

**Klonierung der Gene der Ribonucleotid-Reduktasen  
von *Corynebacterium ammoniagenes* und  
*Corynebacterium glutamicum***

Vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Wulf Oehlmann**

geboren am 19.03.1965  
in Braunschweig

1998

Referent: Prof. Dr. G. Auling  
Koreferent: Prof. Dr. J. Lengeler  
Tag der Promotion: 29.10.1998

## Abstract

OEHLMANN, WULF

### **Cloning of the genes of the ribonucleotide reductases from *Corynebacterium ammoniagenes* and *Corynebacterium glutamicum***

Ribonucleotide reductases (RRases) catalyze the irreversible reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides required for DNA replication using diverse metallo-cofactors in a radical mechanism. The genetic information for the ribonucleotide reductases which are divided into four classes due to their diversity is encoded by the *nrd* genes (*n*ucleotide *r*eduction). The peculiarity of the metallo-cofactor bound to the small subunit of the RRase from *C. ammoniagenes* is based on a mononuclear manganese(II) center.

Due to a constant lack of protein for a more detailed characterization of the metal center in the Mn-RRase by advanced spectroscopic methods cloning of the *nrd*-genes from *C. ammoniagenes* and *C. glutamicum* became necessary. The cloning experiments presented here were based on the comparison of the primary structure of the large catalytic subunit from known RRases in a special view of the R1 protein from *Mycobacterium tuberculosis*. The determination of preserved domains led to the design of oligonucleotide primers used in PCR for amplifying fragments of the *nrdE* genes from *C. ammoniagenes* and *C. glutamicum*. Based on these results *nrdF2* from *M. tuberculosis* was used as a probe for cloning of the genomic region surrounding the *nrd* genes in both corynebacteria. This allowed sequencing of *nrdF* from *C. ammoniagenes* and of *nrdHIEF* from *C. glutamicum*. Upon conjugative introduction of pWCG6 harboring *nrdE* from *C. glutamicum* thermosensitive mutants of *C. ammoniagenes* regained the ability to grow at 37°C. Increasing the copy number of *nrdF* caused enhanced resistance towards the RRase-specific inhibitor hydroxyurea indicating that the cloned genes code for the Mn-RRase of *C. ammoniagenes* and for the RRase of *C. glutamicum*, respectively. The alignment of the deduced amino acid sequences of the metal-containing subunits of the RRases from *C. ammoniagenes* and *C. glutamicum* with R2 of the Fe-RRase from *E. coli* revealed the preservation of all residues described as metal ligands in the Fe-RRase. This unexpected observation is discussed with a focus on the question which characteristics discriminate ligands for iron and manganese.

Successful cloning of the genes of RRases from *C. ammoniagenes* and *C. glutamicum* will facilitate overexpression in order to clarify this fascinating question.

**Keywords: Manganese ribonucleotide reductase, sequence alignment, functional complementation**

## Zusammenfassung

OEHLMANN, WULF

### **Klonierung der Gene der Ribonucleotid-Reduktasen von *Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium glutamicum***

Ribonucleotid-Reduktasen (RRasen) katalysieren die irreversible Reduktion von Ribonucleotiden zu den für die DNA-Replikation benötigten Desoxyribonucleotiden und nutzen dabei unterschiedliche metallische Cofaktoren für den radikalischen Mechanismus. Die genetische Information für die auf Grund ihrer Diversität in vier Klassen gegliederten Ribonucleotid-Reduktasen ist durch die *nrd*-Gene (*n*ucleotide *r*eduction) kodiert. Die Besonderheit des metallischen Cofaktors in der kleinen Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase von *C. ammoniagenes* beruht auf einem einkernigen Mangan(II)-Zentrum. Da für die genauere Charakterisierung des Metallzentrums mittels spektroskopischer Methoden nicht ausreichend Protein der metallhaltigen Untereinheiten zur Verfügung stand, wurde die Klonierung der Gene der RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* nötig. Die hier vorgestellten Klonierungsexperimente gingen aus von einem Vergleich der Primärstrukturen der großen katalytischen Untereinheiten bekannter RRasen unter besonderer Berücksichtigung des R1-Proteins von *Mycobacterium tuberculosis*. Die Bestimmung konservierter Domänen resultierte in der Entwicklung von Oligonucleotidprimern, mit denen in der PCR jeweils ein Fragment des *nrdE*-Gens von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* amplifiziert werden konnte. Aufbauend auf der großen Homologie zwischen der Sequenz des Fragmentes aus *C. ammoniagenes* und *nrdE* von *M. tuberculosis* konnte *nrdF2* von *M. tuberculosis* direkt als Sonde für die Identifizierung der Gene der metallhaltigen Untereinheiten von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* eingesetzt werden. Fragmente chromosomaler DNA aus der Region der *nrd*-Gene beider Corynebakterien wurden kloniert und die Sequenzen von *nrdF* von *C. ammoniagenes* sowie *nrdHIEF* von *C. glutamicum* bestimmt. Komplementationsversuche mit thermosensitiven Mutanten von *C. ammoniagenes* und Experimente zum Gendosisseffekt belegten die funktionelle Bedeutung der klonierten Gene für die Zelle und zeigten, daß wirklich die Gene der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* bzw. der RRase von *C. glutamicum* kloniert wurden. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der metallhaltigen Untereinheiten der RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* mit R2 der Fe-RRase von *E. coli* zeigten, daß in den unterschiedlichen Metallzentren alle für die Fe-RRase beschriebenen als Metallliganden fungierenden Aminosäurereste erhalten sind, so daß hier Metallspezifität und Diversität der RRasen unter Beibehaltung einer großen Ähnlichkeit der Proteine diskutiert wird.

Die erfolgreiche Klonierung der RRase-Gene von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* ermöglicht deren Überexpression zur Klärung dieser faszinierenden Fragestellung.

**Schlagwörter: Mangan-Ribonucleotid-Reduktase, Sequenzvergleich, funktionelle Komplementation**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Chemikalien, Enzyme und Isotope</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2 Bakterienstämme und Plasmide</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3.Häufig verwendete Puffer und Lösungen</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4. Wachstumsmedien</b> .....	<b>10</b>
2.4.1. Seed-Medium (Thaler & Diekmann, 1979).....	10
2.4.2. Luria Bertani (LB) (Miller 1972).....	10
2.4.3. LBG-Medium .....	11
2.4.4. Elektroporationsmedium für Corynebakterien (Haynes & Britz, 1989) .....	11
2.4.5. SOC-Regenerationsmedium (Dower et al., 1988).....	11
2.4.6. Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium mit Sorbitol .....	11
2.4.7. NBH-Medium.....	11
2.4.8. Mineralsalzmedium (modifiziert nach Liebl et al., 1989) .....	12
<b>2.5. Antibiotikazusatz</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6. Messung von pH-Wert und optischer Dichte</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7. Anzuchtverfahren</b> .....	<b>13</b>
2.7.1. Anzucht von Vorkulturen .....	13
2.7.3. Anzucht von <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> im 10 L-Fermenter .....	13
<b>2.8. Zellernte</b> .....	<b>14</b>
<b>2.9. Zellaufschluß</b> .....	<b>14</b>
<b>2.10. Proteinreinigung</b> .....	<b>15</b>
2.10.1 Fällungen .....	15
2.10.1.1. Streptomycinsulfatfällung.....	15
2.10.1.2. Ammoniumsulfatfällung .....	15
2.10.2. Chromatographische Methoden.....	16
2.10.2.1. Affinitätschromatographie mit 2', 5'-ADP-Sepharose 4B .....	16
2.10.2.2. Gelfiltration mit Superdex G 200.....	17
2.10.2.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	17
<b>2.11. Proteinbestimmungsmethoden</b> .....	<b>18</b>
2.11.1. Proteinbestimmung ganzer Zellen nach der Methode von Biuret (Herbert et al.,1971) .....	18
2.11.2. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte nach Bradford (1976).....	18
2.11.3. Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) .....	18
<b>2.12. Dialyse und Proteinkonzentrierung</b> .....	<b>19</b>
<b>2.13. Mutagenese mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)</b> .....	<b>19</b>
<b>2.14. Permeabilisierung von <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> nach Luo (1994)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.15. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b> .....	<b>20</b>
2.15.1. Standardproteintrennung im SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970).....	20
2.15.2. 2-dimensionale Gelelektrophorese.....	22
2.15.3. Proteinkonzentrierung im SDS-Polyacrylamidgel nach Vandekerckhove et al. (1993).....	22
2.15.4. Färben der Polyacrylamidgele.....	23
2.15.4.1. Silberfärbung (Blum et al., 1987) .....	23
2.15.4.2. Coomassie-Färbung .....	23
2.15.4.3. Amido black-Färbung.....	24
<b>2.16. „In-gel“-Verdau von Proteinen</b> .....	<b>24</b>

2.16.1. Verdau mit Endoproteinase LysC.....	24
2.16.2. Verdau mit Bromcyan.....	24
<b>2.17. Western-Blot.....</b>	<b>25</b>
<b>2.18. Biochemisch analytische Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.18.1. Bestimmung der Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität.....	26
2.18.1.1. Standardtest für die Detektion der Mn-RRaseaktivität.....	26
2.18.1.2. Biochemischen Komplementationstest.....	28
2.18.1.3. Trennung des Ribonucleosid- / 2'-Desoxyribonucleosid-Gemisches mittels HPLC.....	28
2.18.1.4. Chromatographieparameter und Fraktionierung.....	28
<b>2.19. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.19.1. Bestimmung der DNA Konzentration.....	29
2.19.2. Isolierung von Gesamt-DNA.....	29
2.19.3. Isolierung von Plasmid-DNA.....	30
2.19.4. DNA-Fragmentisolierung.....	30
2.19.5. DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen.....	30
2.19.6. Inaktivierung von Restriktionsenzymen.....	31
2.19.7. Dephosphorylierung der 5'-Enden geschnittener Vektor-DNA.....	31
2.19.8. Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA.....	31
2.19.9. Ligation.....	31
2.19.10. Methoden zum Gentransfer.....	32
2.19.10.1 Elektrotransformation von <i>Escherichia coli</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> und <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> .....	32
2.19.10.2. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.19.10.3. RP4 vermittelte Konjugation für den Gentransfer von <i>E. coli</i> nach <i>Corynebacterium</i> .....	33
2.19.11. DNA-DNA Hybridisierung.....	34
2.19.11.1. DNA-Transfer vom Agarosegel auf Nylonmembranen (nach Southern, 1975).....	34
2.19.11.2. DNA-DNA Hybridisierung (Maniatis et al., 1982).....	34
2.19.11.3. Immunologischer Nachweis Digoxegenin-markierter Sonden.....	35
2.19.11.4. Markierung von DNA-Sonden mit Digoxegenin.....	35
2.19.12. Amplifikation von DNA mit der „polymerase chain reaction“ (PCR) (Saiki et al., 1985).....	35
2.19.13. Erstellung von größenabhängigen Teilgenbanken.....	35
2.19.14. Herstellung der CA2-spezifischen Sonden aus <i>M. tuberculosis</i> DNA.....	36
2.19.15. Sequenzierung.....	36
2.20. Computerprogramme zur Auswertung von DNA/Protein-Gelen und Sequenzen.....	36
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Eingangsexperimente für die Klonierung der Gene der Mn-RRase von</b> <b><i>C. ammoniagenes</i>.....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Experimente zur Schrotschußklonierung des Gens des CA1-Proteins.....	38
3.1.2. Versuche zur biochemischen Charakterisierung der metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase von <i>C. ammoniagenes</i> .....	40
3.1.3. Versuche zur Gewinnung von Peptidinformationen vom 50 kDa CA2-Protein.....	42
3.1.4. Heterologe biochemische Komplementation partiell gereinigter Unterein- heiten von den RRasen aus <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	44

