67
3.4.4 Bildung von THON (1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat) durch Enamidase.....	69
3.5 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase .....	69
3.5.1 Expression des <i>hgd</i> Gens in <i>E.coli</i> und Reinigung der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase.....	70
3.5.2 Kinetik der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase .....	71
3.5.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der 2- (Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase für weitere Substrate.....	73
3.6 Kristallisation und Strukturaufklärung der Enamidase .....	76
3.6.1 Proteinkristallisation .....	76
3.6.2 Die Struktur der Enamidase bei einer 1,89 Å Auflösung.....	79
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>83</b>
4.1 Klonierung des Nicotinat-Locus .....	83
4.2 6-Hydroxynicotinat-Reduktase .....	85
4.3 Enamidase .....	89

---

4.4 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase .....	93
4.5 Identifikation von Gencluster, die an Nicotinat-Abbau bei anderen Organismen beteiligt sind .....	95
4.6. Ausblick .....	98
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
Persönlichen Daten.....	109
Schulbildung .....	109

---

## Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen sind als Standardabkürzungen im European Journal of Biochemistry (Instruction for authors, 2004) veröffentlicht. Davon abweichende Abkürzungen werden im Anschluss definiert.

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
DIG	Digoxigenin
Ena	Enamidase
Hnr	6-Hydroxynicotinat-Reduktase
Hgd	2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase
Hmd	2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
LB	Luria Broth
Maldi-Tof MS	Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry
PEG	Polyethylenglycol
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcinol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THON	1,4,5,6-Tetrahydro-6-oxonicotinat

Die %-Angaben beziehen sich auf g Feststoff oder ml Flüssigkeit ad 100 ml





## Zusammenfassung

Aus *EcoRI*- und *BamHI/BglII*-Phagen-Genbanken von *Eubacterium barkeri* wurde mit Hilfe Digoxigenin-markierten homologen DNA-Sonden, direkter genomischer Sequenzierung und Seegene Speedwalking ein Gencluster von 23 kbp kloniert, das für die Enzyme der Nicotinatfermentation kodiert. Nach Sequenzierung und Analyse wurden die folgenden 22 offenen Leserahmen identifiziert. Die *ndhFSLM* Gene kodieren für die Untereinheiten der Nicotinat-Dehydrogenase, deren Aminosäuresequenzen signifikante Identitäten zu Xanthin-Dehydrogenase aufweisen. *hnr* kodiert für die 6-Hydroxynicotinat-Reduktase, ein  $[2\text{Fe-2S}]^+ \times 2 \times [4\text{Fe-4S}]$  Enzym mit kovalent gebundenem Flavin. *ena* kodiert für die Enamidase, deren Aminosäuresequenz eine Zugehörigkeit zur Amidohydrolase Superfamilie aufweist, und *hgd* für die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase. Die *dmdAB* Gene (60-73 % Aminosäuresequenz-Identität zu Isopropylmalat-Isomerase) kodieren für die beiden Untereinheiten der Dimethylmalat-Dehydratase. Über die Aminosäuresequenzenidentität zur  $\alpha$ -Untereinheit der  $[4\text{Fe-4S}]$ -Serin-Dehydratase (23-26 %) wurde *hmd* als Gen potentiell identifiziert, das für die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase kodiert. Mit den bereits vorher charakterisierten *mgm* (2-Methylglutarat-Mutase), *mii* (3-Methylitaconat-Isomerase), *mgmL* (2-Methylglutarat-Mutase Reaktivase/Stabilisierungsfaktor) und *dml* (Dimethylmalat-Lyase) Genen sind jetzt die Primärstrukturen aller Enzyme der Nicotinatfermentation identifiziert. Neben diesen Genen wurden zwischen den Nicotinat-Fermentationsgenen die *orfC*, *orfD* und *orfE* Gene, stromaufwärts von *hnr* die *nicR*, *orfA* und *orfB* Gene, und stromabwärts von *dmdAB* die *orfF* und *orfG* Gene angetroffen. Außer für *nicR* (potentieller Regulator) und *orfC* und *orfE* (grenzend an *hnr*-Homologen) konnte eine Beteiligung am Nicotinatabbau noch nicht aufgeklärt werden. Über die Sequenzen von Hnr und Ena wurden in 6 Proteobakterien Gencluster für den Abbau von Nicotinat zu 2-Formylglutarat gefunden.

Für biochemische Untersuchungen wurden *ena* und *hgd* heterolog in *E. coli* exprimiert. Die mit N-terminalen Streptags versetzte Enamidase und 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase wurden mit Streptactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die kinetischen Parameter wurden bestimmt.

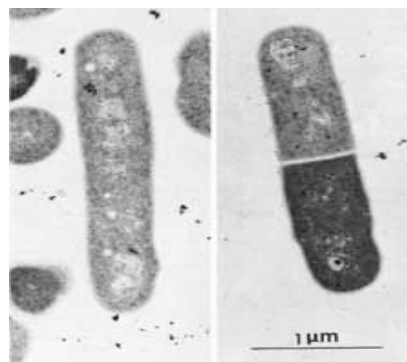
Die Kristallstruktur der Enamidase von *E. barkeri* wurde in Zusammenarbeit mit der AG Essen zu einer Auflösung von 1,89 Å bestimmt. Gemäss Metallanalyse wurden im Homotetramer vier binukleäre Eisen-Zink Zentren gefunden. Glutamat, Chlorid und ein Sauerstoff Atom verbrückten die Metallionen.

## 1 Einleitung

### 1.1 Nicotinatabbau durch Bakterien

Nicotinat (Pyridin-3-Carboxylat) als Bestandteil des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- (Phosphat) (NAD(P)) ist in der Natur weit verbreitet. Durch das Absterben der Organismen wird das Nicotinat dem mikrobiellen Abbau. Mehrere *Bacillus*- und *Pseudomonas*-Arten [1-4] sind in der Lage Nicotinat unter aeroben Bedingungen als Energie- und Kohlenstoff-Quelle zu nutzen. Der aerobe Nicotinat-Abbau findet technologische Anwendung, z. B. in der industriellen Biosynthese von 6-Hydroxynicotinat im Tonnen-Maßstab durch *Alcaligenes* sp. [5]. Der anaerobe Abbau ist weniger weit verbreitet: bisher sind nur drei Bakterien-Arten bekannt, die Nicotinat ohne Sauerstoff verwerten können.

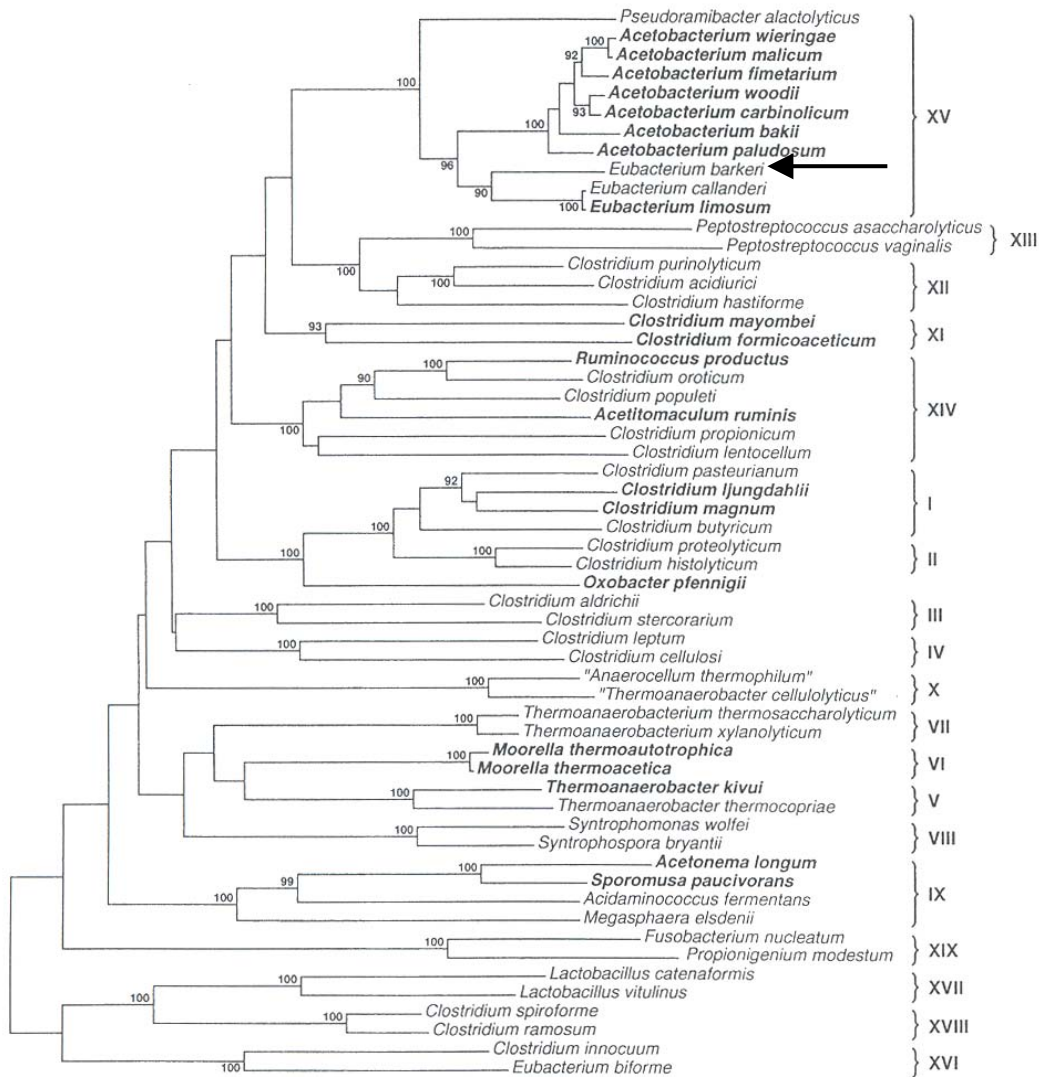
Die erste ausführlich charakterisierte Spezies ist ein Bakterium, das zur  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien gehört und aus dem anaeroben Sediment des Potomac Flusses (Washington, USA) isoliert wurde [6]. Aufgrund seines anaeroben Stoffwechsels und seiner terminalen Sporen wurde es zunächst der Gattung *Clostridium* zugeordnet [7] und später als *Eubacterium barkeri* reklassifiziert [8]. Da es die Fähigkeit besitzt, neben Nicotinat auch Kohlenhydrate abzubauen, wurde es der physiologischen Gruppe der saccharolytischen Clostridien zugeordnet.



**Abb. 1.1:** *Eubacterium barkeri* zu Beginn und gegen Ende der Sporulation [7]

Mit Hilfe der 16S-rRNA Sequenzierung konnte es zusammen mit anderen Clostridien (*Acetobacterium* sp., *Eubacterium limosum*, *E. callanderi* und *Pseudoramibacter alactolyticus*) in eine enge phylogenetische Gruppe eingeordnet werden: Cluster XV [8, 9] (siehe Abb. 1.2), im Bergey's Manual of systematic Bacteriology wurde diese drei Genera in

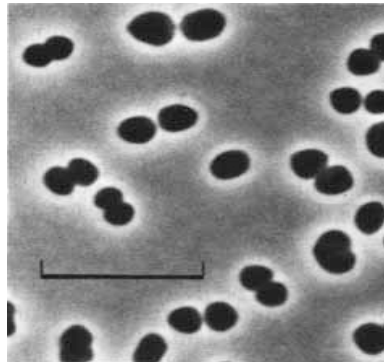
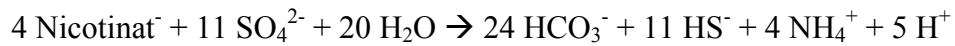
die Familie „*Eubacteriaceae*“ (Ordnung *Clostridiales*) eingeordnet. Die Zellen von *E. barkeri* sind stäbchenförmig und färben Gram-positiv. Der Organismus ist nicht pathogen. Der G+C-Gehalt der DNA beträgt 55% bis 58 % [10].



**Abb. 1.2: Phylogenetischer Stammbaum der Cluster XI bis XV [9].** Die Position von *Eubacterium barkeri* ist mit einem Pfeil bezeichnet.

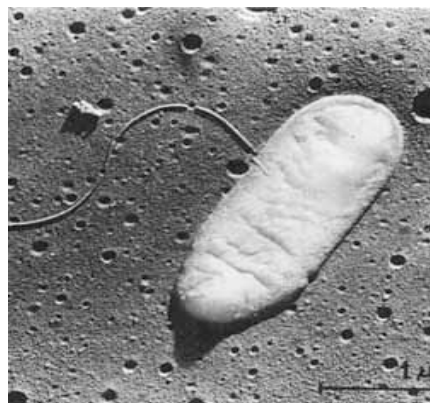
Die zweite Spezies ist ein Bakterium, das zur  $\delta$ -Gruppe der Proteobakterien gehört. Es handelt sich dabei um den Gram-negativen mesophilen Sulfatreduzierer *Desulfobacterium niacini* [11]. *D. niacini* kann Nicotinat mineralisieren [12]. Im Gegensatz zu *Eubacterium barkeri* sind die beteiligten Enzyme und der Abbauweg bei *D. niacini* noch nicht untersucht. Die Nicotinat-Dehydrogenase ist zwar vorhanden, aber eine 2-Methylglutarat-Mutase Aktivität

konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (O. Zelder, unveröffentlichte Ergebnisse). Der Abbau von Nicotinat durch *D. niacini* verläuft nach folgender Gleichung:

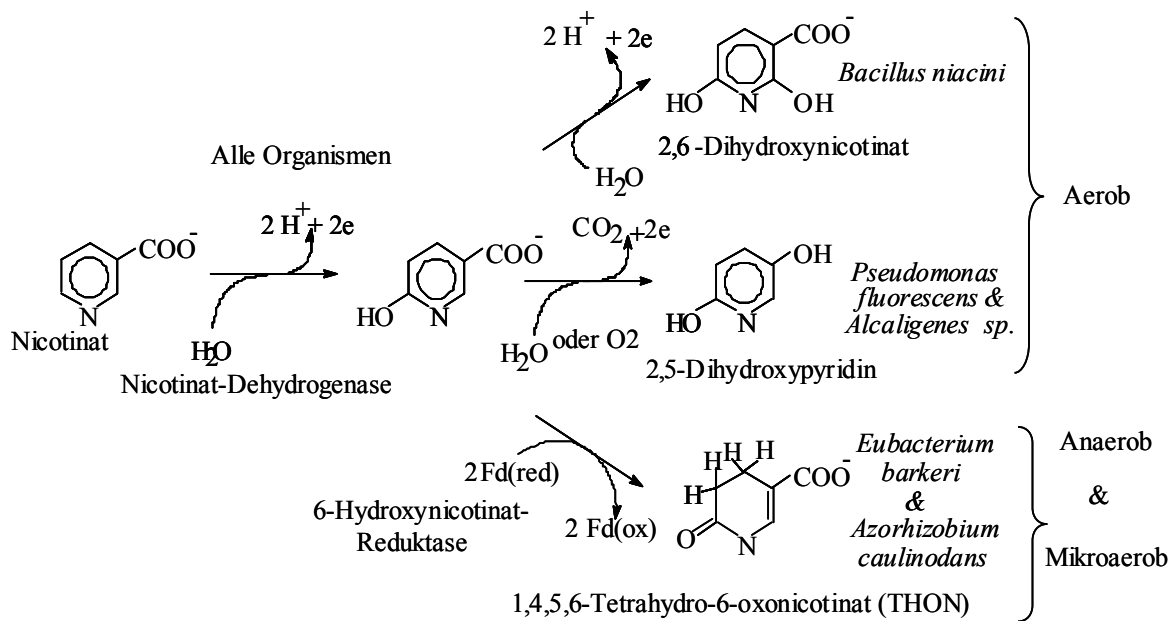


**Abb. 1.3:** *Desulfobacterium niacini* [12]

Die dritte Spezies ist *Azorhizobium caulinodans* [13-15], ein Bakterium das zur  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien gehört. Es ist ein microaerober symbiotischer Organismus, der in Luftknöllchen des west-afrikanischen Strauchs *Sesbania rostrata* lebt. Durch Analyse von Mutanten [14] wurde nachgewiesen, dass der erste Teil des Stoffwechselwegs dem Fermentationsweg von *E. barkeri* entspricht.

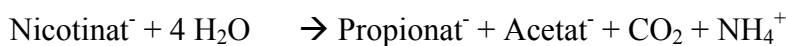


**Abb. 1.4:** *Azorhizobium caulinodans* [14]



**Abb. 1.5: Die ersten zwei Schritte des Nicotinat Metabolismus in den Mikroorganismen**

In allen Fällen beginnt der Metabolismus von Nicotinat mit der Hydroxylierung des Nicotinats zu 6-Hydroxynicotinat durch das gut charakterisierte Enzym Nicotinat-Dehydrogenase [3]. Der weitere Metabolismus von Nicotinat enthält komplizierte spezielle Enzyme, die von der Verwendbarkeit des Sauerstoffes [5] abhängen. In den aeroben Organismen wird 6-Hydroxynicotinat oxidativ zu 2,5-Dihydroxypyridin [6] decarboxyliert, oder zu 2, 5-Dihydroxynicotinat hydroxyliert [7]. Unter den microaeroben oder anaeroben Bedingungen wird die ferredoxin-abhängige Reduktion zu 1,4,5,6-Tetrahydro-6-oxonicotinat (THON) beobachtet. Nicotinat wird durch *E. barkeri* nach folgender Gleichung fermentiert:



## 1.2 Nicotinatfermentation durch *Eubacterium barkeri*

Die Fermentation von Nicotinat durch *E. barkeri* ist zum Teil aufgeklärt [16, 17] und kann pro mol Nicotinat ein mol ATP liefern:



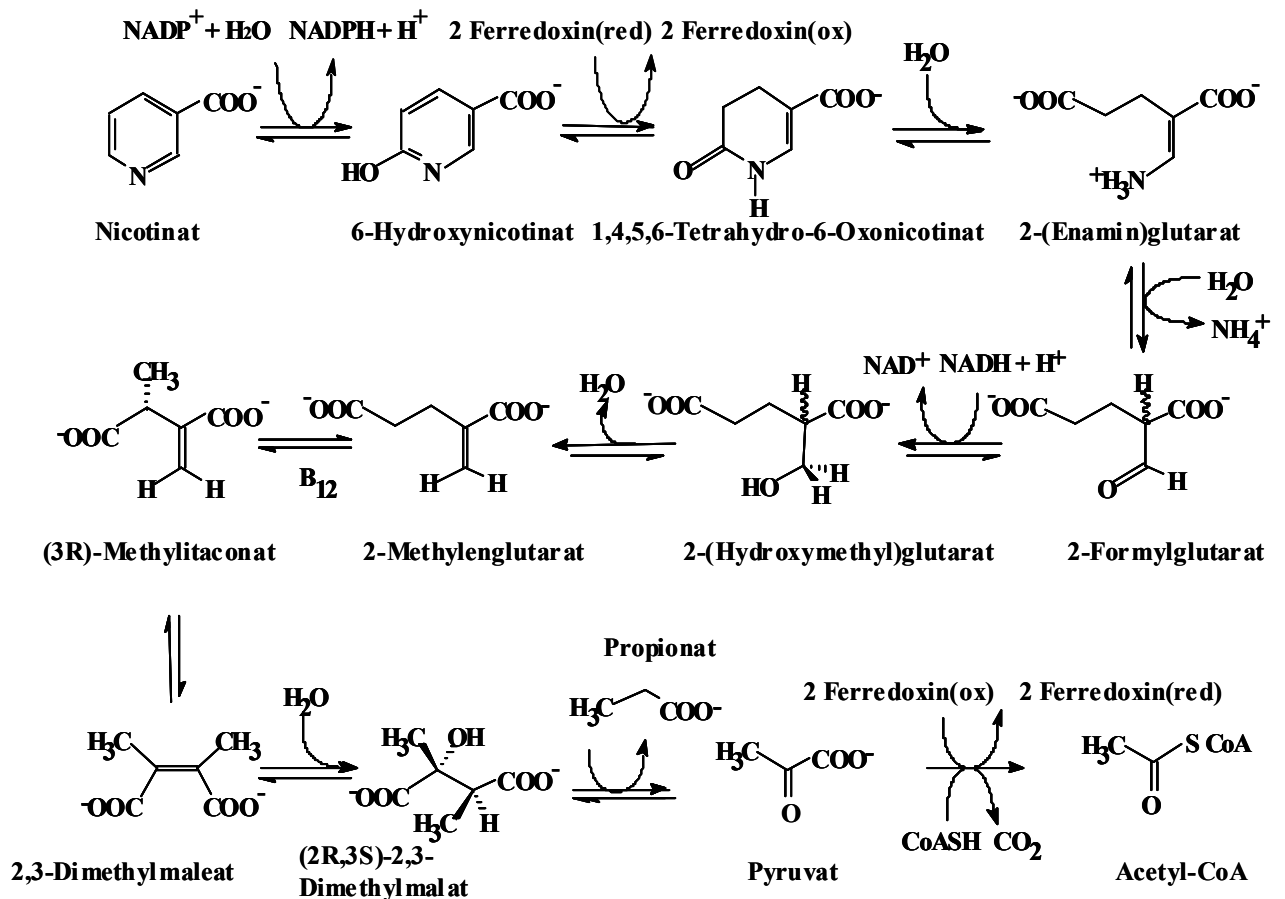


Abb. 1.6: Der Stoffwechselweg des anaeroben Nicotinat-Abbaus in *E. barkeri*.

### 1.2.1 Oxidation von Nicotinat zu 6-Hydroxynicotinat, katalysiert von der Nicotinat-Dehydrogenase

Im ersten Schritt des Abbaus (siehe Abb. 1.5) wird Nicotinat mit  $\text{NADP}^+$  unter der Katalyse Nicotinat-Dehydrogenase zu 6-Hydroxynicotinat oxidiert [18]. Dieses Enzym ist ein gut charakterisiertes Molybdo-Selen-Enzym [12]. Das Molybdän befindet sich im gereinigten Enzym als Molybdopterin in der Oxidationsstufe V [19]. Das Selen ist nicht als Selenocystein in die Polypeptidkette eingebaut, sondern ist labil und kann unter Verlust der Aktivität verloren gehen [20]. Das Protein ist aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut: Flavoprotein, [Fe-S]-Protein und zwei weitere Proteine, möglicherweise Abbauprodukte des Molybdopterin-Proteins [20].

## 1.2.2 Reduktion des 6-Hydroxynicotinats zu 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat

Das Enzym 6-Hydroxynicotinat-Reduktase (HNR) katalysiert die reversible Reduktion von 6-Hydroxynicotinat zu 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat (THON). Es benötigt Ferredoxin als Elektronendonator. Schon 1966 wurde THON als Intermediat nach Inkubation von 0,2 M Nicotinat mit Zellextrakt von *E. barkeri* in Anwesenheit von 0,2 M Pyruvat identifiziert [21]. Erst im Jahre 1969 wurde das Enzym partiell gereinigt und charakterisiert [22]. Sowohl Substrat als auch Produkt der HNR stehen zur Verfügung: 6-Hydroxynicotinat ist kommerziell erhältlich und eine chemische Synthese von THON, ausgehend von Cumalinsäure, wurde beschrieben in [23]. In 1982 wurde eine andere, neue Synthese des THON Ethylesters aus den Ausgangsstoffen Ethylacrylat und disilyliertem Formylacetamid beschrieben [24]. Dieser Ester wurde nicht für biochemische Zwecke benutzt. Später wurde in Mutanten von *Azorhizobium caulinodans* die Produktion von THON nachgewiesen [13-15], so dass damit wahrscheinlich auch hier eine noch nicht weiter charakterisierte 6-Hydroxynicotinat-Reduktase vorliegt.

Die 6-Hydroxynicotinat-Reduktase aus *E. barkeri* benötigt *in vivo* reduziertes Ferredoxin (siehe auch [22]). *In vitro* kann auch Dithionit-reduziertes Methylviologen oder Benzylviologen benutzt werden. Die Rückreaktion, die Oxidation von chemisch synthetisiertem 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat funktioniert mit oxidiertem Benzylviologen, Methylviologen, 2,3,5-Triphenyltetrazolium oder Ferredoxin als Elektronenakzeptor. Der physiologische Elektronendonator bzw. Akzeptor der HNR ist Ferredoxin, ein allgegenwärtiges Eisen-Schwefel-Protein. Das *E. barkeri* Ferredoxin besitzt wahrscheinlich wie die meisten Ferredoxine der *Clostridien* zwei  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+/2+}$  Cluster. Die 2x4 Eisen-Ionen sind an 2x4 anorganische Sulfidionen und über 2x4 Cystein-Reste an das Protein gebunden. Die Redoxpotenziale der beiden  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+/2+}$  Cluster der clostridiellen Ferredoxine sind mit -300 bis -500 mV sehr niedrig [25]. Weil das Redoxpotential von 6-Hydroxynicotinat / THON -390 mV beträgt [22], ist klar einzusehen, dass reduziertes Ferredoxin und nicht NADH oder NADPH als Elektronendonator gebraucht wird. Das reduzierte Ferredoxin wird am Ende der Nicotinatabbaus durch oxidative Decarboxylierung des gebildeten Pyruvats regeneriert. Das reduzierte Ferredoxin wird durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat gebildet.



Die Hydroxynicotinat-Reduktase wurde als Sauerstoff-labiles, dunkelbraunes Nicht-häm-Eisen-Schwefel-Protein charakterisiert [22]. Es wurde aber keine UV-vis- und ESR-Spektroskopie, Metallanalyse, molekulare Massen-Bestimmung, sowie Flavin-Gehalt-Bestimmung durchgeführt [22]. Im Gegensatz zu der Benzoyl-CoA-Reduktase [26], benötigt die 6-Hydroxynicotinat-Reduktase kein ATP [22]. Offensichtlich ist das aromatische System des 6-Hydroxynicotinats im Vergleich zum Benzoyl-CoA schon so geschwächt, daß die Reduktion ohne zusätzliche Energiequelle abläuft. In der vorherigen Diplomarbeit [27] wurde ein Reinigungsprotokoll ausgearbeitet, um ausreichende Enzymmengen zur biochemischen Charakterisierung der HNR zu erhalten. Mit der gereinigten HNR wurde 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat enzymatisch synthetisiert. Nach Dowex 1X8 Chromatographie und Säurefällung hatte die gereinigte Präparation ein  $^1\text{H-NMR}$ -,  $^{13}\text{C-NMR}$ - und UV-Spektrum, das identisch zu von Dr. D. J. Darley chemisch synthetisierten 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat war. Das dunkelbraune Enzym zeigte im UV-Vis-Spektrum eine für ein [Fe-S]-Flavoenzyme typische Absorption. Nach Zerstörung der [Fe-S]-Zentren konnte eine stöchiometrische Menge von einer noch nicht näher identifizierte Flavin-Spezies nachgewiesen werden, welches möglicherweise kovalent an die HNR gebunden ist. Durch ESR-Messungen (in Zusammenarbeit mit Dr. A. J. Pierik) wurde gezeigt, dass  $[2\text{Fe-2S}]^{1+/2+}$  und  $[4\text{Fe-4S}]^{1+/2+}$  Cluster im anwesend sind. Die magnetische Kopplung deutete darauf hin, dass diese Cluster in der HNR  $<12 \text{ \AA}$  von einander entfernt sind. Die Anwesenheit von 9 Fe/HNR zeigen zusammen mit ESR-Daten und UV-vis spektroskopischen Ergebnissen, dass das Enzym mindestens einen  $[2\text{Fe-2S}]^{1+/2+}$  Cluster, einen  $[4\text{Fe-4S}]^{1+/2+}$  Cluster und ein Flavin enthält.

### **1.2.3 Enamidase katalysiert die Ringöffnung von 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat (THON)**

Nach der Reduktion folgt eine Ringöffnung, wobei aus 1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat unter Hydrolyse und Hydratisierung, 2-Methylenglutarat und  $\text{NH}_4^+$  gebildet werden. Diese Schritte wurden bisher kaum untersucht.

Enamidase ist homotetrameres Metalloprotein (4x40 kDa) und enthält Eisen (Mitteilung Dr. Pierik). Enamidase gehört zu der Amidohydrolase Superfamilie bzw. den zyklischen Amidohydrolasen, einschließlich Dihydropyrimidinase, Allantoinase, Hydantoinase und Dihydroorotase. Sie sind Metall-abhängige Hydrolasen und spielen eine entscheidende Rolle im Metabolismus des Purins und des Pyrimidins in pro- und eukaryotischen Zellen.

Ungefähr ein Drittel aller Enzyme benötigen für die Entfaltung ihrer optimalen Aktivität die Anwesenheit von Metallionen, die als Cofaktoren dienen. Als katalysierend wirkende Metalle kommen vor allem die Übergangselemente Mn, Fe, Mo, Co, Cu und Zn vor. Bei den

metallhaltigen Enzyme werden zwei Haupttypen unterschieden, die ineinander übergehen können:

1. Die Metalloenzyme, bei denen das Metallion integraler Bestandteil ist, der in einem bestimmten molaren Verhältnis zum Protein vorkommt. Die Metallionen dissoziieren unter physiologischen Verhältnissen praktisch nicht. Nach ihrer Entfernung geht die enzymatische Aktivität verloren. Es handelt sich vor allem um  $\text{Fe}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$  (Oxidoreduktasen und Cytochrom),  $\text{Zn}^{2+}$  (Dehydrogenasen, Carboxylasen, Peptidasen, Hydrolasen),  $\text{Mo}^{5+}$  (Xanthin-Oxidasen) und  $\text{Mn}^{2+}$  (Pyruvat-Carboxylase, Phosphotransferasen)
2. Die Metallionen-aktivierten Enzyme, bei denen das Metallion nur relativ locker gebunden ist und während der Isolierung des Enzyms verlorengehen kann. Die Metallionen werden für die Entwicklung der maximalen Aktivität des Enzyms benötigt. Es handelt sich vor allem um  $\text{Mg}^{2+}$  (Hexokinase, Adenosin-Triphosphatase, Carboxylase).

#### 1.2.4 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (Hgd)

Im Rahmen einer Diplomarbeit (Bishop) wurde versucht, die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase aus *E. barkeri* zu reinigen [28]. Dazu wurde racemisches 2-(Hydroxymethyl)glutarat und  $\text{NAD}^+$  verwendet, für enzymatische Bestimmungen in der im Vergleich zur Physiologie umgekehrte Richtung. NADH Bildung konnte indirekt über Absorptionzunahme bei 492 nm mit INT/Meldolablauf beobachtet werden. Dabei beobachtete man, dass solche Präparationen auch Leucin-Dehydrogenase Aktivität hatten. Es wurde ferner versucht (Elsner und Pierik), das Enzym mit andere und moderneren Säulematerialien zu reinigen, aber diese Versuche führten ebenfalls nur zu Anreicherung des Enzyms. Immerhin konnte die Leucin Dehydrogenase Aktivität abgetrennt und die  $\text{NAD}^+$  Abhängigkeit bestätigt werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei pH 9,5 im Glycin-Puffer die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase NADH ohne Kopplung mit INT/Meldolablauf bildet. Wegen der Hintergrundreaktion von INT/Meldolablauf mit Thiolen war die direkte Messung von NADH bei 340 nm vorteilhafter. Das Enzym ist interessanterweise für  $\text{NAD}^+$  spezifisch, was vermuten lässt, dass *E. barkeri* über eine NADH / NADPH-Transhydrogenase verfügt, da im Stoffwechselweg des anaeroben Nicotinat-Abbaus  $\text{NADPH}^+$  gebildet und  $\text{NADH}^+$  verbraucht wird (C. Edwards, H. Bothe und A.J. Pierik, unveröffentlichte Ergebnisse).

### 1.2.5 Die Umwandlung von 2-(Hydroxymethyl)glutarat zu 2-Methylenglutarat

Die **Dehydratisierung** bezeichnet eine Reaktion, bei der von einer Hydroxyverbindung Wasser abgespalten wird. Bei enzymatische Dehydratisierung von aliphatischen 2-, 3- und 4-Hydroxy-monocarboxylaten sind in vielen Fälle CoA-Ester beteiligt [29]. Die Dehydratisierung von nicht-aktivierten 2- und 4-Hydroxyacyl-CoA-Estern wird in der Aminosäure-Fermentation von Komplexen [FeS]-Flavoenzymen durchgeführt [29]. Die Dehydratisierung von 3-Hydroxyacyl-CoA-Estern ist mechanistisch wesentlich einfacher und wird von Enzymen ohne Kofaktoren katalysiert, z.B. im umgekehrter Richtung bei der Hydratisierung von Enoyl-CoA in der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren. 2-(Hydroxymethyl)glutarat, das wegen der Trennung des zweiten Carboxylats durch zwei Methylengruppen effektiv als 3-Hydroxy-Monocarboxylat betrachtet werden kann, sollte also ebenfalls auf CoA-Ester Ebene dehydratisiert werden. Dabei wäre neben der Dehydratase eine CoA-Transferase essentiell. Alternativ könnte 2-(Hydroxymethyl)glutarat ohne CoA Esterifizierung von einem [FeS] Enzym ähnlich wie Aconitase oder die labile Serin-Dehydratase [30, 31] dehydratisiert werden. In diesem Fall könnte auf eine CoA-Transferase verzichtet werden. Die nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase die freie Säure und nicht den CoA-Ester als Substrat akzeptiert.

### 1.2.6 Die Umwandlung von 2-Methylenglutarat zu Acetat, CO<sub>2</sub> und Propionat

Die nächsten Abbau-Stufen sind zuerst im Labor von T. C. Stadtman und dann in unserem Labor charakterisiert worden: die Coenzym B<sub>12</sub>-abhängige 2-Methylenglutarat-Mutase lagert 2-Methylenglutarat zu (*R*)-3-Methylitaconat um [29, 32-53]. Daraufhin isomerisiert die (*R*)-3-Methylitaconat- $\Delta$ -Isomerase das (*R*)-3-Methylitaconat zu 2,3-Dimethylmaleat [54-57]. In den letzten Schritten wird durch die 2,3-Dimethylmaleat-Hydratase Wasser an die Doppelbindung von 2,3-Dimethylmaleat addiert [58]. Diese labile Hydratase wurde nur partiell gereinigt und charakterisiert [58]. Das gebildete (2*R*,3*S*)-Dimethylmalat wird dann durch die (2*R*,3*S*)-Dimethylmalat-Lyase in Propionat und Pyruvat gespalten [59-61]. Das Gen der Lyase wurde von Wagener in ihrer Diplomarbeit kloniert und in *E. coli* exprimiert [62]. Zum Schluß wird Pyruvat oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Die dabei erzeugten Reduktionsäquivalente

---

werden auf oxidiertes Ferredoxin unter Bildung von reduziertem Ferredoxin übertragen. Die Produktion von Acetat ermöglicht dem Mikroorganismus, ATP durch Substratkettenphosphorylierung herzustellen. Das wichtigste bei der Acetatproduktion erzeugte Zwischenprodukt ist das energiereiche Acetyl-CoA, das mit anorganischem Phosphat von der Phosphotransacetylase zu Acetylphosphat umgewandelt wird. Zum Schluß wird die energiereiche Phosphatgruppe des Acetylphosphats durch die Acetat-Kinase auf ADP übertragen werden und so ATP erzeugt [63].

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Ziele, die im Wesentlichen erreicht worden sind: die Klonierung, vollständige Sequenzierung des Nicotinat-Locus von *E. barkeri* und die Expression der Strukturgene der Enamidase, 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase, 6-Hydroxynicotinat-Reduktase und (Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase in *E. coli*. Die Kristallisation und Charakterisierung der Enamidase war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt) bezogen. Biochemikalien und Enzyme für molekularbiologische Experimente lieferten Amersham (Braunschweig) und Boehringer (Mannheim). Die Prozentangaben verstehen sich als Massenprozent pro Volumen (w/v), sofern nicht anders angegeben.