<b>3.2. Klonierung der Gene der Mn-RRase von <i>C. ammoniagenes</i> .....</b>	<b>46</b>
3.2.1. Entwicklung und Anwendung abgeleiteter PCR-Primer für die Herstellung einer spezifischen Sonde für das Gen des CA1-Proteins .....	47
3.2.2. Sequenzierung und Sequenzvergleich des 935 bp PCR-Produktes .....	49
3.2.3. Identifizierung von Restriktionsfragmenten chromosomaler DNA von <i>C. ammoniagenes</i> mit der CA1-Sonde durch Southern Hybridisierung .....	51
3.2.4. Sondenentwicklung für das Gen des CA2-Proteins von <i>C. ammoniagenes</i> ...	52
3.2.5. Identifizierung von Restriktionsfragmenten chromosomaler DNA von <i>C. ammoniagenes</i> mit Sonden für das Gen des CA2-Proteins durch Southern Hybridisierung .....	52
3.2.6. Sequenzierung des Gens des CA2-Proteins der Mn-RRase von <i>C. ammoniagenes</i> .....	54
3.2.7. Sequenzanalyse des <i>nrdF</i> Gens von <i>C. ammoniagenes</i> .....	54
3.2.8. Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Genprodukte von <i>nrdE</i> und <i>nrdF</i> ..	57
<b>3.3. Klonierung der RRase-Gene von <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>60</b>
3.3.1. Entwicklung der CG1-Sonde und Anwendung beim Screening einer <i>C. glutamicum</i> -Cosmidbank.....	60
3.3.2. Subklonierung und Sequenzierung von <i>nrdH</i> , <i>nrdI</i> und <i>nrdE</i> aus <i>C. glutamicum</i> .....	62
3.3.3. Identifizierung und Sequenzierung von <i>nrdF</i> aus <i>C. glutamicum</i> .....	64
3.3.4. Analyse der Sequenz von <i>nrdHIE</i> und dem distalen <i>nrdF</i> aus <i>C. glutamicum</i> .....	67
3.3.5. Genetische Komplementation der thermosensitiven <i>C. ammoniagenes</i> Mutanten CH31 und CH33 mit pWCG6 .....	71
3.3.6. Überprüfung der Kopienzahl für das <i>nrdF</i> Gen im Chromosom von <i>C. glutamicum</i> .....	72
 <b>4. Diskussion</b>	 <b>74</b>
 <b>5. Ausblick</b>	 <b>94</b>
 <b>6. Literaturverzeichnis</b>	 <b>96</b>



## Abkürzungen:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ap, Ap <sup>r</sup>	Ampicillin, Ampicillinresistenz
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin
CA1	große katalytische Untereinheit der Mn-RRase von <i>C. ammoniagenes</i>
CA2	kleine metallhaltige Untereinheit der Mn-RRase von <i>C. ammoniagenes</i>
CG1	große katalytische Untereinheit der RRase von <i>C. glutamicum</i>
CG2	kleine metallhaltige Untereinheit der RRase von <i>C. glutamicum</i>
Ci	Curie, $3,7 \times 10^{10}$
Cm, Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol, Chloramphenicolresistenz
cpm	counts per minute
Da	Dalton
dpm	Zerfälle pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	fast protein liquid chromatography
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatographie
HU	Hydroxyharnstoff (= hydroxyurea)
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km, Km <sup>r</sup>	Kanamycin, Kanamycinresistenz
KP-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LB	Luria-Bertani (Medium)
MNNG	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin
Nal, Nal <sup>r</sup>	Nalidixinsäure, Nalidixinsäureresistenz
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bei 578 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
R1	große katalytische Untereinheit der Fe-RRasen
R2	kleine metallhaltige Untereinheit der Fe-RRasen
RRase	Ribonucleotid-Reduktase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle

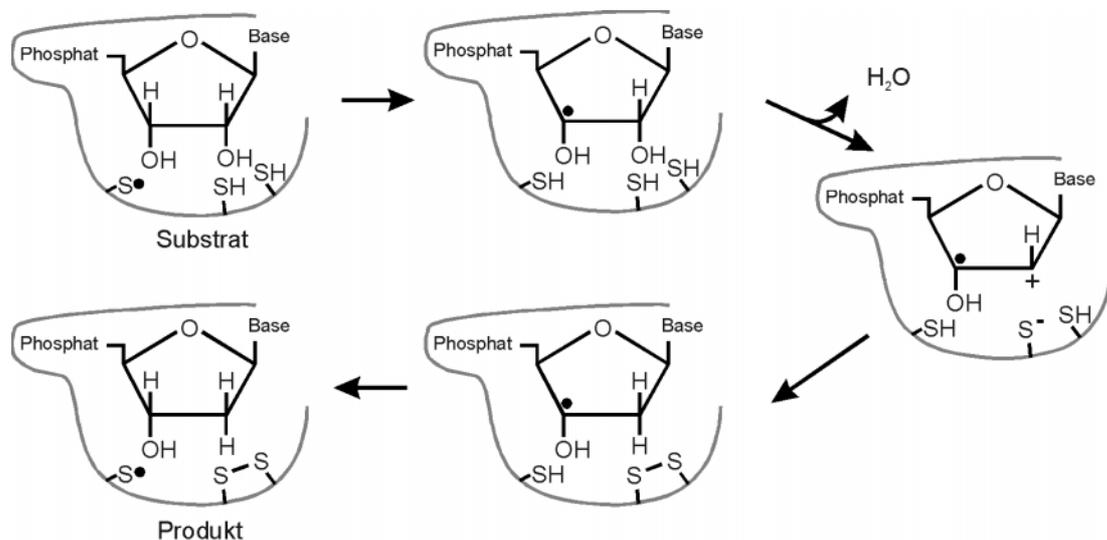
Tp, Tp <sup>r</sup>	Trimethoprim, Trimethoprimresistenz
Tris	Tris-2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ÜNK	Übernachtkultur
V <sub>e</sub>	Elutionsvolumen
V <sub>0</sub>	Ausschlußvolumen
V <sub>t</sub>	Säulenvolumen

Nucleotide und Nucleoside:

AMP, ADP, ATP	Adenosin-5'-mono-,di-, triphosphat
CMP, CDP, CTP	Cytidin-5'-mono-,di-, triphosphat
GMP, GDP, GTP	Guanosin-5'-mono-,di-, triphosphat
UMP, UDP, UTP	Uridin-5'-mono-,di-, triphosphat
NDP, NTP	Nucleosid-5'-di-, triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat

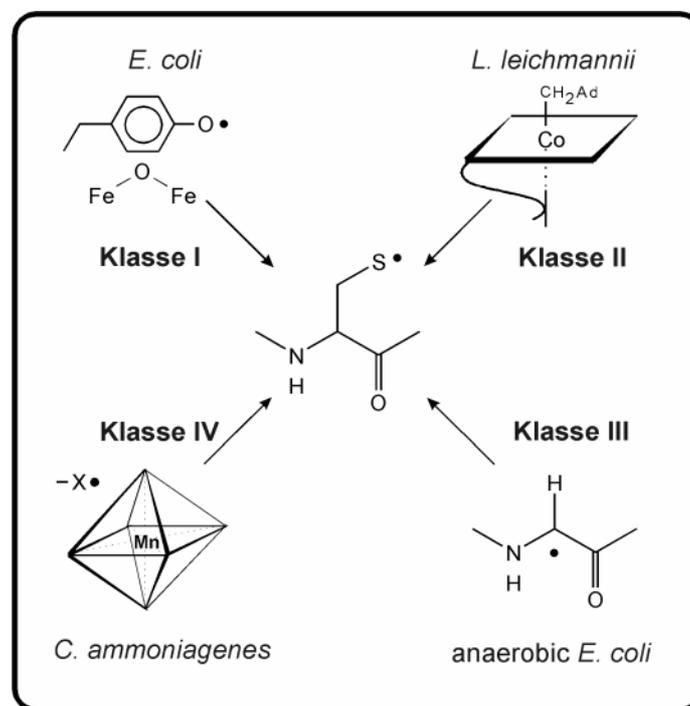
## 1. Einleitung

Nachdem die Evolution der Organismen die Desoxyribonukleinsäuren als Speichermedium der genetischen Information ausgewählt hatte, wurde die Ribonucleotid-Reduktion ein unerlässlicher Schritt der *de novo* DNA-Synthese. Die anfänglich noch autokatalytische Reduktion der RNA wurde in den ersten einfachen Organismen schließlich von Proteinen übernommen, die ihrerseits eine Entwicklung hin zu den heute bekannten Ribonucleotid-Reduktasen (RRasen) durchmachten (FOLLMANN, 1982; REICHARD, 1993). Diese Enzyme zeichnen sich durch eine komplexe allosterische Regulation aus, da sie bei der DNA-Vorstufensynthese für die Reduktion aller vier Ribonucleotide zuständig sind und dabei auch der Kontrolle verschiedener Nucleotideffektoren unterliegen (HOGENKAMP, 1984). Bei allen heutigen RRasen ist das Prinzip der allosterischen Regulation stets gleich. Es wird genauso wie der allen RRasen gemeinsame Reaktionsmechanismus (Abb. 1.1) als Argument für deren monophyletischen Ursprung und zwar bezogen auf ihre katalytische Untereinheit angeführt. Demgegenüber steht die Diversität des metallischen Cofaktors, der für die Bereitstellung des die Reduktion einleitenden Startradikals notwendig ist (FOLLMANN, 1982). Dieses transiente Startradikal wird vermutlich an einem Cysteinrest (Cys<sub>439</sub>; *E. coli*-Nummerierung) gebildet, der in allen Ribonucleotid-Reduktasen im aktiven Zentrum erhalten ist (UHLIN & EKLUND, 1994; SJÖBERG, 1997) und das Argument des monophyletischen Ursprungs der katalytischen Untereinheit noch untermauert. Ausgehend von diesem Cysteinylnradikal findet die Reduktion der Ribonucleotide statt, deren vorgeschlagener, komplexer radikalischer Mechanismus in Abbildung 1.1 dargestellt ist (REICHARD, 1993; STUBBE & VAN DER DONK, 1995; SJÖBERG, 1997).



**Abbildung 1.1** Schema des vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus für die Ribonucleotid-Reduktion nach SJÖBERG (1997).

Für die Aufrechterhaltung der katalytischen Funktionalität sind die verschiedenen RRasen jeweils auf ihren spezifischen metallischen Cofaktor angewiesen, der die Diversität dieser Enzymgruppe widerspiegelt und die Grundlage bei der Klassifizierung (Abb. 1.2) der Ribonucleotid-Reduktasen bildet (STUBBE & VAN DER DONK, 1995). Die unterschiedlichen Cofaktoren werden bei der Ribonucleotid-Reduktion entweder für die Bildung eines transienten oder aber eines stabilen, dann Protein-gebundenen Radikals genutzt. Für die Bildung eines transienten Radikals tritt das katalytische Protein direkt in Kontakt mit dem metallischen Cofaktor, während ein stabiles Radikal die Bindung des Metalls in einem separaten „Hilfsprotein“ voraussetzt, von dem aus dann der Elektronentransfer zur katalytischen Untereinheit stattfindet. Welche Form im Laufe der Evolution in den verschiedenen RRase-Klassen verwirklicht wurde, soll im folgenden erklärt werden.



**Abbildung 1.2** Einteilung der Ribonucleotid-Reduktasen in vier Klassen auf Grund der Art der metallischen Cofaktoren modifiziert nach STUBBE & VAN DER DONK (1995).

Die Klasse I bilden die Eisen-abhängigen Ribonucleotid-Reduktasen (Fe-RRase), die man bei einigen Prokaryoten und den Eukaryoten sowie ihren Viren findet. Die inzwischen am genau-esten charakterisierte Fe-RRase ist die von *Escherichia coli* (REICHARD, 1993), die repräsentativ für diese Gruppe steht. Das Enzym besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, die in  $\alpha_2\beta_2$  Struktur die aktive Form des Holoenzym bilden. Die größere R1-Untereinheit (80 kD je Monomer) ist die für die Katalyse zuständige und enthält die Bindestellen für Substrate und Effektoren (UHLIN & EKLUND, 1994), während die kleinere R2-Untereinheit (43,5 kD je Monomer) ein zweikerniges Fe(III)-Zentrum beherbergt (SJÖBERG et al., 1982; NORDLUND et al., 1990), welches für die Erhaltung

eines stabilen Tyrosyl-Radikals zuständig ist (LARSSON & SJÖBERG, 1986; ORMÖ et al., 1994) das durch Hydroxyharnstoff (HU) als spezifischem Inhibitor „gelöscht“ wird (LABMANN et al. 1992). Es wird angenommen, daß dieses Tyrosyl-Radikal die Katalyse im Holoenzym einleitet, wobei ein „long range“ Elektronentransfer für die Bereitstellung des transienten Thiylradikals am Cystein (Cys<sub>439</sub>) im katalytischen Zentrum nötig ist (SJÖBERG, 1994). Der „Weg des Radikals“ führt entlang an insgesamt neun Aminosäureresten, die anhand der dreidimensionalen Struktur beider Untereinheiten der Fe-RRase aus *E. coli* identifiziert wurden (NORDLUND et al., 1990; UHLIN & EKLUND, 1994) und deren Beteiligung am Elektronentransfer durch gerichtete Mutagenese belegt wurde (LARSSON & SJÖBERG, 1986; CLIMENT et al., 1992; ECKBERG et al., 1996; KATTERLE et al., 1997).

In *Lactobacillus leichmannii* wurde ein anderer RRase-Typ als B<sub>12</sub>-abhängig beschrieben (BLAKLEY & BARKER, 1964; BOOKER & STUBBE, 1993). Das aktive Enzym ist hier ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 82 kDa, das mit S-adenosylcobalmin als Cofaktor in direktem Kontakt nur dann ein vergängliches Radikal bildet, wenn ein Ribonucleotid an der Substratbindestelle reduziert werden soll (LICHT et al., 1996). Dieses Enzym nutzt Nucleosidtriphosphate (SINGH et. al., 1977) als bevorzugte Substrate. Auch bei Vertretern anderer Gattungen wurden B<sub>12</sub>-abhängige Ribonucleotid-Reduktasen gefunden, die sich durch ihre homodimere Struktur und die Nutzung von Nucleosid-diphosphaten als Substrat von der RRase aus *L. leichmannii* unterscheiden ( TSAI & HOGENKAMP, 1980; HOGENKAMP, 1984). Die Klasse II umfaßt demnach eine etwas heterogenere Enzymgruppe.

Die ausschließlich für die anaerobe Reduktion von Ribonucleosidtriphosphaten in *E. coli* zuständige RRase (FONTECAVE et al., 1989) steht repräsentativ für die Klasse III. Dieses Enzym besteht aus einem Homodimer von insgesamt 160 kDa (SUN et al., 1993), welches Fe-S-Cluster enthält. Aber erst in Verbindung mit S-Adenosylmethionin und noch anderen Proteinkomponenten kann ein Protein-gebundenes Glycyl-Radikal generiert werden, so daß Ribonucleotide reduziert werden können (MULLIEZ et al., 1993; REICHARD, 1993). Eine zweite strikt anaerobe RRase wurde in *Methanobacterium thermoautotrophicum* beschrieben (HOGENKAMP et al., 1987), für die aber eine Charakterisierung des Cofaktors noch aussteht.

Die Mangan-abhängige Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium* (früher *Brevibacterium*) *ammoniagenes* (WILLING et al., 1988a) ist der Prototyp der Klasse IV. Die Mn-RRase kann genau wie die Klasse I Enzyme durch HU gehemmt werden, wodurch sie sich von den B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen bzw. den anaeroben Klasse III RRasen absetzt. Die Sensitivität gegenüber HU stellt gleichzeitig ein effektives und einfaches

Testsystem bei der Untersuchung von Organismen hinsichtlich des RRase-Types dar (LAMMERS & FOLLMANN, 1983). Ebenfalls übereinstimmend mit den Fe-RRasen führt das Mn-Enzym die Reduktion von Ribonucleosiddiphosphaten durch. Die Mn-RRase besteht aus einer monomeren 80 kDa katalytischen Untereinheit (CA1), die wie R1 der Fe-RRasen die Bindestellen für Substrate und Effektoren besitzt, und zusätzlich aus einem Homodimer von insgesamt 100 kDa. In jeder dieser beiden kleinen Untereinheiten (CA2) ist das Mangan gebunden (WILLING et al., 1988a). Im Gegensatz zur Fe-RRase von *E. coli* wird angenommen, daß in *C. ammoniagenes* das Mangan in einkernigen Metallzentren organisiert ist (BLASCZYK, 1994). Mit Hilfe dieses Metallzentrums wird auch in der Mn-RRase ein stabiles proteingebundenes Radikal gebildet, das erst kürzlich nachgewiesen wurde (GRIEPENBURG et al. 1996).

Zusammenfassend gesagt, sind der Aufbau des Holoenzym aus zwei heterologen Untereinheiten, die Verwendung von Ribonucleosiddiphosphaten als Substrate und der spezifische Inhibitor HU gemeinsame Merkmale der Klasse I und IV RRasen und setzen diese Enzyme aus evolutionärer Sicht in eine engere Beziehung zueinander als zu den anderen beiden Typen. Auch wenn für Klasse I und IV RRasen bei den biochemischen und physikalischen Untersuchungen Gemeinsamkeiten offen gelegt wurden, waren die Unterschiede - der Metallcharakter - der ursprüngliche Anlaß zu der Untersuchung dieser Enzyme. Auf diesen Unterschieden, die sich in der Verwendung der unterschiedlichen metallischen Cofaktoren zeigt, basiert die hier übernommene Klassifizierung (STUBBE & VAN DER DONK, 1995).

Der molekulare Vergleich und somit die Suche nach Ähnlichkeiten der Primärstrukturen der Proteine wurde erst mit der Klonierung der Gene der RRasen möglich. Die *nrd* (=nucleotid *re*duction) Gene der Fe-RRase (*nrdAB*: CARLSON et al., 1984) und des anaeroben Klasse III Enzyms (*nrdD*: FONTECAVE et al., 1989) aus *E. coli*, sowie der B<sub>12</sub>-abhängigen RRase aus *L. leichmannii* (BOOKER & STUBBE, 1993) wurden bereits für Sequenzvergleiche herangezogen. Dabei zeigte sich, daß zwei Bereiche, in denen für die Fe-RRase katalytisch aktive Cysteinreste bestimmt worden waren, im B<sub>12</sub>-Enzym von *L. leichmannii* und in der anaeroben RRase aus *E. coli* wiedergefunden werden konnten (UHLIN & EKLUND, 1994; Sjöberg, 1997). Ob diese und vielleicht auch andere funktionell wichtige Aminosäuren in der Mn-RRase erhalten sind, konnte mittels Sequenzvergleiche noch nicht untersucht werden, weil deren Gene bislang nicht kloniert werden konnten. Versuche, *nrd*-Mutanten von *E. coli* mit DNA aus *C. ammoniagenes* zu komplementieren, schlugen fehl (G. AULING, persönliche Mitteilung), was verschiedene Ursachen haben konnte. Eine war sicherlich die Verschiedenheit von Fe- und Mn-RRase, deren Untereinheiten nicht miteinander kooperieren (WILLING, 1986). Außerdem blieb eine funktionelle Expression des Mn-RRase Holoenzym in *E. coli* fraglich. Zudem konnte aber auch eine grundsätzlich unterschiedliche Regulation der

DNA-Synthese Ursache für das Scheitern der Komplementierungsversuche gewesen sein. Schließlich war *C. ammoniagenes* gerade auf Grund einer Besonderheit im Verlauf der Mangan-abhängigen DNA-Synthese als Studienobjekt ausgewählt worden. Unter Manganmangel kommt es zu einer Akkumulation von Nucleotiden im Kultur-medium, was Anlaß zu genaueren Untersuchungen gab (AULING, 1980; AULING & FOLLMANN, 1994) und in Japan schon seit den 60er Jahren für die biotechnologische Produktion von Nucleotiden und davon abgeleiteten Derivaten ausgenutzt wurde. (OGATA et al., 1976). *C. ammoniagenes* ist in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt nicht die einzige Spezies, deren DNA-Synthese unter dem Einfluß von Mangan steht. Schon früher waren Effekte von Mangan bei der DNA-Bildung bei *Nocardia opaca* (WEBLEY, 1960; WEBLEY et al., 1962) beschrieben worden bzw. die reversible Hemmung der DNA-Bildung unter Manganmangel bei einigen *Nocardia*- und *Rhodococcus*-Stämmen (SCHIMPF-WEILAND et al., 1981; LAMMERS & FOLLMANN, 1983). Dies läßt vermuten, daß die Manganabhängigkeit der Ribonucleotid-Reduktion innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt weit verbreitet ist, da die enge Zusammengehörigkeit dieses Zweiges der Bakterien durch taxonomische Studien bezüglich der 16S rRNA und des Mykolsäuregehaltes belegt ist (PASCUAL et al., 1995; COLLINS & CUMMINS, 1986). Die Einordnung des Nucleotidproduzenten *Brevibacterium ammoniagenes* in die Gattung *Corynebacterium* (COLLINS, 1987) stellte diesen jetzt auch offensichtlich an die Seite einer anderen industriell bedeutenden Spezies. *C. glutamicum*, der bei der Herstellung des Geschmacksverstärkers L-Glutamat und des als Futtermittelzusatz verwendeten L-Lysins im großtechnischen Maßstab Einsatz findet (YAMADA et al., 1972), wird im Gegensatz zu *C. ammoniagenes* schon seit mehr als einem Jahrzehnt gentechnisch ausgiebig bearbeitet (WOHLLEBEN et al., 1993). Mit der Isolierung erster kryptischer Plasmide war es möglich, Klonierungs-vektoren zu konstruieren (MIWA et al., 1984). Dabei war von Bedeutung, daß heterologe Antibiotika-Resistenzgene (z.B. aus *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* sp. u. a.) in *C. glutamicum* zur Expression gebracht werden können (WOHLLEBEN et al., 1993). Die neukonstruierten Plasmide, die zumeist shuttle-Vektoren für Klonierung und Expression von Genen sind (MIWA et al., 1985), können am effizientesten mittels Elektroporation (HAYNES & BRITZ, 1989) oder durch Konjugation ausgehend von *E. coli* (SCHÄFER et al., 1990) in *C. glutamicum* eingebracht werden. Zusätzlich stehen Restriktions- (LIEBL & SCHEIN, 1990; LIN & CHIOU, 1993) und *recA*-Mutanten (FITZPATRICK et al. 1994) zur Verfügung und es sind Methoden zur Herstellung von Insertions- und Deletionsmutanten beschrieben (SCHÄFER et al., 1994a). Diese reich-haltigen Methoden wurden gerade bei der Aufklärung des Aminosäurestoffwechsels in *C. glutamicum* und der Klonierung daran beteiligter Gene eingesetzt (SEEP-FELDHAUS et al., 1991; KRONEMEYER et al. 1994). Die gezielte Veränderung besonders der Gene der am Aminosäureexport der Zellen beteiligten