Die Gase Stickstoff (99,996%), Stickstoff-Wasserstoff Gemisch (Formiergas, 95 % N<sub>2</sub> / 5 % H<sub>2</sub>) und flüssigen Stickstoff lieferte Messer Griesheim (Düsseldorf, BRD). Nicotinsäure, 6-Hydroxynicotinsäure, 1,4-Dithiothreitol (DTT), Methylviologendichlorid, Natriumdithionit, Kaliumhexacyanoferrat(III), FAD, FMN, Riboflavin, Benzylviologen und Cumalinsäure wurden von den Firmen Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA), BioRad (Richmond, USA), Biomol (Hamburg, BRD), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, BRD), PerSeptive Biosystems GmbH (Hamburg, BRD), Roth (Karlsruhe, BRD) und Sigma (St. Louis, USA) bezogen. NAD<sup>+</sup>, L-Serin, D-Serin, D-Glycerat, L-Glycerat, die Methylester von (*R*) und (*2S*)-3-Hydroxyisobutyrat, 3-Hydroxypropionat, (*2R,3S*)-Threonin (D-Threonin), (*2R,3R*)-allo-Threonin (D-allo-Threonin), (*2S,3S*)-allo-Threonin (L-allo-Threonin), (*2S,3R*)-Threonin (L-Threonin) und (*3R*)-Hydroxybutyrat wurden von Sigma (Deutschland) bezogen. Strep-Tactin Chromatographie, HABA (Hydroxy-Azophenyl-benzoesäure, Regenerationspuffer) und Desthiobiotin (Elutionspuffer) wurden von IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) geliefert. THON und 2-(Hydroxymethyl)glutarat wurde von Dr. Dan Darley synthetisiert. (*2R*) und (*2S*)-3-Hydroxyisobutyrat wurden durch Verseifung aus den entsprechenden Methylester synthetisiert [64]

### 2.2 Geräte und Spektrometer

Die Absorptionsmessungen für Enzymtests der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase und Enamidase wurden mit Hilfe eines Uvikon Typ 943 Doppelstrahl-Spektrophotometers der Firma Kontron Instruments (Freiburg, BRD) durchgeführt. Spektren wurden mit diesem Gerät oder mit einem Typ 8453 Diodenarray-Spektrometer aufgenommen (Hewlett Packard, Wehrheim).

## 2.3 Bakterien, Vektoren und Bakteriophagen

*Eubacterium barkeri* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Nr. 1223, Braunschweig, BRD) bezogen.

**Tab. 2.1: Von *Escherichia coli* wurden die folgenden Stämme verwendet:**

<i>Escherichia coli</i>	Stamm	Herkunft
XL1-Blue MRF <sup>c</sup>	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 } supE44 \text{ thi-1 } recA1 \text{ gyrA96 } relA1 \text{ lac}[F' \text{ proAB } lacI^qZ \Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r)]$	Stratagene
BL21(DE3)	$F^- \text{ ompT } hsdS(r_B^- m_B^-) \text{ gal dcm (DE3)}$	Novagen (Heidelberg)[65]
XL0LR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 } thi-1 \text{ recA1 } gyrA96 \text{ relA1 } lac [F' \text{ proAB } lacI^qZ \Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r)] \text{ Su}^-(\text{nonsuppressing}) \lambda^r$ (lambda resistant)	Stratagene
TOP10 One Shot competent cells	$F^- \text{ mcrA } \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80 \text{ lacZ.M15 } \Delta \text{ lacX74 } recA1 \text{ deoR } araD139 \Delta(araleu) 7697 \text{ galU } galK \text{ rpsL (Str}^R) \text{ endA1 } nupG$	Invitrogen

**Tab. 2.2: Die folgenden Vektoren wurden verwendet:**

pBK-CMV vector	Phagemid- Klonierungs- und Expressionsvektor (4,5 kbp) mit hoher Kopienzahl, Kan <sup>r</sup>	Stratagene (Heidelberg)
pPR-IBA2 vector	Für Expression, Amp <sup>r</sup> , Carb <sup>r</sup>	IBA, GmbH, Göttingen
pCR <sup>TM</sup> II-Vektor	Klonierungsvektor, 3,9 kb, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Selektion über $\alpha$ -Komplementation möglich	Invitrogen

**Tab. 2.3:** Die folgenden Bakteriophagen wurden verwendet:

$\lambda$ -ZAP-Express <sup>TM</sup>	$\Delta cl$ , $\Delta att$ , $\Delta int$ , $\Delta xix$ , $\Delta WL113$ , $\Delta KH54$ , $\Delta nin5$ , <i>red</i> <i>gam</i> <sup>+</sup> , <i>bio</i>	Stratagene [66]
ExAssist <sup>TM</sup> Helferphage	f1-Helferphage	Stratagene

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *Lac* U169 ( $\Phi$ 80 *LacZ* $\Delta$ M 15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) [67] wurde für die Erstellung der eingeschränkten Plasmidgenbank, und für die Plasmidvermehrung verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C aerob auf Standard I Nährmedium (Merck) kultiviert.

Flüssigmedium : Standard I Nährmedium (Merck) 25 g pro Liter

Platten : Standard I Nährmedium mit 16 g Agar pro Liter

Die Vereinzelung und Stammhaltung von Plasmid-tragenden Klonen erfolgte auf Standard I Agarplatten, die Carbenicillin (100 $\mu$ g/ml, nach dem Autoklavieren zugesetzt) bzw. Ampicilin (100 $\mu$ g/ml) enthielten.

## 2.4 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

### 2.4.1 Kulturmedien und Wachstumsbedingungen

Der Organismus wurde in Flüssigkultur bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen in einem Komplexmedium kultiviert (Zusammensetzung siehe unten). Nach Zugabe des Reduktionsmittels (Cystein Hydrochlorid) wurden die Kulturgefäße sofort anaerobisiert. Filtersterilisiertes Natriumdithionit wurde nach Autoklavieren und Abkühlen zugegeben (0,2 g / L).

Zur Stammhaltung wurden 100-ml-Infusionsflaschen zur Hälfte mit noch heißem, vorher aufgekochtem Medium gefüllt und mit Butylgummistopfen sowie Aluminiumkappen verschlossen. Direkt nachher wurde die Luft in den Flaschen durch dreimaliges Evakuieren

und Begasen gegen Stickstoff ausgetauscht. Anschließend wurde 20 Minuten im Autoklaven bei 121 °C sterilisiert. Die Stammkulturen wurden steril mit 0,5 bis 2 % Inokulum angeimpft und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die hochgewachsenen Kulturen wurden bei 4 °C gelagert und in 4-Wochen-Abständen überimpft.

Zur Großzucht von *E. barkeri* wurde eine mit 1 L anaerobem Medium gefüllte 2-L-Infusionsflasche, mit 20 ml exponentiell wachsender *E. barkeri*-Kultur beimpft und 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die nächste Stufe wurde 9 L Medium in einer offenen 10 L Steilbrustflasche sterilisiert. Direkt nach Autoklavieren wurde das noch heiße Medium während der Abkühlung langsam mit Stickstoff steril durchgast. Das Animpfen der 9 L Kultur mit 500 ml der 1 L-Vorkultur erfolgte mit einer Doppelkanüle durch den Silikonstopfen. Nach 24 h bei 37 °C war die Vorkultur hochgewachsen und konnte als Inokulum für den mit ca. 90 L anaerobem Medium gefüllten Fermenter verwendet werden. Das Medium wurde direkt im Fermenter mit Hilfe eines Dampfgenerators sterilisiert und unter Stickstoff abgekühlt. Der pH Wert nach Autoklavieren wurde mit 20%iger HCl auf 8,2 eingestellt, und 25 g Natriumdithionit wurden zugegeben. Das Animpfen des Fermenters erfolgte mit Stickstoff-Druck über sterilisierte Schläuche. Nach 16 h bei 37 °C und langsamen Rühren betrug die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Kultur etwa 2,6. Die geerntete Zellmasse betrug 409 g und wurde in 10-20 g Mengen in Falcon Röhrchen bei -80 °C eingefroren.

*E. coli* DH5α wurde auf Standard I-Medium (Standard I-Nährbouillon, Merck, 25g/L) aerob bei 37°C kultiviert. *E. coli* XL1-Blue MRF9 wurde auf LB-Medium mit Maltose und MgSO<sub>4</sub> bzw. NZY Medium, *Escherichia coli* XL0LR auf LB-Medium aerob bei 30°C bzw. 37°C kultiviert. Die Belüftung der Flüssigkulturen wurde durch Schütteln der Erlenmeyerkolben erreicht.

Für die Herstellung fester Nährböden wurde den Medien Agar (Roth) in einer Endkonzentration von 1,6 % (bzw 0,7 % für Top-Agar), zugegeben. Für die Selektion oder Stammhaltung von Transformanten und Expressionsversuche wurden bei einer Temperatur des Mediums von ca. 50 °C, entsprechend der verwendeten Vektor-Systeme, Antibiotika sowie X-Gal und IPTG zugesetzt.

Die Sterilität wurde durch Autoklavieren (1 bar, 121 °C, 20 min) oder, bei thermolabilen Substanzen, durch Sterilfiltration (Filtervorsätze: 0,2 µm, Schleicher & Schuell) gewährleistet.



**Tab. 2.4:** Zusammensetzung des *E. barkeri* Mediums

	1 L	9 L	90 L
Hefeextrakt	20 g	180 g	1800 g
Nicotinsäure	10 g	90 g	900 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O (1 mM)	1 ml	9 ml	90 ml
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (10 mM)	1 ml	9 ml	90 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (10 mM)	1 ml	9 ml	90 ml
NaHCO <sub>3</sub>	4 g	36 g	360 g
<b>Salzlösungen</b>			
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0081 g	0,073 g	0,73 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,080 g	0,721 g	7,21 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,182 g	1,64 g	16,43 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,142 g	1,28 g	12,84 g
NaCl	0,08 g	0,72 g	7,2 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (20 mM)	1 ml	9 ml	90 ml
Cystein.HCl	0,5 g	4,5 g	45 g

Mit NaOH wird der pH auf 8,2 eingestellt.

**LB-Medium:**

NaCl 10g

Trypton 10g

Hefeextrakt 5g

auf pH 7,0 einstellen und mit Wasser auf 1 L auffüllen

**NZY-Medium:**

NaCl 5g

MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 2g

Hefeextrakt 5g

Casein-Hydrolysat 10

auf pH 7,5 einstellen und mit Wasser auf 1 L auffüllen

**M9-Minimalmedium:**

5 X M9-Salze	200 ml
20 % Glucose	20 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
0,5 % Thiamin	100 µl
Fe(II)SO <sub>4</sub> 4,2 mg/ml	1 ml
- mit Wasser auf 1 L auffüllen	

**5 X M9-Salze**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NH <sub>4</sub> Cl	5 g
NaCl	2,5 g
- mit Wasser auf 1 L auffüllen	

**Aminosäuren-Gemisch**

L-Lysin	100 mg
L-Phenylalanin	100 mg
L-Threonin	100 mg
L-Isoleucin	50 mg
L-Leucin	50 mg
L-Valin	50 mg
L-Selenomethionin	50 mg
mit Wasser auf 5 ml auffüllen	

**Tab. 2.5: Zusätze**

	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
X-Gal	40 mg/ml	40 µg/ml
1 M IPTG	250 mg/ml	verschieden

## 2.4.2 Präparation kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ Zellen für die Elektrotransformation

Standard I Medium (0,5 l) wurde mit 0,5 % (v/v) einer *E. coli* DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 bis 0,8 aerob kultiviert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (GSA-Rotor, 6000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in einem Volumen eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieses Resuspendieren und Abzentrifugieren wurde noch dreimal wiederholt, wobei das Resuspensionsvolumen sukzessive auf 1/2, 1/50 und 1/500 verkleinert wurde. Ab 1/50 Volumen wurden die Zellen nicht mehr in reinem Wasser, sondern mit 10 % Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellen wurden portioniert (50  $\mu$ l) und entweder direkt zur Elektrotransformation verwendet oder bei – 80 °C gelagert.

## 2.4.3 Elektrotransformation von *E. coli* DH5 $\alpha$

Kompetente Zellen (50  $\mu$ l) wurden aufgetaut und 1  $\mu$ l Ligationsansatz oder Plasmid-DNA wurde dann zugegeben und auf Eis aufbewahrt. Zellen und DNA wurden in eine auf Eis gekühlte Elektrotransformationsküvette (Gene pulser Cuvette, 0,2 cm Elektrodenspalt, PeQlab, Erlangen) überführt und unter folgenden Bedingungen mit einem Gene pulser<sup>TM</sup> (BioRad, München) transformiert: Widerstand 200 Ohm, Kapazität 25  $\mu$ F, angelegte Spannung 2,5 kV. Nach Ertönen des akustischen Signal wurde der Inhalt der Küvette sofort in einem Eppendorf mit 1 ml Standard I Medium (ohne Selektionsdruck) überführt, 1 h bei 37 °C aerob auf einem Schüttler inkubiert und anschließend auf Standard I Agarplatten mit Selektionsmarker (100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 40  $\mu$ g/ml X-Gal) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Derivate vom TOPO-Vector, die in ihrer multiplen Klonierungsstelle eine Fremd-DNA trugen, konnten aufgrund des Verlustes der  $\alpha$ -Komplementation in dem lacZ $\Delta$ M15 Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  auf Ampicillin/X-Gal-Platten identifiziert werden. Im Falle von pPR-IBA2 wurden rekombinante Klone durch Restriktion und Sequenzierung isolierter Plasmid-DNA identifiziert.

**Tab. 2.6: Puffer und Lösungen (Sambrook et al. 1989)**

Lösungen	Herstellungen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,4 oder 8,0
TAE-Puffer (50 X)	242 g Tris-HCl ; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; mit Wasser auf 1L.
SSC-Puffer (20 X)	175,3 g NaCl; 88,2 g Natriumcitrat; in 800 ml Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.
Farbmarker für Agarosegele	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylen cyanol FF, 0,25 % Orange G in 40 % (w/v) Saccharose in Wasser
Ethidiumbromid-Lösung	2 µg/ml

#### 2.4.4 Präparation von genomischer DNA aus *E. barkeri*

Genomische DNA wurde aus tiefgefrorenen Feuchtzellen (-80°C) extrahiert. 1 g Feuchtzellen wurde in 2 ml Tris-Saccharose-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 % Saccharose) aufgetaut. Nach Zugabe von 50 mg Lysozym wurde die Suspension 90 min vorsichtig bei 37 °C geschwenkt. Nach Zugabe von 2 ml Tris-EDTA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA) folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Die Zell-Lyse erfolgte anschließend durch Zugabe von 5 ml 1 % SDS (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA), 100 µg RNase, 10 mg Proteinase K und vorsichtiges Schwenken bei 37 °C (180 min). Proteine wurden durch dreimalige Phenolextraktion und einmalige Chloroform/Isoamyl-Behandlung [68, 69] aus dem Ansatz entfernt. Die DNA-haltige Phase wurde 24 h bei +4 °C gegen zweimal 5 L TE-Puffer dialysiert.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der genomischen DNA wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt ( $\Delta E_{260}/\Delta E_{280} = 1,8$  für saubere DNA und  $\Delta E_{260}/\Delta E_{280} \ll 1,8$  für mit Protein oder Phenol verunreinigte DNA).

### **2.4.5 Phenolextraktion von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen**

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an Tris-gepuffertem Phenol (pH 8,0, Rotiphenol, Roth) gemischt, und 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die wäßrige obere Phase wurde abgenommen und mit Phenol re-extrahiert bis keine weiße Interphase (denaturierte Proteine) mehr sichtbar war. Phenolische Verunreinigungen der wässrigen Phase wurden durch wiederholte Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) beseitigt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

### **2.4.6 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen**

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,5, und dem zweifachen Volumen 96 % Ethanol (-20 °C) versetzt. Nach der Fällung für 30 min bei -80°C wurde die DNA 30 min abzentrifugiert (12000 x g), mit 70 % Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen und 20 min bei 37 °C getrocknet und im Wasser aufgenommen.

### **2.4.7 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Bei Aufreinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion werden gleiche Volumina DNA-Lösung und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 gesättigt in TE-Puffer) gevortext und 20 min zentrifugiert (4000 x g bei 4°C). Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut in demselben Volumen Phenol-Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wie oben, wird die wässrige Phase abgenommen, die DNA gefällt und in 1xTE-Puffer oder H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von DNA-Fragmente (nach [69]) wurden 0,8 - 1,2 %ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarose (Sigma) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Erwärmen gelöst und bei einer Temperatur von ca. 60 °C auf eine mit einem geeigneten Kamm versehene Glasplatte gegossen. Die DNA-Proben wurden 1:5 in Probenpuffer verdünnt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Zur Herstellung des Größenmarkers wurden 50 µg λ-DNA (Fermentas, Vilnius, Litauen) mit 100 U *Pst*I in einem

Gesamtvolumen von 225 µl des zugehörigen Puffers über Nacht verdaut. Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 100 V und einer Stromstärke von ca. 50 mA statt. Die DNA wurde nach Einlegen des Gels in eine Ethidiumbromid-Lösung auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht.

## **2.4.9 Elution von DNA aus Agarose-Gelen**

Durch kurze Betrachtung der Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gele auf dem UV-Schirm (70 % Leistung) wurden die DNA-Fragmente lokalisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Danach erfolgte eine Gelextraktion (QIAquick Gel Extraktion Kit, QIAGEN GmbH) nach dem Protokoll des Herstellers, um die Fragmente aus dem Gel zu isolieren.

## **2.4.10 Präparation von Plasmid-DNA mit Qiaprep Spin Plasmid Kit**

Zur Gewinnung von Plasmidminipräparationen für Restriktionsanalysen und Doppelstrangsequenzierung, wurden transformierte Einzelkolonien von *E. coli* DH5α mit einer sterilen Spitze von der Agarplatte gepickt, in 3 ml Standard I-Medium (Carbenicillin, 100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C aerob inkubiert. Die mittels Anionenaustauscher-Säulen (QIAGEN Inc., Chatsworth, USA) isolierte DNA war hinsichtlich des erzielten Reinheitsgrades und der Konzentration, für Klonierungen und Sequenzierungen geeignet. Von einer Übernachtskultur wurden 3 ml abzentrifugiert und in 250 µl Puffer P1 (100 µg/ml RNaseA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugesetzt und der Ansatz 5 mal vorsichtig über Kopf geschwenkt. Nach Zugabe von 350 µl Puffer P3 (3 M Kalium-Acetat pH 5,5) wurde der Ansatz erneut geschwenkt und das entstandene Präzipitat mittels einer Zentrifugation von 10 min in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde auf die Säule mit Sammelgefäß gegeben und für 1 min zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde entleert und die Säule mit 750 µl PE-Puffer [1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol (pH 7,0)] gewaschen. Zur Elution der DNA wurden 35 µl steriles Wasser auf die Säule pipettiert und nach einer 1 minütigen Inkubation in ein Eppendorfggefäß zentrifugiert.

### 2.4.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm (mit einem Hewlett Packard Typ 8453 Diodenarray-Spektrometer) aufgenommen. Die DNA-Konzentration (in mg/ml) wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{genomische DNA}] = \Delta E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.4.12 Restriktion von DNA

Für Klonierungen wurden Plasmide mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 15-20  $\mu\text{l}$  in dem vom Hersteller angegebenen Puffer geschnitten. Die beiden Enzyme sollten nach Herstellerangaben mindestens zu 75% in 1 h schneiden. War das nicht möglich, wurden die Verdauungen nacheinander durchgeführt, wobei als erstes das Enzym mit dem niedrigeren Salzgehalt angesetzt wurde. Nach dem Umpuffern des ersten Ansatzes wurde das zweite Enzym im empfohlenen Puffer angesetzt und bei einer Temperatur von 37°C für 2 h inkubiert. *BsaI* war eine Ausnahme und wurde bei 55°C inkubiert. Die vollständige Restriktion wurde im Agarosegel (0,8-1%) überprüft.

### 2.4.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR= *Polymerase Chain Reaktion*) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Zwei ausgewählte Oligonukleotide (MWG AG Biotech), auch Primer genannt, legen die äußere Begrenzung der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz fest. Nach Hitzedenaturierung des zu analysierenden DNA-Gemisches bei 95°C hybridisieren die Primer mit der Zielsequenz bei der Annealing-Temperatur, die etwa

5°C unter der Temperatur  $T_m$  liegt, bei der 50% der Primerstränge denaturiert sind.  $T_m$  ist von der Basenzusammensetzung und Länge der Primer abhängig und errechnet sich nach folgender Formel:  $T_m = (A+T)*2 + (G+C)*4$  (in °C). Für jede Reaktion wurde etwa 50 bis 100 ng genomische DNA als Template eingesetzt. Das Reaktionsgemisch (50 µl) beinhaltete neben der thermostabilen *Pfu*UltraHot-Start (1 unit), die den Komplementärstrang synthetisiert, PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Amersham), einzelne Nukleotide (2,5 mM; Sigma) und Primer (0,2 µM). Um unspezifische Primer Bindungen zu vermeiden, wurde eine *Pfu*UltraHot-Start PCR benutzt, indem die Proben direkt nach dem Pipettieren kurz auf 95°C erhitzt wurden. Es wurden jeweils 30 Zyklen durchlaufen. Mit Hilfe von Gradienten-PCRs wurden Versuche zur Optimierung der Annealing-Temperatur durchgeführt.

**Tab. 2.7: Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
Nico_21for	GACCATGCATTGTAAGACCGGAGC	AC und AG
Nico_22for	GCATCTTCCGGGTTCTTAATAGTCC	AC und AG
Nico_25rev	CTCCAATGTATTCCTCGACAGG	AD10
Nico_27for	TGAAGGCCCAAAGTGCTTCGG	AD10
Nico_26for	GTGCTCTGGAAATTGGTCTGG	AH1
Nico_84rev	CACCATACCGAAATACACTTCC	AH1
Nico_103for	ACCTCATCCTCCACATCATCG	AE4
Nico_107rev	CGGCGATGAGGGTTTGCATG	AE4
Nico117_rev	GGTGTCGTAGTCTTTGAAGGC	AR
Nico112_iPCR	AAGCTGGAGATGAAGTCGAGG	AR

Die PCR-Produkte wurden mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit, der den pCR<sup>™</sup>II-Vektor und den One Shot<sup>®</sup> Competent *E. coli* (Invitrogen) enthält, nach dem Protokoll des Herstellers kloniert. Diese von Invitrogen patentierte Methode erlaubt die direkte Ligation von gereinigten PCR Produkten in diverse Klonierung - TOPO TA) mit einer wesentlich höheren Ligationseffizienz als die klassische Ligation mit T4-Ligase. TOPO-Vektorlösungen enthalten linearisierten Vektor mit 3'-T-Überhängen, die komplementär zu den von der Taq-DNA-Polymerasen erzeugten 5'-A Überhängen sind. Die Ligation wird von einer mit den Vektorenden assoziierten Topoisomerase vermittelt. Für die Ligationsreaktion nach Herstellerprotokoll wurden PCR Produkt und Vektorlösung in einem Gesamtvolumen von 6 µl gemischt, 5 min bei RT inkubiert und die Reaktion mit einer konzentrierten Salzlösung (0,3 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) gestoppt. Das Ligationsprodukt wurde direkt zur Elektroporation (Transformation) eingesetzt.



#### 2.4.14 Erzeugung von A Überhängen für die TA Klonierung

In einigen Fällen wurden PCR Produkte mit Hilfe des „TOPO TA Cloning® Kit“ in den geöffneten, aktivierten Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert. Dieser stellt an seiner Klonierungsstelle T-Überhänge bereit. Voraussetzung dafür, dass ein PCR Produkt erfolgreich ligiert werden kann, sind die mitgebrachte 3'-A-Überhänge. Diese werden bei der Amplifizierung von DNA mit nicht Proofreading Polymerasen (z.B. Taq) automatisch generiert. Die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der Proofreading Polymerasen (z.B. *Pfu*UltraHotstart-Polymerase) verhindert aber die Erzeugung solcher A-Überhänge während der PCR, was dazu führt, dass die PCR Produkte glatte Enden haben. Solche PCR Produkte werden zur Ligation mittels „TOPO TA Cloning® Kit“ mit Taq Polymerase vorbehandelt, indem dem PCR-Ansatz 5 U Taq-Polymerase/50 µl Gesamtvolumen und 160 µM dATP zugesetzt werden und der Ansatz 10 min bei 72°C inkubiert wird.

#### 2.4.15 Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter Klone

Zur Selektion von Transformanden, die ein Insert im Plasmid enthielten, wurde dem Agar IPTG (48 µg/ml) und β-D-Galactosid (X-Gal; 40 µg/ml) zugesetzt (Horowitz et al., 1964). Der verwendete *E. coli* Klonierungsstamm DH5α ist durch eine Deletion im *lacZ*-Gen gekennzeichnet und kann daher keine aktive β-Galactosidase mehr bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pCR2.1, die über das Gen der α-Untereinheit der β-Galactosidase verfügen, in dem sich wiederum die Multiklonierungsstelle befindet, kommt es zur Bildung eines aktiven Enzyms. Dies kann auf X-Gal und IPTG-haltigen Platten sichtbar gemacht werden, auf denen das *lacZ*-Gen durch IPTG induziert wird und die β-Galactosidase das Glukoseanalogon X-Gal spaltet, wonach durch Luftoxidation ein blauer Farbstoff entsteht. Soll in die Multiklonierungsstelle des Plasmides ein Insert ligiert werden, kann man den Erfolg der Insertion nach Transformation anhand der Kolonienfarbe sehen. Zellen, die Plasmide mit einer Insertion in der Multiklonierungsstelle und damit im *lacZ*-Gen beinhalten, können keine aktive Galactosidase bilden und erscheinen weiß (Blau/Weiß-Selektion).

### 2.4.16 DNA-Transfer auf Membranen (Southern Blot-Technik)

Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt und der Verdau auf Vollständigkeit überprüft. Anschließend wurde die DNA mit einem Vakuum System für den Transfer von DNA aus Agarosegel auf Membranen (VacuGene XL, Pharmacia LKB) nach den Angaben des Herstellers unter den folgenden Bedingungen auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond RPN 303N, Amersham, Braunschweig) übertragen.

**Tab. 2.8: Lösungen und Bedingungen für den DNA-Transfer**

Lösungen	Zusammensetzung	Einwirkdauer	Unterdruck
1. Depurinisierungslösung	0,25 M HCl	10 min	40 mbar
2. Denaturierungslösung	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl	10 min	40 mbar
3. Neutralisierungslösung	1,0 M NH <sub>4</sub> Acetat pH 7,0	10 min	40 mbar

Nach der Fixierung der DNA durch UV-Quervernetzung (beidseitig, Programm: Auto Cross link, UV Stratalinker<sup>TM</sup> 2400, Stratagene) konnte die Membran für Hybridisierungen eingesetzt werden.

### 2.4.17 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels PCR (Sonde C und T)

Die Digoxigenin-markierten DNA-Sonden wurden nach dem gleichen PCR-Protokoll wie zur Amplifizierung von DNA-Fragmente hergestellt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass statt von 5 µl dNTP-Gemisch nur 2 µl dNTP-Gemisch und zusätzlich 1,5 µl Markierungsgemisch mit Digoxigenin-markiertem dUTP (dNTP-Labeling Mixture, Boehringer Mannheim) eingesetzt wurden. Die markierten homologen DNA-Sonden wurden zur Hybridisierung mit auf Membranen fixierten Nukleinsäuren eingesetzt.

**Tab. 2.9: Primern:**

NE01_for	GATGGCCACGTTGAAACCTAC	Sonde C
NE01_rev	GCATACTCTCCTCATTCCAC	Sonde C
Nico41_for	GCAGGAGGGACAGATTTGG	Sonde T
Nico41_rev	TCCATGGTTTCCATGGTCAGG	Sonde T

### 2.4.18 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels DIG DNA Labeling Kit (Sonde K und M)

Zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde für die Southern-Hybridisierung wurde der DIG-labeling Mix (Boehringer Mannheim) verwendet. Zwischen 50-1000 ng aufgereinigtes Fragment in 14 µl TE werden 10 min. bei 95°C in Wasserbad denaturiert, schnell abzentrifugiert (13000 rpm, 10 sec) und auf Eis abgekühlt. Zu dem Fragment werden 2 µl dNTP-Gemisch (10x) und 2 µl dNTP-Markierungsgemisch (10x) pipettiert, gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (5 U) gestartet. Die Markierungsreaktion erfolgt Über Nacht. Anschließend wurden 2 µl EDTA (200 mM) dazugegeben. Sonde K ist *EcoRI/PstI* Fragment und wurde vom 1,5 kbp *EcoRI-EcoRI* Klon hergestellt. Sonde M wurde vom AD10 Klon durch Verdauen mit *EcoRI* hergestellt.

### 2.4.19 Hybridisierung von DNA mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Prähybridisierungslösung: 5 x SSC  
 1 % Blockierungsreagenz  
 0,1 % N-Laurylsarkosin  
 0,02 % SDS

Hybridisierungslösung: Digoxigenin-markierten DNA-Sonde 1:1000 verdünnt in  
 Prähybridisierungslösung

Die Membran mit der gebundenen DNA wurde 1 h bei 68 °C mit 20 ml Prähybridisierungslösung gegen unspezifische Bindungen abgesättigt. Die markierten DNA-Sonden wurden direkt vor dem Gebrauch denaturiert (5 min, 95 °C). Die Membran wurde mit

3 ml Prähybridisierungslösung und ca. 100 ng der Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (homologe DNA-Sonde) zur Hybridisierung in einen passendes Glasröhrchen eingeführt. Die Membran wurde im Drehofen bei 68 °C über Nacht in 30 ml Hybridisierungslösung inkubiert.

#### 2.4.20 Nachweis von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Puffer I:	0,1 M Maleinsäure pH 7,5 0,15 M NaCl
Puffer II:	1 % Blockierungsreagenz (Milchpulver)in Puffer I
Puffer III:	0,1 M Tris-HCl 0,1 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> auf pH 9,5 mit 5 M NaOH einstellen
Färbereagenz:	45 µl NBT-Lösung (Nitroblau-Tetrazolium-Salz, Roth, 75 mg /ml 70 % DMF) 35 µl X-Phosphat-Lösung (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat, Toluidinium-Salz, Roth, 50 mg/ml in 100 % DMF) in 10 ml Puffer III

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zweimal 1 min mit Puffer I gewaschen und anschließend 30 min mit 25 ml Puffer II bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Puffer I folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (150 U/ml, 1:5.000 in Puffer II). Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit Puffer I (zweimal 15 min) entfernt. Nach Äquilibrierung der Membran in Puffer II (2 min) erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe von 5 ml Färbereagenz (30 min bis 16 h im Dunkeln). Die Färbung wurde durch intensives Spülen der Membran mit Wasser gestoppt. Die Membranen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und für eine spätere Dokumentation im Dunkeln aufbewahrt.

### **2.4.21 Reinigung von PCR-Produkten**

Die Reinigung präparativ amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem "*QIAquick PCR Purification Protocol*" (QIAGEN GmbH, Hilden).

### **2.4.22 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Um eine Selbstligation von geöffneten Vektoren zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Enden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP; Calf Intestine Alkaline Phosphatase) entfernt. In der Regel wird nach Ende des präparativen Restriktionsverdau 1-10 U CIP pro  $\mu\text{g}$  DNA direkt in den Verdau pipettiert und für 30 min. weiter bei 37°C inkubiert. Ein Entfernen der CIP ist nicht nötig, wenn der Verdau über ein Gel gereinigt wird. In Fällen, in denen dies nicht ausreichend ist, wird die DNA mit Ethanol gefällt, in 20  $\mu\text{l}$  CIP Puffer aufgenommen und mit 1-10 U CIP pro  $\mu\text{g}$  DNA für 1 h bei 37°C inkubiert. Die CIP kann alternativ zum Gel durch 20 min. Erhitzen auf 70°C deaktiviert und durch anschließende Ethanolfällung entfernt werden. Die vollständige Dephosphorylierung wird über eine Kontrolligation des Vektorfragments getestet. Es dürfen nur sehr wenige Bakterienkolonien wachsen.

### **2.4.23 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 16  $\mu\text{l}$ . Das Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA betrug ca. 1:4. Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase (Stratagene, Heidelberg) und in einem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, der ATP enthielt, durchgeführt. Es wurde 1 U T4-Ligase zugegeben und kurz gemischt. Die Ligationen wurden entweder 2 bis 3 h bei Raumtemperatur oder Über Nacht bei 16 °C h inkubiert.

### **2.4.24 Die Mikrodialyse**

Die Mikrodialyse wurde durchgeführt, um Restriktionspuffer bei Doppelverdauen zu wechseln und zur Entsalzung von Ligationsansätzen, die zur Elektroporation eingesetzt werden sollten. Dazu wurden ca. 20 ml Wasser in eine sterile Petrischale gefüllt und ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,025 mm (Millipore GmbH, Eschborn) auf die

Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die DNA-Probe wurde auf den Filter aufgetropft und nach 30-60 min. wieder abgenommen. Der Ansatz konnte dann sofort transformiert werden.

### 2.4.25 Genome Walking

Für das Ableiten der Probe T und M sowie für das Ableiten von Primern für die PCR/TA Klonierung der 5'- und 3'-Ende des Nicotinat Locus wurde die von von Dr. Fackelmayer (GATC, Konstanz) direkte chromosomale Sequenzierung [70] durchgeführt. Diese Methode braucht relativ große Mengen sehr sauberen konzentrierten chromosomale DNA und ergibt im günstigen Fall Sequenzen von 200-500 Basen. Die Qualität der Sequenz ist jedoch niedriger als beim Sequenzieren von Plasmiden. Auch erfolgt aus Kostengründen die Sequenzierung nur in einer Richtung. Deswegen war es notwendig die Ergebnisse durch PCR Amplifikation und TA-Klonierung zu überprüfen. Die direkte chromosomale Sequenzierung in der 3'-Richtung von *DmdB* funktionierte leider in einen Bereich mit hohem GC Gehalt Gen nicht weiter. Deswegen wurde in diesen Bereich zusätzlich Seegene Speedwalking (Seegene, Seoul, Süd Korea) benutzt. Diese PCR-Methode bietet die Möglichkeit ausgehend von einer bekannte DNA Sequenz durch niedrig spezifische Hybridisierung von Annealing Control Primer [71] Fragmente mit zusätzlicher DNA aus benachbarten Sequenzbereiche zu amplifizieren. Durch Benutzen von 'nested' PCR bezüglich Primern aus dem bereits bekannten Bereich wird die Spezifität gewährleistet. Diese Methode wurde im Auftrag und in Zusammenarbeit mit Dr. Knobloch (Seqlab, Göttingen) durchgeführt.

### 2.4.26 Herstellung einer $\lambda$ -ZAP-Express-Genbank

Bei der Erstellung von Genbanken müssen grundsätzlich zwei Arten unterschieden werden: die genomische Genbank und die cDNA-Bank. Eine genomische Genbank beinhaltet das gesamte Genom eines Organismus. Dafür zerschneiden bestimmte Restriktionsenzyme das Genom (die DNA) an vielen Stellen. Das Ergebnis ist eine große Zahl von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, die man in Vektoren einbringen kann. Bei dieser Methode wird jedoch nur ein Teil aller DNA-Fragmente als vollständige Gene enthalten, viele werden nur aus Teilen eines Gens bestehen und die meisten werden nur nicht-codierende Sequenzen enthalten, die in höheren Organismen den größten Teil des Genoms ausmachen. Mit dem  $\lambda$ -ZAP-Express-System (Stratagene) wurde nach dem Protokoll des Herstellers eine chromosomale *EcoRI*, *BamHI*, *BamHI-BglII* - Genbank von *E. barkeri* hergestellt.