Proteine (FERNANDEZ-GONZÁLEZ, 1996; KRÄMER, 1993) ist ein wichtiges Werkzeug bei der Stammverbesserungen für die Aminosäureproduktion. Demgegenüber wurden bei der Nucleotidproduktion häufig klassische Verfahren zur Stammoptimierung benutzt (TAKAYAMA et al., 1970), so daß bisher nur wenig genetische Arbeiten über *C. ammoniagenes* (HAGIHARA et al., 1995) zu finden sind. Bei den Methoden für den Gentransfer profitiert *C. ammoniagenes* nur zum Teil von den für die Nachbarspezies entwickelten Systemen. So kann der Vorläufer des *E. coli/C. glutamicum* „shuttle“-Vektors pECM2 (JÄGER et al., 1992) durch konjugative Übertragung auch in *C. ammoniagenes* eingebracht worden. Allerdings mit einer mehr als 100fach schlechteren Effizienz (SCHÄFER et al., 1990). Gleiches gilt für die Elektroporation (C.-H. LUO, persönliche Mitteilung). Aber wichtig ist, daß die Anwendung dieser Methoden auf *C. ammoniagenes* möglich war. Bei der Anwendung der Vektoren sollte darauf geachtet werden, daß sie ihren Ursprung in der pHM1519- oder pBL1-Familie haben, da diese Plasmide ein breites Wirtsspektrum im *Corynebacterium glutamicum-Brevibacterium ammoniagenes* Taxon abdecken (WOHLLEBEN et al., 1993). Im Hinblick auf die bisher nicht glungene Klonierung der Mn-RRase-Gene standen gut charakterisierte Mutanten von *C. ammoniagenes* zur Verfügung, die bei 37°C nicht mehr zur Zellteilung befähigt sind. Der Defekt dieser Mutanten liegt in der katalytischen Untereinheit der Mn-RRase mit der Folge, daß anders als beim Wildtyp bei 37°C keine Ribonucleotide mehr reduziert werden können (LUO, 1994; LUO et al. 1997). Im Zusammenhang mit den bestehenden Gentransfermöglichkeiten wurde durch das Vorhandensein der thermosensitiven Mutanten das Tor zur Schrotschuß-Klonierung der Gene der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* aufgestoßen.

Um bei der Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit und deren Diskussion eine deutliche Unterscheidung der gerade besprochenen Klasse I und IV RRasen und ihrer Untereinheiten zu ermöglichen, soll folgende Nomenklatur verwendet werden. So sind in der Literatur die Bezeichnungen R1 für die katalytische und R2 für die metallhaltige Untereinheit der Fe-RRase üblich (REICHARD, 1993; SJÖBERG, 1994). Dagegen sollen die Untereinheiten der RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* mit den Kürzeln ihrer Gattungs- und Speziesnamen als CA1 bzw. CG1 und CA2 bzw. CG2 abgesetzt werden.

**Problemstellung:**

Die Mn-Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* stellt auf Grund ihrer Eigenschaft, Mangan als essentielles Metall für die Ribonucleotid-Reduktion zu verwenden, einen neuen Typ dieser streng allosterisch regulierten Enzyme dar (AULING, 1980; WILLING et al., 1988a). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war ein einkerniges Manganzentrum für das *C. ammoniagenes* Enzym postuliert (BLASCZYK, 1994), womit

sich eine andere Lösung der Metallkatalyse andeutete als sie mit dem zweikernigen Eisenzentrum in den Klasse I RRasen verwirklicht ist. Da ausreichende Mengen der metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase (CA2) nicht vorhanden waren, standen interdisziplinäre Untersuchungen zur Quantifizierung des Metalls und der detaillierten Charakterisierung des von GRIEPENBURG et al. (1996) nachgewiesenen Radikals noch aus. Zur Aufklärung dieser unzureichend untersuchten Punkte muß mehr gereinigte Mn-RRase bereit gestellt werden, was allerdings nur durch die gezielte Überproduktion der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* erreicht werden kann. Voraussetzung dafür sind Klonierung und Sequenzierung zumindest des Gens der kleinen metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase als vorbereitender Schritt zu ihrer Überexpression.

Es boten sich drei mögliche Ansätze für die Klonierung der Gene der Mn-RRase von *C. ammoniagenes*.

In der rein genetischen Vorgehensweise sollte ausgehend von den thermosensitiven Mutanten (LUO et al., 1997) versucht werden, über die genetische Komplementation dieser Mutanten nach Gentransfer die Gene der Mn-RRase zu identifizieren. Zuvor mußte jedoch noch die Anwendbarkeit der für *C. glutamicum* ausgearbeiteten genetischen Methoden auf die Mutanten des genetisch wenig untersuchten Industriestammes *C. ammoniagenes* ATCC 6872 überprüft werden.

Die Reinigung des CA2-Proteins bildete die Grundlage für eine biochemische orientierte Klonierungsstrategie, um über die Bestimmung des N-Terminus oder interner Peptide Aminosäuresequenzen zu erhalten, aus denen Primer für eine PCR-Klonierung abgeleitet werden können.

Ein alternativer Ansatz eröffnete sich im Verlauf der Arbeit durch die Veröffentlichung der Sequenz der katalytischen Untereinheit der RRase von *Mycobacterium tuberculosis* (YANG et al., 1994). Mit dieser Sequenzinformation dieses Gram-positiven Bakteriums mit hohem GC-Gehalt wurde ein Vergleich der Primärstruktur mit bereits bekannten Klasse I RRasen möglich. Dem Argument des monophyletischen Ursprungs der katalytischen Proteine folgend sollten die konservativen Strukturen im aktiven Zentrum aller RRasen bei der Entwicklung von degenerierten Primern besonders berücksichtigt werden.

Dieser Ansatz sollte wegen der Verwandtschaft von *M. tuberculosis*, *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt, deren DNA-Synthese Mangan-abhängig ist, auch auf die genetisch besser untersuchte und handhabbare Spezies *C. glutamicum* angewendet werden. Es bot sich damit die Möglichkeit, Zugriff auf eine zweite Mn-RRase zu erhalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Enzyme und Isotope

Alle handelsüblichen Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen und Detergenzien sowie Kohlenhydrate, Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika hatten, soweit nicht anders angegeben, die Reinheitsstufe „p.a.“, „reinst“ oder „für biochemische Zwecke“ und wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), ICN (Amsterdam, Niederlande), Lumac B.V. (Groningen Niederlande), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Zinsser Analytik (Frankfurt/Main) bezogen.

DNA-modifizierende Enzyme und Feinchemikalien für molekularbiologische Methoden stammen von den Firmen Amersham Buchler (Braunschweig), Appligene/Oncor (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Life Technologies Gibco BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Pharmacia LKB (Freiburg) und Qiagen (Hilden).

Die verwendeten radioaktiven Substrate [5-<sup>3</sup>H]-CDP und [8-<sup>3</sup>H]-GDP für den Ribonucleotid-Reduktasetest wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

### 2.2 Bakterienstämme und Plasmide

**Tabelle 2.1** Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

Stamm	relevanter Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<b><i>Corynebacterium ammoniagenes</i>:</b>		
ATCC 6872		Stammsammlung
CH 31	thermosensitive Ribonucleotid-Reduktion	LUO 1994
CH 32	thermosensitive Ribonucleotid-Reduktion	LUO 1994
CH 33	thermosensitive Ribonucleotid-Reduktion	LUO 1994
<b><i>Corynebacterium glutamicum</i>:</b>		
ATCC13032		ABE et al. 1967
R163	Restriktionsdefekt	LIEBL & SCHEIN, 1990
<b><i>Escherichia coli</i> K-12:</b>		
S17-1	RP4-Derivat im Chromosom integriert	SIMON et al., 1983
DH5 $\alpha$	<i>hsdR17</i>	GRANT et al., 1990
JM109	e14( <i>mcrA</i> ), <i>hsdR17</i>	RALEIGH et al., 1988
XL1 BLue	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$	JERPSETH et al., 1993
Plasmide:		
pUC57	Ap <sup>r</sup>	MBI Fermentas
pUC18/19	Ap <sup>r</sup>	YANISCH-PERRON et al., 1985

Plasmid	relevanter Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
pECM2	Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> <i>oriC oriV</i>	JÄGER et al., 1992
pCV22	Km <sup>r</sup> <i>oriV</i>	SEEP-FELDHAUS et al., 1991
pWCG2	1,2 kb <i>EcoRI</i> -Fragment von Cosmid 810	diese Arbeit
pWCG21	pWCG2 mit Δ(0,39 kb <i>BamHI-BglIII</i> -Fragment)	diese Arbeit
pWCG3	4,3 kb <i>XbaI-BamHI</i> -Fragment von Cosmid 810	diese Arbeit
pWCG31	pWCG3 Δ <i>EcoRI</i> (ca. 3,5 kb)	diese Arbeit
pWCG32	pUC18 mit 1,8 kb <i>EcoRI</i> -Fragment	diese Arbeit
pWCG33	pUC18 mit 1,1 kb <i>HindIII</i> -Fragment	diese Arbeit
pWCG34	pWCG3 Δ(2kb <i>PstI</i> -Fragment) .	diese Arbeit
pWCG35	pUC18 mit 0,9 kb <i>PstI</i> -Fragment	diese Arbeit
pWCG36	pUC18 mit 1,1 kb <i>PstI</i> -Fragment	diese Arbeit
pWCG4	pUC18 mit 6,2 kb <i>SalI</i> -Fragment von Cosmid 810	diese Arbeit
pWCG51	pUC18 mit 1kb <i>nrdF'</i> Fragment von Cosmid 810 und 1 kb Fragment vom SuperCos1	diese Arbeit
pWCG52	pUC18 mit 1,4 kb <i>nrdF'</i> Fragment von Cosmid 810	diese Arbeit
pWCG6	pECM2 mit 4,3 kb Fragment aus pWCG3	diese Arbeit
pWCA1	pUC57 mit 938 bp PCR-Fragment aus <i>C. ammoniagenes</i>	diese Arbeit
pWCA2	pUC18 mit ca. 4,3 kb Fragment mit <i>nrdE'</i> und <i>nrdF</i> von <i>C. ammoniagenes</i>	diese Arbeit
pWCA5	pECM2 mit ca. 4,3 kb Fragment mit <i>nrdE'</i> und <i>nrdF</i> von <i>C. ammoniagenes</i>	diese Arbeit

### 2.3.Häufig verwendete Puffer und Lösungen

**Tabelle 2.2** Aufzählung der häufig verwendeten Puffer und Lösungen

Abkürzung	Komponenten	Zusammensetzung oder Endkonzentration
TAE, 50fach	Tris-Base Eisessig EDTA, 0,5 M, pH 8,0 H <sub>2</sub> O	242 g 57.1 mL 100 mL ad 1 L
TE 10.01	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0	10 mM 0,1 mM
TBS (Tris buffered saline)	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl	100 mM 150 mM
SSC, 20fach	NaCl tri-NaCitrat dihydrat pH 7,5	3 M 0,3 M

## Material und Methoden

Abkürzung	Komponenten	Zusammensetzung oder Endkonzentration
GLB, 5fach	Glycerin	50%
	TAE	0.5fach
	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylencyanolblau	0,25 %
I-Puffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,00 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,20 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,12 g
CIA	Chloroform : Isoamylalkohol	24 : 1
Standardpuffer pH 6,6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M Stammlösungen wurden durch mischen auf pH6,6 eingestellt und dann mit H <sub>2</sub> O auf 85 mM eingestellt
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	DTT	
Phenol/CIA	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol	25 : 24 : 1

### 2.4. Wachstumsmedien

Für die Herstellung von Agarplatten wurde den im folgenden beschriebenen Flüssigmedien 1,5 % (w/v) Agar (Oxoid) zugegeben. Für die Herstellung von Schrägröhrchen wurden 2,0 % (w/v) Agar eingesetzt.

#### 2.4.1. Seed-Medium (THALER & DIEKMANN, 1979)

D-Glucose-Monohydrat	20,0 g
Pepton aus Casein	10,0 g
Yeast-Extract (Difco)	10,0 g
NaCl	2,5 g

Der pH-Wert wird mit 3 N NaOH auf 7,4 eingestellt und dann mit entionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren sollte das Medium eine goldgelbe Farbe besitzen.

#### 2.4.2. Luria Bertani (LB) (MILLER 1972)

Bacto-Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

pH 7,4 mit 2 M NaOH einstellen.

**2.4.3. LBG-Medium**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

**2.4.4. Elektroporationsmedium für Corynebakterien (HAYNES & BRITZ, 1989)**

Trypton	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	5 g	
Glucose-Monohydrat	2 g	
Glycin	2,5 % (w/v)	(steril filtrieren)
Tween 80	0,1 % (w/v)	(getrennt autoklavieren)
Isonicotinsäurehydrazid	1,5 mg/mL	(getrennt autoklavieren)

**2.4.5. SOC-Regenerationsmedium (DOWER et al., 1988)**

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10 mM
Glucose	20 mM

**2.4.6. Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium mit Sorbitol**

Brain-Heart-Infusion (Difco)	37 g
Sorbitol	93 g

Beide Substanzen wurden getrennt in je 0,5 L H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend getrennt autoklaviert. Danach wurden die Lösungen 1 : 1 gemischt und 10 mL 1M MgSO<sub>4</sub> pro Liter Medium hinzugefügt.

**2.4.7. NBH-Medium**

Nutrient broth (Difco)	8 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	3 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

Mit 3 N NaOH wird vor dem Autoklavieren der pH Wert auf 7,4 eingestellt.

### 2.4.8. Mineralsalzmedium (modifiziert nach LIEBL et al., 1989)

#### Lösung A:

Harnstoff	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
Tri-Natrium-Citrat x $2\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6 g
$\text{NaCl}$	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 g
$\text{H}_2\text{O}$	941,5 mL

#### Lösung B:

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Stammlsg. 8%)	5 mL
---	------

#### Lösung C:

$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Stammlsg. 100mM)	0,5 mL
--	--------

#### Lösung D:

D-Glucose (Stammlsg. 20%)	50 mL
---------------------------	-------

#### Lösung E:

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Stammlsg. 1mM)	50 $\mu\text{L}$
--	------------------

#### Lösung F:

Spurenelemente:	2 mL
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	88 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	270 mg
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	870 mg
$\text{CoCl}_2$	35 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5 mg

#### Lösung G:

Vitamin Stammlösung:	1 mL
Biotin	1 mg
Thiamin-HCl	10 mg
$\text{H}_2\text{O}$	10 mL

### Lösung H:

MnCl<sub>2</sub> (Stammlsg. 100 mM)                      20 µL (bei Bedarf)

Lösungen A, B, D, E, H werden getrennt .

Lösungen C, F, G werden sterilfiltriert.

Alle Lösungen werden vor Gebrauch steril vereinigt.

## 2.5. Antibiotikazusatz

Wenn nicht gesondert angegeben wurden Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen den entsprechenden Medien beigefügt: Ampicillin (Ap) 100 mg/L, Chloramphenicol (Cm) 25 mg/L, Tetracyclin (Tc) 10 mg /L in 50 % Ethanol gelöst; Kanamycin (Kn) 25 mg/L, Nalidixinsäure (Nal) 50 mg/L, Novobiocin (Nb) 25 mg/L und Trimetoprim (Tp) 15mg/L in H<sub>2</sub>O. Die Antibiotika-Lösungen wurden steril filtriert.

## 2.6. Messung von pH-Wert und optischer Dichte

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde ein Gerät der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten (Weilheim) vom Typ pH522 mit der dazugehörenden Elektrode Typ E50 benutzt, welches vor Gebrauch jeweils auf den verwendeten pH-Bereich geeicht wurde.

Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wurde in einem Eppendorf Photometer 1101 M (Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) bei 578 nm unter Verwendung einer Rechteckblende 1770 gegen einen Leerwert gemessen.

## 2.7. Anzuchtverfahren

### 2.7.1. Anzucht von Vorkulturen

Vorkulturen der coryneformen Bakterien wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben in 10 mL Seed-Medium bei 30°C im Schüttelwasserbad bei 120 U/min über Nacht inkubiert.

Zellen von *E. coli* wurden für Transformationen in 5 mL Medium in Reagenzgläsern über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Abweichungen sind im Text gesondert beschrieben.

### 2.7.3. Anzucht von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* im 10 L-Fermenter

Für die Produktion von Biomasse zur Gewinnung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* wurden Zellen von einer ÜNK in mehrere 500 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Seed-Medium mit einer OD<sub>578</sub> von 0,5 angeimpft und

unter Schütteln mit 150 U/min bei 30°C 10-12 h inkubiert, so daß sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befanden. Dann erfolgte das Überimpfen in einen Fermenter des Typs MF-14 (Kompaktsystem von New Brunswick Scientific Co., Inc., New Brunswick, N.J., USA) in 10 L Seed-Medium mit einer OD<sub>578</sub> von ebenfalls 0.5. Bei 30°C, 250 U/min und einem Luftdurchsatz von 4 L/min wurden *C. ammoniagenes*-Zellen bis zu einer OD<sub>578</sub> von ca. 15 und *C. glutamicum*-Zellen von ca. 10 angezogen, da hier die höchste Aktivität in der Ribonucleotid-Reduktion vorhanden war.

## **2.8. Zellernte**

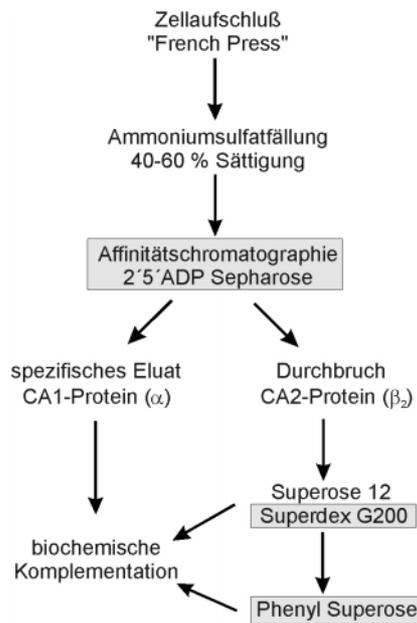
Die Zellernte erfolgte, indem der Fermenterinhalt auf mit flüssigem Stickstoff gekühltes Eisgranulat unter ständigem Rühren gegeben wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Cryofuge 6-6 (Hareus Christ GmbH, Osterode) bei 3500 U/min und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde dann in 85 mM KP-Puffer (pH, 6,6) resuspendiert und zum Waschen in einer Kühlzentrifuge des Typs Sorvall RC-5C (Du Pont de Nemours GmbH, Deutschland) bei 18000 U/min erneut sedimentiert. Zur Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

## **2.9. Zellaufschluß**

Alle Arbeiten mit der sehr temperaturempfindlichen Mn-RRase wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt. Als Standardpuffer diente 85 mM KP-Puffer (pH 6,6) mit 2 mM DTT.

Der Zellaufschluß wurde mit frischen oder eingefrorenen Zellen durchgeführt, die in 1,5 mL Standardpuffer mit zusätzlich 0,1 M HEPES pro 1 g Zellen suspendiert waren. So vorbereitet und im NaCl-Eiswasserbad auf 2°C gekühlt wurde das Material mit einem Ultraschall-Desintegrator, Branson Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA), bis zu fünf mal für je 20 Sekunden bei 80 Watt maximaler Leistung mit einer Makro-Titanspitze vorbehandelt. Diese homogenisierte Zellsuspension wurde anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten French Press (French Pressure Cell Press mit 20KManuel-Fill Cell, SLM Instruments Inc., Urbana IL, USA) bei einem Kammerinnendruck von 1500-1800 psi aufgebrochen. Drei Passagen waren nötig, um Zellen vom Wildtyp *C. ammoniagenes* aufzuschließen. Bei der gesamten Prozedur ist darauf zu achten, daß die Temperatur der Zellsuspension nicht über 10°C steigt und dementsprechend im Eiswasserbad immer wieder gekühlt wird. Der Erfolg des Aufschlusses wurde mittels Proteinbestimmung (Kap. 2.11.) kontrolliert. Anschließend folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 40.000 x g und 4°C, so daß der zellfreie Überstand als Rohextrakt für die weitere Proteinreinigung verwendet werden konnte.

## 2.10. Proteinreinigung



Da die Mn-Ribonucleotid-Reduktase ein sehr empfindliches Protein mit einer Halbwertszeit von 1,5 Stunden bei RT ist, wurden sämtliche Reinigungsschritte bei 4°C im Kühlraum oder im Eisbad durchgeführt. Zur Aufbewahrung wurden die Proteinlösungen immer in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

**Abbildung 2.1** Generelles Schema für die Reinigung der Mn-Ribonucleotid-Reduktase von *C. ammoniagenes*

### 2.10.1 Fällungen

#### 2.10.1.1. Streptomycinsulfatfällung

Durch seine Fähigkeit zur Bindung an negativ geladene Substanzen eignet sich Streptomycin besonders für die Entfernung von Nucleinsäuren zu Beginn einer Proteinreinigung. Hierzu wurde dem zellfreien Rohextrakt eine Streptomycinsulfat-Stammlösung (20 % in 85 mM Standardpuffer) innerhalb von 30 Minuten unter Rühren bis zu einer Endkonzentration von 2 % tropfenweise zugegeben und anschließend weitere 30 Minuten nachgerührt. Das ausgefallene Material wurde dann 30 Minuten bei 40.000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde für die weitere Reinigung verwendet.

#### 2.10.1.2. Ammoniumsulfatfällung

Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung in den Bereichen 0-40 % und 40-60% Sättigung durchgeführt (COOPER, 1981). Dabei erfolgte die Salzzugabe über einen Zeitraum von 30 Minuten, worauf sich eine ebenso lange Nachrührphase anschloß. Nach jedem Fällungsschritt wurde die Proteinlösung 30 Minuten bei 40.000 x g und 4°C zentrifugiert. Da sich die Ribonucleotid-Reduktase in der 40-60 % Fraktion befand, wurde das Pellet dieser Fällung je nach Masse der aufgeschlossenen Zellen in 2-4 mL Standardpuffer gelöst und zweimal eine Stunde gegen 85 mM Standardpuffer bei 4°C dialysiert.

**2.10.2. Chromatographische Methoden**

Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden mit einem FPLC-System von Pharmacia LKB (Pharmacia Biotech, Freiburg) bestehend aus dem Steuergerät (Gradient Programmer GP-250 Plus), zwei Pumpen (High Precision P-500), einem Aufgabeventil (V7), einer UV-Zelle (Uvicord® SII), einem Leitfähigkeitsdetektor, einem Fraktions-sammler (FRAC-100) und einem REC-481-Schreiber (Kipp-Zonen) durchgeführt.

**2.10.2.1. Affinitätschromatographie mit 2', 5'-ADP-Sepharose 4B**

Durch die stereochemisch kontrollierte Reaktion zwischen den immobilisierten Liganden der Säulenmatrix (N<sup>6</sup>-(6-aminohexyl)adenosin-2', 5'-bisphosphat als gruppenspezifischer Ligand, NADP<sup>+</sup>-Analogon) und der Nucleotidbindungsstelle des CA1-Proteins kommt es zur Bindungsknüpfung. Aufgrund der leichten Dissoziierbarkeit des Mn-RRase-Holoenzym lässt sich das CA2-Protein im Pufferstrom vom CA1-Protein trennen. Durch Reaktion mit dem allosterischen Effektor d-ATP, dessen Affinität zum gruppenspezifischen Liganden sehr hoch ist, kommt es durch eine einfache Konkurrenzreaktion zum spezifischen Ablösen des CA1-Proteins von der Säulenmatrix.