Die aus *E. barkeri* isolierte genomische DNA wurde über Nacht mit den oben genannten Restriktionsenzymen vollständig verdaut und mit Ethanol gefällt. Diese DNA-Fragmente (400 ng) wurden mit der geschnittenen und dephosphorylierten  $\lambda$ -ZAP-Express-DNA (1  $\mu$ g, ZAP-Express<sup>TM</sup>/Predigested Vector Kit: *Bam*HI/CIAP-treated, Stratagene) ligiert. Die erhaltene  $\lambda$ -ZAP-Express/Insert-DNA wurde mit einem Verpackungsextrakt (Gigapack<sup>®</sup> II Gold Packaging Extract, Stratagene) nach den Angaben des Herstellers in  $\lambda$ -Hüllproteine verpackt. Anschließend wurde die  $\lambda$ -ZAP-Express-Genbank in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>7</sup> amplifiziert (Titer: ca.  $10^8$ -  $10^9$  pfu/ml).

#### 2.4.27 Identifizierung positiver $\lambda$ -ZAP-Express-Klone

Bei erfolgreicher Infektion waren am nächsten Tag Phagen-Plaques im dicht gewachsenen *E. coli* Rasen zu sehen. Um die Platte nach einem bestimmten Klon zu screenen, mussten zuerst Replika von den Platten hergestellt werden. Dies geschah, indem eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) für ca. 2 min auf die Phagen-Platten gelegt wurde, wodurch durch Adhäsion Phagenpartikel an der Membran festgehalten wurden. Danach erfolgte die Fixierung der  $\lambda$ -Phagen an die Membran. Die DNA wurde durch UV-Quervernetzung (beidseitig, Programm: Auto Cross Link, UV Stratalinker<sup>TM</sup>2400, Stratagene) auf der Membran fixiert. Mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde wurde die Genbank nun nach positiven Phagenklonen durchgesucht. Die entsprechenden Phagenplaques wurden mit Pasteurpipetten ausgestochen bzw. mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben, das 600  $\mu$ l SM Puffer enthielt. Damit sich die Phagen aus dem Agar lösen konnten, wurden noch 50  $\mu$ l Chloroform zugegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert. Diese Phagen sollten erneut ausplattiert werden.

**Tab. 2.10: Lösungen und Inkubationsdauer für die Fixierung von Phagen-DNA auf Nylonmembranen**

Lösung	Inkubationsdauer	Zusammensetzung
I	2 min	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
II	5 min	1,5 M NaCl 0,5 M TrisHCl (pH 8,0)
III	30 sec	0,2 M TrisHCl (pH 8,0) 2 x SSC

---

SM-Puffer.	Pro 1 L 5,8 g NaCl 2,0 g MgSO <sub>4</sub> 50 ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 5 ml 2 % Gelatine
20 x SSC	pro 1 L 175,3 g NaCl 88,2 g Na Citrat pH 7,0 wurde mit 10 M NaOH eingestellt

#### 2.4.28 Exzision des Phagemids pBK-CMV aus dem $\lambda$ -ZAP-Express-Vektor

Die Exzision des Phagemids pBK-CMV mit dem klonierten DNA-Fragment wurde mittels Ko-Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF mit den identifizierten  $\lambda$ -Phagen und dem filamentösen Helferphagen ExAssist<sup>TM</sup>, einem M13-Derivat mit zyklischem Genom, durchgeführt.

Zwei Sequenzregionen (Initiator und Terminator) auf dem linearen  $\lambda$ -Zap-Express-Vektor werden durch das Gen II-Protein des Helferphagen erkannt. Ein neuer DNA-Strang wird synthetisiert, der den vorhandenen Strang verdrängt. Der synthetisierte DNA-Strang wird zirkularisiert und von Proteinen des Helferphagen als filamentöser M13-Phage verpackt. Die Phagen werden aus den *E. coli*-Zellen freigesetzt.

Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert und mit den im Überstand befindlichen Phagen wurde *E. coli* XL0LR infiziert. Dieser Stamm kann aufgrund fehlender Rezeptoren nicht von  $\lambda$ -Phagen, die als Verunreinigung im Lysat vorliegen könnten, infiziert werden. Die M13-Phagen dagegen können *E. coli* XL0LR infizieren. Sie können sich jedoch in diesem Stamm nicht replizieren. Da das Phagen genom (Phagemid) einen colE1-Replikationsursprung trägt, wird es von den *E. coli*-Zellen als Plasmid repliziert. Die Plasmid-tragenden Klone können auf Kanamycin-Agarplatten identifiziert werden, da pBK-CMV ein entsprechendes Resistenzgen trägt.



## 2.4.29 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden bei MWG (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Für Sequenzreaktionen wurden entweder universelle plasmid- oder interne insertspezifische Primer verwendet und die Reaktionsprodukte mit einem ABI Prism 377 Automated Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems) aufgetrennt.

## 2.5 Expression und Reinigung

### 2.5.1 Herstellung der *Hgd*, *Hmd*, *Ena* und *Hnr* Expressionsvektoren

Tab. 2.11 zeigt die gesamte Oligonukleotide. Alle wurden HPLC gereinigt von der Firma Metabion bezogen. Die synthetische *hgd*, *hnr*, *hmd* und *ena* Gen-Sequenzen wurden durch PCR mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Die Primer wurden an den Enden durch Anfügen von Restriktionsschnittstellen modifiziert. Als Oligonukleotide wurden die in der Tab. 2.11 dargestellte Primers eingesetzt. Die amplifizierte (*hgd*, *hnr* und *hmd*) DNA wurde mit der Restriktions-Endonuklease *BsaI* nachgeschnitten, und in den mit *BsaI* geschnittene pPR-IBA2 Vektor kloniert. Für Enamidase wurde das PCR Produkt mit den Restriktions-Endonukleasen *BamHI* und *KspI* (Roche) geschnitten, mit SAP für 1h behandelt und in den mit *KspI/BamHI* geschnittene pPR-IBA2 Vektor kloniert.

**Tab. 2.11: Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung und Restriktionsenzyme
Hnr_for	ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGTTAAAA TTGATGAAGAAAAGTGTAAAG	pPR-IBA2 Klonierung von HNR N-terminal Strep, <i>BsaI</i>
Hnr_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATTGTACTCG GACACATCTTTGATC	pPR-IBA2 Klonierung von HNR N-terminal Strep, <i>BsaI</i>
Hgd_for	ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGGAAAAA TCAATTAATAATTGGATTTATCG	pPR-IBA2 Klonierung von HGD N-terminal Strep, <i>BsaI</i>
Hgd_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATTGCCCTCCT GAAACTGAAACGC	pPR-IBA2 Klonierung von HGD N-terminal Strep, <i>BsaI</i>
Ena_for	ATGGTACCGCGGTTATGAGTAAACAA TTATCAAAAACATTGG	pPR-IBA2 Klonierung von Ena N-terminal Strep, <i>KspI</i>
Ena_rev	ATGGTAGGATCCTTATAAAATCTTTGCA GCTCTTTTGC	pPR-IBA2 Klonierung von Ena N-terminal Strep, <i>BamHI</i>
Hmd_for	ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGAAGGCC ATGACAGAATTAAGAC	pPR-IBA2 Klonierung von Hmd N-terminal Strep, <i>BsaI</i>
Hmd_rev	ATGGTAGGTCTCATATCAATCCACCAGC TGAACGCCAATTTC	pPR-IBA2 Klonierung von Hmd N-terminal Strep, <i>BsaI</i>

## 2.5.2 Strep-Tag Expressionssystem

Es wurde das Strep-Tag Expressionssystem der Firma IBA verwendet. Es wurden immer frisch transformierte Klone für die Fremdgenexpression benutzt. Für Expressionskulturen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches Medium überimpft und im Schüttelinkubator bei 30°C oder 37°C inkubiert. Durch Zugabe von IPTG, 1,5 mM für *Ena* und 3 mM Endkonzentration für *Hgd*, erfolgte die Induktion des T7-Promotors. Die optimalen Induktionsbedingungen wurden für alle Fremdproteine getrennt ermittelt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (5.000 x g, 4°C, 10 min.) sedimentiert und bei -20°C gelagert.

## 2.5.3 Heterologe Expression von 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (Hgd)

Das in den Expressionsvektor pPR-IBA2 klonierte Gen der *Hgd*, wurde in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Standard I-Medium mit Carbenicillin bei 37°C aerob auf dem Schüttler kultiviert. Bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression von *Hgd* durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 3mM) induziert, und die Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler Über Nacht fortgesetzt. Die Zellen, ca. 4g/L, wurden 20 min. bei 5.000 x g abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

## 2.5.4 Heterologe Expression von Enamidase

Die Expression von *Ena* erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3). Dafür wurde von einer Plattenkultur eine Einzelkolonie in 200 ml LB-Medium überführt, welches 100 µg Carbenicillin als Antibiotikum enthielt, und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 4 L LB-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in zwei 5 L-Schikanekolben. Die OD<sub>600</sub>-Werte wurden gegen steriles LB-Medium als Leerwert gemessen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Kultur mit 1,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und für 3 h bei 30 °C weiterinkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 2,1 Abzentrifugiert (6000 rpm, 20 min, 4°C). Für die Expression des Selenomethionin-Derivats von *Ena* wurde der gleiche *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. Die Selenomethionin-Inkorporation erfolgte auf Minimalmedium. Dazu wurden die in 20 ml LB-Medium gewachsenen Zellen der Vorkultur vorsichtig abzentrifugiert und in der gleichen Menge Minimalmedium wieder

resuspendiert. Die Animpfung von 4 l Minimalmedium mit den Antibiotika Carbenicillin wurde dann in 10 L-Schikanekolben mit dieser Vorkultur durchgeführt. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 nach 15-minütigen Inkubation und Zugabe von 5 ml/L Aminosäure Gemisch (siehe Medien). Nach Induktion wurden die Zellen für 5 h bei 37 °C inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Abzentrifugation (5.000 x g, 20 min., 4°C) bei einer  $OD_{600}$  von 1,3.

### **2.5.5 Aufschluss der Bakterienzellen**

Zum Aufschluß wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in ca. 20 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert. Danach wurde das Homogenat 3 x 30 s im einem Rosettengefäß im Eisbad sonifiziert (Sonorex Super; Stufe 4, 50% Impulsdauer) und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (30 min. bei 100.000 x g) abgetrennt. Der Überstand wurde für weitere Analysen verwendet.

## **2.6 Biochemische Methoden**

### **2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford [72] photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin-Lösung (1mg/ml) (BSA) in den Konzentrationen 0,1 bis 15 µg/ml im Absorptionsbereich vom 0 bis 1,2 erstellt [73]. Bradfordreagenz 200 µl (BioRad, München) wurden 1 bis 50 µl Probenlösung versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Nach 20 min. Inkubation bei RT im Dunkeln, wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Konzentrationsbestimmungen wurden darüber hinaus auch photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Dazu wurden 1 - 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit Wasser auf 1 ml Volumen in Quarzküvetten aufgefüllt und die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die gemessene Extinktion wurde durch den aus der Sequenz berechnete Extinktionskoeffizient [74] dividiert und ergab die Proteinkonzentration in mg/ml unter Berücksichtigung der jeweiligen Proteinverdünnung.

## 2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Protean-II-Elektrophorese-Apparatur der Firma BioRad (München, BRD) nach Laemmli [75] durchgeführt. Um die apparente Größe der Untereinheiten von Proteinen untersuchen zu können, wurden 15%-ige SDS-PAGE-Gele angefertigt, welche nach Polymerisation mit einem 5%-igen Sammelgel überschichtet wurden. Die Größe der gegossenen Gele betrug  $9 \times 7 \times 0,15$  cm.

**Tab. 2.12: Zusammenstellung des 15%-iges Trenngels:**

1 M Tris/HCl, pH 8,8	3,00 ml
H <sub>2</sub> O	1,37 ml
10 % SDS	0,085 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (40 % / 1,6 %)	2,75 ml
5 % TEMED	0,085 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	0,115 ml

Die obengenannte Mischung wurde in die zusammengepresste Elektrophoresekammer bis zu einem Abstand von 1,5 cm zum oberen Rand der Ohrenplatte eingefüllt, mit Wasser überschichtet und für mindestens 15 min zum Polymerisieren erschütterungsfrei stehengelassen. Danach wurde das Wasser entfernt und die Geloberfläche mit neuem Wasser gewaschen. Auf das Trenngel wurde nun das Sammelgel bis zum oberen Rand der Ohrenplatte aufgetragen. Die Proteine wurden im elektrischen Feld bei einer konstanten Spannung von 180 V aufgetrennt. Die Elektrophorese war beendet, wenn der Bromphenolblau-Marker das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1h).

## 2.6.3 Coomassie Färbung

Polyacrylamidgele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung kurz zum Sieden erhitzt, 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien und die einzelnen Proteinbanden deutlich hervortraten.

---

Probenpuffer:	125 mM Tris/HCl (pH 8,0) 4 % SDS 10 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,25 % Bromphenolblau
Elektodenpuffer:	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Färbelösung:	0,1 % Coomassie-Brillantblau R250 7 % (v/v) Essigsäure 14 % (v/v) Methanol
Entfärber:	7 % (v/v) Essigsäure 14 % (v/v) Methanol

#### 2.6.4 Reinigung über das *Strep-tag II* Protein Reinigungssystem

Mittels des *Strep-tag II* Überexpressionssystems konnten exprimierte Proteine in einer Einschritt-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Reinigung des Target-Proteins wird N-terminal ein *Tag* eingefügt, der aus 8 Aminosäuren (MWSHPQFEK) besteht. Dieser *Strep-tag* bindet spezifisch an *StrepTactin*, das als Säulenmaterial verwendet wurde. Weiterhin beeinflusst dieser kurze *Tag* normalerweise weder Proteinlokalisierung noch Proteinfaltung. Unspezifisch bindende Proteine konnten während eines Waschschrittes entfernt werden, während das Target-Protein spezifisch, durch Austausch der Bindung mit Desthiobiotin, von der Säule eluiert werden konnte.

Die Säule wurde mit 5 Vol Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 150 mM NaCl) equilibriert. Die Zellextrakte, welche das gewünschte *Strep-tag II*<sup>®</sup>-Fusionsprotein enthielten, wurden auf die Säule gegeben, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial band. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Waschen mit 10 Vol. Puffer W entfernt. Das Target-Protein wurde mittels 3-4 Vol. Puffer E (2,5 mM Desthiobiotin in Puffer W) eluiert. Das Säulenmaterial wurde durch Spülen mit 10 Vol. Puffer R (1 mM HABA in Puffer W) regeneriert.

## 2.6.5 Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membran (Westernblot)

Proben gereinigter 6-Hydroxynicotinat Reduktase von *E. barkeri* (für Reinigung des Proteins siehe [27]) wurde über SDS-PAGE in einem 10 %igen Gel aufgetrennt und anschließend durch Elektroblothing in einer Semi-dry Transfer Zelle (Trans-blot SD, BioRad, München) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P Transfer Membran, Millipore) übertragen. Als Transferpuffer diente 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 10 % (v/v) Methanol. Der Elektrotransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA über 1 h bei Raumtemperatur. Transferte Proteine wurden kurz mit 0,1 % Coomassie Brilliantblau R-250 in Methanol/Wasser/Eisessig (5:4:1) angefärbt. Die Entfärbung erfolgte 2 min mit Wasser/Methanol (1:1). Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit Seradest bei Raumtemperatur gewaschen und über Nacht bei 4 °C gegen 5 L Seradest dialysiert, um das Glycin zu entfernen. Die 55 kDa Proteinbande wurde aus der PVDF-Membran herausgeschnitten. Die N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abau wurde von Dr. D. Linder am Biochemischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

## 2.6.6 Bestimmung von Zink

Bestimmung von Zink wurde durch Komplexierung mit 4-(2-Pyridylazo)-resorcin (PAR) gemacht. PAR ist ein metallochromophorer Indikator gelber Färbung. Er bindet Zink unter Bildung einer roten Farbe. Diese Farbveränderung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm verfolgt werden [76]. Als Zinkstandard wurde eine Zinkchlorid-Lösung in einer Endkonzentration von 0-5 µM eingesetzt. Das Protein wurde erst 10 min in 1 % HCl bei 95°C denaturiert und abgekühlt. Um das in der Enamidase enthaltene Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup> zu oxidieren wurde 64 µl 1 M NaOH zugegeben und 5 Minuten inkubiert. Der 1 ml Testansatz enthielt 50 mM Tris pH 7,0, 100 µM PAR, 150 µM p-Hydroxymercurisulfonat, 0,5 % SDS und 100-200 µg Enamidase. Die Absorption wurden nach Abkühlen auf Raumtemperatur bei 500 nm gemessen. Es wurde ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{500} = 63 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für Zn<sup>2+</sup> ermittelt.

### 2.6.7 Eisen Bestimmung

Nicht-Häm-Eisen wurde kolorimetrisch mit Feren (Dinatrium Salz von 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(5-Sulfo-2-Furyl)-1,2,4-Triazine Trihydrat) [77] bestimmt. Das Nicht-Häm-Eisen wird durch Inkubation mit 1% HCl aus dem Protein freigesetzt, nach Neutralisieren mit Ammoniumacetat und Reduktion des Eisens zu  $\text{Fe}^{2+}$  mit Ascorbinsäure, kann das Eisen mit dem dafür extrem spezifischen Chelator Ferene nachgewiesen werden.

Zur Ermittlung des Eisengehaltes der Enamidase wurde vor jedem Versuchsansatz eine frische 0,200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Mohr's Salz) Eichlösung angefertigt. Proben oder Standard-Lösungen mit 2-20 nmol Eisen (100  $\mu\text{l}$ ) wurden mit 100  $\mu\text{l}$  1% HCl versetzt, für 10 Sekunden abzentrifugiert und 10 Minuten bei 80 °C in einem Thermomixer (Comfort, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 500  $\mu\text{l}$  7,5% Ammoniumacetat, 100  $\mu\text{l}$  frische 4% Ascorbinsäure, 100  $\mu\text{l}$  2,5 % SDS und 100  $\mu\text{l}$  1,5 % Feren zugegeben, gemischt und für 5 min bei  $13.000 \times g$  abzentrifugiert. Anschliessend erfolgte die Messung der Absorption bei 593 nm.

### 2.6.8 Massenspektrometrie mittels MALDI/TOF

Die Analyse von Proteinproben zur Ermittlung der molekularen Masse mittels MALDI/TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight) Massenspektrometrie, wurde an einem Voyager DE<sup>TM</sup>RP Spectrometer (Applied Biosystems, Langen) durchgeführt. Hierbei wurden Proteinproben in unterschiedlichen Konzentrationen mit gesättigter Sinapinsäurelösung (in 0,1 % Trifluoressigsäure, 67 % Acetonitril) versetzt, auf einen Probenträger aufgetragen und getrocknet. Die Messung der Proben und anschließende Auswertung erfolgte durch die vom Hersteller mitgelieferte Software. Die Geräteparameter waren: 25.000 V Beschleunigungsspannung, 23.000 V Gitterspannung, 300 nsec Verzögerung und 50 % Laserstärke.

### 2.7 Kristallisation von Enamidase

Der erste Schritt auf dem Weg zu einer Röntgenstrukturbestimmung von Proteinkristallen besteht darin, Kristalle zu züchten. Die Kristallographie ist eine empirische Methode. Die erfolgreiche Kristallisation eines Proteins hängt von zahlreichen Faktoren ab. In einem typischen „Kristallisationsscreen“ werden üblicherweise Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke,

und die Konzentrationen der einzelnen chemischen Komponenten systematisch variiert. Dieser Ansatz liegt den heutzutage weit verbreiteten und kommerziell erhältlichen so genannten „sparse matrix screens“ zugrunde [78]. Von besonderer Bedeutung können überdies der Oligomerisierungsgrad des zu kristallisierenden Proteins, sowie dessen Reinheit und die Homogenität der verwendeten Proteinlösung sein. Auch die Wahl der geeigneten Kristallisationsmethode kann den Erfolg eines Kristallisationsexperimentes beeinflussen. Zwei der gängigsten Methoden sind dabei die „hanging drop“- [79] und die „sitting-Drop-Methode“ [80]. Beide beruhen auf dem Prinzip der Dampfdiffusion. Wie aus der Abb.2.12 hervorgeht stehen sich dabei in einem geschlossenen System ein die jeweilige Kristallisationslösung enthaltendes Reservoir und ein Tropfen gegenüber, der aus einer Mischung dieser Lösung mit der Proteinlösung besteht. Auf diese Weise stellt sich zwischen Tropfen und Reservoir ein Gleichgewicht ein. Durch den Entzug von Wasser kommt es zur Erhöhung von Protein- und Fällungsmittelkonzentration, die im Idealfall zur Bildung eines Proteinkeimes und zum Kristallwachstum führt. Für die in dieser Arbeit beschriebene erfolgreiche Kristallisation des Enzyms Enamidase wurden sowohl die „hanging drop“- als auch die „sitting-Drop-Methode“ angewendet.

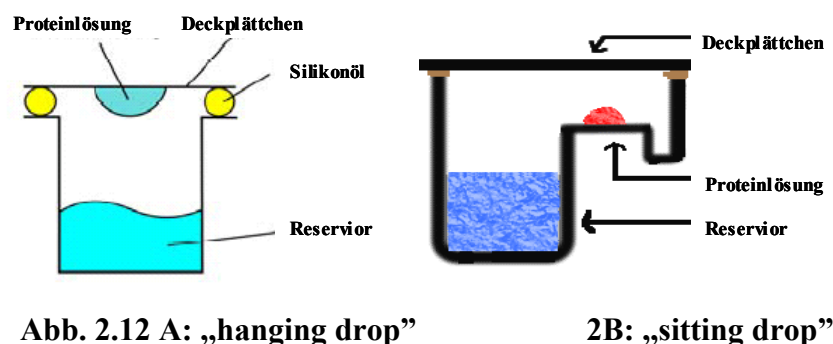


Abb. 2.12 A: „hanging drop“

2B: „sitting drop“

Für das Auffinden geeigneter Kristallisationsbedingungen wurden insgesamt fünf verschiedene kommerziell erhältliche sparse matrix-Screens der Firmen Sigma-Aldrich und Nextal verwendet. Die Durchführung dieses Vorversuches erfolgte mit Hilfe eines speziellen Pipettier-Roboters (Genomic solutions, A Harvard Bioscience Company, USA) am MPI für Biophysik in Frankfurt am Main. Dabei wurden spezielle Kristallisationsplatten der Firma Greiner verwendet, die 96 voneinander abgetrennte Reservoirs besitzen. Diese wurden zunächst mit jeweils 100 µl der entsprechenden Kristallisationslösungen gefüllt. Das Pipettieren des eigentlichen Kristallisationstropfens erfolgte hiernach vollautomatisch. Die Tröpfchen bestanden dabei aus je 300 nl Proteinlösung und 300 nl der jeweiligen Reservoirlösung. Da die Kristallisationsplatten pro Reservoir Platz für bis zu drei Tropfen verschiedener



---

Zusammensetzung bieten, wurde nicht nur die Proteinkonzentration variiert (20 und 10 mg/mL) sondern auch ein Tropfen auspipettiert, der lediglich den für das Protein verwendeten Puffer enthielt und somit als Negativkontrolle diente. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte bei 18°C. Direkt nach Fertigstellung des Screens wurden die einzelnen Tropfen begutachtet und eine ggf. eintretende Trübung der Lösung oder die Präzipitation des Proteins protokolliert. Dazu wurden die Kristallisationsansätze unter einem Mikroskop (*Olympus*) bei 40 facher Vergrößerung durch einen Polarisationsfilter hindurch betrachtet. Die Ansätze wurden nach 2-3 Tagen erneut und danach etwa einmal pro Woche auf die gleiche Weise kontrolliert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung und Sequenzierung des kompletten Nicotinat-Locus

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte das komplette Gen-Cluster des Nikotinat-Locus aus *Eubacterium barkeri* kloniert und identifiziert werden. Die Klonierung und Sequenzierung des Nicotinat-Locus war die Voraussetzung zur Expression der Gene in *E. coli*. Aus früheren Arbeiten war die DNA Sequenz eines 3,7 kb *PstI* Fragments bekannt [54, 81]. Dieses Fragment enthielt die *mgm* und *mii* Gene, kodierend für die 2-Methylglutarat-Mutase und Methylitaconat-Isomerase sowie zwei unvollständige Leseraster an den 5'- und 3'-Seiten. Die Klonierung erfolgte über Hybridisierung einer Digoxigenin markierten Sonde unter Benutzung einer eingeschränkten Genbank. Als Oligonukleotid Sonde wurde ein PCR Fragment verwendet. Die degenerierten Primer für die PCR waren von Sequenzen des Aminoterminus und eines internen Peptids der 2-Methylglutarat-Mutase abgeleitet.

Da in viele Fällen Gene für Stoffwechselwege in Gen-clustern vorliegen, wurden benachbarte Bereiche kloniert und sequenziert. Dazu wurden mit Hilfe des  $\lambda$  ZAP-Express-Systems (Stratagene) nach dem Protokoll des Herstellers drei chromosomale  $\lambda$ -Phagen-Genbanken von *E. barkeri* hergestellt (Material und Methoden). Dieses System enthält ein in den Phagen integriertes, vom pBluescript abgeleitetes pBK-CMV-Phagemid, in das die mit Restriktionsenzymen geschnittene genomische DNA kloniert werden kann. Die  $\lambda$ -Phagen-Bank wurde nach Transfektion von *E. coli* über Southern Hybridisierung der entstandenen Phagenplaques durchsucht. Die Phagen DNA wurde dann mit Hilfe des Helferphagen  $\phi$ 1 *in vivo* in das pBK-CMV-Phagemid umgewandelt. Nach erfolgreichen Excission und Zirkularisierung sind die Zellen, die diesen Vektor tragen, gegen Kanamycin resistent. Plasmide wurden isoliert und nach Restriktionsverdau und Southern Hybridisierung auf die Anwesenheit des gewünschten DNA Fragments überprüft.

Für die Klonierung des Nicotinat-Locus wurde zwei Genbanken benutzt, welche *EcoRI*, oder *BamHI/BglII*-verdaute *E. barkeri* DNA enthielten. Über Restriktionskartierung mit Southern Hybridisierung von chromosomale DNA wurde bestimmt, welche Restriktionsenzyme geeignete Fragmente lieferten. Obwohl theoretisch bis zu 10 kb chromosomale DNA in den  $\lambda$ -Phagen kloniert werden kann, hat es sich erfahrungsgemäß in unserem Labor und in dieser Doktorarbeit ergeben, dass eine Größe bis 6 kb am besten funktioniert. Durch Klonierung von überlappenden DNA-Abschnitten kann auf diese Weise ein größerer Abschnitt sequenziert werden. Die für die Suche und Klonierung notwendigen Sonden wurden aus den äußeren

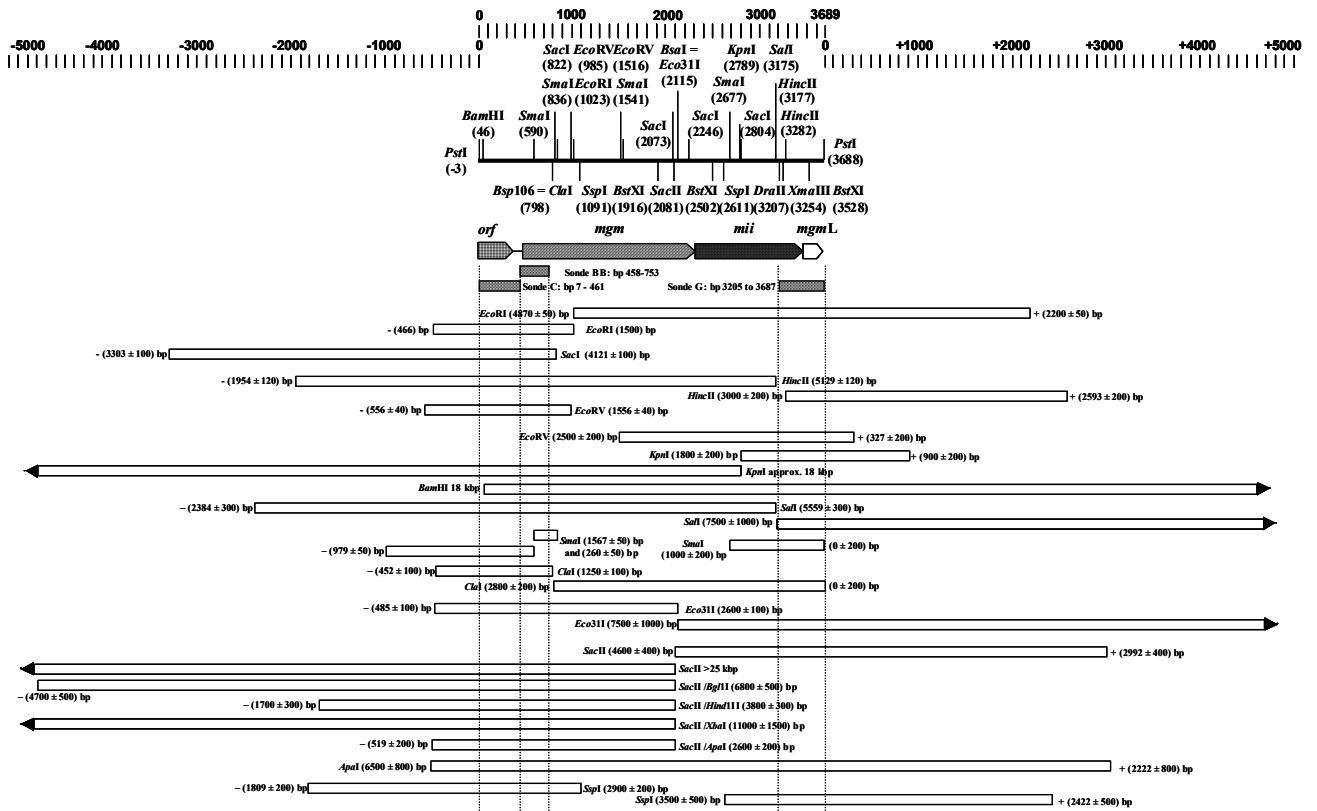
Enden des bereits bekannten *PstI* Fragments und aus weiteren klonierten Fragmenten ermittelt. Während der Arbeit hat sich zusätzlich die direkte genomische Sequenzierung bewährt, falls in den angefertigten Genbanken keine überlappenden Fragmente zur Verfügung standen. Diese Methode lieferte die Möglichkeit, in der gleichen Genbank das nächste Fragment zu suchen.

### 3.1.1 Klonierung der *EcoRI* Fragmente mit Sonden von den äusseren Enden des *PstI* Fragments

Zwei Sonden, die den 5'- und 3'-Enden des bekannten *PstI* Fragments entsprachen, wurden mittels PCR hergestellt. Als Primer dienten NE01\_for und NE01\_rev für die 5' Sonde C und NE02\_for und NE02\_rev für die 3' Sonde G. Genomische DNA aus *E. barkeri*, die mit



**Abb. 3.1:** Southern Blot mit genomischen Restriktionsfragmenten von *E. barkeri*. Genomische DNA von *E. barkeri* wurde mit verschiedenen Restriktionsenzyme verdaut, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon Membran geblottet. Die Membran wurde dann mit der homologen Sonde C hybridisiert. Das 1,5 kb *EcoRI* Fragment ist mit einem Kreis hervorgehoben.



**Abb. 3.2: Restriktionskarte im Bereich des *PstI* Fragments.** Die Karte konnte aus den Ergebnissen der Southern Blots (Sonde C vorherige Abb. 3.1, Daten mit Sonde G [62] und Sonde B, [81] abgeleitet werden. Im unterem Teil der Abbildung sind die Fragmente zu sehen. Im oberen Teil sind die bekannte Schnittstellen im *PstI* Fragment eingezeichnet.

verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig verdaut worden war, wurde nach Elektrophorese auf Nylon-Membranen übertragen (Southernblot) und mit der Sonde C (siehe Abb. 3.1 für ein Beispiel) bzw. Sonde G (Abb.4.1 in [62]) hybridisiert. Die hybridisierenden Banden wurden über eine Farbreaktion detektiert. Gleichzeitig war diese Hybridisierung eine Gelegenheit, die Funktionsfähigkeit der Sonden zu überprüfen. An Hand dieser Blots und Daten von Beatrix [81] ließ sich eine Karte der Restriktionsmarker erstellen (Abb. 3.2). Die Größen der mit der Sonde C hybridisierenden Fragmente sind in Tab. 3.1 angegeben.

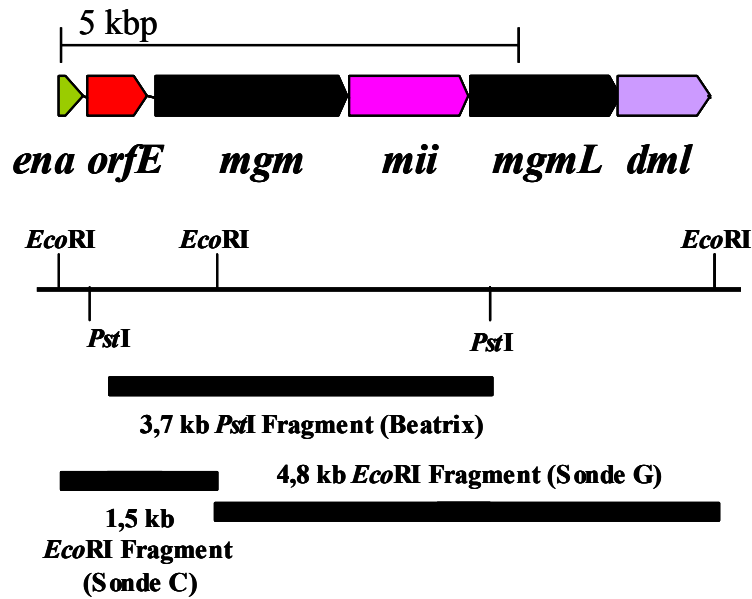
**Tab. 3.1: Größe der DNA-Fragmente, die in genomischen Totalverdaus von *E. barkeri*-DNA mit der Sonde C hybridisierten.**

Restriktionsenzym	Fragmentgröße (kb)
<i>EcoRI</i>	1,5
<i>SacI</i>	4,12
<i>HincII</i>	5,1
<i>EcoRV</i>	1,55
<i>KpnI</i>	18
<i>BamHI</i>	18
<i>SalI</i>	5,5
<i>SmaI</i>	1,56 und 0,26
<i>ClaI</i>	1,25
<i>Eco31I</i>	2,6
<i>SacII/BglIII</i>	6,8
<i>SacII/HindIII</i>	3,8
<i>SacII/XbaI</i>	11
<i>SacII/ApaI</i>	2,6
<i>SspI</i>	2,9

Der Verdau mit *EcoRI* ergab geeignete Größen von mit Sonde C und G hybridisierenden Fragmenten. Die Größe mit Sonde C betrug 1,5 kb und mit Sonde G 4,8 kb. Deshalb wurde eine  $\lambda$ -Phagen *EcoRI*-Genbank von *E. barkeri* mit dem  $\lambda$ -Zap-Express-System erstellt und über Plauehybridisierung mit den homologen Sonden durchgesucht. Zuerst wurde das 1,5 kb große Fragment kloniert, das mit Sonde C hybridisierte. Die Klonierung des 4,8 kb großen mit Sonde G hybridisierenden Fragments wurde auf ähnliche Weise parallel von Nadine Wagener durchgeführt und bereits in ihrer Diplomarbeit dargestellt [62].