Bereitstellung des Säulensystems für die Affinitätschromatographie

5g 2', 5'-ADP-Sepharose 4B wurden in 80 mL 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 aufgenommen und in einem 100 mL-Rundkolben, der an einen Rotationsverdampfer gekoppelt war über Nacht bei geringer Drehgeschwindigkeit (10 U·min<sup>-1</sup>) bei 4 °C bewegt. Diese Prozedur diente der besseren Quellung des Affinitätsmaterials. Im Anschluß daran wurde die gequollene Gelsuspension mit einem Glassaugtiegel (Porengröße-Nr.: 3) filtriert und mit 1,5 L eiskaltem 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 gewaschen und in eine 16/10 HR-Leersäule (Pharmacia) mit beweglichem Stempel überführt.

Das so behandelte 2', 5'-ADP-Sepharose 4B-Gel lieferte etwa 20 mL gebrauchsfähiges Affinitätsmaterial.

Im Anschluß daran wurde die Säule mit 20 mM Standardpuffer bei 4 °C und einer Flußrate von 10 mL · h<sup>-1</sup> equilibriert.

Trennung des CA1-/CA2-Proteins an 2', 5'-ADP-Sepharose 4B

Aufgetragen wurde dialysierter Enzymextrakt aus *C. ammoniagenes* ATCC 6872 nach Streptomycin- und Ammoniumsulfatfällung (40 - 60 % Sättigung) gelöst in 20 mM Standardpuffer mit einer Gesamtmenge Protein von 200 mg. Über den Gradientenprogrammer GP-250 Plus wurde eine Flußrate von 0,17 mL · min<sup>-1</sup> eingestellt. Sobald die Säule mit dem gesamten Protein beladen war, erfolgte ein Elutionsstopp für 30 min. Anschließend wurde das CA2-Protein enthaltene unspezifische Eluat solange mit Standardpuffer von der Säule gewaschen bis kein Protein mehr detektiert werden konnte. Jetzt wurde mit einem Säulenvolumen 20 mM KP-Puffer mit 0,05 M NaCl die Säule

gewaschen und mit Standardpuffer ebenfalls solange nachgespült bis kein Protein mehr angezeigt wurde. Dies diente der Entfernung unspezifisch gebundener Proteine. Für die spezifische Elution des CA1-Proteins wurde 20 mM KP-Puffer mit 1 mM dATP verwendet, dabei erfolgte nach einem Säulenvolumen ein 30 minütiger Elutionsstopp, bevor das gebundene Protein gänzlich von der Säule gewaschen wurde.

Sowohl der Durchbruch (CA2-Protein) als auch das spezifische dATP-Eluat (CA1-Protein) wurden separat gesammelt und anschließend getrennt aufgearbeitet.

### Regeneration der 2', 5'-ADP-Sepharose 4B

Zur Regeneration der Affinitätssäule wurden jeweils mindestens 10 Säulenvolumen der Lösungen A (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl; pH 8,5) und B (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl; pH 4,5) mit einer Flußrate von maximal 0,2 mL/min über das Affinitätsmaterial geschickt und schließlich wurde die Säule nach Equilibrierung mit 20 % Ethanol gelagert.

### 2.10.2.2. Gelfiltration mit Superdex G 200

Das konzentrierte unspezifische Eluat der Affinitätschromatographie oder dialysiertes Proteinmaterial nach Ammoniumsulfatfällung mit höchstens 200 mg Gesamtprotein wurden bei der Gelfiltration mit einer Superdex G 200-Säule (Pharmacia) entsprechend des Molekulargewichts getrennt. Dies erfolgte bei einer Flußrate von 0,8 mL mit 85 mM Standardpuffer, dabei war die Fraktionsgröße 2 oder 4 mL.

### 2.10.2.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde die verwendete Proteinlösung direkt vor der Probenaufgabe mit 3 M Ammoniumsulfat in 85 mM Standardpuffer auf 1,5 M Ammoniumsulfat eingestellt. Mit so vorbereitetem Material wurde die Chromatographiesäule beladen. Im Verlauf der Proteintrennung wurde die Ammoniumsulfatkonzentration des Laufpuffers (85 mM Standardpuffer) von anfangs 1,5 M auf 0 M abgesenkt. Die unter Einfluß der hohen Salzkonzentration an die Säulenmatrix gebundenen Proteine wurden so nach erfolgter Rehydratisierung von der Säule gewaschen.

Bei der Verwendung einer analytischen Phenylsuperose Säule (Pharmacia) wurden maximal 5 mg Protein bei einer Flußrate von 0,25 mL/min in 1 mL Fraktionen aufgefangen. Die Ammoniumsulfatkonzentration wurde dabei während 12 mL kontinuierlich auf null abgesenkt.

Bei der Verwendung einer preparative Phenylsepharose Säule (Pharmacia) konnten 100 mg Protein aufgetragen werden. Bei einer Flußrate von 1,5 mL/min wurden 10 mL Fraktionen gesammelt. Die Breite des Gradienten betrug 360 mL.

## **2.11. Proteinbestimmungsmethoden**

Für alle Proteinbestimmungen wurde für den entsprechenden Meßbereich eine Eichkurve unter Verwendung einer BSA-Standardreihe ermittelt, mit der dann die gemessenen Proteinwerte verglichen wurden.

### **2.11.1. Proteinbestimmung ganzer Zellen nach der Methode von Biuret (HERBERT et al., 1971)**

Für diese Art der Proteinbestimmung ganzer Zellen wurden 10 - 50 mL einer Zellsuspension in einer Labofuge (Hareus Christ GmbH, Osterode) 10 min auf Stufe 5 abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen, die  $OD_{578}$  der Suspension auf 2-3 eingestellt und von dieser wurden 2 mL nach Zusatz von 1 mL 3 M NaOH 15 min gekocht. Nach rascher Abkühlung im Eisbad und Zusatz von 1 mL Biuret-Reagenz (Merck) wurde gut gemischt und 15 min bei RT stehen gelassen. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min. Die Absorption des Überstandes wurde bei 546 nm in einem Spektralphotometer Ultrospec III (Pharmacia LKB, Freiburg) gegen einen Blindwert gemessen.

Mit dieser Methode konnten Proben mit einer Proteinkonzentration von 0,25 - 2 mg/mL bestimmt werden.

### **2.11.2. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte nach BRADFORD (1976)**

Zur Bestimmung löslicher Proteine nach BRADFORD mußte folgendes Reagenz hergestellt werden:

- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) in 50 mL Ethanol absolut lösen
- 100 mL 85 % Phosphorsäure zugeben
- auf ein Endvolumen von 1 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- Lösung einen Tag stehen lassen und dann filtrieren

Für die eigentliche Bestimmung wurden 0,1 mL Proteinlösung mit 5 mL Bradfordreagenz gemischt, 2 min bei RT inkubiert und dann die Extinktion bei 546 nm bestimmt.

Die verwendeten Proben sollten eine Proteinkonzentration im Bereich von 0,1 - 1,0 mg/mL haben.

### **2.11.3. Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951)**

Für die Bestimmung nach LOWRY et al. wurden drei Stammlösungen benötigt.

Lösung I: 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 100 mL 0,5 M NaOH

Lösung II: 0,5 g CuSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O in 100 mL 1 % (w/v) Na<sub>3</sub> Citrat x 2H<sub>2</sub>O

Folin-Reagenz (Merck)

10 Teile Lösung I wurden mit 1 Teil Lösung II gemischt und davon 0,2 mL zu einem gleichen Volumen der Proteinprobe gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 0,6 mL eines Gemisches aus 1 Teil Folin-Reagenz und 10 Teilen H<sub>2</sub>O zugefügt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 540 nm in einem Pharmacia -Photometer bestimmt.

Die zu bestimmenden Proben sollten eine Konzentration zwischen 50 - 300 µg Protein pro mL haben.

### 2.12. Dialyse und Proteinkonzentrierung

Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche (Visking 20/32, Ø 16 mm) der Firma Serva (Heidelberg) verwendet. In diesen wurden die Proteinlösungen in der Regel 2 x eine Stunde gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

Nach der Affinitätschromatographie wurde das große Volumen des spezifischen Eluates in einer AMICON®-Zelle Model 12 (Amicon GmbH, Witten/Ruhr) unter Verwendung der entsprechenden Ultrafiltrationsmembranen (PM10) ebenfalls von Amicon auf etwa 2 mL reduziert. Dabei wurde mit drei Volumen Standardpuffer „gewaschen“, um den Chromatographiepuffer zu entfernen.

Alle weiteren Konzentrierungsschritte wurden mit einer Vacuumzentrifuge „GeneVac“ GVP 100 von Biometra (Göttingen) durchgeführt. Dafür wurden die Deckel der Eppendorfgefäße mit einem Loch versehen.

### 2.13. Mutagenese mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

Eine Mutagenese mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin führt wie alle chemischen Mutageneseverfahren zu ungerichteten Veränderungen der DNA. Dabei wird bevorzugt G:C zu A:T vertauscht.

Die MNNG-Mutagenese (MILLER 1992) wurde mit exponentiell wachsenden Zellen durchgeführt, die in 100 mL NBH-Medium angezogen wurden. Nach zweimaligem Waschen in I-Puffer wurden 19 mL einer Suspension mit  $2,1 \times 10^8$  Zellen/ mL I-Puffer hergestellt. Zu dieser wurde 1 mL MNNG-Lösung (1 mg/mL I-Puffer, mit einem Tropfen DMSO) gegeben, so daß eine Endkonzentration von 50 µg MNNG/mL vorlag. Die Zellen wurden 25 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, anschließend zweimal mit I-Puffer gewaschen und nach dem Resuspendieren in 100 mL NBH-Medium bei 30°C unter Schütteln über Nacht inkubiert.

Vor und nach der Mutagenese wurde jeweils die Lebendkeimzahl bestimmt.

Alle Gerätschaften, die mit MNNG in Kontakt gekommen waren, wurden zur Neutralisierung des Mutagens mit 1 M NaOH gespült.

### 2.14. Permeabilisierung von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* nach LUO (1994)

Um die Aktivität der Ribonucleotid-Reduktase in Mutanten oder transformierten Zellen möglichst schnell bestimmen zu können wurden diese mit Ether oder Toluol für Nucleotide permeabilisiert, so daß der Standard- Ribonucleotid-Reduktase-Test (Kapitel 2.18.2.1.) *in situ* durchgeführt werden konnte.

Für die Permeabilisierung wurde die zu untersuchende Zellsuspension in Teflon FEP Röhrchen (Nagle Company, N.Y., USA) sedimentiert und mit 85 mM KP-Puffer mit 0,6 M Sorbitol (pH 7,2 für in Seed-Medium gewachsene Zellen; pH 6,6 für in Mineral-Medium gewachsene Zellen) gewaschen und anschließend in soviel von dem genannten Permeabilisierungs-Puffer resuspendiert, daß die Suspension eine OD<sub>578</sub> von 50 erhielt. Die so vorbereiteten Zellen wurden dann entweder mit dem gleichen Volumen Ether für 1 min oder in Gegenwart von 1 % Toluol für 10 min unter ständigem, leichtem Schütteln permeabilisiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde das Lösungsmittel abpipettiert und ein Volumen Permeabilisierungs-Puffer zugegeben und sofort zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen konnten die Zellen sofort im Test eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -70°C gelagert werden.

### 2.15. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 2.15.1. Standardproteintrennung im SDS-Polyacrylamidgel (LAEMMLI, 1970)

Für die Gelelektrophorese wurde entweder ein Minigel-System (Firma Biometra GmbH, Göttingen) mit einer Gelgröße von 80 x 80 x 1 mm (B x H x T) oder für sehr proteinreiche zur besseren Trennung ein System mit Gelen einer Größe von 180 x 180 x 1,5 mm (Renner GmbH, Dannstadt).