Es wurden etwa 50.000 phagenplaques überprüft, von denen 15 mit Sonde C hybridisierten. Nach Verdünnung und *in vivo* Excission und Zirkularisierung zu pBK-CMV wurden die erhaltenen Plasmide mit *EcoRI* verdaut. Die verdaute DNA wurde dann elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und dann

mit Sonde C hybridisiert. Alle diese Klone erwiesen sich nach Isolierung und Hybridisierung als positiv und enthielten jeweils ein mit Sonde C hybridisierendes Insert von 1,5 kbp. Zwei pBK-CMV Plasmide mit dem 1,5 kb Insert (1490 bp) wurden sequenziert. Beide Plasmide zeigten eine identische Sequenz des *EcoRI* Inserts. An der 3'-Seite des 1,5 kb Fragments konnten erwartungsgemäß die bereits im *PstI* Fragment vorhandenen Leseraster des *mgm* Genes und des 5'- von *mgm* gelegenen *orfE* identifiziert werden. Vor allem die Analyse der 464 Basenpaare 5' von der *PstI* Schnittstelle war von Bedeutung, da sich damit herausstellte, ob eine weitere Klonierung in die 5'-Richtung sich lohnen würde. Mit Hilfe des Computerprogrammes DNASTAR sowie einer Datenbank-Suche unter Verwendung des BLAST-Algorithmus [82] wurde eine Analyse durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass *orfE* jetzt komplett sequenziert war (193 AA, 581 bp). *orfE* wies 45-55% Aminosäuresequenzidentität mit hypothetischen Genen auf (z.B. Blr3824 aus *Bradyrhizobium japonicum*). In den 259 Basenpaaren an der 5'-Seite von *orfE* lag ein weiteres Gen. Nach Übersetzung der meist am 5'-Ende gelegenen 226 Basenpaaren ergab sich eine 74 Aminosäuren lange Sequenz eines C-terminalen Bereichs. Datenbank-Suche zeigte 36% Aminosäuresequenzidentität zu Proteinen, wie Bll3830 aus *Bradyrhizobium japonicum*. Dieses Protein sowie weitere Homologe zeigten im N-terminalen Bereich eine sehr deutliche Sequenz-Identität (24%) mit biochemisch charakterisierten Amidohydrolasen, wie Adenin-Deaminase, Dihydroorotase und Urease. Da zu diesem Zeitpunkt mit der N-terminalen Sequenz der aus *E. barkeri* gereinigten Enamidase bei Datenbanksuche die gleichen Homologen (wie z.B. Bll3830) gefunden wurden (persönliche Mitteilung Dr. A.J. Pierik), wurde vermutet, dass dieses Gen (*ena*) die Enamidase kodiert. Um die vollständige Enamidase Sequenz zu ermitteln, wurde die weitere Klonierung in die 5'-Richtung des 1,5 kb *EcoRI* Fragments durchgeführt. Zusätzlich deuteten auch die Daten von Nadine Wagener [62] darauf hin, dass die Gene für den Nicotinat-Abbau in einem Cluster vorlagen. Sie identifizierte mit dem 4,8 kb *EcoRI* Fragment, das mit Sonde G hybridisierte, zwei Gene, *mgmL* und *dml*, die für eine potentielle 2-Methylglutarat-Mutase Reaktivase und die Dimethylmalat-Lyase kodieren. Eine Übersicht über die mit Sonde C und G ermittelten Daten ist in Abb. 3.3 dargestellt.



**Abb. 3.3:** Übersicht über den bekannten *PstI* Abschnitt [81] und den ersten der zwei *EcoRI* Fragmente des Nicotinat-Locus. Das Gen *ena* kodiert für die Enamidase, *orfE* für ein unbekanntes Protein, *mgm* für die 2-Methylglutarat-Mutase, *mii* für die 3-Methylitaconat-Isomerase, *mgmL* für die Reaktivase oder den Stabilisierungsfaktor für Mgm und *dml* für die Dimethylmalat-Lyase.

### 3.1.2 Klonierung des *BglII*-*BamHI* Fragments

Um das komplette Enamidase-Gen zu klonieren, wurde eine neue DNA-Sonde aus dem 5'-Ende des 1,5 kb *EcoRI* Fragment hergestellt. Dazu wurde das entsprechende pBK-CMV Plasmid mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und das 500 bp Fragment elektrophoretisch im Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit Digoxigenin markiert. Die Sonde wurde K genannt. Mit Hilfe dieser Sonde wurden Southern Blots mit verdauter chromosomaler *E. barkeri* DNA durchgeführt. *BglII* und *BamHI* Einzelverdau zeigen nur sehr große hybridisierende Fragmente (>10 kb). Aber beim Doppelverdau mit *BglII* und *BamHI* wurde ein mit der Sonde K positiv reagierendes 5,4 kb Fragment detektiert. Deshalb wurde eine *BamHI/BglII*  $\lambda$ -Zap-Express Phagen Genbank von *E. barkeri* angefertigt. Dazu wurde genomische DNA aus *E. barkeri* mit *BamHI* und *BglII* vollständig doppelverdaut und in die *BamHI* Stelle des  $\lambda$ -Phagen ligiert. Die mit *BglII* generierten Überhänge sind mit den mit *BamHI* erzeugten Überhängen kompatibel. Es wurden 12 positive Klone aus etwa 50.000

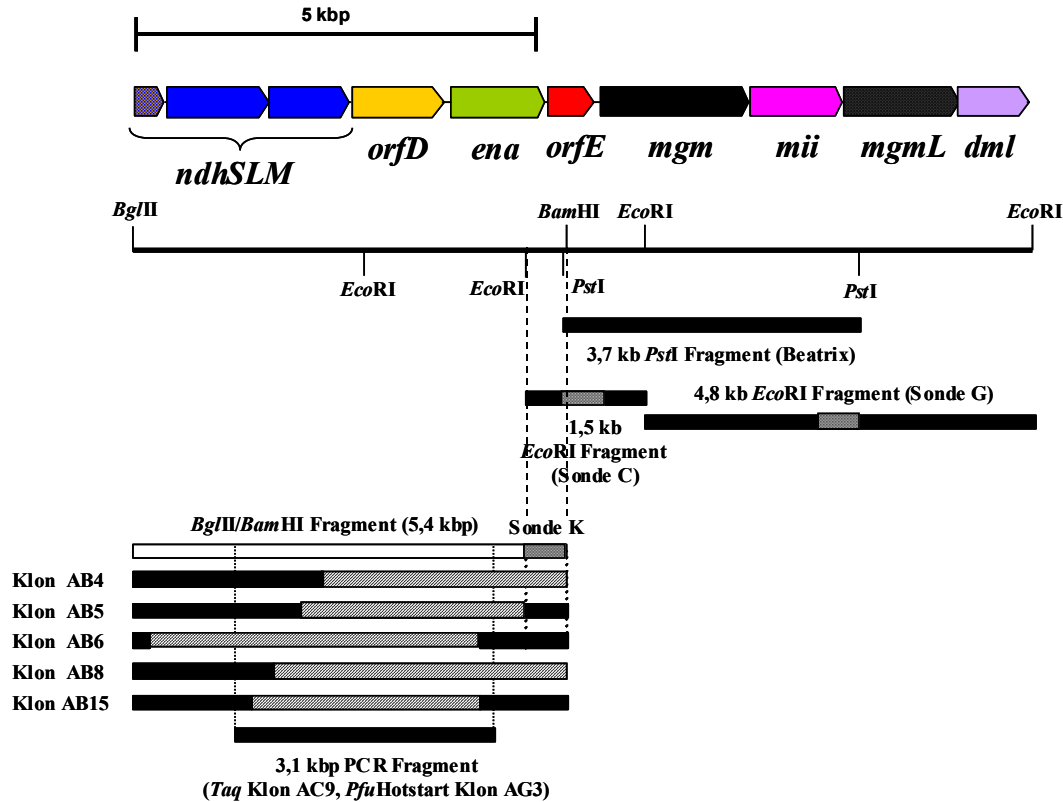
Plaques isoliert. Nach Zirkularisierung zu pBK-CMV wurden 10 Klone isoliert und weitgehend durch Southern Hybridisierung mit Sonde K nach Restriktionsverdau charakterisiert. Diese Klone wurden AB-Klone genannt. Unerwarteterweise wurde jedoch nach *PstI* / *XhoI* Verdau nicht das gewünschte komplette 5,4 kb Fragment beobachtet. Trotzdem hybridisierten 3 der 5 pBK-CMV Plasmide mit Sonde K. Alle 5 Klone wurden sequenziert. Nach mühevoller Analyse stellte es sich heraus, dass im zentralen Bereich des 5,4 kb *BglII/BamHI* Fragments Deletionen aufgetreten waren (Abb. 3.4). Es gab auch Klone (z.B. AB4 und AB8), die nicht mit Sonde K hybridisierten, aber trotzdem zur 5'-Seite der hybridisierenden Klone identisch waren (z.B. AB5 und AB15). Deshalb wurde vermutet, dass die Deletionen bei der Excision/Zirkularisierung aufgetreten waren. Für Klone mit *BglII* 5'- und *BamHI* 3'-Enden (wie AB5, AB6 und AB15) war es durch DNA-Sequenz Analyse möglich, dort aufs Nukleotid genau die Stelle der Deletion zu definieren. Um den fehlenden zentralen Bereich zu klonieren, wurde dieser DNA Abschnitt mittels PCR amplifiziert. Als Primern dienten intakte nicht durch Deletionen beeinträchtigte Sequenzen (Nic\_21 und Nic\_22). Ein 3,1 kbp PCR-Produkt wurde mit einem präparativen Agarosegel gereinigt, extrahiert und durch TOPO-TA-Klonierung in den pCR2.1-Vektor kloniert. Klon AC9 (PCR mit *Taq*-Polymerase) und Klon AG3-5 (PCR mit *Pfu*Hotstart) wurden mit Standardprimern und weiteren genspezifischen Primern sequenziert. Die zusammengestellte DNA-Sequenz der AB Klone aus der Phagenbank und der AC9/AG3-5 Klone (PCR) ergab ein vollständige Sequenz von 5406 bp mit Restriktionsschnittstellen, die mit den Southern Blots von chromosomaler DNA übereinstimmten. Bei der Klonierung der PCR Fragmente des zentralen Bereichs des *BglII/BamHI* Fragments wurden keine Deletionen beobachtet.

### 3.1.3 Analyse der DNA-Sequenz des *BglII-BamHI* Fragments

Dieses Fragment trug fünf offene Leserahmen (ORF): *ena*, *orfD*, *ndhM*, *ndhL* und *ndhS* (siehe Abb. 3.4). Das Strukturgen für Enamidase konnte in diesem Fragment vollständig kloniert und sequenziert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz stimmte mit den bereits sequenzierten *N*-terminus (SKTIKNIGKIVSGDIKSPVLQADTIV, Aminosäure 2-28), und den beiden internen Peptidsequenzen (DAGDATIIDAAGSTVTPGLLDTHV, Aminosäure 45-68; VIFGNDAPSGTGLIPLGILR, Aminosäure 271-290) perfekt überein. Das zweite Leseraster *orfD* kodiert für ein Membranprotein, das 50% Sequenzidentität zu PfoSR aufweist, ein Protein, das an der Regulation von Perfringolysin beteiligt ist [83]. Die Leseraster *ndhL* und *ndhM* sind Gene, die für zwei der vier strukturellen Nicotinat-Dehydrogenase Untereinheiten kodieren. Die *N*-terminalen Sequenzen dieser Untereinheiten



wurden bereits sequenziert [20], und stimmen mit den aus den Genen abgeleiteten Sequenzen überein.



**Abb. 3.4: Organisation der isolierten Gene in *BglIII*-*BamHI* Fragment**

(siehe Text für die schräg gestrichelte Deletionen im *BglIII*-*BamHI* Fragment)

In Abb. 3.4 ist die genetische Organisation der isolierten chromosomalen DNA-Region aus *E. barkeri* im Phagmid und Topo-kloning-Vektor dargestellt, sowie die Lage und Orientierung der Gene. Nicotinat Dehydrogenase aus *E. barkeri* besteht aus 4 Untereinheiten [20]: NdhM (middle), NdhL (large-), NdhS (small-) und NdhF (flavin-Protein). Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen von NdhL und NdhM mit den in der Datenbank am NCBI vorhandenen, bekannten Sequenzen zeigte Homologie mit diversen Molybdopterin-enthaltenden Dehydrogenasen. Die beste Aminosäuresequenzidentität für NdhL (41%) zeigte sich mit dem N-terminalen Bereich (Aminosäure 1-420) von *Bacillus subtilis* PucD und der Molybdopterin Untereinheit einer Xanthin-Dehydrogenase [84]. Für NdhM war dies 42% mit dem C-terminalen Bereich (Aminosäure 448-774) von mll4880, ein Gen aus *Mesorhizobium loti*, annotiert als Aldehyd-Oxidoreduktase. NdhL zeigte 38% Aminosäuresequenzidentität mit mll4880 (Aminosäure 1-441). Im Gegensatz zu den üblichen Molybdopterin-enthaltenden

Dehydrogenasen besitzt die Nicotinat-Dehydrogenase aus *E. barkeri* zwei getrennte Molybdopterin Untereinheiten und ist nicht die Folge von Proteolyse.

Am 5'-Ende lag ein unvollständiges Leseraster (*NdhS*, 397 bp) mit 48-55 % Aminosäuresequenzidentität zu 2 x [2Fe-2S] Cluster Untereinheiten von Molybdopterin-enthaltenden Dehydrogenasen. Es wurde vermutet, dass dieses Leseraster für die kleine 2 x [2Fe-2S] Untereinheit der Nicotinat Dehydrogenase kodierte.

### 3.1.4 Klonierung des *Bgl*III - *Bgl*III -Fragments

Nach der Sequenzierung des *Bgl*III-*Bam*HI Fragments wurde ein weiteres Fragment in 5'-Richtung kloniert. Jedenfalls befindet sich dort der fehlende Teil des *ndhS* Gens und möglicherweise weitere Nicotinat Fermentationsgene, wie z.B. das Gen für die vierte Flavin-Untereinheit (*ndhF*). Für die Suche nach den weiteren Nicotinat-Fermentationsgenen war leider die *Eco*RI-Phagenbank nicht geeignet, da mit einer 600 bp Sonde des 5'-Endes vom *Bgl*III-*Bam*HI Fragments in Southern-Blots nur ein zu großes *Eco*RI-Fragment (8 kbp) hybridisierte. Nach *Bam*HI Einzelverdau wurde ein 10,5 kbp Fragment beobachtet. Das bedeutete, dass man in der *Bgl*III-*Bam*HI Genbank möglicherweise ein  $10,5 - 5,4 = 5,1$  kbp Fragment suchen sollte. Für dieses Fragment bräuchte man jedoch eine Sonde an der 5' Seite der *Bgl*III Schnittstelle, wofür noch keine Sequenzinformation zur Verfügung stand.

Um Sequenzinformation zu ermitteln, wurde für die Ableitung einer Sonde ein neues Verfahren benutzt: die direkte genomische DNA Sequenzierung [70], die bei der Firma GATC mit einzelnen Primern in 5'-Richtung durchgeführt wurde. Dazu wurde sehr saubere konzentrierte *E. barkeri* DNA verwendet. Obwohl die Qualität solcher Sequenzierungen deutlich niedriger war als die reguläre Sequenzierung klonierter Plasmide, reichte die zur ableitung von Primern ermittelte Sequenz, mit denen mittels PCR die neue Sonde T hergestellt werden konnte.

Nach Isolieren des PCR Fragments (500 bp) wurde dieses mit Digoxigenin markiert und zum Durchsuchen der bereits zur Verfügung stehenden *Bam*HI/*Bgl*III  $\lambda$ -Zap-Express Phagenbank benutzt. Die Phagen-Klone wurden isoliert, rezirkularisiert, geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und positive Fragmente mittels Southern-Hybridisierung mit Sonde T ermittelt. Durch dieses Verfahren wurden 8 Klone isoliert, die mit Sonde T ein Signal gaben. Alle Klone zeigten bei Verdau mit *Pst*I das gleiche Muster: eine 5 kbp Bande für den linearisierten pBK-CMV Vektor und zwei Banden (2,6 und 1,8 kbp) für die im Vektor enthaltene klonierte

Sequenz. Nach Übertragen auf Nitrocellulose und Hybridisierung mit der Digoxigenin markierten Sonde T zeigte die 1,8 kbp Bande eine positive Reaktion.

### 3.1.5 Analyse der DNA-Sequenz des *BgIII-BgIII* Fragments

Es zeigte sich, dass das klonierte Fragment ein 4221 bp langes *BgIII* - *BgIII* Fragment war. An der 3'-Seite wurde die bereits mit direkter genomischer Sequenzierung ermittelte Sequenz gefunden. Da befand sich der restliche N-terminale Teil von *ndhS* und, wie vermutet, das *ndhF*-Gen, das für die Nicotinat-Dehydrogenase Flavin-Untereinheit kodiert. Die N-terminale Sequenzen der NdhS und NdhF Genprodukte stimmten mit den experimentell bestimmten N-terminalen Sequenzen überein [20]. NdhF hat 31 % Aminosäuresequenzidentität zu XdhB, der FAD-bindenden Untereinheit der *E. coli* Xanthin-Dehydrogenase. An der 5'-Seite von *ndhF* lag ein Gen, das für ein Protein kodiert, das 40 % Aminosäuresequenzidentität zur 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* [85] und 37 % zur Tartronat-Semialdehyd-Reduktase aus *E. coli* [86] hat. Die Ähnlichkeit der Substrate dieser Enzyme mit 2-Formyl- und 2-(Hydroxymethyl)glutarat gab den klaren Hinweis, dass dieses Gen (*hgd*) für die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (siehe Abb. 3.5) kodiert. Durch heterologe Expression und Aktivitätsbestimmungen wurde diese Annahme im weiteren Verlauf der Doktorarbeit bestätigt. In der Mitte des *BgIII-BgIII* Fragments liegt ein unbekanntes Gen, *orfC*, mit 24-29 % Aminosäuresequenzidentität zu hypothetischen Genen (z. B. Blr3823 aus *Bradyrhizobium japonicum*).

Am extremen 5'-Ende des Fragments wurde ein Gen gefunden, das für ein Protein von 499 Aminosäuren (19 Cysteine) kodiert. Eine Aminosäuresequenzidentität von 40-43% wurde mit hypothetischen Proteinen aus *Silicibacter pomeroyi*, *Bradyrhizobium japonicum* (Blr3822) und anderen Organismen beobachtet. Das wichtigste Ergebnis war jedoch die eindeutige Identifikation des Strukturgens (*hnr*) der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase. Am Anfang meiner Doktorarbeit wurde 6-Hydroxynicotinat Reduktase durch Edman-Abbau N-terminal sequenziert. Diese Sequenz (MFKIDEEKCKKCRMVXKEXPVHAVYY) und die des *hnr* Genprodukts waren identisch.

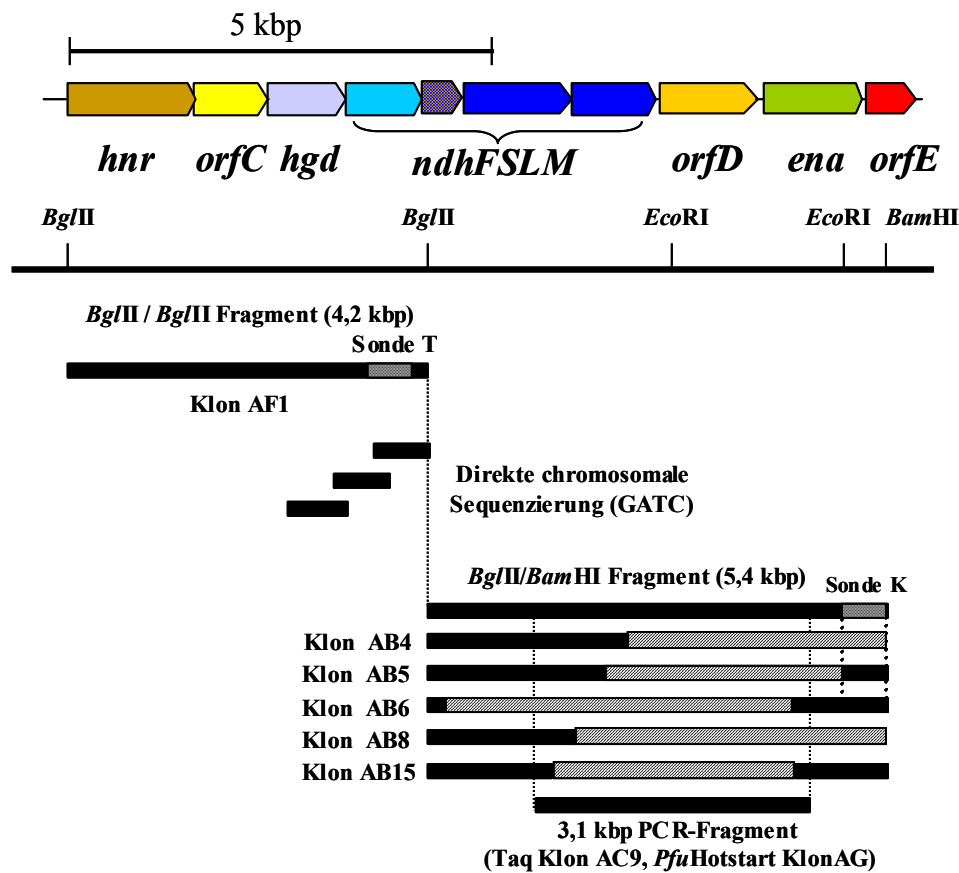


Abb. 3.5: Organisation der isolierten Gene in *BgIII*-*BgIII* Fragment.

### 3.1.6 Klonierung und analyse des 5'-Endes des *BgIII*-*BgIII* Fragments

Nach der positiven Erfahrung mit der direkten genomischen DNA Sequenzierung wurden ausgehend vom 5'-Ende des *BgIII*-*BgIII* Fragments von der Firma GATC noch sechs weitere Schritte in die 5'-Richtung durchgeführt (insgesamt ca. 3 kbp). Diese Sequenzen zeigten zwei *Bam*HI und eine *Eco*RI Schnittstelle an der 5'-Seite und deuteten an, dass die Benutzung der Phagenbanken nicht sinnvoll war. Deswegen wurde der DNA Bereich, der mit genomischer Sequenzierung bestimmt war, durch PCR mit *Pfu*Hotstart in zwei Abschnitten amplifiziert (Klon AI und AQ, siehe Abb. 3.6), und in den pCR-Vektor kloniert und doppelsträngig sequenziert. Im neuen Bereich waren 2 vollständige Gene vorhanden. *NicR* kodiert für ein Protein mit 35% Aminosäuresequenzidentität zu CAC2394, ein Transkriptionsregulator der LysR Familie aus *Clostridium acetobutylicum*. Da Regulatoren für den Aromatenabbau oft direkt neben, aber in umgekehrten Richtung zu den zu regulierenden Transkripten vorliegen [87], ist *NicR* wahrscheinlich an der Regulation der Expression der

Nicotinatfermentationsgene beteiligt. *OrfB* hat 30 % Aminosäuresequenzidentität zu einem, als *cobW* annotierten Gen, das an der Cobalamin Biosynthese beteiligt ist. Schließlich lag am extremen 5'-Ende noch der N-terminale Bereich eines partiellen Leserahmens (*orfA*) mit 26 % Aminosäuresequenzidentität zu MtbA, einer Methylcobamid:CoM Methyltransferase aus *Methanosarcina acetivorans*.

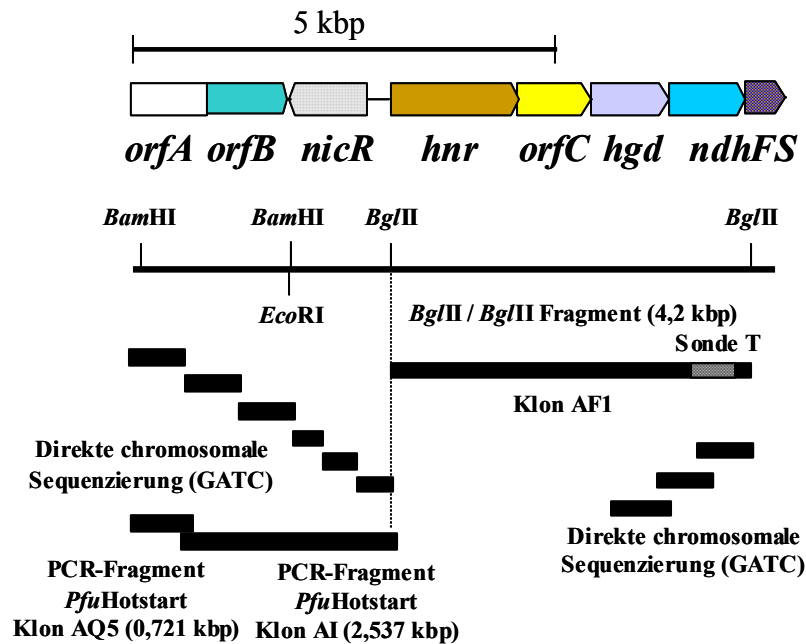


Abb. 3.6: Organisation der isolierten Gene 5' vom *Bgl*II-*Bgl*II Fragment.

### 3.1.7 Klonierung des 2,3 kb *Eco*RI Fragments

Es wurde weiter nach Nicotinat Fermentationsgenen in die 3'-Richtung gesucht. Da in Southern Blots bei *Bam*HI/*Bgl*II Verdau nur ein sehr großes Fragment mit Sonde G hybridisierte, wurden bei der Firma GATC mit Hilfe der Sequenz des bereits bekannten Strukturgens *dml* [62] zwei direkte genomische DNA Sequenzierungsschritte in die 3'-Richtung durchgeführt. Mittels PCR mit *Pfu*Hotstart wurden einige DNA Fragmente amplifiziert und in dem pCR-Vektor kloniert. Diese neuen Klone wurden sequenziert (AD Klone, Abb. 3.7). Klon AD10 (Primer Nico\_25for und Nico\_27rev) wurde mit *Eco*RI verdaut, das 574 bp DNA Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für die Dig-Markierung (Sonde M) benutzt. Mit Hilfe dieser neuen Sonde M wurde die bereits vorhandene *Eco*RI-Genbank durchsucht.



Serin-Dehydratase eliminiert Wasser aus einer 2-substituierten 3-Hydroxysäure. Diese Reaktion ist ähnlich zu Eliminierung von Wasser aus 2-(Hydroxymethyl)glutarat zu 2-Methylenglutarat. Deswegen wird postuliert, dass dieser Leserahmen die 2-(Hydroxymethyl)-Glutarat-Dehydratase (Hmd) kodiert.

Nach einer relativ langen intergenen Region (366 bp) folgte die *N*-terminale Region eines Leserahmens (198 Aminosäuren) mit 60-73 % Aminosäuresequenzidentität zu als Isopropylmalat-Isomerase annotierten Genen. Die Identität mit bekannten biochemisch charakterisierten bakteriellen Isopropylmalat-Isomerasen ist niedriger (22-27 %). Die Stereochemie der Hydratisierung von 2,3-Dimethylmaleat zu (2*R*,3*S*)-Dimethylmalat [58] ist identisch zur Hydratisierung von Isopropylmaleat zu (2*R*,3*S*)-3-Isopropylmalat durch die Isopropylmalat-Isomerase. Da zusätzlich bekannt ist, dass die Dimethylmalat-Dehydratase wie die Isopropylmalat-Isomerase ein durch Eisen zu aktiviertes labiles Enzym ist [89], wird angenommen, dass dieser Leserahmen für die Dimethylmalat-Dehydratase (DmdA) kodiert.

### 3.1.9 Klonierung des extremen 3'-Endes

Ausgehend vom 2.289 bp *Eco*RI Fragment (AE Klon) wurden in 3'-Richtung vier weitere direkte chromosomale Sequenzierungsschritte durchgeführt. Mittels PCR mit *Pfu*Hotstart wurden drei Fragmente in den pCR-Vektor kloniert (Klon AH1, AH4 und AJ1/2c) und sequenziert (siehe Abb. 3.7). Die neue Sequenz vervollständigte die Sequenzierung von *dmdA* (420 Aminosäuren) und identifizierte einen kleineren Leserahmen (163 Aminosäuren) direkt an der 3'-Seite von *dmdA*. Dieser hatte 60-68 % Aminosäuresequenzidentität zu der kleinen Untereinheit, die mit den DmdA-homologen Isopropylmalat-Isomerase assoziiert ist. Dieses Gen entspricht wahrscheinlich der zweiten Untereinheit der Dimethylmalat-Dehydratase und wurde deswegen als *dmdB* bezeichnet.

Eine weitere direkte genomische DNA Sequenzierung an der 3'-Seite von *dmdB* war wegen des hohen GC-Gehalts in diesem Bereich fehlgeschlagen. Durch PCR mit einem genspezifischen Primer an der bekannten Seite und einen sogenannten Annealing-Control Primer [71] konnte jedoch mit *Taq* Polymerase ein überlappendes weiteres 1,3 kbp Fragment isoliert und sequenziert werden. Dieser Sequenzbereich wurde mit PCR (Primer Nico112\_iPCR und Nico117\_rev) amplifiziert und in den pCR-Vektor kloniert (AR Klon, siehe Abb. 3.7). Im Vergleich zu Klon AJ1/2c wurden keine Abweichungen beobachtet. Im neuen Bereich wurde ein potentieller offener Leserahmen (*orfF*) ohne Sequenzhomologie

gefunden. Am extremen Ende lag der N-terminale Teil eines Leserahmens (*orfG*), das für ein Protein mit 61-65 % Aminosäuresequenzidentität zu clostridiellen Elektrontransfer-Untereinheiten kodiert. Solche Untereinheiten sind oft mit Glutamat-Synthase, Hydrogenase oder Dihydroorotat-Dehydrogenase assoziiert.

### 3.1.10 Zusammenfassende Überblick über die klonierten Gene

**Tab. 3.2. Übersicht über die klonierte Gene des Nicotinat-Locus von *E. barkeri***

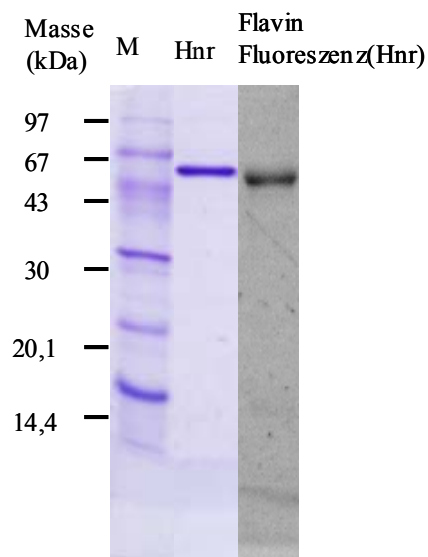
Gen	(vorgeschlagene) Funktion	Beschreibung, Beweis, N-Terminal Identität
<i>orfA</i>	? Methyltransferase	26 % id. zu Gen annotiert als Methylcobamid:CoM Methyltransferase
<i>orfB</i>	? Cobalamin Biosynthese	30% id. zu Gene annotiert als cobW
<i>nicR</i>	Regulator	35% id. zu clostridiellen regulatorischen Proteinen (wie LysR)
<i>hnr</i>	6-Hydroxynicotinat-Reduktase	Strukturgen, bestätigt durch Reinigung und N-terminale Sequenz [27]
<i>hgd</i>	2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase	40% id. zu 3-Hydroxyisobutyrate-Dehydrogenase und 37% id. zu Tartronat-Semialdehyd-Reduktase
<i>orfC</i>	unbekannt	31% id. mit Blr3823
<i>ndhF</i>	Nicotinat-Dehydrogenase, Flavoprotein Untereinheit	Strukturgen, bestätigt durch N-terminale Sequenz [20]
<i>ndhS</i>	Nicotinat-Dehydrogenase, [FeS] Protein Untereinheit	Strukturgen, bestätigt durch N-terminale Sequenz [20]
<i>ndhL</i>	Nicotinat-Dehydrogenase, Molybdopterin Untereinheit	Strukturgen, bestätigt durch N-terminale Sequenz [20]
<i>ndhM</i>	Nicotinat-Dehydrogenase, Molybdopterin Untereinheit	Strukturgen, bestätigt durch N-terminale Sequenz [20]
<i>orfD</i>	Membran Protein	50% id. zu pfoSR Gen, beteiligt an Regulation von Perfringolysin
<i>ena</i>	Enamidase	Strukturgen, bestätigt durch Reinigung und Sequenzierung des N-Terminus und 2 internen Peptiden
<i>orfE</i>	unbekannt	55% id. zu Blr3824 protein
<i>mgm</i>	2-Methylengluarat-Mutase	Strukturgen, kloniert und exprimiert [32]
<i>mii</i>	3-Methylitaconat-Isomerase	Strukturgen, kloniert und exprimiert [54]
<i>mgmL</i>	Reaktivase oder Stabilisierungsfaktor für Mgm	Strukturgen, ähnlich wie Diol-Dehydratase - Reaktivase, hat ATP-Bindestelle, kloniert und exprimiert
<i>dml</i>	(2R,3S)-Dimethylmalat-lyase	Strukturgen, kloniert und exprimiert [62]
<i>hmd</i>	2-(Hydroxymethyl)-Glutarat Dehydratase	23-26% id. zu $\alpha$ -Untereinheit der [4Fe-4S]-enthaltenden labilen Serin-Dehydratase
<i>dmdAB</i>	(2R,3S)-Dimethylmalat-Dehydratase	60-73% id. zu als Isopropylmalat-Isomerase annotierten Genen
<i>orfF</i>	unbekannt	Kein Ähnlichkeit zu bekannte Gene
<i>orfG</i>	Elektrontransfer Untereinheit	61-65% id. zu Elektrontransfer Untereinheiten



### 3.2 6-Hydroxynicotinat-Reduktase enthält kovalent-gebundenes Flavin

Bei Beleuchtung mit UV-Licht von ungefärbten SDS-Gelen der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase (HNR) wurde Fluoreszenz an der Stelle der Protein-Bande detektiert (siehe Abb.3.8). Diese Beobachtung bestätigt die Anwesenheit von kovalent gebundenen Flavin in der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase [27].

Zur Bestimmung der Seite des kovalenten gebundenen Flavin von HNR wurde zunächst die proteolytische Spaltbarkeit des Proteins durch reduktive Carboxymethylierung erhöht. Aber Probleme der Löslichkeit nach Carboxymethylierung der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase verhinderten die Isolierung der Peptide mit HPLC.

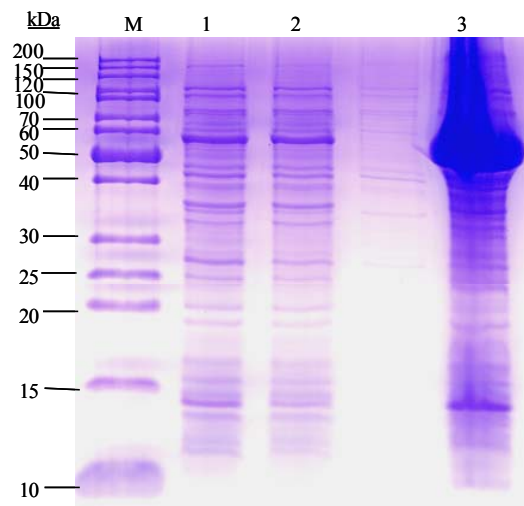


**Abb. 3.8: SDS-PAGE von 6-Hydroxynicotinat-Reduktase:** Beide Spuren an der linken Seite sind vom Coomassie-gefärbtem SDS-gel (M, Standard Proteinmarker; Hnr, gereinigte 6-Hydroxynicotinat-Reduktase). An der rechten Seite, gereinigte 6-Hydroxynicotinat-Reduktase nach SDS-PAGE, fotografiert unter UV-Beleuchtung.