Für ein Trenngel mit 16 % Acrylamidgehalt und ein 5 %iges Sammelgel wurden folgende Stammlösungen zusammengegeben (für das Renner Gelsystem wurde die 2,5fache Menge benötigt):

Trenngel:	30 % Acrylamid	8,0	mL
	1 % Bisacrylamid	1,1	mL
	1 M Tris-HCl, pH 8,5 gegen	5,8	mL
	20 % SDS	75	µL
	10 % Ammoniumpersulfat	75 µL	

Nach 5 minütiger Entgasung erfolgte die Zugabe von 0,013 mL TEMED und das sofortige Befüllen der vorher zusammengesetzten Gelkammer. Mittels Pasteurpipette wurde die Acrylamidlösung mit Isopropanol überschichtet.

## Material und Methoden

---

Sammelgel:	30 % Acrylamid	1,67 mL
	1 % Bisacrylamid	1,30 mL
	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8	5,00 mL
	20 % SDS	0,05 mL
	RO/VE-Wasser	1,95 mL
	10 % Ammoniumpersulfat	0,05 mL
	TEMED (nach Entgasung)	0,01 mL

Das Sammelgel wurde genauso hergestellt, wie für das Trenngel beschrieben.

Nachdem das Isopropanol aus der Gelkammer abgegossen, Reste mit Wasser ausgespült und dann mit einem saugfähigen Papier entfernt worden waren, wurde die entgaste Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Im Anschluß daran wurde der Probenkamm zwischen die beiden Glasplatten eingepaßt.

Der Elektrophoresepuffer wurde vor jedem Lauf frisch angesetzt und bestand aus folgenden Komponenten (für Renner-System 6fache Menge):

Laufpuffer:	Tris	3,03 g
	Glycin	1,88 g
	SDS	0,25 g
	RO/VE-Wasser	250,00 mL

Die Proben von 20  $\mu$ L Volumen sollten für das Mini-Gel-System eine Proteinkonzentration von 10 mg / mL nicht überschreiten. Für das große Gelsystem wurde durchaus die 10fache Proteinmenge eingesetzt. Zu den Proteinproben wurden jeweils 0,5 Volumen eines Probenaufnahmepuffers gegeben. Dieser Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

1 M	Tris-HCl, pH 6,8	3,20 mL
20 %	SDS	1,00 mL
	Glycerin	1,00 mL
	$\beta$ -Mercaptoethanol	0,02 mL
0,2 %	Bromphenolblau	0,05 mL

Die Proben wurden anschließend 5 Minuten gekocht und im Eisbad abgekühlt. Nach erfolgter Zentrifugation (5 Minuten) in der Eppendorfzentrifuge wurden jeweils 20  $\mu$ L der Proben (17  $\mu$ L Eichstandard) vorsichtig in die Geltaschen gegeben. Zum Größenvergleich wurde ein Proteinstandard der Firma Pharmacia verwendet.

Zu Beginn der elektrophoretischen Trennung mit dem Minigel wurde eine konstante Stromstärke von 10 mA pro Gel eingestellt; bei dem Maxigel von 20 mA. Nach Erreichen der Phasengrenze zum Trenngel wurde die Stromstärke verdoppelt. Der Gellauf wurde beendet, wenn die blaue Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.15.2. 2-dimensionale Gelelektrophorese

Bei der 2-dimensionalen Gelelektrophorese von Proteinen wurden die Proteine zuerst nach ihrer Ladung und anschließend nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Die isoelektrische Fokussierung bei der 2-D Elektrophorese wurde mit dem SE 220 Mighty Small Tube Gel Adaptor Kit (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) unter Beachtung der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für die zweite Dimension, Trennung der Proteine nach Größe im SDS-Polyacrylamidgel, wurde nach der Vorschrift in Kapitel 2.15.1 durchgeführt. Dafür wurde der Polyacrylamidstrang aus der Isoelektrischen Fokussierung blasenfrei über dem Gel zwischen den Glasplatten platziert und mit 1% Agarose eingegossen.

### 2.15.3. Proteinkonzentrierung im SDS-Polyacrylamidgel nach VANDEKERCKHOVE et al. (1993)

Mit dieser Methode war es möglich, so viele aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnittene „dünne“ Banden in einem „Spot“ zu sammeln, daß auf diese Weise eine Konzentrierung von Protein erreicht wurde, die anschließend einen „in gel“-Verdau für die Sequenzierung interner Peptide erlaubte.

Die Proteinkonzentration im SDS-Polyacrylamidgel wurde mit einem Gelsystem der Firma Renner GmbH (Dannstadt) durchgeführt. Dabei wurden selbstgemachte „Spacer“ (Stärke 2,5 mm) verwendet, deren Anordnung im Gel in Abbildung 2.1 wiedergegeben wird. Die Zubereitung der Acrylamidlösungen wurde wie in Kapitel 2.15.1. beschrieben durchgeführt, allerdings so, daß das Sammelgel 5 %ig und das Trenngel 10 %ig waren.

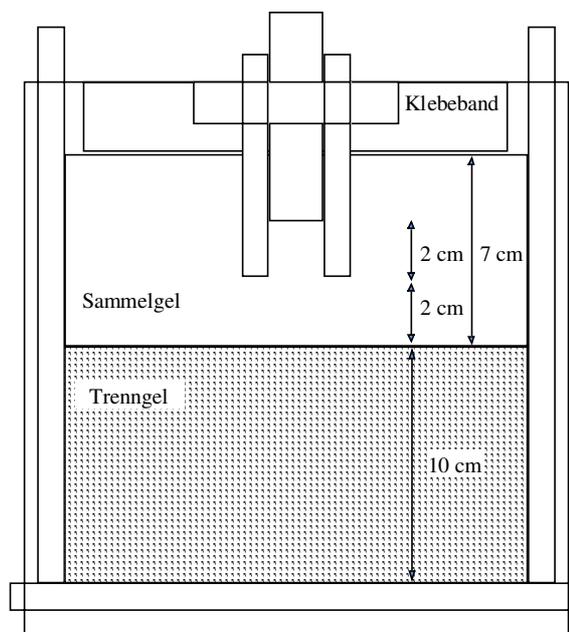


Abbildung 2.2 Skizze des Konzentrations-Gelsystems nach Vandekerckhove et al. (1993)

Vor dem Gellauf wurden die in Würfel (Kantenlänge maximal 2 mm) geschnittenen Gelstücke in einem Eppendorfgefäß 5 mal mit 1 mL Wasser gewaschen und dann 3 mal mit 1 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert. Schließlich wurden sie in Probenauftragspuffer (Kapitel 2.15.1.) equilibriert und in die Geltasche eingebracht.

Jetzt wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V die Elektrophorese gestartet. Nach 10 min wurde die Tasche mit den Gelstückchen mit einem Spacer geschlossen und die Spannung bis zum Schluß auf 350 V erhöht.

#### **2.15.4. Färben der Polyacrylamidgele**

##### **2.15.4.1. Silberfärbung (BLUM et al., 1987)**

Für die Durchführung der Silberfärbung wurden folgende Lösungen benötigt, wobei die Lösungen 4-7 immer frisch hergestellt wurden:

Lösung 1:	50 %	Methanol	
	12 %	Essigsäure	
	0,5 mL/L	Formaldehyd	37 %
Lösung 2:	50 %	Ethanol	
Lösung 3:	30 %	Ethanol	
Lösung 4:		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,20 g/L
Lösung 5:		AgNO <sub>3</sub>	2,00 g/L
	37 %	Formaldehyd	0,75 mL
Lösung 6:		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	60,00 g/L
	37 %	Formaldehyd	0,50 mL
		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	4,00 mg/L
Lösung 7:	10 %	Methanol	
	12 %	Essigsäure	

Nach dem Gellauf wurde das Polyacrylamidgel mindestens eine Stunde in Lösung 1 fixiert, dann 40 min in Lösung 2 und schließlich 20 min in Lösung 3 gewaschen. Hierauf erfolgte eine 1 minütige Inkubation in Lösung 4. Jetzt wurde das Gel 3 mal für 20 sec in Wasser geschwenkt. Zum Imprägnieren wurde 20 min in Lösung 5 geschüttelt. Nach erneutem Waschen 2 mal 20 sec in Wasser wurde dann in Lösung 6 solange entwickelt bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren, bevor mit Lösung 7 die Reaktion gestoppt wurde. Vor dem Trocknen der Gele wurde noch 2 mal 5 min mit Wasser gewaschen, um die Lösung 7 zu entfernen.

##### **2.15.4.2. Coomassie-Färbung**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Lösung aus 25 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0.1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) für eine Stunde fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit einem Gemisch aus 25 % Methanol und 10 % Essigsäure wieder entfärbt.

**2.15.4.3. Amido black-Färbung**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Lösung aus 30 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0.1 % Amido Black (Serva) für 10 min fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit einem Gemisch aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure wieder entfärbt. Diese Methode eignet sich gut für die Färbung von Membranen nach dem „Western blot“.

**2.16. „In-gel“-Verdau von Proteinen**

Für die Bestimmung der Aminosäuresequenzen von internen Peptiden wurden die entsprechenden Proteinbanden mit einem Skalpell aus dem mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in einem geeigneten Gefäß mehrfach mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Gelstücke möglichst klein geschnitten und in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß gesammelt. Zum Entfärben wurden die Acrylamidwürfel mehrfach mit jeweils 1 mL Acetonitril gemischt. Mit 0,5 mL 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) erfolgte anschließend die Rehydrierung für 5 min, bevor 0,5 mL Acetonitril zugefügt und für weitere 15 min inkubiert wurde. Es ist darauf zu achten, daß die Gelstücke nicht verkleben! Zuletzt wurde die gesamte Flüssigkeit entfernt und ein völliges Trocknen in der Vacuum-Zentrifuge erreicht.

**2.16.1. Verdau mit Endoproteinase LysC**

Die Endoproteinase LysC (WAKO) wurde in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  Inkubationspuffer (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,02 % Triton X100 (hydrogenated, pH 9) zu den getrockneten Gelstücken gegeben, so daß diese gerade bedeckt waren. Nach und nach mußte weitere LysC-Lösung zugefügt werden, da diese von den Gelpartikeln aufgesaugt wurde. Schließlich wurde ca. 12 h bei RT und dann weitere mindestens 12 h bei 30°C inkubiert.

Die Elution der Peptide erfolgte, indem die Gelstücke mit Ameisensäure, Wasser, Acetonitril und schließlich nochmals mit Wasser jeweils mehrfach gewaschen wurden. Dabei wurde die Flüssigkeit nach jedem Waschschrift gesammelt und am Ende in der Vacuum-Zentrifuge verdampft. Die zurückbleibenden Peptide konnten jetzt der Sequenzierung zugeführt werden.

**2.16.2. Verdau mit Bromcyan**

Bromcyan schneidet Proteine auf der C-terminalen Seite von Methioninresten und muß, da es kein Enzym ist, in großem Überschuß zu den vermuteten Methioninresten des zu verdauenden Proteins eingesetzt werden (1000 fach).

Nach der oben beschriebenen Vorbehandlung wurden die Gelstücke in ein fest verschließbares Pyrexröhrchen überführt und mit 1 mL Bromcyan-Lösung (10 mg/mL in

70 % Ameisensäure) bedeckt. Die folgende Inkubation erfolgte bei RT für 18-24 h im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 Volumen H<sub>2</sub>O bidest. gestoppt. Die Flüssigkeit wurde durch Lyophilisierung über Nacht entfernt. Die so vorbereiteten Gelstücke wurden in 2 mL Probenauftragspuffer aufgenommen und zur Elution der Peptide auf ein SDS-Polyacrylamidgel nach VANDEKERCKHOVE et al. (1993) aufgetragen.