### 3.3 Heterologe Überexpression der N-terminalen Strep-tagged *ena*, *hgd*, *hmd* und *hnr* Gene in *E.coli*

Für die Expression der Gene in *E. coli* wurde das *Strep*-tag II-System verwendet, wodurch sich das erhaltene Protein über eine Affinitätsreinigung-Säule aufreinigen ließ. Die Gene wurden mittels PCR unter Nutzung der aufgeführten Primer (siehe Tab.11 Material und

Methoden) aus der chromosomalen DNA von *E. barkeri* amplifiziert. Die Primer wurden an den Enden durch Anfügen von Restriktionsschnittstellen modifiziert. Die amplifizierten DNA Fragmente (*hgd*, *hnr* und *hmd*) wurden über Agarose Elektrophorese gereinigt, mit der Restriktions-Endonuklease *BsaI* verdaut, und in den mit *BsaI* geschnittenen pPR-IBA2 Vektor kloniert. Für *ena* wurde das isolierte PCR Produkt mit den Restriktions-Endonukleasen *BamHI* und *KspI* doppelverdaut und in den mit *BamHI/KspI* geschnittene pPR-IBA2 Vektor kloniert. Nach Identifikation von positiven Klonen durch Restriktionsverdau wurden die angefertigten Konstrukte mittels Sequenzierung überprüft. Im Vergleich zu den aus Phagenbanken und mit PCR ermittelten Sequenzen wurden keine Mutationen beobachtet. Die Expressionskassetten der *Strep*-tag-Vektoren stehen unter der



**Abb. 3.9 : SDS-PAGE: Expression des *hnr*-Gens.** Spur M: Proteinmarker; 1: Expressionsklon vor Induktion 2.:Zellfreier Extrakt 3h nach Induktion; 3: resuspendiertes Pellet in (Puffer W) 3h nach Induktion

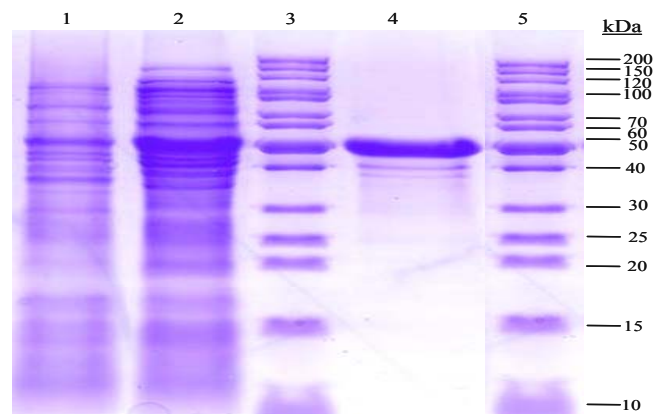
transkriptionellen Kontrolle des Isopropyl- $\beta$ -D-Galaktosid (IPTG) induzierbaren T7-Promotor/Operators. Durch die sich an den T7-Promotor/Operator anschließende Ribosomenbindestelle wird die Initiation der Translation gewährleistet. Die Expression von Genen im mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli*-Stamm BL21 wurde durch Zugabe von 0,5 bis 3 mM IPTG induziert. Der Nachweis der Expressionsprodukte erfolgte durch SDS/PAGE von in Probepuffer aufgekochten ganzen Zellen vor und nach Induktion. Zusätzlich wurden induzierte Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen und mit Ultrazentrifugation fraktioniert. Die lösliche Fraktion wurde mit Affinitätschromatographie über Strep-Tactin Säulen gereinigt (siehe Material und Methoden). Expression und Reinigung

der Enamidase und 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase war erfolgreich und wird in den nachfolgenden Kapittel dargestellt. Leider waren die Ergebnisse mit Expression von *hnr* und *hmd* vor allem in Hinsicht auf Löslichkeit der Expressionsprodukte bisher noch nicht positiv. Trotz viele Versuche mit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Temperatur, aerob/anaerob) und Induktion (Zeitpunkt der Induktion, Länge der Induktion, IPTG Konzentration) wurde nur unlösliches Hnr und Hmd isoliert (siehe Abb. 3.9 als Beispiel für Hnr). Die Proteine häuften sich anscheinend als Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) in der Zelle an.

### 3.4 Enamidase

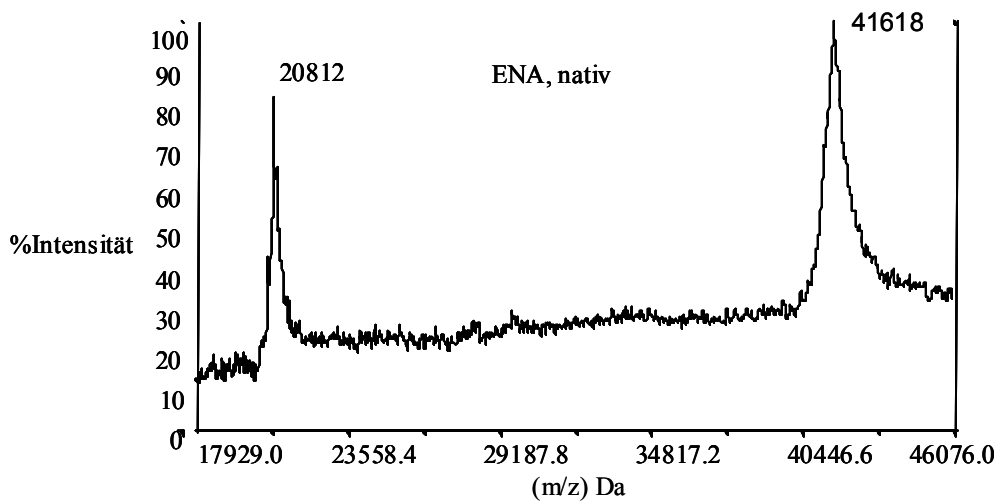
#### 3.4.1 Expression des *ena* Gens in *E. coli* und Reinigung der Enamidase

Nach mehreren Versuche stellte sich heraus, dass die optimale Ausbeute von löslicher N-terminal Streptagged Enamidase durch Induktion mit 1,5 mM IPTG und Wachstum für 3 Stunden bei 30 °C erzielt wurde. Pro Liter Expressionskultur konnten ca. 10 mg Protein isoliert werden. Die gute Expression erlaubte weitere Untersuchungen und vor allem Kristallisation.



**Abb. 3.10 : SDS/PAGE, Überproduktion und Reinigung von Enamidase:** Der pBR-IBA2 Vektor mit kloniertem *Ena*-Gen wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Von diesen Zellen wurde eine Flüssigkultur gezogen, die nach Erreichen einer  $OD_{600} = 0,6$  mit 1,5 mM IPTG induziert wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Spur 1: Expressionsklon vor Induktion; 2: Zellfreier Extrakt 3h nach Induktion; 3: Proteinmarker; 4: gereinigte Enamidase bei einer Masse von 42 kDa; 5: Proteinmarker.

Abb. 3.10 zeigt den Verlauf von Überproduktion und Reinigung auf SDS-PAGE. Für Kristallisation wurde die Enamidase mit Gelfiltration weiter über Superdex 200 gereinigt. Die in *E. coli* produzierte Enamidase eluierte wie das aus *E. barkeri* gereinigte Protein als Homotetramer. Mit MALDI-TOF Massenspektrometrie (Abb. 3.11) wurde eine Molekülmasse von  $41.618 \pm 100$  Da für die N-terminal Streptagged Enamidase gemessen (berechnete Masse 41.650 Da, ohne N-terminales Methionin).



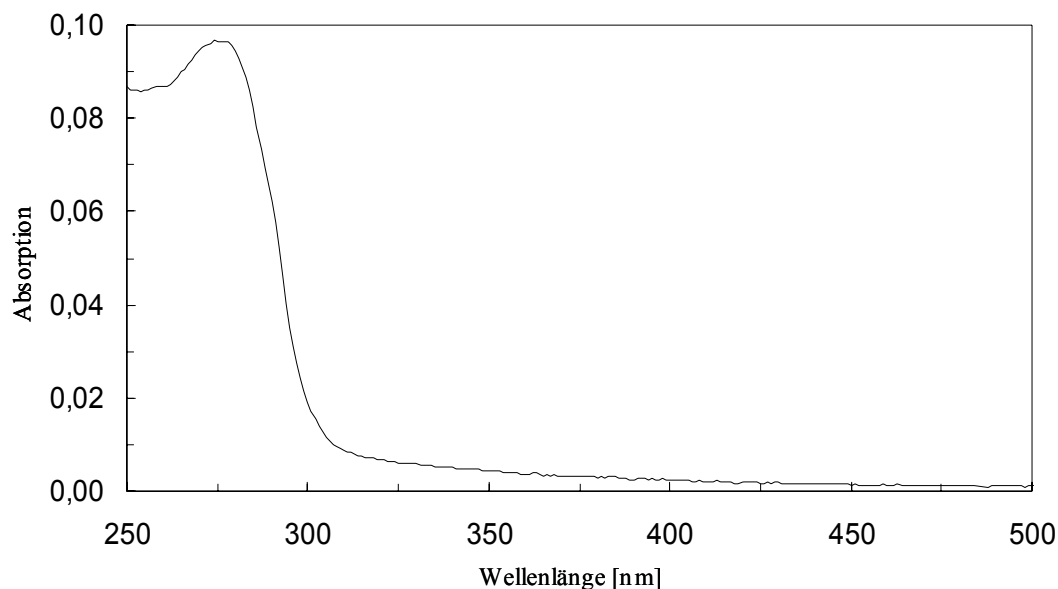
**Abb. 3.11: Analyse von Enamidase durch MALDI/TOF Massenspektrometrie.** Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet. Zusätzlich wurde ein Peak für das doppelt geladenene Ion bei  $m/z$  20812 beobachtet

### 3.4.2 Enamidase ist ein Metalloprotein

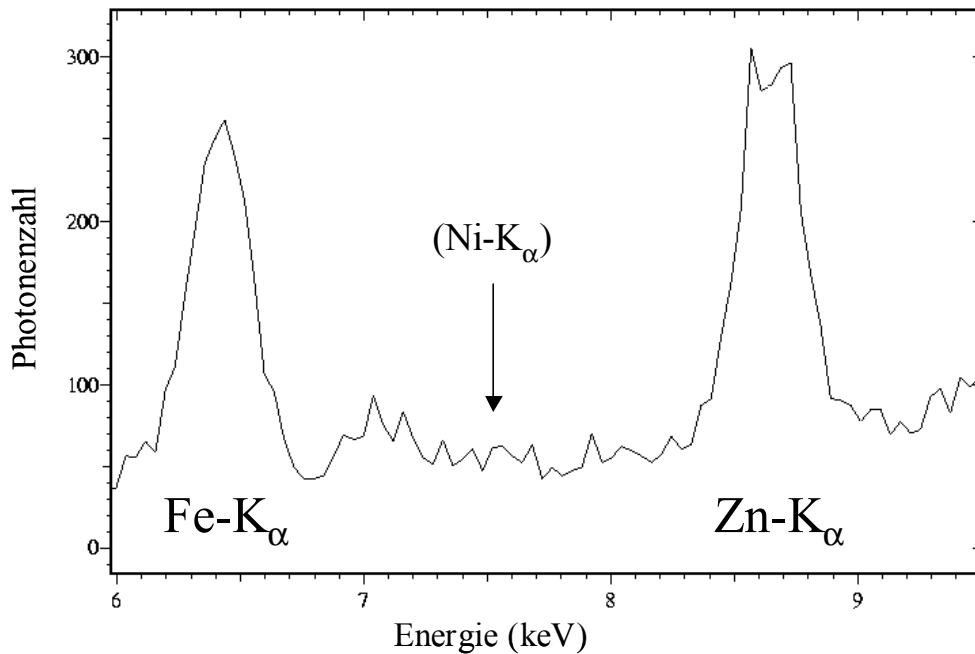
Eine Datenbanksuche mit der kompletten Aminosäuresequenz der Enamidase gab Homologie zu vielen Enzymen, die zur Amidohydrolase Superfamilie gehören. Alle diese Enzyme zeigen 15-25% Identität mit der N-Terminale Sequenz der Enamidase, und teilen ein konserviertes His-X-His Muster im N-Terminus, welches an der Bindung eines Metallions ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  oder  $Ni^{2+}$ ) beteiligt ist. Die Art dieses Metallions kann nicht aus der Primärsequenz ermittelt werden. Die meisten aber nicht alle Enzyme der Amidohydrolase Superfamilie haben ein binukleares Metallzentrum. Jedoch ist die Anwesenheit und Art des zweiten Metallions ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  oder  $Ni^{2+}$ ) durch niedrige Sequenzidentität nicht aus der Primärsequenz abzuleiten. Deswegen wurde für Enamidase aus *E. barkeri* und *E. coli* Eisen mit Feren und Zink mit 4-(2-Pyridylazo)resorcinol kolorimetrisch bestimmt. Beide

Präparationen enthielten 1,0-1,1 Fe und 0,8-1,0 Zn pro Monomer. Im sichtbaren Bereich zeigte die Enamidase keine ausgeprägte Absorption (Abb. 3.12). Es wurde jedoch beobachtet, dass die für die Kristallisation ankonzentrierte Enamidase Lösungen (20-40 mg/ml) ein leichte Gelbstich hatten.

Mit Röntgenfluoreszenz-Emissionsspektroskopie wurde von einem Enamidase Einzelkristall Mikroelementanalyse gemacht. Mit dieser Methode können Elemente nach Anregung mit Synchrotronstrahlung über die beim Zurückfallen zum elektronischen Grundzustand freigesetzte Röntgenstrahlung detektiert werden. Jedes Element hat bei einer bestimmten Energie spezifische Emissionsbanden [90] und die Intensität der Emission ist ein Maßstab für die Konzentrationen (siehe z. B. [91]). Die Anwesenheit von Eisen und Zink wurde mit Röntgenfluoreszenz Emissionsspektroskopie bestätigt (Abb. 3.13). Deutliche  $K_{\alpha}$  Emissionsbande bei 6,4 keV (Fe) und 8,6 keV (Zn) wurden detektiert, sowie schwächere Schultern für die entsprechenden  $K_{\beta}$  Banden (7,1 keV für Fe, 9,6 keV für Zn). Obwohl eine exakte quantitative Auswertung zu weit führen würde, kann jedenfalls aus den Intensitäten der Emissionsbanden ein ungefähres stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 für Fe und Zn abgeleitet werden. An der Position der Ni  $K_{\alpha}$  Band (7,5 keV, siehe Pfeil in Abb. 3.13) wurde keine Emission wahrgenommen und damit die Anwesenheit von signifikante Mengen Nickel in der Enamidase ausgeschlossen.



**Abb. 3.12 :** UV/Vis-Spektrum von Enamidase aus *E. coli*. Das Spektrum wurde an einem Diodenarray Photometer (Zeiss, Jena) bei Raumtemperatur ermittelt. Die Probe enthielt 150  $\mu\text{g}$  Protein in 10 mM Kalium-Phosphat Puffer pH 7,0.

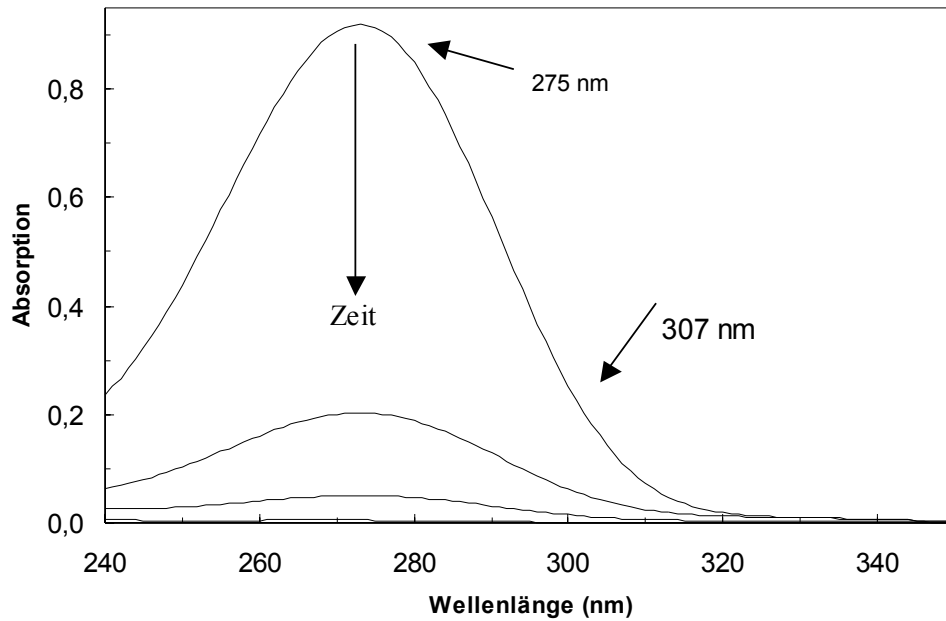


**Abb. 3.13 : Röntgenfluoreszenz Emissionsspektrum von einem Enamidase Einzelkristall.**

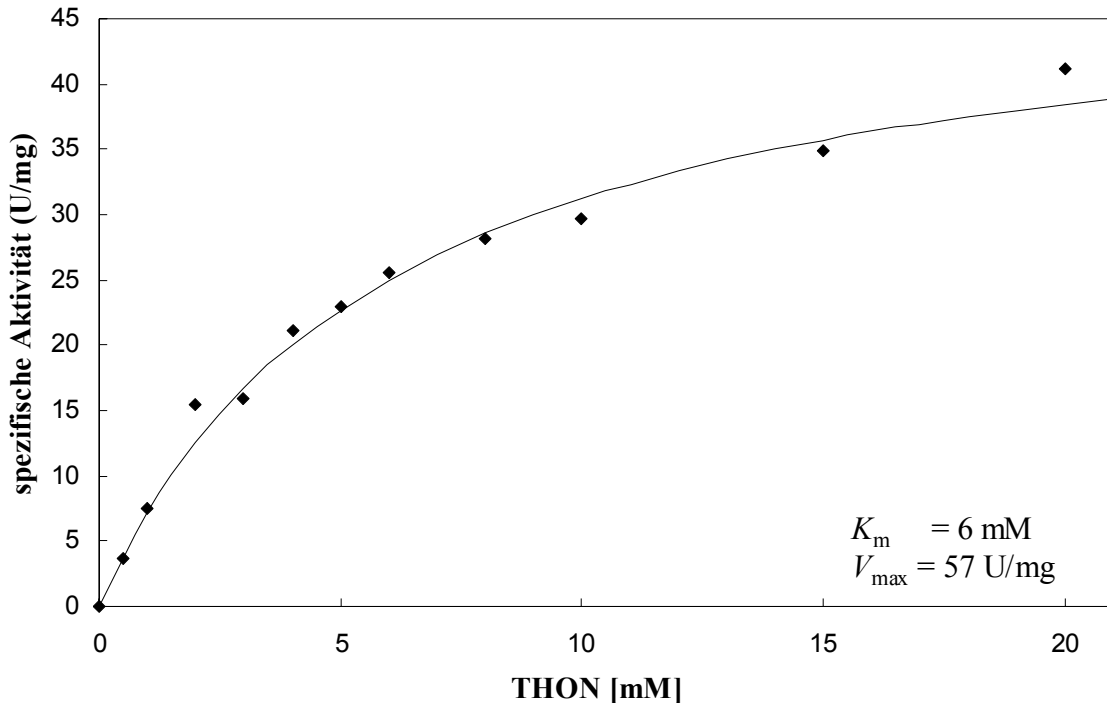
Das Spektrum wurde gemessen nach Anregung mit Synchrotronstrahlung (13,6 keV) mit einem Fluoreszenzdetektor, Beamline BW6, DESY, Hamburg.

### 3.4.3 Kinetik der Enamidase

Bei neutralem pH hat THON ein Absorptionsmaximum bei 275 nm ( $\epsilon = 11,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Das Produkt der Hydrolyse, 2-Formylglutarat, absorbiert in diesem Bereich nicht. THON-Hydrolyse konnte über UV-Spektralphotometrie bequem verfolgt werden (Abb. 3.14). Zuerst wurde THON verwendet, das enzymatisch, ausgehend von 6-Hydroxynicotinat, mit der 6-Hydroxynicotinat Reduktase synthetisiert wurde. Die Verwendbarkeit von synthetischem THON in größeren Mengen vereinfachte die Messungen und ermöglichte eine weitere Charakterisierung. Da THON bei 275 nm zu stark absorbiert, um Messungen bei Konzentrationen über 0,2 mM in normalen Küvetten durchzuführen, wurde die Aktivität von Enamidase über die Absorptionsabnahme bei 307 nm ( $\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und in Küvetten mit geringeren Schichtdicken (1, 2 und 5 mm) verfolgt. Die Messungen mit Schichtdicken von 1 und 2 mm (THON Konzentration  $> 4 \text{ mM}$ ) erwiesen sich wegen der Bildung von Luftbläschen als relativ schwierig.



**Abb. 3.14: Die Änderung der Abnahme von THON durch Zugabe von Enamidase.** Die Spektren (von oben nach unten) werden 2, 6 und 24 Stunden nach Zugabe von 5  $\mu\text{g}$  gereinigter Enamidase aufgenommen (0,8 mM THON, 20 mM Kalium Phosphat puffer, pH 7,4).



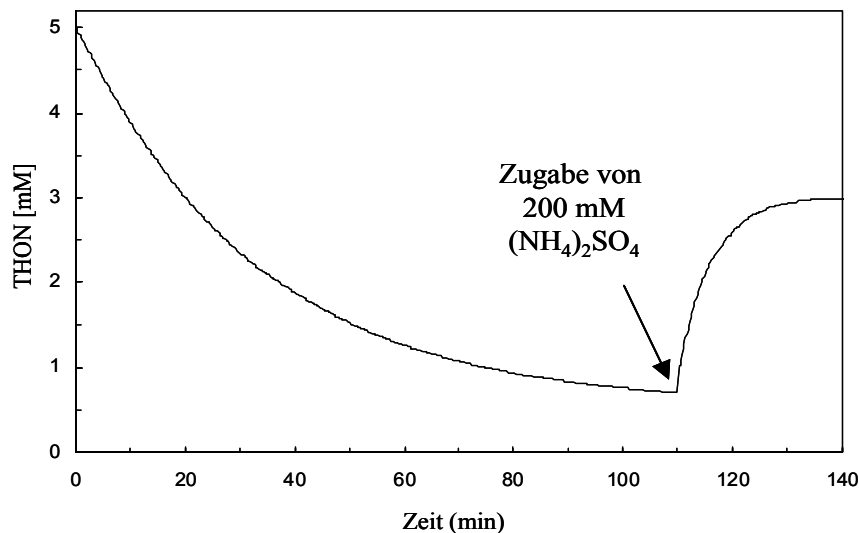
**Abb. 3.15: Michaelis-Menten-Auftragung der spezifischen Enzymaktivität gegen die THON Konzentration.**

Die photometrische Test zur Ermittlung der Enamidase-Aktivität wurde in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 bis 10 mm und in einem Volumen von 500 bis 800  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Die Aktivität wurde an der Absorptionabnahme von THON bei 307 nm ( $\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

verfolgt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM CHES Puffer, pH 9,5, 1 bis 20 mM THON (Substrat) und 10 – 20  $\mu\text{g}$  Enamidase. Die Testansätze wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bestimmungen wurden für THON-Konzentrationen von 1 bis 20 mM durchgeführt. Trotz leichter Streuung der Daten in oberen Konzentrationsbereich konnte ein apparter  $K_m$ -Wert von 6 mM und ein  $V_{\text{max}}$  von 57 U/mg bestimmt werden (Abb. 3.15). Für Enamidase isoliert aus *E. barkeri* wurde ein apparter  $K_m$ -Wert von 11 mM und ein  $V_{\text{max}}$  von 53 U/mg bestimmt.

### 3.4.4 Bildung von THON (1,4,5,6-Tetrahydro-6-Oxonicotinat) durch Enamidase

Enamidase katalysierte nicht nur die Hydrolyse von THON, sondern auch dessen Bildung. Dazu wurde die Gleichgewichtslage durch Zugabe von 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  verschoben (Abb. 3.16). In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Zugabe nach Entfernung der Enamidase durch Membranfiltration (Centricon YM30) keine Absorptionszunahme verursachte.



**Abb. 3.16: Hydrolyse und Bildung von THON durch die Enamidase.** Eine THON-Lösung (5mM in 50 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,4) wurde mit 10  $\mu\text{g}$  Enamidase 110 min lang hydrolysiert. Danach wurde  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zu einer Endkonzentration von 200 mM zugegeben.

### 3.5 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase

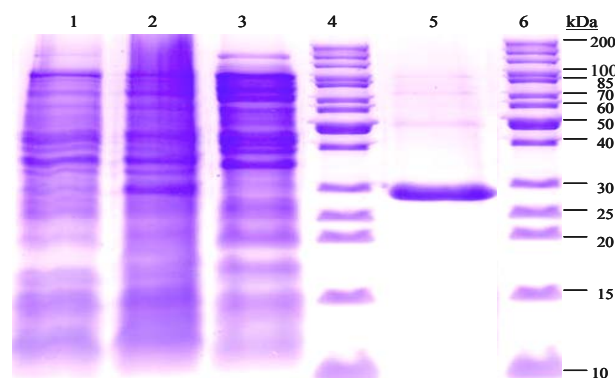
Auf Grund der Aminosäuresequenzidentität mit 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase [92] und Tartronat-Semialdehyd-Dehydrogenase [86] wurde vermutet, dass das *hgd* Gen im



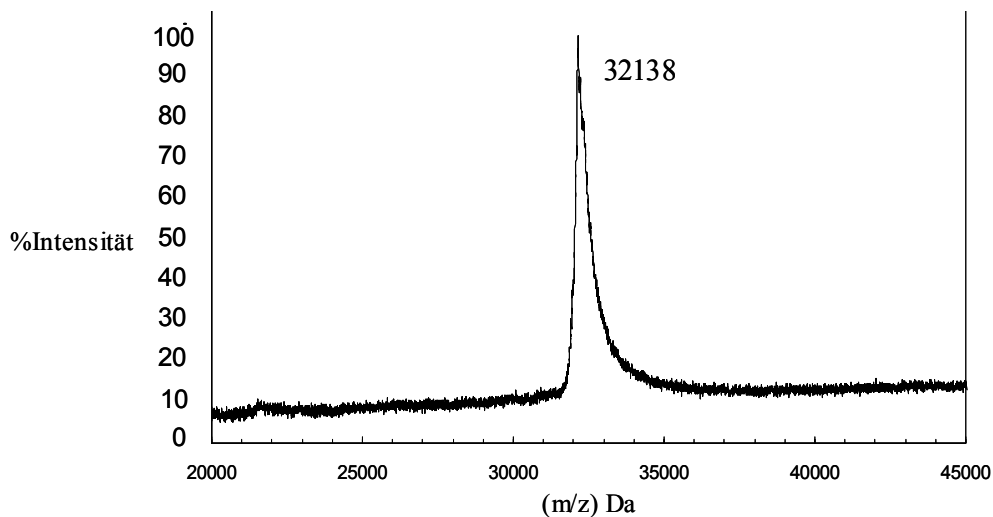
Nicotinat-Locus von *E. barkeri* die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase kodierte. In diesem Kapitel wird diese Vermutung durch heterologe Expression in *E. coli*, Reinigung und Charakterisierung der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase Aktivität bestätigt.

### 3.5.1 Expression des *hgd* Gens in *E.coli* und Reinigung der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase

Das Wachstum von *E. coli* BL21, transformiert mit pPR-IBA2-*hgd*, war im Gegensatz zu den Beobachtungen mit *ena* komplizierter. Die Wachstumsrate, vor allem nach Induktion mit IPTG, war viel niedriger. In einigen Fällen wuchs die Kultur nach Induktion sogar nicht weiter. Es wurde Vermutet, dass die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase in *E. coli* mit  $\text{NAD}^+$  und bestimmten Verbindungen toxische Aldehyd bildete. Mehrere Versuche mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen, Wachstumtemperaturen und Zeiten scheiterten. Nur Induktion mit 3 mM IPTG und Inkubation für 15 h bei 30 °C führte zu weiteren Wachstum. Glücklicherweise war die überproduzierte N-terminale Streptagged 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase löslich; jedoch war die Ausbeute durch das relativ schlechte Wachstum nur ca. 2 mg Protein pro Liter Expressionskultur. Der Verlauf von Überproduktion und Reinigung wird in Abb. 3.17 anhand von SDS-PAGE dargestellt. Mit MALDI-TOF Massenspektrometrie (Abb. 3.18) wurde eine Molekülmasse von  $32.138 \pm 100$  Da bestimmt und stimmte mit der berechneten Masse des N-terminalen Streptagged Hgd von 32.199 Da nach Entfernung des N-terminalen Methionins überein. 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase eluierte bei Gelfiltration über Superdex 200 als Homotetramer.



**Abb. 3.17 : SDS-PAGE: Expression des *Hgd*-Gens.** Spur 1: Expressionsklon vor Induktion; 2: Zellfreier Extrakt 3h nach Induktion; 3: Durchlauf; 4: Proteinmarker 5: die über Strep.tag Säule gereinigte 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase bei einer Masse von 30 kDa 6: Proteinmarker

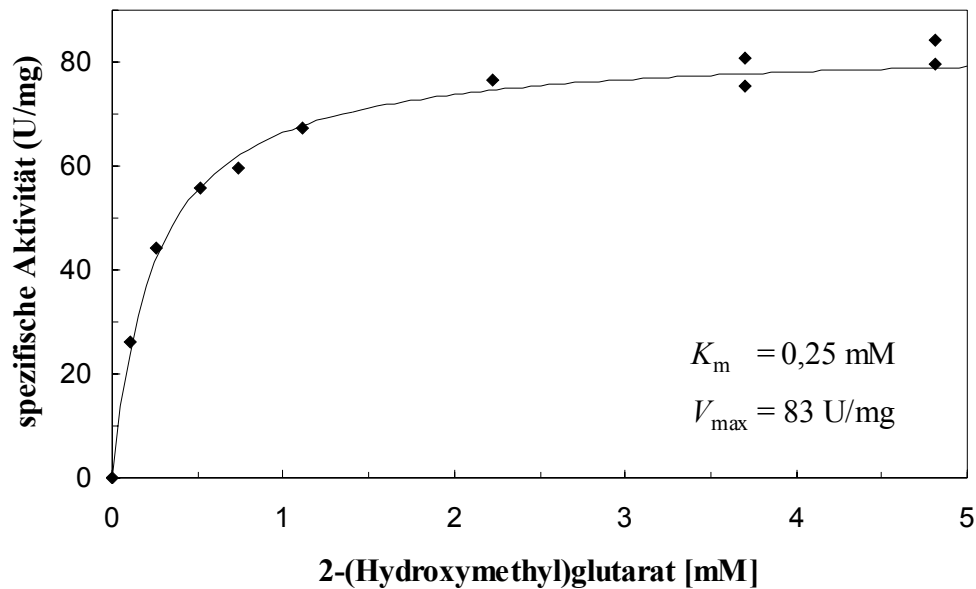


**Abb. 3.18: Bestimmung der molekularen Masse der Hgd mit MALDI/TOF Massenspektrometrie.** Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet.

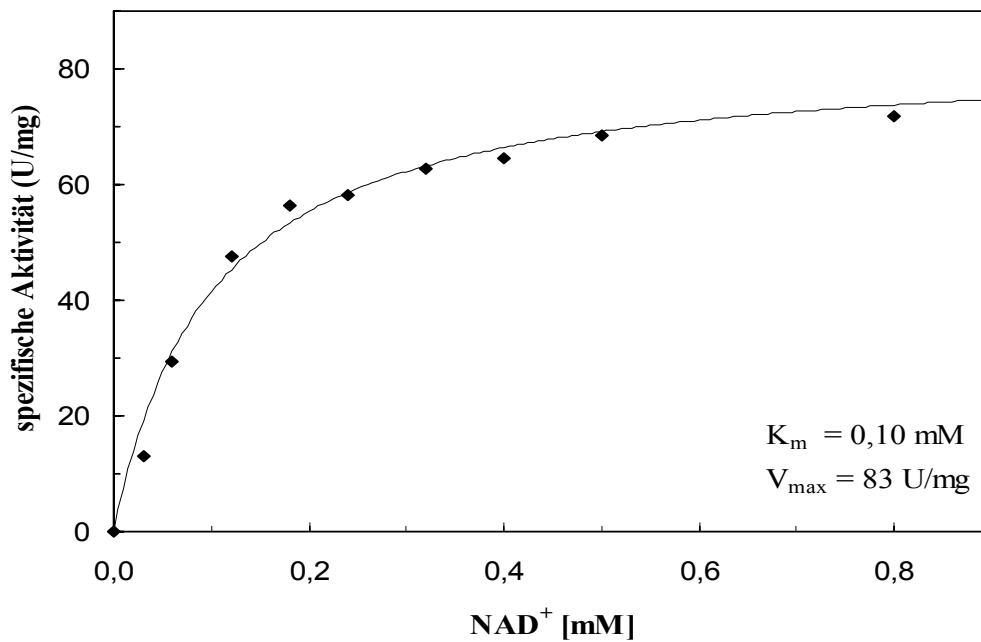
### 3.5.2 Kinetik der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase

Die Aktivität der gereinigten N-terminalen Streptagged Hgd wurde mit chemisch synthetisierten razemischen 2-(Hydroxymethyl)glutarat über die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu NADH nm gemessen. Es stellte sich heraus, dass die mit Meldolablauf und INT gekoppelte Aktivitätsbestimmung eine relativ hohe Hintergrund-Absorptionszunahme hatte. Aber es wurde beobachtet, dass die NADH Bildung (bei 340) pH 8,5 bis 10,5 auch ohne INT/Meldolablauf stattfand. Die höchste Aktivität wurde in 0,1 M Glycin/NaOH bei pH 9,5 gemessen. Das direkte Verfolgen der NADH Bildung ohne hohen Hintergrund war vor allem für die Messungen der Substratanaloga mit niedrigen Wechselzahlen (siehe unten) von Bedeutung. Hgd hat eine spezifische Aktivität von 83 U/mg und  $K_m$ -Werte von 0,25 mM für 2-(Hydroxymethyl)glutarat und 0,10 mM für  $\text{NAD}^+$  (Abb. 3.19 und 3.20). Falls Hgd nur ein

Stereoisomer des 2-(Hydroxymethyl)glutarats benutzt und das falsche Stereoisomer nicht hemmt, könnte der  $K_m$ -Wert für 2-(Hydroxymethyl)glutarat noch zweifach niedrig sein. Hgd ist  $\text{NAD}^+$  spezifisch:  $\text{NADP}^+$  zeigte weniger als 0,1% Aktivität. Die ermittelten Werte zeigten, dass Hgd ein sehr spezifisches Enzym ist.



**Abb. 3.19: Bestimmung des  $K_m$ -Werts für das Substrat 2-(Hydroxymethyl)glutarat der HGD.** Die Messungen wurden mit  $0,2 \mu\text{g}$  2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase bei Raumtemperatur in  $100 \text{ mM}$  Glycin/NaOH, pH 9,5 mit  $5 \text{ mM}$   $\text{NAD}^+$  durchgeführt (Volumen  $1 \text{ ml}$ ). Es wurde racemisches 2-(Hydroxymethyl)glutarat verwendet.

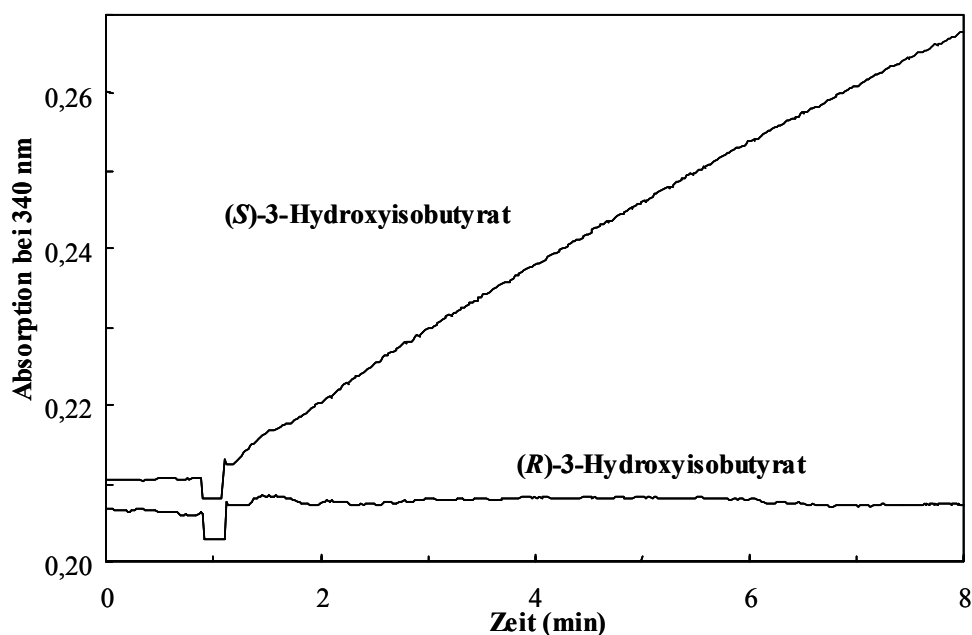


**Abb. 3.20: Bestimmung des  $K_m$ -Werts für das Substrat  $\text{NAD}^+$  der Hgd.** Die Messungen wurden wie in Abb. 3.19 in Anwesenheit von 10 mM racemischem 2-(Hydroxymethyl)glutarat durchgeführt.

### 3.5.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase für weitere Substrate

Die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase gehört zur 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase / 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase Familie [93]. In dieser Familie sind weitere Enzyme wie Serin-Dehydrogenase und Tartronat-Semialdehyd-Dehydrogenase vertreten, die 3-Hydroxysäuren mit  $\text{NAD(P)}^+$  zu 3-Ketosäuren oxidieren. Zur Überprüfung der Substratspezifität der Hgd wurde eine Reihe von typischen Substraten für diese Enzymfamilie getestet. Zusätzlich wurde erwartet, dass über die Spezifität der Hgd für einzelne Stereoisomere dieser ('nicht-natürlichen') Substrate die Stereochemie des natürlichen Substrats 2-(Hydroxymethyl)glutarat abgeleitet werden konnte. Eine Synthese der reinen Stereoisomere von 2-(Hydroxymethyl)glutarat stand noch nicht zur Verfügung (persönliche Mitteilung Dr. D. Darley).

Für die Aktivitätsmessungen mit potentiellen Substraten wurden üblicherweise bis 100-fach größere Mengen an Hgd benutzt, um eine hinreichende Empfindlichkeit zu gewährleisten. Ein Beispiel für solche Aktivitätsmessungen wird in Abb 3.21 für 3-Hydroxyisobutyrat gezeigt.

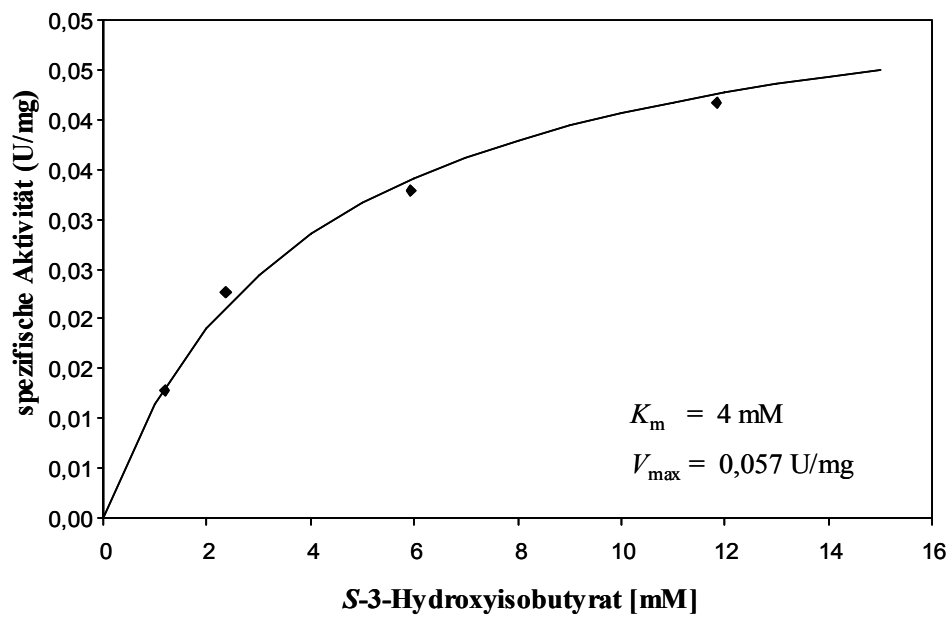


**Abb. 3.21:** Hgd zeigt Aktivität mit dem *S*- aber nicht mit dem *R*-Stereoisomer von 3-Hydroxyisobutyrat. In einem Volumen von 1 ml wurde 5 mM  $\text{NAD}^+$ , 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,5 in Anwesenheit von 10 mM 3-Hydroxyisobutyrat inkubiert. Nach 1 min wurde 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (35  $\mu\text{g}$ ) zugegeben und die NADH Bildung über die Absorptionzunahme bei 340 nm verfolgt.

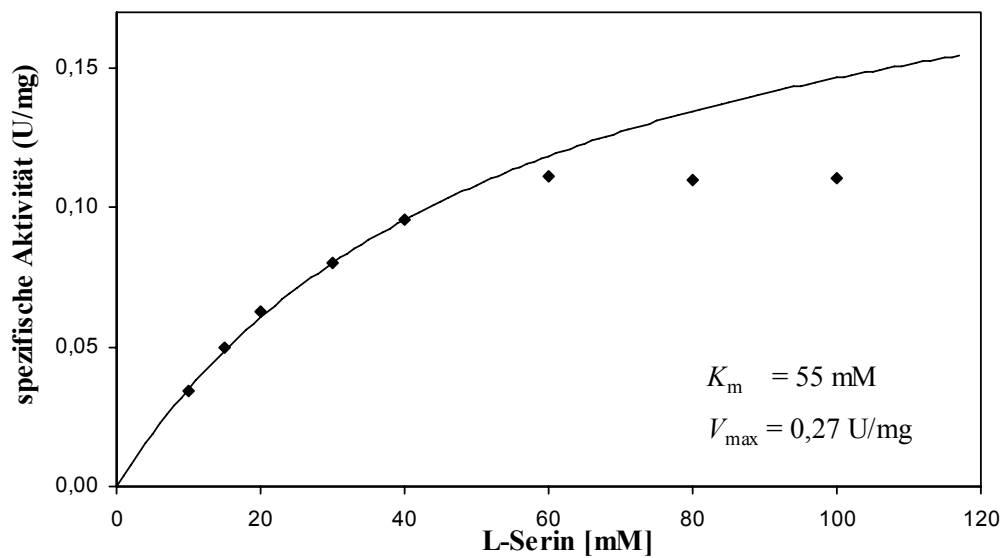
In Tab. 3.2 sind die kinetischen Parameter der Hgd für 2-(Hydroxymethyl)glutarat und von drei aktiven Stereoisomeren von Substraten mit niedriger Aktivität zusammengefasst (siehe Abb. 3.22 bis 3.24 für die Bestimmung der Parameter). Neben diesen Substraten wurde eine ganze Reihe von weiteren Substanzen getestet, jedoch keine zeigte signifikante Aktivität ( $< 0,02$  U/mg bei 50 mM, siehe Tab. 3.3)

**Tab. 3.2.** Aktivitäten und  $K_m$  Werte für Substrate der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase

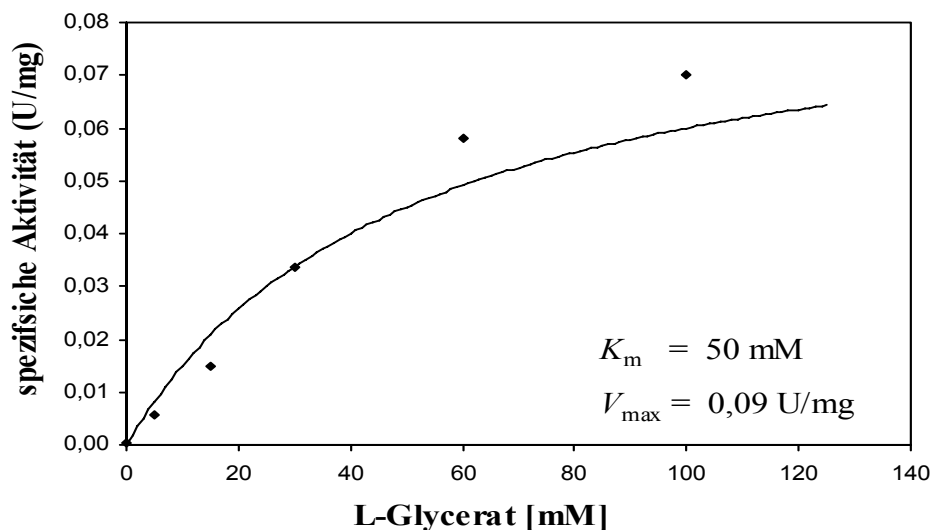
Substrat	Aktivität (U/mg)	$K_m$ Wert (mM)
2-(Hydroxymethyl)glutarat (razemisch)	83	0,25
( <i>S</i> )-3-Hydroxyisobutyrat	0,057	4
L-Serin	0,27	55
L-Glycerat	0,09	50



**Abb. 3.22:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für das Substrat (S)-3-Hydroxyisobutyrat der Hgd. Siehe Abb. 3.21 für die Bedingungen.



**Abb. 3.23:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts der Hgd für das Substrat L-Serin. Siehe Abb. 3.21 für die Bedingungen.



**Abb. 3.24 :** Bestimmung des  $K_m$ -Werts der Hgd für das Substrat L-Glycerat.

Siehe Abb. 3.21 für die Bedingungen.

**Tab. 3.3.** Getestete Substrate mit der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase, die keine Aktivität zeigten ( $< 0,02 \text{ U/mg}$  bei  $50 \text{ mM}$ )

( <i>R</i> )-3-Hydroxyisobutyrat	( <i>S</i> )-3-Hydroxybutyrat
D-Serin	D-Glycerat
D-Threonin	3-Hydroxypropionat
L-Threonin	Ethanol
D-allo-Threonin	2-Propanol
L-allo-Threonin	1-Butanol
( <i>R</i> )-3-Hydroxybutyrat	D-Lactat

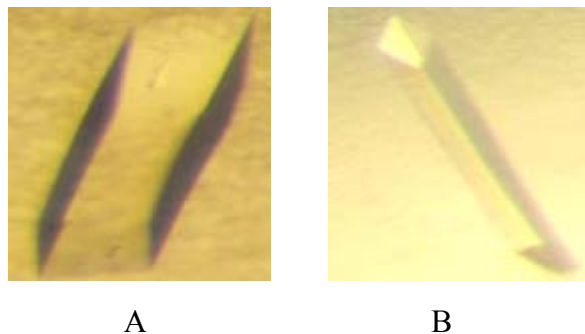
## 3.6 Kristallisation und Strukturaufklärung der Enamidase

### 3.6.1 Proteinkristallisation

Beim Vorscreening mit der Sitting-Drop Methode am mikroskopische Kristallisationsroboter im sub- $\mu\text{l}$  Maßstab konnte bereits nach wenigen Stunden in einigen der Kristallisationsansätze der Enamidase kristallines Material beobachtet werden. Nach einer Woche enthielten 7,5 %

der insgesamt 480 Bedingungen Kristalle. Ein Kristall (Nextal Classic Screen, Bedingung Nr. 70: 0,2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Natriumcacodylat, pH = 6,5; 30 % PEG 8000) wurde direkt in der Arbeitsgruppe Essen (Fachbereich Chemie, Uni-Marburg) unter Verwendung von Cu-K $\alpha$  Strahlung vermessen und lieferte einen ersten Datensatz bis zu einer Auflösung von ca. 2,7 Å. Leider konnte das Phasenproblem nicht durch Molecular Replacement mit Strukturen anderer Amidohydrolasen gelöst werden (Mitteilung Prof. L.-O. Essen).

Ausgehend von der erfolgreichen Kristallisationsbedingung, die zum 2,7 Å Datensatz führte, wurde anschließend ein Feinscreen zur Verbesserung der Kristallqualität durchgeführt. Dabei wurden in selbst angesetzten Lösungen systematisch pH-Wert (pH 5,5/6,0/6,5/7,0), Salzkonzentration (0,1/0,2/0,3 M Ammoniumsulfat) und Fällungsmittelkonzentration (10 bis 30 % PEG 8000) mit der Hanging Drop Methode variiert. Außerdem wurden die Kristallisationsansätze bei verschiedenen Temperaturen (6 und 18 °C) inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Temperatur von 6 °C mit einer Kristallisationslösung erreicht, die 0,2 M Ammoniumsulfat und 17,5 % PEG 8000 enthielt. Als optimale pH-Werte wurden



**Abb. 3.25: Fotografien typischer Enamidasekristalle**

(A) nativer Kristall (ca. 0,1 mm in Längsrichtung)

(B) Kristall der mit Selenomethionin markierten Enamidase (ca. 0,3 mm in Längsrichtung)

Kristallisationsbedingung: 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5, 0,2 M Ammoniumsulfat, 17,5 % PEG 8000

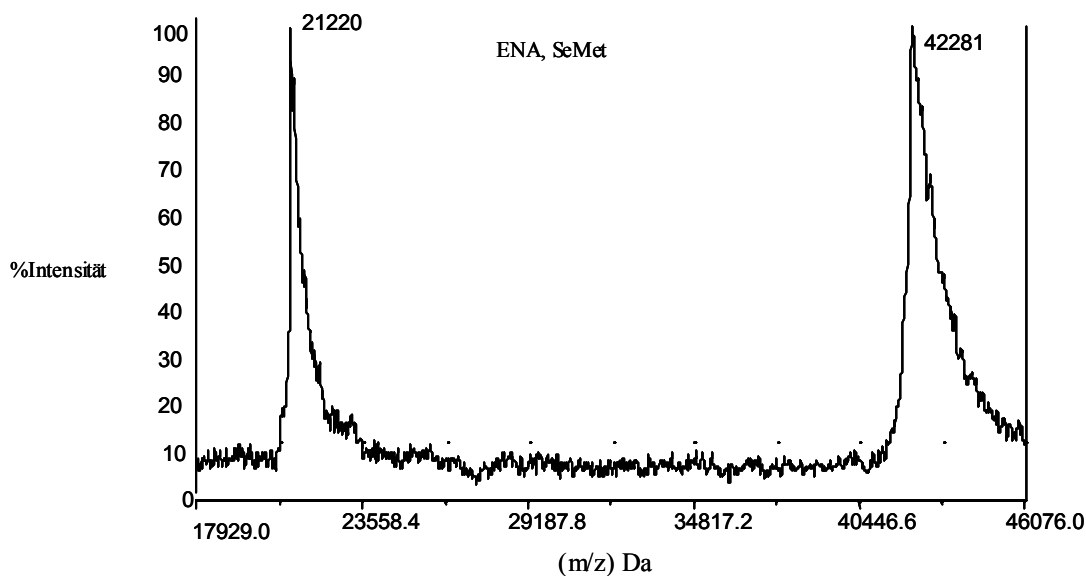
pH 6,5 (0,1 M Natriumcacodylat) bzw. 7,0 (0,1 M Tris-HCl) bestimmt, wobei jeweils Proteinlösungen mit einer Konzentration von 3 bis 8 mg/mL verwendet wurden (siehe Abb. 3.25).

Um das Phasenproblem zu lösen, wurde die Enamidase mit Selenomethionin markiert. Diese Markierung erlaubt nach Vermessen von Datensätzen mit Synchrotronstrahlung bei verschiedenen Wellenlängen die kristallographische Phaseninformation zu erhalten. Eine Voraussetzung für die Selenomethionin-Markierung war die bereits etablierte heterologe Expression in *E. coli* (transformiert mit dem pPR-IBA2-*ena* plasmid). Durch Wachstum von



*E. coli* in einem Selenomethionin enthaltenden Minimalmedium kann diese Selenverbindung durch biologischen Einbau anstelle der natürlichen Aminosäure Methionin in Proteine eingeführt werden. Durch Inhibition der Methioninbiosynthese von *E. coli* BL21 mit einem Aminosäurengemisch (siehe Material und Methoden [94]) vor Zugabe von Selenomethionin wird die Einbau von nicht-markierten Methionin unterdrückt.

Das Wachstum von *E. coli* BL21 pPR-IBA2-*ena* auf Minimalmedium vor Induktion war bereits bedeutend langsamer als bei der üblichen Expression im LB Medium. Nach Induktion mit 1,5 mM IPTG war das Wachstum noch langsamer und statt 3 Stunden bei 30 °C wurde deswegen 18 Stunden inkubiert. Pro Liter Expressionskultur konnten ca. 1,5 mg Enamidase isoliert werden. Dass die Selenomethionin Markierung tatsächlich gelungen war, zeigte das (parallel mit nicht-markierter Enamidase aufgenommene) MALDI-TOF Massenspektrum (Abb. 3.26). Statt 41.618 Da (Abb. 3.11) wurde eine Molekülmasse von 42.281 Da beobach-



**Abb. 3.26: Analyse von Selenomethionin markierten Strep-tag-Enamidase durch MALDI/TOF Massenspektrometrie**

Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet. Zusätzlich wurde ein Peak für das doppelt geladenene Ion bei  $m/z$  21220 beobachtet

tet. Obwohl die absolute Werte der Massen einen systematischen Fehler von 100 Da erwarten lassen, entsprach die Differenz relativ genau den berechneten Massenzunahme von 656,5 Da bei vollständige Markierung (Enamidase hat 15 Methionine, N-terminales Methionin fehlt, Masse S 32,07, Masse Se 78,96).

Das Selenomethionin-markierte Enamidase konnte unter den gleichen Bedingungen wie das native Protein erfolgreich kristallisiert werden (siehe Abb. 3.25).

### 3.6.2 Die Struktur der Enamidase bei einer 1,89 Å Auflösung

Die Sammlung der Strukturdatensätze wurde unter Verwendung von Synchrotron-Röntgenstrahlung an der Max-Planck-Beamline BW6 am DESY in Hamburg durchgeführt. Dabei konnte ein nativer Datensatz bis 1,89 Å mit einer Vollständigkeit von 99,1 % gesammelt werden. Um das Phasenproblem zu lösen, wurde die sogenannte MAD-Methode (MAD, multiple wavelength anomalous dispersion) angewandt. Dazu wurde ein Kristall des mit Selenomethionin markierten Proteins bei drei verschiedenen Wellenlängen vermessen (siehe Tabelle 3.4). Die weitere Prozessierung der gesammelten Daten sowie die eigentliche Aufklärung und Verfeinerung der Struktur wurden in der AG Essen durchgeführt. Die folgende Tabelle enthält alle relevanten kristallographischen Daten.

**Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Kristallographischen Daten, Datensammlung, Phasierungs- und Verfeinerungsstatistiken**

(zur Verfügung gestellt von Daniel Kress und Prof. L.-O. Essen)

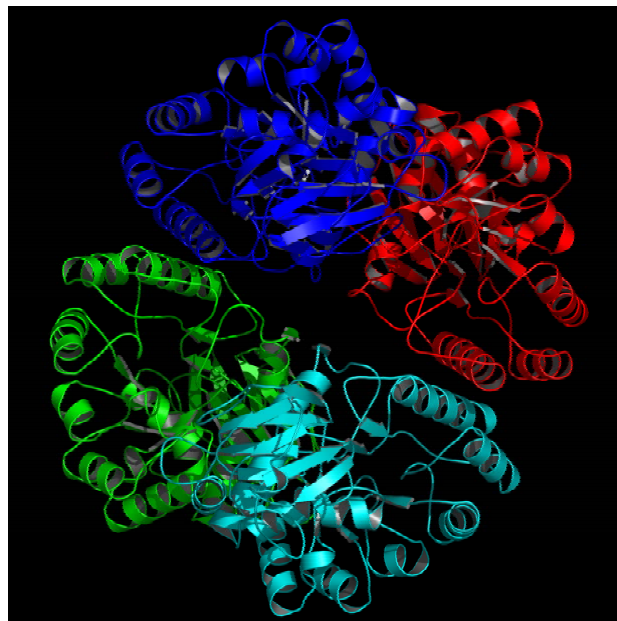
	SeMet			Wild type
<i>A. Data collection</i>				
Space group	C2221			C2221
<i>Unit cell axes</i>				
a (Å)	146.71			146.35
b (Å)	160.84			159.82
c (Å)	162.11			161.68
Wavelength (Å)	0.97943 (peak)	0.97963 (inflection)	0.95000 (remote)	1.05000
Resolution (Å)	40.4-2.5	40.4-2.5	40.3-2.5	39-1.89
Completeness (%)	100	100	100	99.1
No. reflections	244625	244157	243323	917787
No. unique reflections	65905	65951	95898	288999
Redundancy	3.7	3.7	3.7	3.2
R <sub>sym</sub> (%)	5.6 (11.6)	5.4 (11.2)	5.1 (11.9)	4.4 (25.4)
Mean I/σ I	16.0 (8.4)	16.7 (8.6)	17.5 (8.8)	18.5 (2.9)
Mosaicity	0.28			0.65
<i>B. Phasing</i>				
Scattering factor $f'$ (e <sup>-</sup> ) <sup>§</sup>	-6.0	-7.0	-3.0	
Scattering factor $f''$ (e <sup>-</sup> ) <sup>§</sup>	5.0	3.5	2.5	
Mean figure of merit	0.59			
<i>C. Refinement</i>				
Resolution range (Å)				38.78-1.89
No. reflections used in refinement				146770
R <sub>cryst</sub> (%)				0.17
R <sub>free</sub> (%)				0.20
No. residues				385
No. of protein atoms				12405
No. solvent molecules				1281
Average B-factors (Å) <sup>2</sup>				36.0

---

<i>r.m.s. deviations</i>	
bonds (Å)	0.015
angles (deg.)	1.414

---

In der Einheitszelle liegt ein Molekül von einem Enamidase Homotetramer mit 222-Symmetrie vor. Genauer betrachtet lässt sich dieses Tetramer als "Dimer von Dimeren" beschreiben (Abb. 3.27). Diese quartäre Struktur stimmt mit dem Elutionsverhalten bei der Gelfiltration überein (Homotetramer). Die über die DNA-Sequenz bestimmte Aminosäuresequenz der Enamidase ließ sich von Aminosäure 3 bis 386 (bezogen auf die Numerierung ohne N-terminale Streptag) hervorragend in die Elektronendichte hinein modellieren und es gab keine Hinweise auf Diskrepanzen. Elektronendichten für die ersten beiden Aminosäuren und den N-terminalen



**Abb. 3.27: Die dreidimensionale Struktur der Enamidase bei 1,89 Å Auflösung**

Dargestellt sind die vier Enamidase Untereinheiten, die zusammen ein Dimer von Dimere bilden. Einzelne Untereinheiten sind unterschiedlich eingefärbt.  $\beta$ -Faltblätter sind durch Pfeile repräsentiert,  $\alpha$ -Helices durch Spiralen. Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur wurden als Schleifen dargestellt.

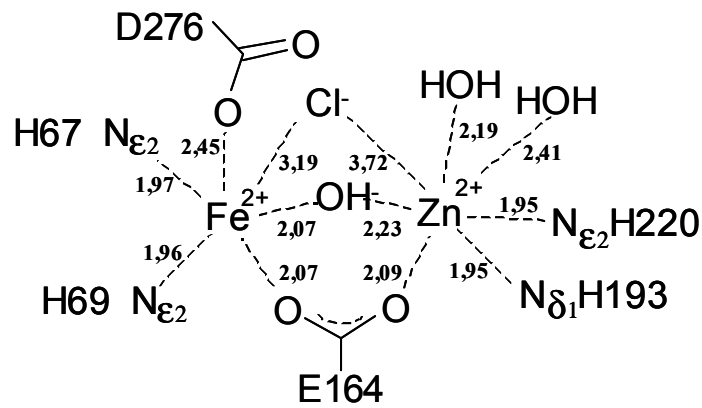
Streptag wurden nicht detektiert. Damit ist anzunehmen, dass dieser Teil der Enamidase ungeordnet in der Struktur vorliegt. Wie andere strukturell charakterisierte Enzyme der Amidohydrolase-Superfamilie besteht die größere Subdomäne (64-299) aus einem verzerrten  $(\alpha\beta)_8$  Faltungsmotiv, das halbseitig geöffnet ist. Die Aminosäuren K3-L63 und I301-386

bilden eine kleinere, in das  $(\alpha\beta)_8$  Fass inserierte, Subdomäne, die in einem  $\beta$ -Sandwich organisiert ist. Das  $(\alpha\beta)_8$  Fass bildet die meisten Protein-Protein Wechselwirkungen im Tetramer, wobei die  $\beta$ -Sandwichdomäne senkrecht aus den  $(\alpha\beta)_8$  Tetramer heraussteht.

Erwartungsgemäß wurde nach Primärstrukturvergleich und Metallanalyse der Enamidase zwischen den Aminosäuren H67, H69 und D276 (Metall-1) und zwischen den Aminosäuren H193 und H220 (Metall-2) eine hohe zusätzliche Elektronendichte wahrgenommen. Dieses binukleare Zentrum liegt zur C-terminalen Seite des  $(\alpha\beta)_8$ -Fasses. Die Karboxylatgruppe von E164 und ein als Sauerstoff modelliertes Atom verbrückten diese Elektronendichten. Obwohl die exakte Identität von Metall-1 und Metall-2 nur indirekt aufgrund der Größe der anomalen Differenzdichte bestimmt werden kann, waren die relative Elektronendichten bei Cu- $K_\alpha$  und 1,05 Å Synchrotron Strahlung in Übereinstimmung mit Fe als Metall-1 und Zn als Metall-2. Die kolorimetrische Eisen und Zink Bestimmung der für die Kristallisation benutzte Enamidase Präparationen bestätigten die Anwesenheit von stöchiometrischen Mengen an Fe und Zn.

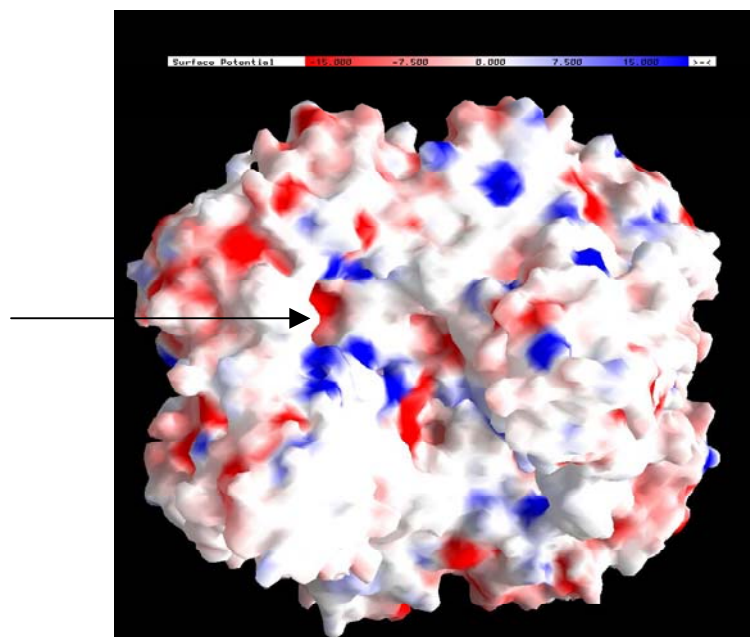
Neben den Elektronendichten der Metallionen und einem Brücken-Sauerstoff wurden in der direkten Koordinationsschale der Metallionen noch drei weitere Elektronendichten beobachtet. Zwei wurden als Wassermoleküle an Zn/Fe (Metall-2) modelliert, die dritte Elektronendichte war ausgedehnter und wurde als Chlorid-Ion zwischen Fe und Zn modelliert (siehe Abb. 3.28). In einer Kammer neben dem aktiven Zentrum ist bisher noch eine nicht näher identifizierte Elektronendichte gefunden worden (möglicherweise Tris; Cacodylat wurde ausgeschlossen). Zwei Aminosäuren (R78, H103) umgeben diese Kammer und liegen zusätzlich nahe an den Metallionen. Die andere Seite der Kammer wird durch die Aminosäuren 373-377 aus dem  $\beta$ -Sandwich der benachbarten Untereinheit aufgebaut.

Das binukleare aktive Zentrum der Enamidase liegt an der Seite des Zn-Ions (Metall-2) nahezu direkt an der Proteinoberfläche. Bei einer berechneten Ladungsdarstellung der Oberfläche der Enamidase wurde in der Nähe des Eingang zum aktiven Zentrum eine positive Oberfläche-Ladung beobachtet (Abb. 3.29, siehe Pfeil).



**Abb. 3.28: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Enamidase**

Die Aminosäuren und modellierte Atome in der direkte Koordinationsschale der Metallionen sind angezeigt. Für die Übersichtlichkeit sind die Metallionen als  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  dargestellt. Die Distanzen sind angegeben in Å (die Fe-Zn Distanz ist 3,64 Å).



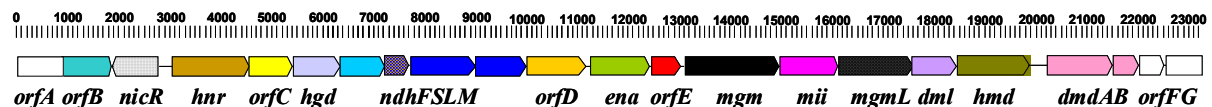
**Abb. 3.29: Berechnete Oberfläche-Ladungsverteilung der Enamidase**

Blau entspricht einer positiven, rot einer negativen Ladung. Die Berechnung wurde mit dem Programm GRASP durchgeführt mit einer Ionenstärke von 0,1 M NaCl. Der Pfeil deutet den Eingang zum aktiven Zentrum an.

## 4 Diskussion

### 4.1 Klonierung des Nicotinat-Locus

Um das komplette Nicotinat-Locus zu klonieren, wurden mit Hilfe des Lambda ZAP-Express-Systems chromosomale *EcoRI* und *BamHI/BglII* Genbänke von *E. barkeri* hergestellt. Mit Hilfe dieser Bänke wurden nach Screening von Phagenplaques mit Dig-markierte Sonden vier *E. barkeri* DNA-Fragmenten kloniert, die zusammen mit dem von Nadine Wagener klonierten Fragment [62] den zentralen 17.741 bp Teil der Gesamtsequenz umspannen. Durch zusätzliche direkte chromosomale DNA-Sequenzierung und Seegene Speedwalking, sowie durch PCR wurden weitere Abschnitte von 3.058 bp an der 5'-Seite und 2.403 bp an der 3'-Seite kloniert. Die Gesamtsequenz umfasst 23.202 bp mit einem G + C Gehalt von 52,8 %. Bei der Erstbeschreibung von *E. barkeri* wurde ein G + C Gehalt von 55-58 % erwähnt [7]. Dieser Unterschied könnte auf eine Ungenauigkeit bei der damaligen Bestimmung des G + C Gehalts zurückzuführen sein, oder deutet darauf hin, dass der Nicotinat-Locus einen niedrigeren G + C Gehalt hat.-+



**Abb. 4.1. Organisation der klonierten Gene im Bereich des Nicotinat-Locus. Der Maßstab ist in bp.**

In der Gesamtsequenz von 23.202 bp sind 22 Leseraster identifiziert worden (siehe Abb. 4.1. und Tabelle 3.2). Die Identifikation der 22 Leseraster im sequenzierten Bereich erwies sich als relativ einfach, da zum einen experimentelle N-terminale Sequenzen (Hnr, NdhFSLM, Ena, Mgm, Mii) verfügbar waren und zum anderen ähnliche Proteine in der Datenbank gefunden wurden. Auch waren in einigen Fällen die deutlich ausgeprägten Shine-Dalgarno Sequenzen (siehe Abb. 4.2.) für die Bestimmung des richtigen Startcodons hilfreich. Die Leseraster lagen mit Ausnahme von zwei intergenen Regionen (260 bp zwischen *nicR* und *hnr*, und 367 bp zwischen *hmd* und *dmdA*) sehr nah an einander und überlappt sogar in einigen Fällen. Von den 9 Enzymen, die an der Nicotinat-Fermentation beteiligt sind, sind über heterologe Expression und Aktivitätsmessungen die strukturelle Gene für (Hgd, Ena, Mgm, Mii, Dml)

Eubbar 16S	AGAAAGGAGGTGATC>NNNNNNNNCTTCCGATAC>NNNNNNCTT
Eubagg 16S	<u>GGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTT</u>
OrfB	taatggcgaaattaagcagctttccattattcccgataatgaagaattaagccaggaaa <b>TTG</b> aagccctctta <b>taa</b> agggtgtc
Ni cR	gctaaaaatgaaat <del>taaat</del> cgatatgggtgttccatcttaaaactaggaggtttgatcgt <b>ATG</b> acattaaacagcttgaatat
HNR	ttggaaaggagaatcagtgccggagaggaccgattattcgatgaaggagatctagagg <b>ATG</b> tttaaaattgatgaagaaaaag
OrfC	accggcaacgggtggcgcgggtggaatacacccatgacggtagcggattacgaagccatgg <b>GTG</b> gccatattggtcagatcaaag
Hgd	atgttgggggacccgcatggcgtggcaccccaatgaagta <b>tag</b> agatggagtggaaca <b>ATG</b> gaaaaatcaataaaaatgga
NdhF	cagcggctcattaaggatgggagcagatgaccggcgtttcagtttcaggagggcaatag <b>ATG</b> aaagactttgaatttttcggc
NdhS	ccagggcgtctttaaagctttttgtggacattctggatcaattagaagggggatgca <b>ATG</b> aat <b>taa</b> aatcaccattaatctt
NdhL	cgctgctgtgctacgccgtggaacgatgcccgaact <b>tg</b> aggatgaaggagggcgcc <b>ATG</b> gaaaggactatcaagtactt
NdhM	cgctcggcttaatcgaaacactggaaaaagccagagaaaaagcagtg <b>ggagg</b> tgatgggt <b>ATG</b> aaaaaacgcgg <b>taa</b> agggtg
OrfD	acaagaaaa <b>taa</b> aactgaatacaatccattaatgttaacaattagagaggggaaacact <b>ATG</b> gaaacaaagagaaaaacgca
Ena	aaaaaacactgagtcattcacgggtcattaccatgaaaatataat <b>ggagg</b> aactgt <b>ATG</b> agtaaaacaattatcaaaaac
OrfE	gcaaaaagagctgcaaaagatttta <b>taa</b> tttaaacatttagaataaaggagaaataat <b>ATG</b> gctgtagaaccgaaaatcaga
Mgm	tcccagggaaagctgaaagatagagaatcagatgttgaagagagtggaat <b>ggagg</b> agat <b>ATG</b> caagagaaaaacaaaagaatc
Mii	tgtgttaaaatcatcggcgatgatcaatgccaaagac <b>taa</b> taaggaggagaatg <b>ATG</b> agtgatcaaatgcgaatcccc
MgmR	tggaaggctatgtctacgtcgaaaaagcgaattagtt <b>taa</b> gaaatcgggaggcggag <b>ATG</b> gacgcgaatctcattgtattt
Dm1	gccgttctggattttatgcttgaagaatggaaaaatatagaacatgaggagattaa <b>ccATG</b> aatacagcagcaaaagatgaga
Hmd	catgggactggaaaagattcgcgaagtcgaacacaactacgccaccggagc <b>tag</b> cg <b>GTG</b> aaggccatgacagaatgaaga
DmdA	caacctgaccgcacacggtttcacttttttagatgaagaatgaaaaggagaattatatt <b>ATG</b> ggaatgcaaatgaccagaag
DmdB	catctgccatcctgggacgtattgcgaccccagacgaatt <b>taa</b> gaggaggacatttag <b>ATG</b> aaagcaaaaggaagtgtattt
OrfF	tatatataacgccactgagaag <b>tag</b> agggcgggagctgggcggt <b>ggggg</b> tagcgtct <b>ATG</b> aagggcggggggctggacat
OrfG	cagaacgaaacacctatgatttgcatt <b>tg</b> aagaatgacaagcaagaataaaggagagat <b>ATG</b> tacaaaatcgtcaaagccgaa

#### Abb. 4.2. Shine-Dalgarno Sequenzen, Start- und Stopcodons im Nicotinat-locus

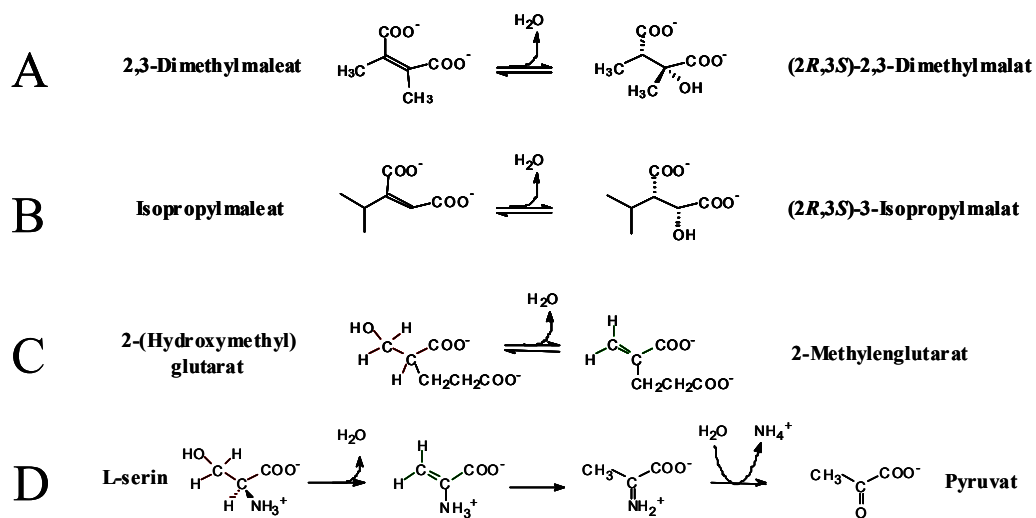
In Grossbuchstaben: *Eubbar* 16S zeigt das reverse Komplement der 16S r RNA Sequenz von *Eubacterium barkeri* (N sind unbekannte Nukleotide), *Eubagg* 16S zeigt das revers Komplement der 16S Sequenz von *Eubacterium aggregans*.

Schwarz unterstrichen sind Sequenzen die als Shine Dalgarno sequenzen betrachtet werden. Die identifizierte Startcodons sind rot und fettgedruckt (unterstrichen bei Bestätigung durch *N*-terminale Sequenzierung durch Edman Abbau). Die in blau dargestellte Nukleotide sind die Stopcodons der an der 5' Seite gelegene Leseraster.

Enzyme einwandfrei identifiziert worden. Über die Sequenzidentität und Ähnlichkeit der katalysierten Reaktion mit der Isopropylmalat-Isomerase (siehe Abb. 4.3, A und B) konnten die strukturellen Gene *dmdA* und *dmdB* zwar nicht sicher, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit denen der Dimethylmalat-Dehydratase zugeordnet worden. Das Strukturgen für die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase konnte über die Sequenzidentität mit [4Fe-4S]-Cluster enthaltenden Serin-Dehydratase [95] und die Ähnlichkeit der katalysierten Reaktion (siehe Abb. 4.3, C und D) identifiziert worden. Damit bildet die 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase ein neues Beispiel für Dehydratisierung von 3-Hydroxysäuren ohne Beteiligung von CoA-Ester.

Im sequenzierten Bereich befinden sich vier weitere Gene (*orfC*, *orfD*, *orfE*, *mgmL*), die durch ihre Lage zwischen bereits identifizierten Nicotinat-Fermentationsgenen (d.h. zwischen *hnr* und *dmdB*) höchst wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Nicotinat-Fermentation spielen. Von *MgmL* wird vermutet, dass es die Methylenglutarat-Mutase reaktiviert [55]. Proteine mit 32 % Aminosäuresequenzidentität zu *OrfC* und 40-55 % zu *OrfE* sind in sechs genomischen Sequenzen beide direkt an der 3'-Seite von *hnr*-ähnlichen Gene (Gen kodiert für 6-Hydroxynicotinat-Reduktase) (siehe 4.5). Die exakte Funktion dieser orfs lässt sich damit

nicht ableiten, jedoch diese Beobachtung bildet einen deutlichen Hinweis auf eine Funktion, die mit der Nicotinat-Fermentation assoziiert ist. Für das vierte Gen im *hnr-dmdB* Bereich, *orfD*, lässt sich über die Ähnlichkeit zu Genen, die möglicherweise an der Regulation der Perfringolysin-Produktion beteiligt sind, nicht weiteres ableiten. Im Gegensatz zu diesem membranständigen *orfD* ist das an der 5'-Seite von *hnr* liegende *nicR* durch Sequenzidentität mit LysR-Typ Regulatoren des Aromatenabbaus ein deutlicher Kandidat für Regulation der Nicotinat-Fermentationsgene. Die Beteiligung der *orfA*, *orfB*, *orfF* und *orfG* Gene an der Nicotinat-Fermentation ist weiterhin unklar.



**Abb. 4.3.** Vergleich der Reaktionen katalysiert von Dimethylmalat-Dehydratase (A), Isopropylmalat-Isomerase (B), 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase (C) und Serin-Dehydratase (D).

## 4.2 6-Hydroxynicotinat-Reduktase

Mit Datenbanksuchen wurden 6 Gene identifiziert, die für Proteine mit einer Länge von 495 bis 547 Aminosäuren mit 40-43 % Aminosäuresequenzidentität zur Hnr (6-Hydroxynicotinat-Reduktase) kodieren. Ein Alignment mit ClustalW (Abb. 4.4) zeigte, dass die 6-Hydroxynicotinat-Reduktase aus *E. barkeri* im Gegensatz zu den Homologen eine zusätzliche N-terminale Sequenz von 60 Aminosäuren hatte. In dieser N-Terminale Sequenz lagen zwei CXXCXXCXXXC Bindemotive vor. Dieses Cystein-Muster ist typisch für clostridielle 2x[4Fe-4S] Ferredoxine: die ersten drei Cysteine binden mit dem letzten Cystein des zweiten Musters das erste Cuban und die ersten drei Cysteine des zweiten Musters binden



mit dem letzten Cystein des ersten Musters das zweite Cuban. Ein geringfügiger Unterschied mit Ferredoxine ist, dass Hnr in einem der Muster nicht **CXXCXXCXXXCP** sondern **CXXCXXCXXXCK** besitzt. Diese zusätzliche N-terminale Sequenz von 60 Aminosäuren stellt in Hnr wahrscheinlich eine räumlich getrennte Ferredoxin-ähnliche Domäne dar.

Erst Aminosäure 65 bis 116 von Hnr zeigte im Alignment Ähnlichkeit zu den homologen Proteine und enthielt ein **CXXCPXXCX<sub>9</sub>C** Muster. Da mit ESR Spektroskopie gezeigt

```
Eubbar_Hnr      MFKIDEEKCKKCRMCVKECPVHAVVYEKKDKGAIVEITEKCVECGICKRVCKFGAienda  60
Silpom          -----MTER  4
SAR86          -----MTDQPS  6
Meslot         -----MSELAERFETHDPGEK  16
Brajap         -----MITAVSAGLHMVTETTS  17
Burxen         -----
Polsp          -----MTEHTKTDGLPGMDMPDPLQVMERARPRNER  31
```

```
Eubbar_Hnr      PLESVITCSSCPIQCKVPLGETGACTRYRNVGGKLVDRDELVVEALEQKEAADNIK---- 116
Silpom          IRPEKIRCDACPVLCYIADGKSGACDRYANHGELVRLDALTVIESGSTRVVPFLK----  60
SAR86          AKPVKIRCDACPVMCFIADGKSGACDRYANQDGLIRLDPLTVIESG-VPVAVFLD----  61
Meslot         QVAEKIRCDACPVMCIIADGRTGACDRYGNAGGRIVRMDPLTILDHAAGTGGTIVP----  72
Brajap         AATDKIRCDACPVMCYIKPGAAGACDRYANHDGKLVVDPHVLERTVSHGGKLV-----  73
Burxen         MASNKIECNACPVLQISEGRTGACDRYANSDGRLIRVDPVVFLSRDLTSDADAGSENA  60
Polsp          MNSEKIECNACPVLQISDGRSGACDRYANRGGTLVVRVDPVLLLRRLTADKEAHVVPFAG  91
                * * . : * * : * : * : * * * * * * . * : : * .
```

```
Eubbar_Hnr      -----KPIITAVGAGTNYPCSKPAPHIVSEC 142
Silpom          -----DAQTGDDWDGNIVQQNRAFVAVGAGTTPDYKPPAFIVSQQ 102
SAR86          -----TGDSASEWDGDMIKGHRQFVAVGAGTTPDYKPPAFIVSQQ 103
Meslot         -----FVAEGEAWDGELVNTGRRFVTAIGAGTTPDYKPPAFIVSQE 114
Brajap         -----FSRT-EDWDGKIVHEPSTFVTAIGAGTTPDYKPPAFIVSAE 114
Burxen         TIEFG-----ASSEMQ-DAAAEQALFVTGVSSTYPDYKPPAFIVASK 103
Polsp          RVAVGNPAGQAPPPEGVPAAPAAPEWSGDLLLADEVFITGVSSTYPDYKPPAFIVSSR 151
                : : * . : * : : . * * * * * . * * :
```

```
Eubbar_Hnr      RDGVVVTVVTEAPLSYSGLVIKLDTNTYIGEEGDPVYRDGKVVGMVNTTEYGSKMIAIG 202
Silpom          VEGVDMVTVVTEGIFSYCGVKVKIDTDRHIGHERDVVRVDGEPIGHVMTSEYGSKMLSLG 162
SAR86          VDDIDMVTVVTEAIFSYCGVKVKIDSDRHIGHERAIVRANGEPIGHVMTGEYGSKMLSLG 163
Meslot         VEGVDLVTVVTEGIFSYCGVKVKIDTDRHIGPETAVVRSQGEAIGHVTTGEYGSQMLSLG 174
Brajap         VDGVDMVTVVTEGIFSYCGIKVKIDTDRYLGPEATATVRAQGEAVGHVTTSEYGSQMLSLG 174
Burxen         LDDVDMITVVTEGIFSYCSFKVKIDTDRFLGPEQSNVRCHGEIVGHVTTAEYGSQMLSLG 163
Polsp          AAGVDLVTVVTEGIFSYCSFKVKIDTDRFLGAEQANVRVKGEVVGHVTTAEYGSQMLSLG 211
                . : * : * * * * * . : * * . . : * * : : . : * * * * * * * * * * * * :
```

```
Eubbar_Hnr      GANRLTGDN---GFATARTIVELANGEEVELKVNKK---IVLKLKAGVAPVIDGVEESIM 256
Silpom          GVEHLTGGSKKEGRVTCALLRLCNCEAVEMVIGEPGHETTLIVQAGRAPIINGVEEKLML 222
SAR86          GVDHLTGGSKKEGRATCDALLQLCNRQAVDLEIEAG---ATLTVQAGQPPIINGVAEKLM 220
Meslot         GVHHLTGGSKAEGRATCDALLNLCNRKPVELTIDGG---ATIIVEAGKPPVIDGKQEHRLM 231
Brajap         GVHHLTGGSKKEGRVTCDTLMDLANCKAVELTIDGG---ATVVVQAGQPPIVNGAKEERM 231
Burxen         GVHHLTGGSKKEGRVTCMMLALGNKEAVELSIDGG---ASLVIRAGAAPIVDGVEEQRM 220
Polsp          GVHHLTGGSKKEGRVTVMEMKALGNKQAVEFTIDGG---SQILIQAGRAPPVNGVEEKRM 268
                * . . : * * * * . * * * : * * * : * : : : : : * * * * * * * * :
```

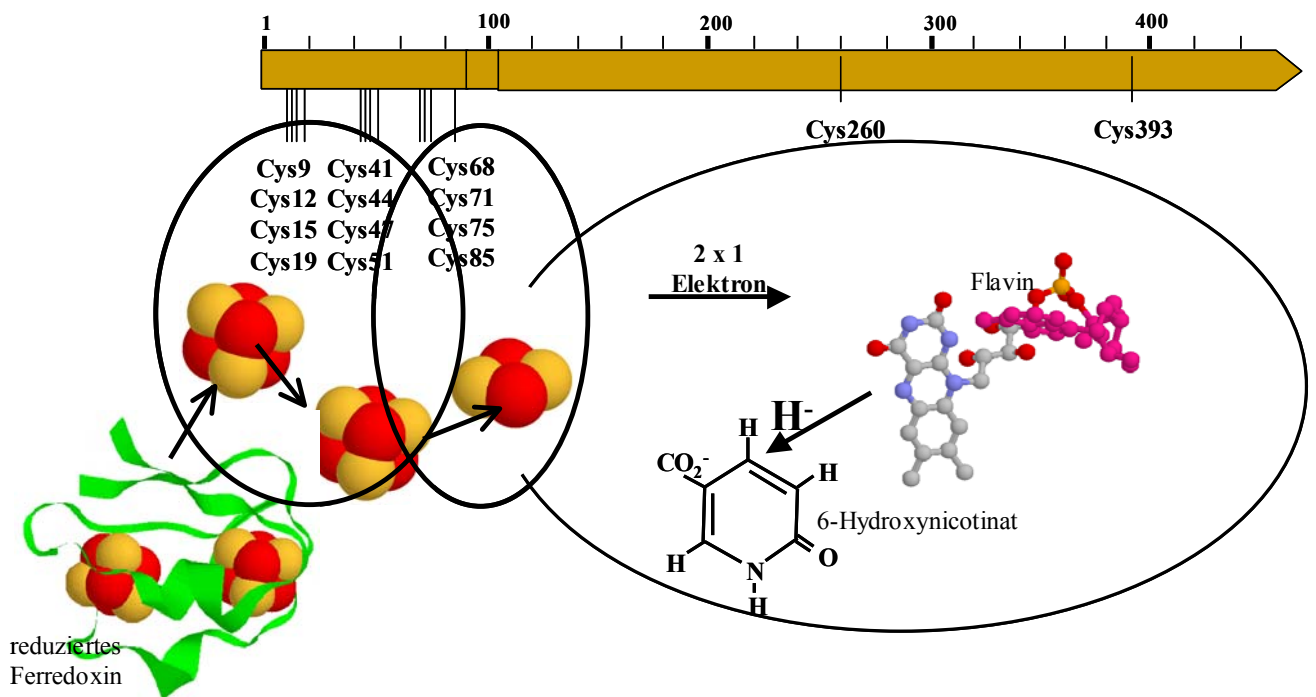
```
Eubbar_Hnr      RIGCGSATVGLFAKRMKDAVDECIVIDHHVIGLCSEHLAGEAVGMTWSGIIPNATKSSRG 316
Silpom          RVGCGSAAIGMFAKQWLGHADDVVVDDHITGVLSEHQAGKMLDVPPTGIRIKGRRSTPG 282
SAR86          RVGCGSATIGMFAQQWAPYVDEVVVDDHITGVLSEHEAGKGLDMAPSGIKVTRKSTPG 280
Meslot         RVGCGSATIGMFAQWRGLVDEVVVDDHITGVVSEHQAGKVLGWQDTGIKIIGRRSTPG 291
Brajap         RVGCGSATIGMFAKQWHGKVDEVVVDDHITGVLSEHQAGKLLDIADTGIKMKGRRSTPG 291
Burxen         RVGCGSATIGIFAKQWFGHADEVVVVDDHITGVLTEHQAGRCLGMARSGLKIRGRKSTPG 280
Polsp          RVGCGSATIGIFAKQLFGKLDDEVVVVDDHITGVLTEHQAGRCLDMRASGIRMRGRKSTPG 328
                * : * * * * * : * * * : * * * * : * * * * * : : * * * * * * * * :
```

Eubbar_Hnr	RYFGG--HGSGIGGTSLETPRDAIKGADMSI-AKAGMQVMVNTTGEIYALFELKADGSF	373
Silpom	RYFQVADPGTGWGGTNVEDPLVILNAFKPDV-AWPGLRLMMVSTTGEQFAYYELDADLVP	341
SAR86	RYFQVAEPGTGWGGTDVDDPLSILKPADPKK-AWPGLRLLMISTTGEQWAYFELDEDLVP	339
Meslot	RYFKVSEPGLGWGGTSDPLSILGEWNAKKGARPGLSLLMVSTTGEQFAYYELDDDELKP	351
Brajap	RYFQVADPGTGWGGTNI SDPLAILGPFDAKE-AKPGLSMLMVSTTGEHSSYYVLDDEALKP	350
Burxen	RYFQVANPGTGWGGTDIQDPLAIVEGFDPV-ARPGMRLLMVSTTGEHAQWYELDHDLVP	339
Polsp	RYFQVANPGTGWGGTDIADPLSIIESWDAEV-AWPGLRLLMTSTTGEHASWYVLDDEALNP	387
	*** * * * * . : * : . * . * : : : . * * * * : * .	
Eubbar_Hnr	DEIPMTEAALGVALAIQDN <b>C</b> QRSMTSILYTGTTGGSARGGVCTHPVKITEAVHEQKAVLT	433
Silpom	QPVP IPEKLRASAELIAEN <b>C</b> EPSVCSVLFMGGAGGSLRAGVTENPVRLTKSVKSSLTHVS	401
SAR86	QPATISAPLLASAERVAEN <b>C</b> EPSLCSVLFMGGAGGSLRAGVTENPVRLTRSVKQALTHVT	399
Meslot	VEKPPPERLQKSVNLIEDN <b>C</b> EPALCTVLFIGGAGGSLRAGVTENPNLTRSVQGLKTYVT	411
Brajap	VETEMPADLKF SVERIGEN <b>C</b> EPALCTVLFMAGAGGSLRAGVTDNPVRLTRSVKDALTRVT	410
Burxen	RIAAAMPEAVRRTVERIGEN <b>C</b> EPSLATVLFLLGGAGGSLRAGATENPVLLTRAIKQKLVNVT	399
Polsp	VEQEMPAEVRRIVERIGEN <b>C</b> EPSLSTVLFLLGGAGGSLRAGVTENPVLLTRAIKQKLVNVT	447
	: . . : * * : : : * * : * : * * * * * . * * . * * : * : * : : . : :	
Eubbar_Hnr	IGGAPAFVYVPGGGINFMVDTKQVVKAFWTWVPTPATVAPVEYTMTVADYEAMGGHMDQIK	493
Silpom	CGGAAAYVWPGGGITVMVDVTEMPNSFSGYVPTPALVAPMEFTMRVSDYGLGGHVSEIK	461
SAR86	CGGAPAYIWPGGGITFMADVMEPNSAFGYVPTPALVAPVEFTLRKADYVALGGHTDRIV	459
Meslot	VGGAPVYVWPGGGITLMVDVTRVPEGAFGYVPTPALVAP IEF TLRDDYVRLGGYEA EIR	471
Brajap	SGGAPVYVWPGGGITVMVDVQMPSGAFGYVPTPALVAP IEF TMLKLSDYAALGGHMDYVK	470
Burxen	CGGAPAYVWPGGGITVMVDVSRMPDRSFGTVPTPAIVAP IEF TMTYDAYRDLGGHLDVAVR	459
Polsp	CGGAPAYVWPGGGITVMADVMRMPDNSFGTVPTPAIVAP IEF SMKLLDDYRVLGGHMDYVR	507
	* * * . . : : * * * * * . * . * . . : * * * * * * * * : : : * : * * : :	
Eubbar_Hnr	DVSEYK-----	499
Silpom	PVAQVISERDRKLGKRDSPDPNARENRYRWSRGEDE-----	497
SAR86	PLQAVLSSDIRTVAPITNHAHPADRKNYRWA VSKQVGS-----	497
Meslot	SVEDIVAKGGEYLNPRHGTGAPSDNPWPPLAQLRRAASNGTG-	513
Brajap	PLSEVQNGEDVRQLPWQNP I PG PRA-----	495
Burxen	SLASVLANGPEHTEGAPLARRTLARNPDNPWP PAMP PMLG---	499
Polsp	TLEDALRRGAWHNEGAPSAREWVQLSPANPWPLARPPLLG---	547
	:	

**Abb. 4.4.: Vergleich der Aminosäuresequenz der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase aus *E. barkeri* mit anderer Proteine.** Die Cysteinreste im N-terminalen Bereich, die wahrscheinlich die [4Fe-4S] bzw. [2Fe-2S] Clusters binden, sind rot gekennzeichnet. Zwei konservierte Cysteinreste im mittlerem Bereich sind blau gekennzeichnet. Folgende Proteine sind aufgeführt: Eubbar\_Hnr, 6-Hydroxynicotinat-Reduktase aus *E. barkeri*; Silpom, hypothetisches Protein Spo0829 aus *Silicibacter pomeroyi*; SAR86, hypothetisches Protein EBAC080-L028H02-EBA.28 aus SAR86 clade  $\gamma$ -Proteobacterium 582; Meslot, hypothetisches Protein mll4879 aus *Mesorhizobium loti* MAFF303099; Brajap, hypothetisches Protein blr3822 aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110; Burxen, hypothetisches Protein Bxen02005098 aus *Burkholderia xenovorans* LB400; Polsp, hypothetisches Protein PJS 6w01002064 aus *Polaromonas sp.* JS666.

wurde [27], dass Hnr ein  $[2\text{Fe-2S}]^{1+/2+}$  Cluster enthält, wird angenommen, dass dieses Cystein-Muster an der Bindung dieses Clusters beteiligt ist. Im Alignment folgt auf die beiden Cystein-reichen Bereiche eine Region, die sich durch niedrigere Konservierung und vor allem bei dem Homologen durch Insertionen von 15-38 Aminosäuren im Vergleich zu Hnr aufzeichnet. Das *Polaromonas sp.* Homolog hat die längste und sogar eine sonderbare Alanin/Prolin reiche Insertion. Es wurde deshalb Postuliert, dass Aminosäure 65 bis 116 eine zweite ein  $[2\text{Fe-2S}]^{1+/2+}$  Cluster bindende Domäne darstellt. Aminosäure 120 bis zum C-terminus in Hnr zeigte ein gutes und Lücken Alignment mit den Homologen ohne klare

Cystein Muster. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass zwei weitere konservierte Cysteine (blau in Abb. 4.4) eine Rolle in der Bindung von [Fe-S] bilden. Wenn Aminosäure 1 bis 116 zwei getrennte [FeS] Cluster bindet, ist anzunehmen, dass Aminosäure 120 bis zum C-Terminus das katalytische Zentrum mit dem kovalent-gebundenen Flavin enthält (siehe Abb. 4.5 für einen Model). Die periphere [Fe-S]-Domäne sorgt für den Elektronentransport von Ferredoxin zum Flavin im Hauptbereich der Hnr, wo Reduktion der Doppelbindung von 6-Hydroxynicotinat über Hydridtransfer erfolgt. Aus der Aminosäuresequenzidentität lässt sich nicht schlüssig ableiten, ob die Homologen 6-Hydroxynicotinat-Reduktasen sind. In Kapitel 4.5 wird durch Analyse der benachbarten Gene gezeigt, dass es weitere Indizen gibt, die daraufhin deuten, dass die Homologen tatsächlich für 6-Hydroxynicotinat-Reduktase kodieren.



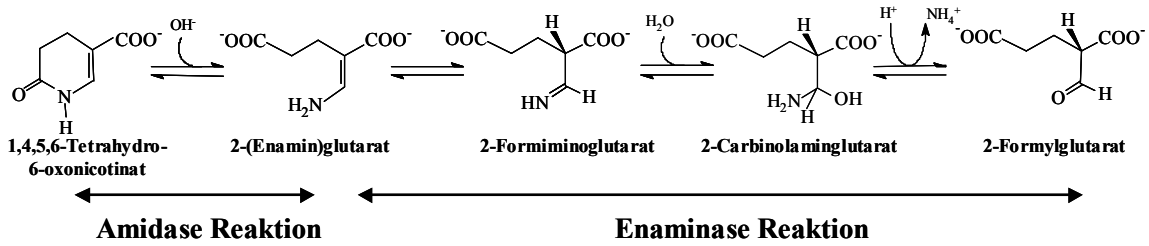
**Abb. 4.5. : Modell der Struktur und Elektronenübertragung bei der Reduktion von HNA zu THON durch die 6-Hydroxynicotinat-Reduktase**

### 4.3 Enamidase

Bereits nach dem Sequenzieren des N-Terminus und der internen Peptide war klar, dass die Enamidase zu der wahrscheinlich Amidohydrolase Superfamilie gehört. Durch die biochemische Charakterisierung, Metallanalyse, Bestimmung der kompletten Primärstruktur und Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Enamidase aus *E. barkeri* ist jetzt bestätigt, dass die Enamidase ein neues Mitglied der Amidohydrolase Superfamilie darstellt. In dieser Superfamilie gibt es zurzeit etwa 18 strukturell charakterisierte Proteine, die eine Reihe von Unterschieden in der Koordination des im  $(\alpha\beta)_8$  Gehäuse anwesende aktiven Metallzentrum aufweisen (siehe [96]). Wie in der Enamidase sind binukleare Metallzentren anwesend z.B. in der Dihydroorotase (2 x  $Zn^{2+}$  [97]), Dihydropyrimidinase (2 x  $Zn^{2+}$  [98]), Isoaspartyl-Dipeptidase (2 x  $Zn^{2+}$  [99]) und der weithin bekannten Urease (2 x  $Ni^{2+}$  [100]). Im Gegensatz zur Enamidase sind in diesem Enzym die Metallionen durch ein carbamoyliertes Lysin überbrückt. Aber in anderen Mitgliedern der Amidohydrolase Superfamilie, wie die *N*-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase (2 x Fe [101]) die menschliche Lactamase/Dipeptidase (2 x  $Zn^{2+}$  [102]) und ein Phosphotriesterase-Homolog (2 x  $Zn^{2+}$  [103]) sind wie die Metallionen in der Enamidase durch Glutamat überbrückt. Die Koordination des ersten Metallions durch His/His/Asp und des zweiten durch His/His ist bei den meisten Mitgliedern identisch (siehe [96]).

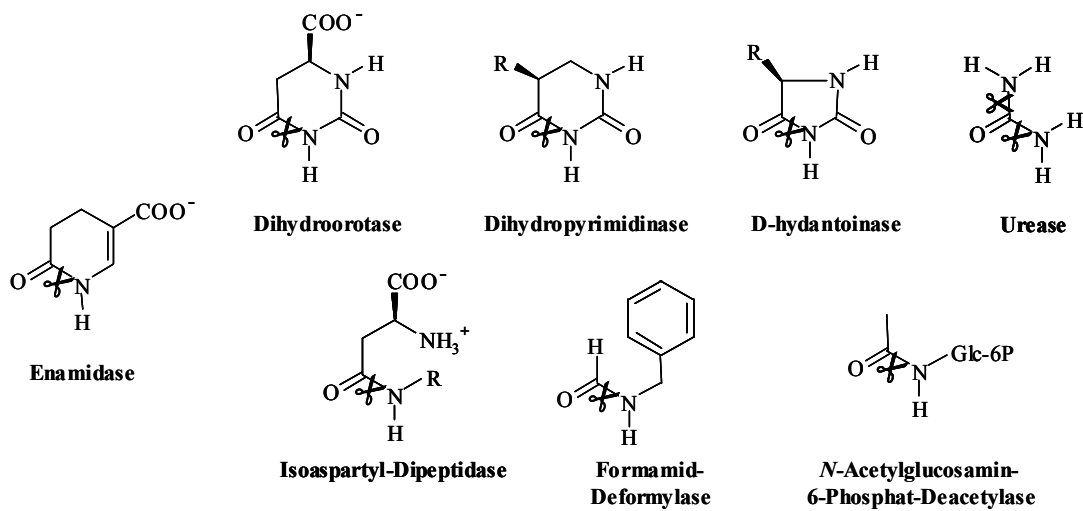
Wie die Enamidase besitzt auch Dihydropyrimidinase [98] eine tetramere Quartärstruktur. Die anderen Mitglieder der Amidohydrolase Familie zeigen eine sehr heterogene Mischung von Quartärstrukturen: Monomer (Phosphotriesterase Homolog [103], Dimer (menschliche Lactamase/Dipeptidase [102], *N*-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase [101] und Dihydroorotase [97]), Trimer (Urease [100]), Hexamer (Cytosin-Deaminase von *E. coli* [104]) und Oktamer (Isoaspartyl-Dipeptidase [99]).

In Hinsicht auf Katalyse stellt der erste Schritt die Hydrolyse der (C=O)-NH Bindung von THON durch die Enamidase ('Amidase' in Abb. 4.6) und die übliche namensgebende Reaktion für die Amidohydrolasen dar. Im Abb. 4.7 sind Substrate und Schnittstellen der Hydrolyse für ausgewählte Amidohydrolasen mit THON/Enamidase verglichen. Die Katalyse eines zweiten Schritts ('Enaminase' in Abb. 4.6) ist dagegen für die Amidohydrolase Superfamilie neuartig. 'Enaminase'-artige Teilreaktionen kommen jedoch bei nicht-amidohydrolytischen Enzymen in der Superfamilie vor, z. B. bei der Cytosin-Deaminase von *E. coli* [104] und die Adenosin-Deaminase von Mäusen [105] vor.

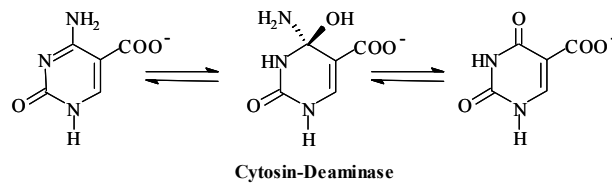


**Abb. 4.6: Katalyse durch die Enamidase**

Enamidase katalysiert zwei Reaktionen: eine 'Amidase' Reaktion (Ringöffnungsreaktion) und eine 'Enaminase' Reaktion (die Umwandlung von 2-Enaminglutarat zu 2-Formylglutarat, hier als *S*-Stereoisomer dargestellt siehe 4.4). Die Bezeichnung Enaminase setzt sich aus den Wortteilen En (Doppelbindung), amin und ase (enzym) zusammen.



**Abb. 4.7: Vergleich der Substrate und des der Hydrolysestelle für Enamidase und ausgewählte Amidohydrolasen.** Die Hydrolyse ist durch eine Schere angezeigt.



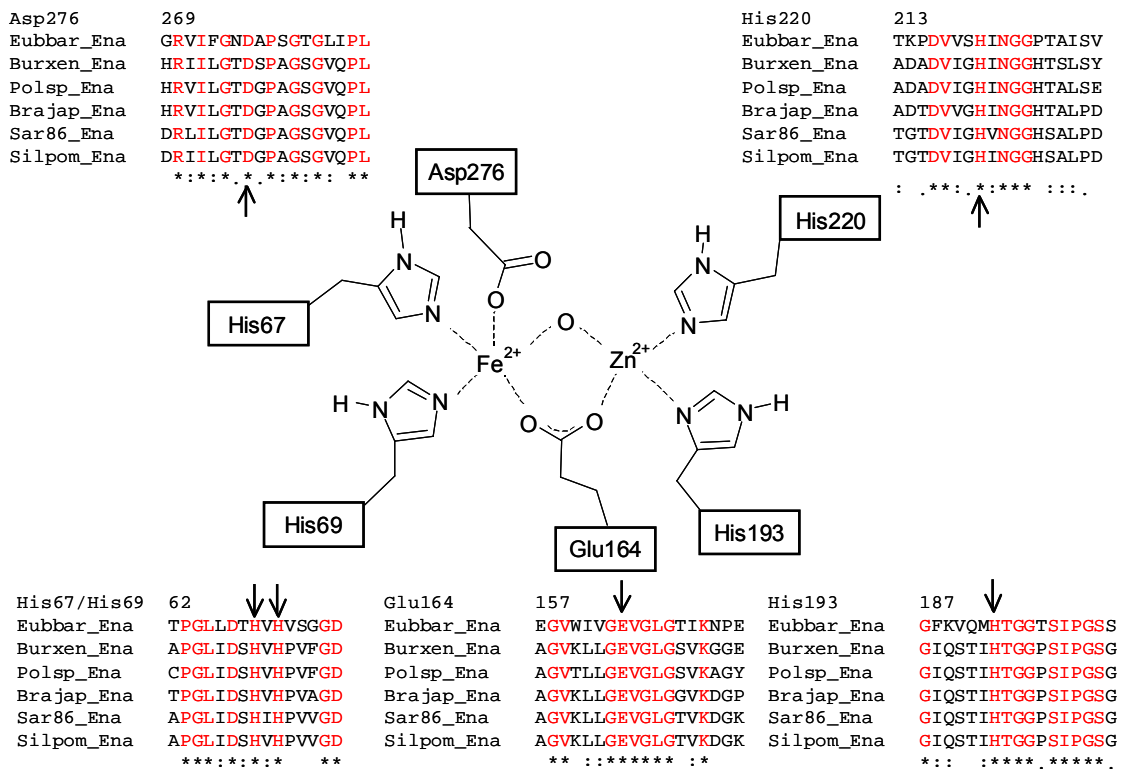
**Abb. 4.8: Die von Cytosin-Deaminase katalysierte Reaktion**

Datenbanksuchen mit der Enamidase (Ena) Sequenz identifizierten 5 Gene aus 5 Organismen, die für Proteine mit einer Länge von 388 bis 401 Aminosäuren mit 42-47 % Aminosäuresequenzidentität zur Ena kodieren. In den gleichen Organismen wurden jeweils auch ein *hnr*-Gen im Abstand zum *ena*-Gen von 2,5-8 kbp gefunden. Ein Alignment mit



MAFF303099 wurde kein Homologes mit Aminosäuresequenzidentität ähnlich zu den vorher erwähnten Proteinen gefunden.

Die in der Struktur der Enamidase identifizierten Metallion-koordinierenden Aminosäuren waren in diesen Ena-Homologen konserviert. In Abb. 4.10 wird die Konservierung der Sequenzbereiche der koordinierende Aminosäuren der Enamidase und Homologen mit der Struktur des binuklearen Zentrums zusammen dargestellt. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Homologen ein identisches binukleares Metallzentrum und wahrscheinlich auch eine ähnliche wenn nicht identische Reaktion katalysieren. Eine tatsächliche Rolle als Enamidase wird in Kapitel 4.5 durch die Analyse der Genome mit *ena*, *hnr*, *orfC* und *orfD* ähnlichen Gene weiter unterstützt.



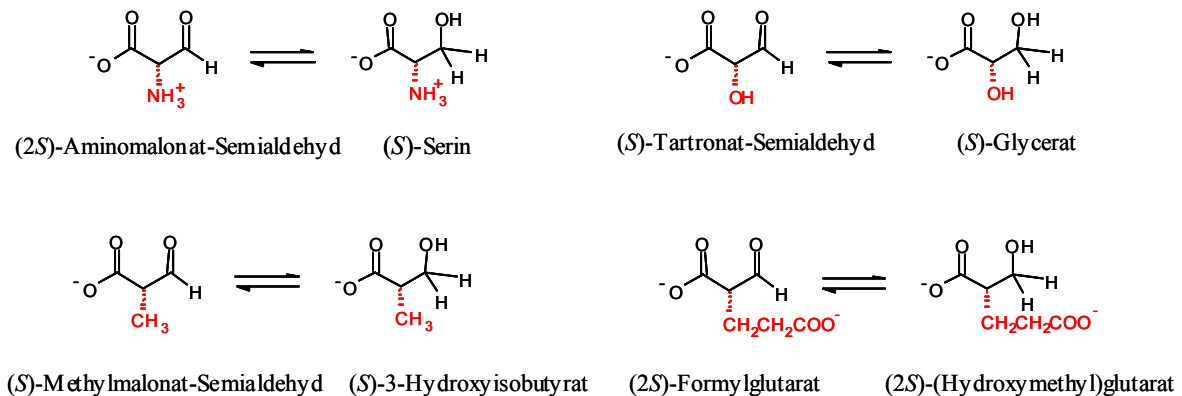
**Abb. 4.10.: Struktur des binuklearen Zentrums der Enamidase aus *E. barkeri* und Sequenzvergleich im Bereich der koordinierenden Aminosäuren mit anderen Proteinen.**

Die mit Pfeilen markierten Aminosäurereste sind an der Koordination des binuklearen Zentrums in der Kristallstruktur der Enamidase aus *E. barkeri* beteiligt (im Zentrum dargestellt). Die Alignments zeigen Sequenzabschnitte im Bereich dieser Aminosäuren (siehe Abb. 4.9. für die Bezeichnung der homologe Proteine).





Hgd katalysiert die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Oxidation von einer begrenzten Reihe von 3-Hydroxysäuren: 2-(Hydroxymethyl)glutarat und, mit  $10^4$ - $10^5$  geringerem Spezifitätskonstanten, L-Serin, L-Glycerat und (*S*)-3-Hydroxyisobutyrat (Kapitel 3.5.2. und 3.5.3.). Aktivitäten mit den *R*-Stereoisomeren von Serin, Glycerat und 3-Hydroxyisobutyrat waren nicht detektierbar. Die Stereospezifität für das natürliche Substrat konnte nicht bestimmt werden, da kein chirales 2-(Hydroxymethyl)glutarat zur Verfügung stand. Da bei den aktiven Stereoisomeren von Serin, Glycerat und 3-Hydroxyisobutyrat in allen Fällen das Wasserstoffatom und den Substituent ( $\text{NH}_3^+$ , OH,  $\text{CH}_3$ ) die gleiche Position haben, kann abgeleitet werden, dass (*2S*)-(Hydroxymethyl)glutarat wahrscheinlich das aktive Stereoisomer ist (siehe Abb. 4.12).



**Abb 4.12. Ableitung der Substratstereochemie der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase durch Vergleich mit alternativen Substraten**

Bei vorherigen Studien der Nicotinat-Fermentation von *E. barkeri* konnte nicht gezeigt werden, ob 2-Formylglutarat und 2-(Hydroxymethyl)glutarat chirale Intermediate sind. Man ging von der Annahme aus, dass nach Hydrolyse der Amid-Bindung von THON das gebildete 2-Enamylglutarat nicht enzymatisch sondern spontan hydrolysierte und racemisches 2-Formylglutarat entstand. Falls die Enamidase jedoch nach der Amidase-Reaktion auch die Enaminase-Reaktion katalysiert, könnte chirales 2-Formylglutarat gebildet werden. Weil eine des gebildeten 2-Formylglutarats Enolisierung relativ langsam ist [106], könnte ohne Verlust der Chiralität durch eine rasche Reaktion mit NADH unter Katalyse der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase stabiles chirales 2-(Hydroxymethyl)glutarat entstehen. Dieser Ablauf wird auf Ebene der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (siehe Kapitel 3.5.3.) durch die hohe Stereospezifität für die *S*-Isomeren von Serin, Glycerat und 3-Hydroxyisobutyrat unterstützt. Zusätzlich ist es biochemisch plausibel, dass die 2-

(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydratase nur mit einem der beiden Stereoisomere von 2-(Hydroxymethyl)glutarat aktiv ist, logischerweise mit dem von 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase gebildeten Stereoisomer.

#### **4.5 Identifikation von Genclustern, die an Nicotinat-Abbau bei anderen Organismen beteiligt sind**

Bereits bei der Diskussion der Datenbanksuchen wurde erwähnt, dass *hnr* (Kapitel 4.2), *orfC* und *orfE* (Kapitel 4.1) und *ena* (Kapitel 4.3) Homologen in verschiedenen Proteobakterien hatten. Die entsprechenden Gene liegen in diesen Organismen (*Silibacter pomeroyi* DSS-3, ein SAR86  $\gamma$ -Proteobakterium, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Burkholderia xenovorans* LB400 und *Polaromonas sp.* JS666) im gleichen Genabschnitt vor (Abb. 4.13). Die Ausnahme bildet die Abwesenheit von einem *ena*-homologen Gen in *M. loti*. Obwohl bei Datenbanksuchen natürlich viele weitere Homologen gefunden wurden, liegen diese nicht zusammen im selben Genabschnitt und haben viel niedriger die Aminosäuresequenzidentitäten, vor allem bei *hnr* und *ena*. Bei genauerer Analyse der identifizierten Gencluster sind bei drei Organismen (*S. pomeroyi*, das SAR86  $\gamma$ -Proteobakterium und *M. loti*) Gene anwesend, die für Molybdopterin-enthaltende Dehydrogenasen und die assoziierten 2 x [2Fe-2S] und Flavin Untereinheiten kodieren. Diese zeigen Aminosäuresequenzidentitäten mit NdhLM (fusioniert), NdhS und NdhF aus *E. barkeri*. In *B. japonicum*, *B. xenovorans* und *Polaromonas sp.* sind ebenfalls Gene vorhanden, die für Molybdopterin-enthaltende Dehydrogenasen und assoziierten 2 x [2Fe-2S] Untereinheiten anwesend kodieren. Diese Dehydrogenasen unterscheiden sich jedoch sehr von denen aus *E. barkeri* und haben statt getrennten Flavin-Untereinheiten eine am C-Terminus fusionierte Domäne mit drei CXXCXH Cytochrom *c* Bindemotiven.

Die Gencluster der anderen Organismen haben in 4 Fällen (*S. pomeroyi*, *B. japonicum*, *B. xenovorans* und *Polaromonas sp.*) ABC-Transporter kodierende Gene zwischen den *E. barkeri* Homologen. Die periplasmatischen Bindeproteine zeigten Ähnlichkeit mit Aminosäure-Bindeproteine. In *M. loti* liegt an der 5'-Seite des Molybdopterin-Dehydrogenase Flavoproteins ein Gen mit 43 % Aminosäuresequenzidentität mit PncA, eine Pyrazinamidase/Nicotinamidase aus *E. coli*. Weiter an der 5' Seite in *M. loti* folgen ABC-Transporter kodierende Gene. Diese haben niedrige Aminosäuresequenzidentitäten mit den ABC-Transporter kodierenden Gene aus *S. pomeroyi*, *B. japonicum*, *B. xenovorans* und *Polaromonas sp.* NicR-ähnliche LysR-Typ Regulatoren sind nicht im Genabschnitt zusammen mit den Homologen der anderen Organismen. Aber *S. pomeroyi*, das SAR86  $\gamma$ -Proteobakterium, *M. loti* und *B. japonicum* haben MarR-Typ Regulatoren, die

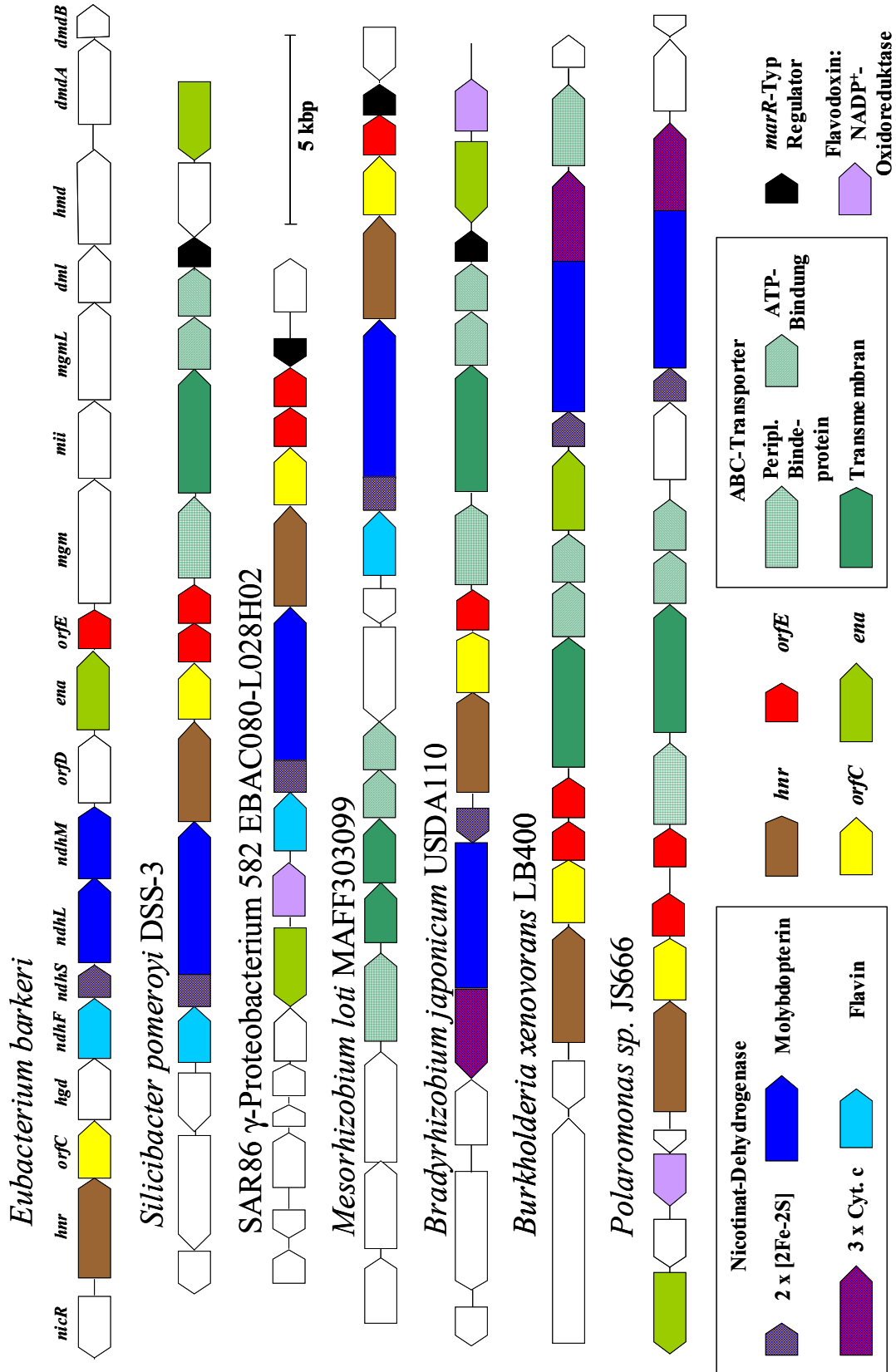


Abb. 4.13.: Übersicht des Nicotinat-Locus verschiedener Organismen

ähnlich zu einander sind. In dem SAR86  $\gamma$ -Proteobakterium, *B. japonicum* und *Polaromonas sp.* sind neben oder nah am *ena*-Homolog Gene, die für Flavodoxin oder Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktasen kodieren. Tab. 4.1. fasst die Sequenzidentitäten für alle diskutierten Gene zusammen.

**Tab. 4.1. Vergleich der Aminosäuresequenzidentitäten der Genprodukte aus postulierte Nicotinat Gen-Cluster mit den entsprechenden Genprodukte aus *Eubacterium barkeri* und *Bradyrhizobium japonicum***

Siehe Abb. 4.13. für eine graphische Darstellung der Lage der Genen und die vollständige Namen der Mikroorganismen. Abkürzungen in der Tabelle: A, kein Homolog in Genabschnitt; U, unterschiedlicher Homolog; Pbp, periplasmatisch Bindeprotein; Mem, membranständiges Protein der ABC-Transporter; ATP1/ATP2, die beide ATP-bindende Proteinen der ABC-Transporter; Reg, MarR-Typ Regulator; Fred, Flavodoxin:NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase.

Organismus	% Aminosäuresequenzidentität mit													
	<i>Eubacterium barkeri</i> Genprodukt							<i>Bradyrhizobium japonicum</i> Genprodukt						
	NdhF	NdhS	NdhLM	Hnr	OrfC	OrfE	Ena	Pbp	Mem	ATP1	ATP2	Reg	Fred	
<i>Silibacter pomeroyi</i>	22	41	35	43	27	39	50	42	61	55	63	58	48	A
SAR86	25	41	35	43	29	45	47	43	A	A	A	A	46	50
<i>Mesorhizobium loti</i>	26	46	38	42	28	46		A	U	U	U	U	55	A
<i>B. japonicum</i>	A	40	19	42	24	53		46	100	100	100	100	100	100
<i>B. xenovorans</i>	A	42	17	41	26	41	49	47	60	52	58	62	U	A
<i>Polaromonas sp.</i>	A	40	19	40	26	42	50	47	61	52	57	61	U	63

Beim Vergleich der Hnr, OrfC, OrfE und Ena-Homologen untereinander wurden Aminosäuresequenzidentitäten von 56-70, 42-54, 39-83 und 63-87 % festgestellt. Die hohe Identitäten zeigen, dass die Gencluster in diesen Organismen wahrscheinlich für den gleichen Stoffwechselweg kodieren.

Als Schlussfolgerung der vorherigen Diskussion wird postuliert, dass in den erwähnten Organismen die Gencluster am Nicotinat-Abbau über Nicotinat-Dehydrogenase, 6-Hydroxynicotinat-Reductase und Enamidase beteiligt sind. Keiner der Organismen hat im hier diskutierten Genabschnitt oder überhaupt im Genom Gene, die für Proteine mit relevanter Sequenzidentität zu Hgd, Hmd, Mgm, MgmL, Mii, DmdAB und Dml kodieren. Das bedeutet,

dass in diesen Organismen der *E. barkeri* Nicotinat-Abbauweg von 2-Formylglutarat bis Propionat/Pyruvat fehlt. Bei *Azorhizobium caulinodans* wurde mit Transposon Mutagenese und metabolische Studien gezeigt, dass Nicotinat-Dehydrogenase, 6-Hydroxynicotinat-Reductase und Enamidase in der Nicotinat-Abbau beteiligt waren [13, 14]. Die Anwesenheit der hier postulierten Gencluster in *M. loti* und das sehr nah mit *Azorhizobium* verwandte *B. japonicum* sind in dieser Hinsicht konsistent.

#### 4.6. Ausblick

Mit dieser Doktorarbeit ist jetzt die Nicotinat Fermentation von *E. barkeri* weitgehend geklärt. Aber weitere Arbeit an Hmd und DmdAB soll die hier beschriebenen Ergebnisse auf biochemischer Ebene bestätigen. Auch sollen weitere genetische Studien die Transkription und Regulation der hier identifizierten Gene charakterisieren. Strukturelle Charakterisierung (wie bei der Enamidase) wird verfolgt: die Kristallisation der 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase ist schon gelungen (Simon Reitz, AG Essen).

Die Identifikation der Stelle des kovalent gebundenen Flavins in der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase war trotz mehrerer Versuche nicht erfolgreich und wird jetzt mit nano-HPLC und MS-MS Spektrometrie versucht (Dr. Uwe Linne, AG Marahiel).

Die Analyse der Gencluster aus *Silibacter pomeroyi* DSS-3, dem SAR86  $\gamma$ -Proteobakterium, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Burkholderia xenovorans* LB400 und *Polaromonas sp.* JS666 hat den Anreiz gegeben, den Nicotinat-Abbau in diesen Organismen zu studieren. Im Rahmen von Diplomarbeiten (Martin Schuster und Andrew Bozarth, Mikrobiologie) sind Wachstum auf Nicotinat, heterologe Produktion von aktiver Enamidase und Nicotinat-Bindung am periplasmatischen Bindepotein von einigen dieser Organismen bereits erfolgreich durchgeführt.

---

## 5. Literaturverzeichnis

1. Ensign, J. C. & Rittenberg, S. C. (1964) The pathway of nicotinic acid oxidation by a *Bacillus* species. *J. Biol. Chem.* 239, 2285-2291.
2. Behrman, E. J. & Stanier, R. Y. (1957) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 228, 923-945.
3. Gauthier, J. J. & Rittenberg, S. C. (1971) The metabolism of nicotinic acid. I. Purification and properties of 2,5-dihydroxypyridine oxygenase from *Pseudomonas putida* N-9., *J. Biol. Chem.* 246, 3737-3742.
4. Thacker, R., Rørvig, O., Kahlon, P. & Gunsalus, I. C. (1978) NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*. *J. Bacteriol.* 135, 289-290.
5. Kulla, H. G. (1991) Enzymatic hydroxylations in industrial application. *Chimia.* 45, 81-85.
6. Harary, I. (1957) Bacterial fermentation of nicotinic acid. I. End products. *J. Biol. Chem.* 227, 815-822.
7. Stadtman, E. R., Stadtman, T. C., Pastan, I. & Smith, L. D. (1972) *Clostridium barkeri* sp. n. *J. Bacteriol.* 110, 758-760.
8. Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812-826.
9. Willems, A. & Collins, M. D. (1996) Phylogenetic relationships of the genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1083-1087.
10. Gottschalk, G., Andreesen, J. R. & Hippe, H. (1981) The genus *Clostridium* (nonmedical aspects). in *The Prokaryotes*. (Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. & Schlegel, H. G., eds) pp. 1766-1803. Springer Verlag, New York.
11. Widdel, F. & Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. in *The Prokaryotes* (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H., eds) pp. 3352-3378. Springer Verlag, New York.
12. Imhoff-Stuckle, D. & Pfennig, N. (1983) Isolation and characterization of a nicotinic acid-degrading sulfate reducing bacterium, *Desulfococcus niacini* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 136, 194-198.

13. Buckmiller, L. M., Lapointe, J. P. & Ludwig, R. A. (1991) Cloning of *Azorhizobium caulinodans* nicotinate catabolism genes and characterization of their importance in N<sub>2</sub> fixation. *J. Bacteriol.* *173*, 2017-2025.
14. Kitts, C. L., Schaechter, L. E., Rabin, R. S. & Ludwig, R. A. (1989) Identification of cyclic intermediates in *Azorhizobium caulinodans* nicotinate catabolism. *J. Bacteriol.* *171*, 3406-3411.
15. Kitts, C. L., Lapointe, J. P., Lam, V. T. & Ludwig, R. A. (1992) Elucidation of the complete *Azorhizobium* nicotinate catabolism pathway. *J. Bacteriol.* *174*, 7791-7797.
16. Eggerer, H. (1985) Completion of the degradation scheme for nicotinic acid by *Clostridium barkeri*. *Curr. Top. Cell. Regul.* *26*, 411-418.
17. Kung, H.-F., Tsai, L. & Stadtman, T. C. (1971) Nicotinic acid metabolism. VIII. Tracer studies on the intermediary roles of  $\alpha$ -methyleneglutarate, methylitaconate, dimethylmaleate, and pyruvate. *J. Biol. Chem.* *246*, 6444-6451.
18. Holcenberg, J. S. & Stadtman, E. R. (1969) Nicotinic acid metabolism. III. Purification and properties of a nicotinic acid hydroxylase. *J. Biol. Chem.* *244*, 1194-1203.
19. Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V. & Stadtman, T. C. (1994) Nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*: electron paramagnetic resonance studies show that selenium is coordinated with molybdenum in the catalytically active selenium-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *91*, 232-236.
20. Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V. & Stadtman, T. C. (1996) Properties of the selenium- and molybdenum-containing nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*. *Biochemistry* *35*, 212-223.
21. Tsai, L., Pastan, I. & Stadtman, E. R. (1966) Nicotinic acid metabolism. II. The isolation and characterization of intermediates in the fermentation of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* *241*, 1807-1813.
22. Holcenberg, J. S. & Tsai, L. (1969) Nicotinic acid metabolism. IV. Ferredoxin-dependent reduction of 6-hydroxynicotinic acid to 6-oxo-1,4,5,6-tetrahydronicotinic acid. *J. Biol. Chem.* *244*, 1204-1211.
23. Tsai, L. & Stadtman, E. R. (1971) Anaerobic degradation of nicotinic acid. *Methods Enzymol.* *18B*, 233-249.
24. Sainte, F., Serckx-Poncin, B., Hesbain-Frisque, A.-M. & Ghosez, L. (1982) A Diels-Alder route to pyridone and piperidone derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 1428-1430.

25. Cirpus, I. (2000) *Die Elektronendonoren der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus Acidaminococcus fermentans. Reinigung und Charakterisierung von Ferredoxin und Flavodoxin.* Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
26. Boll, M. & Fuchs, G. (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* 234, 921-933.
27. Al Hapel, A. (2002) *Reinigung und Charakterisierung der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase aus Eubacterium barkeri.* Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
28. Bishop, J. (1998) *Purification and characterisation of a novel enzyme in Clostridium barkeri.* Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
29. Buckel, W. (1996) Unusual dehydrations in anaerobic bacteria: considering ketyls (radical anions) as reactive intermediates in enzymatic reactions. *FEBS Lett.* 389, 20-24.
30. Hofmeister, A. E. M., Textor, S. & Buckel, W. (1997) Cloning and expression of the two genes coding for L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: relationship of the iron-sulfur protein to both L-serine dehydratases from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 4937-4941.
31. Hofmeister, A. E. M., Grabowski, R., Linder, D. & Buckel, W. (1993) L-serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups. *Eur. J. Biochem.* 215, 341-349.
32. Beatrix, B., Zelder, O., Linder, D. & Buckel, W. (1994) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri* in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 221, 101-109.
33. Beatrix, B., Zelder, O., Kroll, F. K., Örlygsson, G., Golding, B. T. & Buckel, W. (1995) Evidence for a mechanism involving transient fragmentation in carbon skeleton rearrangements dependent on coenzyme B<sub>12</sub>. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2398-2401.
34. Bothe, H., Darley, D. J., Albracht, S. P. J., Gerfen, G. J., Golding, B. T. & Buckel, W. (1998) Identification of the 4-glutamyl radical as an intermediate in the carbon skeleton rearrangement catalyzed by coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*. *Biochemistry* 37, 4105-4113.
35. Buckel, W. (1980) Analysis of the fermentation pathways of clostridia using double labelled glutamate. *Arch. Microbiol.* 127, 167-169.



36. Buckel, W., Bröker, G., Bothe, H., Pierik, A. J. & Golding, B. T. (1999) Glutamate mutase and 2-methyleneglutarate mutase. In *Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>: Part II, Biochemistry of B<sub>12</sub>* (Banerjee, R., ed) pp. 757-781. Wiley, New York.
37. Buckel, W. & Golding, B. T. (1996) Glutamate and 2-methyleneglutarate mutase: from microbial curiosities to paradigms for coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzymes. *Chem. Soc. Rev.*, 329-337.
38. Buckel, W. (2001) Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 263-273.
39. Ciceri, D., Pierik, A. J., Hartrampf, G., Bröker, G., Speranza, G., Buckel, W., Cornforth, J. & Golding, B. T. (2000) Stereochemistry of the methyl group in (*R*)-3-methylitaconate derived by rearrangement of 2-methylideneglutarate catalysed by a coenzyme B<sub>12</sub>-dependent mutase. *Helv. Chim. Acta.* 83, 2550-2561.
40. Edwards, C. H., Golding, B. T., Kroll, F., Beatrix, B., Bröker, G. & Buckel, W. (1996) Rotation of the *exo*-methylene group of 2-methyleneglutarate catalyzed by coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri*. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 4192-4193.
41. Hans, M., Bill, E., Cirpus, I., Pierik, A. J., Hetzel, M., Alber, D. & Buckel, W. (2002) Adenosine triphosphate-induced electron transfer in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Biochemistry* 41, 5873-5882.
42. Hartrampf, G. & Buckel, W. (1986) On the steric course of the adenosylcobalamin-dependent 2-methyleneglutarate mutase reaction in *Clostridium barkeri*. *Eur. J. Biochem.* 156, 301-304.
43. Hoffmann, B., Konrat, R., Bothe, H., Buckel, W. & Kräutler, B. (1999) Structure and dynamics of the B<sub>12</sub>-binding subunit of glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*. *Eur. J. Biochem.* 263, 178-88.
44. Hoffmann, B., Oberhuber, M., Stupperich, E., Bothe, H., Buckel, W., Konrat, R. & Kräutler, B. (2000) Native corrinoids from *Clostridium cochlearium* are adeninylcobamides: spectroscopic analysis and identification of pseudovitamin B<sub>12</sub> and factor A. *J. Bacteriol.* 182, 4773-4782.
45. Locher, K. P., Hans, M., Yeh, A. P., Schmid, B., Buckel, W. & Rees, D. C. (2001) Crystal structure of the *Acidaminococcus fermentans* 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase component A. *J. Mol. Biol.* 307, 297-308.

46. Michel, C., Hartrampf, G. & Buckel, W. (1989) Assay and purification of the adenosylcobalamin-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri*. *Eur. J. Biochem.* 184, 103-107.
47. Michel, C. & Buckel, W. (1991) Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri*. Protection by the substrate from inactivation by light. *FEBS Lett.* 281, 108-110.
48. Michel, C., Buckel, W. & Linder, D. (1991) Purification of the coenzyme B<sub>12</sub>-containing 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri* by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 587, 93-99.
49. Michel, C., Albracht, S. P. J. & Buckel, W. (1992) Adenosylcobalamin and cob(II)alamin as prosthetic groups of 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri*. *Eur. J. Biochem.* 205, 767-773.
50. Pierik, A. J., Ciceri, D., Bröker, G., Edwards, C. H., McFarlane, W., Winter, J., Buckel, W. & Golding, B. T. (2002) Rotation of the *exo*-methylene group of (*R*)-3-methylitaconate catalyzed by coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Eubacterium barkeri*. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14039-14048.
51. Reitzer, R., Krasser, M., Jogl, G., Buckel, W., Bothe, H. & Kratky, C. (1998) Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant glutamate mutase and of the isolated component S from *Clostridium cochlearium*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 1039-1042.
52. Reitzer, R., Gruber, K., Jogl, G., Wagner, U. G., Bothe, H., Buckel, W. & Kratky, C. (1999) Glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*: the structure of a coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzyme provides new mechanistic insights. *Structure Fold. Des.* 7, 891-902.
53. Zelder, O. & Buckel, W. (1993) On the role of two different cobalt(II) species in coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 374, 85-90.
54. Bröker, G. (1996) *Zum Mechanismus der Coenzym B<sub>12</sub>-abhängigen 2-Methylengluutarat-Mutase und der (R)-3-Methylitaconat-Δ-Isomerase aus Clostridium barkeri*. Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
55. Bröker, G. (1999) *Die Coenzym B<sub>12</sub>-abhängige 2-Methylengluutarat-Mutase und die (R)-3-Methylitaconat-Δ-Isomerase: Zwei Enzyme aus dem Nicotinsäure-Fermentationsweg von Clostridium barkeri*. Doktorarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.

56. Kung, H.-F. & Tsai, L. (1971) Nicotinic acid metabolism. VII. Mechanisms of action of clostridial  $\alpha$ -methylene-glutarate mutase ( $B_{12}$ -dependent) and methylitaconate isomerase. *J. Biol. Chem.* 246, 6436-6443.
57. Michel, C. (1988) *Reinigung und Charakterisierung der von Adenosylcobalamin abhängigen 2-Methylenglutarat-Mutase sowie der 3-Methylitaconate-Isomerase aus Clostridium barkeri*. Doktorarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
58. Kollmann-Koch, A. & Eggerer, H. (1984) Nicotinic acid metabolism. Dimethylmaleate hydratase. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 365, 847-857.
59. Pirzer, P., Lill, U. & Eggerer, H. (1979) Nicotinic acid metabolism. 2,3-Dimethylmalate lyase. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 360, 1693-1702.
60. Lill, U., Pirzer, P., Kukla, D., Huber, R. & Eggerer, H. (1980) Nicotinic acid metabolism. Enzymic preparation and absolute configuration of the substrate for 2,3-dimethylmalate lyase. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 361, 875-884.
61. Löhlein, G. & Eggerer, H. (1982) Nicotinic acid metabolism: stereochemical course of the (2R,3S)-2,3-dimethylmalate lyase reaction. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 363, 1103-1109.
62. Wagener, N. (2003) *(2R, 3S)-2,3-Dimethylmalat-Lyase aus Eubacterium barkeri*. Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
63. Valentine, R. C. (1964) Bacterial ferredoxin. *Bacteriol. Rev.* 28, 497-517.
64. Hawes, J. W. & Harper, E. T. (2000) Synthesis of methacrylyl-CoA and (R)- and (S)-3-hydroxyisobutyryl-CoA. *Methods Enzymol.* 324, 73-79.
65. Studier, F. W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 60-89.
66. Short, J. M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. & Huse, W.D. (1988) Lambda-ZAP, a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16, 7583-7600.
67. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
68. Marmur, J. (1961) A procedure for isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
69. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
70. Heiner, C. R., Hunkapiller, K. L., Chen, S. M., Glass, J. I. & Chen, E. Y. (1998) Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res.* 8, 557-561.

71. Hwang, I. T., Kim, Y. J., Kim, S.-H., Kwak, C.-I., Gu, Y.-Y. & Chun, J.-Y. (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques*. 35, 1180-1184.
72. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
73. Foster, J. F. & Serman, M. D. (1956) Conformation changes in bovine plasma albumin associated with hydrogen ion and urea binding. II. Hydrogen ion titration curves. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3656-3660.
74. Gill, S. C. & Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data., *Anal. Biochem.* 319-326.
75. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
76. Hunt, J. B., Neece, S. H., Schachman, H. K. & Ginsburg, A. (1984) Mercurial-promoted  $Zn^{2+}$  release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *J. Biol. Chem.* 259, 14793-14803.
77. Pierik, A. J., Wolbert, R. B. G., Mutsaers, P. H., Hagen, W. R. & Veeger, C. (1992) Purification and biochemical characterization of a putative [6Fe-6S] prismatic-cluster-containing protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur. J. Biochem.* 206, 697-704.
78. Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* 24, 409-411.
79. Davies, D. R. & Segal, D. M. (1971) Protein crystallization: microtechniques involving vapor diffusion. *Methods Enzymol.* 22, 266-269.
80. McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallisation. *Eur. J. Biochem.* 189, 1-23.
81. Beatrix, B. (1994) *Coenzyme B<sub>12</sub>-abhängige 2-Methyleneglutarat-Mutase aus Clostridium barkeri*. Doktorarbeit, Philipps-Universität, Marburg, Germany.
82. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. J. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 403-410.
83. Shimizu, T., Okabe, A., Minami, J. & Hayashi, H. (1991) An upstream regulatory sequence stimulates expression of the perfringolysin O gene of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 59, 137-142.

84. Schultz, A. C., Nygaard, P. & Saxild, H. H. (2001) Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J. Bacteriol.* 183, 3293–3302.
85. Chowdhury, E. K., Akaishi, Y., Nagata, S. & Misono, H. (2003) Cloning and overexpression of the 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* E23. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 438-441.
86. Hubbard, B. K., Koch, M., Palmer, D. R., Babbitt, P. C. & Gerlt, J. A. (1998) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: characterization of the (D)-glucarate/galactarate catabolic pathway in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 14369-14375.
87. Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 474-500.
88. Grabowski, R. & Buckel, W. (1991) Purification and properties of an iron-sulfur-containing and pyridoxal-phosphate-independent L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *Eur. J. Biochem.* 199, 89-94.
89. Kohlhaw, G. B. (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 1-15.
90. Bearden, J. A. & Burr, A. F. (1967) Reevaluation of X-ray atomic energy levels. *Rev. Mod. Phys.* 39, 125-142.
91. Luján, H. D., Mowatt, M. R., Wu, J. J., Lu, Y., Lees, A., Chance, M. R. & Nash, T. E. (1995) Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 270, 13807-13813.
92. Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A. & Sokatch, J. R. (1992) Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267, 13585-13592.
93. Hawes, J. W., Harper, E. T., Crabb, D. W. & Harris, R. A. (1996) Structural and mechanistic similarities of 6-phosphogluconate and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenases reveal a new enzyme family, the 3-hydroxyacid dehydrogenases. *FEBS Lett.* 389, 263-267.
94. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* 229, 105-124.
95. Hofmeister, A. E. M., Albracht, S. P. J. & Buckel, W. (1994) Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. *FEBS Lett.* 351, 416-418.

96. Seibert, C. M. & Raushel, F. M. (2005) Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 44, 6383-91.
97. Thoden, J. B., Phillips, G. N., Jr., Neal, T. M., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (2001) Molecular structure of dihydroorotase: a paradigm for catalysis through the use of a binuclear metal center. *Biochemistry* 40, 6989-6997.
98. Abendroth, J., Niefind, K., May, O., Siemann, M., Syltatk, C. & Schomburg, D. (2002) The structure of L-hydantoinase from *Arthobacter aurescens* leads to an understanding of dihydropyrimidinase substrate and enantio specificity. *Biochemistry* 41, 8589-8597.
99. Jozic, D., Kaiser, J. T., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K. (2003) X-ray structure of isoaspartyl dipeptidase from *E.coli*: a dinuclear zinc peptidase evolved from amidohydrolases. *J. Mol. Biol.* 332, 243-256.
100. Holm, L. & Sander, C. (1997) An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Prot. Struct. Funct.* 28, 72-82.
101. Vincent, F., Yates, D., Garman, E., Davies, G. J. & Brannigan, J. A. (2004) The three-dimensional structure of the *N*-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, NagA, from *Bacillus subtilis*: a member of the urease superfamily. *J. Biol. Chem.* 279, 2809-2616.
102. Nitnai, Y., Satow, Y., Adachi, H. & Tsujimoto, M. (2002) Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis. *J. Mol. Biol.* 321, 177-184.
103. Buchbinder, J. L., Stephenson, R. C., Dresser, M. J., Pitera, J. W., Scanlan, T. S. & Fletterick, R. J. (1998) Biochemical characterization and crystallographic structure of an *Escherichia coli* protein from the phosphotriesterase gene family. *Biochemistry* 37, 5096-5106.
104. Ireton, G. C., McDermott, G., Black, M. E. & Stoddard, B. L. (2002) The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *J. Mol. Biol.* 315, 687-697.
105. Wang, Z. & Quioco, F. A. (1998) Complexes of adenosine deaminase with two potent inhibitors: X-ray structures in four independent molecules at pH of maximum activity. *Biochemistry* 37, 8314-8324.
106. Keeffe, J. R. & Kresge, A. J. (1990) Kinetics and mechanism of enolization and ketonization. In *The chemistry of enols*. (Rappoport, Z., ed) pp. 399-480. John Wiley, Chichester.

---

## Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. A. J. Pierik für die umsichtige und ausgezeichnete Betreuung, die vielen Anregungen und wertvollen praktischen Tips während meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. W. Buckel danke ich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. R. Hedderich danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. L.-O. Essen und Daniel Kreß danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Kristallisation der Enamidase und insbesondere für das superschnelle Lösen der dreidimensionalen Struktur.

Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer für die Möglichkeit, das Maldi-TOF Gerät jeder Zeit nutzen zu können.

Elke Eckel, Iris Schall und Nora Elsner möchte ich für die technische Unterstützung danken. Mein Besonderer Dank gilt Frau E. Eckel für die nette Zusammenarbeit und die Hilfe bei der experimentellen Arbeit.

Dr. D. J. Darley hat mit seinen Synthesen die biochemischen und kinetischen Experimente möglich gemacht; danke Dan für den Geruch im Labor.

Herrn Dr. T. Selmer danke ich für seine Bereitschaft, immer ein Diskussionspartner zu sein.

Dr. S. Zauner für seine Hilfe beim Sequenzieren am Anfang der Arbeit.

Dr. Fackelmayer (GATC, Konstanz) und Dr. Knobloch (Seqlab, Göttingen) möchte ich herzlich für die direkte genomische Sequenzierung und Seegene Speedwalking danken.

Den Arbeitsgruppen Buckel und Bremer danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor.

Meiner Familie. Ganz besonders sei meinen Eltern und Karin für ihre große Unterstützung während des Studiums und der anschließenden Promotion gedankt.

---

**Persönlichen Daten**

Name, Vorname	Al Hapel, Ashraf
Straße	Furtstrasse 6
PLZ/Wohnort	35037 Marburg
Geburtsdatum/-Ort	14.12.1974 in Baitlahia/Gaza
Nationalität	Palästinensisch

**Schulbildung**

1980-1986	Grundschulen in Baitlahia/Gaza
1987-1989	Mittelschule in Baitlahia/Gaza
1990-1992	Gymnasium (Abitur) in Gabalia/Gaza
1992-1996	„Bachelor of Science“ Mikrobiologie/Chemie an Al-Azhar University Gaza
1999-2002	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
August 2002	Diplomarbeit im Laboratorium für biochemische Mikrobiologie unter Leitung von Dr. Antonio Pierik  Titel der Abschlußarbeit: 6-Hydroxynicotinat-Reduktase aus <i>Eubacterium barkeri</i>
Seit August 2002	Stipendiat des Graduiertenkollegs, wissenschaftlicher Mitarbeiter im Laboratorium für biochemische Mikrobiologie bei Prof. Dr. W. Buckel

**Besondere Kenntnisse**

Sprachkenntnisse	deutsch, arabisch, englisch
EDV-Kenntnisse	Grundkenntnisse für windows NT 4.0, windows 2000 und MS Office
Hobbies	Fußball, Volleyball und Schwimmen