### **2.17. Western-Blot**

Der Western-Blot wurde in einer Semi-dry Fast-Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel sofort nach dem Elektrophoreselauf in Transferpuffer (1,1 g CAPS in 450 ml H<sub>2</sub>O; pH 11 mit NaOH einstellen; dann mit 50 mL Methanol auf 500 mL auffüllen) 20 min leicht geschüttelt. Gleichzeitig wurde die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF Immobilon-P Membran wenige Sekunden in Methanol angefeuchtet, dann 2 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend noch einmal 10 min in Transferpuffer equilibriert. Gel und Membran wurden so zwischen ebenfalls zugeschnittenem Blottingpapier GB 004 (Schleicher & Schüll) plaziert, daß von Anode zu Kathode folgende Reihenfolge entstand: 3 Lagen Blottingpapier → PVDF-Membran → SDS-Gel → 3 Lagen Blottingpapier. Das Blottingpapier wurde zuvor ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Es ist darauf zu achten, daß zwischen Membran und Gel keine Luftblasen verbleiben. Der Blot erfolgte bei einer Stromstärke von 4,5 mA/cm<sup>2</sup> Membran für 2 h.

Die so auf eine Membran übertragenen Proteine wurden jetzt je nach Zielsetzung entweder mit Amido black gefärbt, die gewünschten Banden ausgeschnitten und der Aminosäuresequenzierung zugeführt oder im Antikörpertest verwendet.

Eine Immunfärbung der nachzuweisenden Proteine erfolgte nach folgenden Inkubationsschritten, die wenn nicht gesondert angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Nach jedem Schritt wurde dreimal mit 0,05 % Tween 20 in TBS (100 mM Tris pH 0 7,5 ; 150 mM NaCl) gewaschen:

- 2 h Blocken der Membran mit 2 % BSA-Lösung in TBS mit 0,02 % NaN<sub>3</sub>
- Inkubation mit Antiserum, 1 : 1000 verdünnt in PBS (136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; pH = 7,1) mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> über Nacht bei 4°C
- Ziege anti-Kaninchen IgG (1 : 200.000) für 45 min
- streptavidingekoppelte alkalische Phosphatase (1 . 500.000) für 45 min
- Substratpuffer:       + 33 µL Nitrosotetrazoliumchlorid Blau (5 % in 70 % Dimethylformamid)  
                          + 16,5 µL Bromo-chloro-indolyl-phosphat (5 % in 100 % Dimethylformamid)

+ ad 10 mL alkalische Phosphatase Puffer (100 mM NaCl;  
100 mM Tris pH = 9,5)

- nach ca. 30 min Stoppuffer (PBS mit 20 mM EDTA)

### 2.18. Biochemisch analytische Methoden

#### 2.18.1. Bestimmung der Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität

##### 2.18.1.1. Standardtest für die Detektion der Mn-RRaseaktivität

Die gesamte nachfolgende Aktivitätsbestimmung erfolgte aus Sicherheitsgründen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen "save lock". Der Standardradionuklidassay (LUO, 1994; BLASCZYK, 1994) zur Bestimmung der Mn-RRase-Aktivität teilgereinigter Proteinfraction fand im 85 mM Standardpuffer statt und setzte sich wie folgt zusammen (Endkonzentration):

Mit CDP als Substrat

DTT	6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
dATP	50 µM
CDP	50 µM
[5- <sup>3</sup> H]-CDP	0,25 µCi

Die spezifische Aktivität der [5-<sup>3</sup>H]-CDP-Lösung betrug 10 - 30 Ci/mmol.

Mit GDP als Substrat

DTT	6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
dTTP	0,5 mM
GDP	25 µM
[8- <sup>3</sup> H]-GDP	0,25 µCi

Die spezifische Aktivität der [8-<sup>3</sup>H]-GDP-Lösung betrug 10 - 15 Ci/mmol.

Die Stammlösung, die bei -20 °C aufbewahrt wird, setzt sich aus folgenden Komponenten volumetrisch zusammen:

Mit CDP als Substrat

120 mM DTT	5 µL
20 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µL
1 mM dATP	5 µL
[5- <sup>3</sup> H]-CDP	1,25 µL
1 mM CDP	5 µL

Mit GDP als Substrat

120 mM DTT	5 µL
20 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µL
10 mM dATP	5 µL
[8- <sup>3</sup> H]-GDP	1,25 µL
1 mM GDP	5 µL

Die [ $^3\text{H}$ ]-NDP-Lösung (1  $\text{H}_2\text{O}$  : 1  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  v/v) wurde vor dem Ansetzen der Stammlösung (Testmix) im Vakuum von Ethanol befreit. Bei sehr geringen Enzymkonzentrationen im Standardreduktase-Test, wie z. B. bei permeabilisierten Zellen oder unterhalb 100  $\mu\text{g}$  im zellfreien Rohextrakt oder regellosem Ammoniumsulfatpräzipitat wurde die Substratkonzentration auf 25  $\mu\text{M}$  bzw. auf 12,5  $\mu\text{M}$  erniedrigt, bzw ganz auf die Zugabe von "kaltem" [ $^3\text{H}$ ]-NDP verzichtet, um noch meßbare Umsätze zu erhalten. Die praktische Ausführung ist im nachfolgend aufgeführten Schema kurz dargestellt.

- Durchführung des Radionuclid- [ $^3\text{H}$ ]-Assays zur Prüfung der Mn-RRaseaktivität
1. Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  Testmix zu 80  $\mu\text{L}$  Enzymlösung (Zellsuspension) bei ca. 0  $^\circ\text{C}$  (auf Soleeis), anschließend mittels Whirltex oder Eppendorfmixer 5432 (Eppendorf) gut mischen.
  2. 20 minütige Inkubation bei 30 $^\circ\text{C}$  auf dem Eppendorf-Thermoblock 5320.
  3. Abbruch der Enzym-Reaktion durch 3 minütiges Kochen der Proben.
  4. Abkühlen der Assaylösung durch sofortigen Transfer in ein Soleeisbad.
  5. Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  Pronase (25  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$  Standardpuffer) bei 0  $^\circ\text{C}$  zur Deaktivierung der störenden N-Glycosidasen und anschließend gut mischen (Whirltex).
  6. N-Glycosidase-Deaktivierung durch 90 minütige Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$
  7. siehe 3.
  8. siehe 4.
  9. Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  1,5 mM Tris/HCl-Puffer pH 9,9 und 4  $\mu\text{L}$  alkalischer Phosphatase (entsprechend 25 U) zwecks Dephosphorylierung der 2'-Deoxyribonucleotide zu den 2'-Deoxyribonucleosiden (gut mischen).
  10. 90 minütige Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$ .
  11. siehe 3.
  12. siehe 4.
  13. 10 minütige Zentrifugation der Proben bei  $g > 12000$  in der Sigma Zentrifuge (zur Abtrennung der ausgefällten Proteine bzw. Zellen).
  14. Vorsichtige Entnahme von 65  $\mu\text{L}$  (für Knauer Autosampler, jedoch Injektion von nur 10  $\mu\text{L}$ ) aus dem Überstand zur Trennung von Edukt und Produkt mittels HPLC (Kap. 2.18.1.2.) und nachfolgender Fraktionierung (3,5 mL).
  15. Zugabe von Szintillationscocktail (Menge nach Angabe des Herstellers) je Fraktion (für die Gelbildung und Detektion der Radioaktivität).
  16. Detektion der Radioaktivität im LSC (Wallac 1410) im "easy count"-Programm.
  17. Auswertung des Standardradionuklidassays.

### 2.18.1.2. Biochemischen Komplementationstest

Beim biochemischen Komplementationstest wurden zunächst nur die CA1-Proteinlösung (ca. 36 µg Protein absolut) und die CA2-Proteinlösung rekombiniert (in 80 µL) und gut durchmischt. Je nach Reinigungsgrad wurden folgende Mengen CA2-Protein im 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 0 °C (Soleis) vorgelegt:

- nach Affinitätschromatographie mindestens 500 µg Protein absolut)
- nach Gelpermeationschromatographie (250 - 300 µg Protein absolut)
- nach hydrophober Interaktionschromatographie (20 - 25µg Protein absolut)

Erst im Anschluß an eine 5 minütige Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 20 µL Testmix (siehe oben). Die spezifische Aktivität wurde nur nach der Proteinkonzentration des interessierenden Proteins berechnet.

### 2.18.1.3. Trennung des Ribonucleosid- / 2'-Desoxyribonucleosid-Gemisches mittels HPLC

Die Trennung des Ribonucleosid- / 2'-Desoxyribonucleosid-Gemisches, die durch die Ribonucleotid - Reduktion im RRase-Test aufgetreten war, wurde mit Hilfe eines "Isocratic Liquid Chromatography System 330" (Kolbenpumpe 110-A / 110-B, System Controller 420 der Firma Beckmann) durchgeführt.

Verbunden mit diesem HPLC-Block waren der auf 254 nm eingestellte Wellenlängendetektor (Variabel Wavelength Monitor, Knauer) mit einem Durchfließküvettenvolumen von 8 µL, das Probenaufgabesystem (Automatic Sample Injector ASI 120, Knauer), der Thermostat (High Temperature Oven, Knauer), der Fraktionssammler "Frac-100" (Pharmacia) und der Integrator "D-2000 Chromato-Integrator" (Merck).

Die eigentliche Substrat - Produkt - (Ribonucleosid-/2'-Desoxyribonucleosid-)Trennung fand auf der sich im "High Temperature Oven" befindlichen und bei 37 °C temperierten 300 x 4 mm Kationenaustauschersäule EURO-KAT H (Knauer) statt. Eine 30 x 4 mm Säule mit gleichem Material diente als Vorsäule. Auf diesem sulfonierten, quervernetzten Styrol/Divinylbenzol-Copolymer erfolgte im 0,1 M Boratpuffer (bei pH 8,0) als mobiler Phase die Trennung nach dem Prinzip der Anionenausschluß-Chromatographie, der eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Matrix überlagert ist. So werden in aller Regel mit Borat komplexierte Ribonucleotide (Reste von Substrat, welche nicht von der alkalischen Phosphatase gespalten wurden) und Ribonucleoside (dephosphoryliertes Substat) als Anionen direkt durch die Säule gespült, während neutrale Deoxyribonucleoside (dephosphoryliertes red. Substat) und auch Nucleobasen (Purine und Pyrimidine als Folge der Nebenreaktion) auf der Säule retardisiert werden.

### 2.18.1.4. Chromatographieparameter und Fraktionierung

Puffer:	0,1 M Borat / NH <sub>3</sub> , bei pH 8,0
Flußrate:	0,5 mL / min

CDP:	Fraktionierung:	Gesamtdauer 60 min	
		Inhalt	Zeit (min)
	Fraktionen	1. Cytidin, CDP	01,6 - 09,6
		2. d-Cytidin	09,6 - 17,6
		3. Cytosin	17,6 - 25,6
		4. Nachlauf	25,6 - 33,6
GDP:	Fraktionierung:	Gesamtdauer 60 min	
		Inhalt	Zeit (min)
	Fraktionen	1. GDP, Guanosin	02,5 - 14,5
		2. Zwischenfraktion	14,5 - 17,0
		3. d-Guanosin	17,0 - 29,0
		4. Guanin	29,0 - 41,0

Nach Zugabe des Szintillationscocktails (Volumen nach Angabe des Herstellers) Quicksafe A (Zinsser Analytik, Frankfurt/Main) oder Lumasafe plus (Lumac LSC B.V., Groningen, Niederlande) wurde der radioaktive Zerfall im Szintillationszähler Wallac 1410 (Pharmacia) bestimmt.

## 2.19. Molekularbiologische Methoden

### 2.19.1. Bestimmung der DNA Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Präparation von Plasmid- oder genomischer DNA wurde nach MANIATIS et al. (1982) durchgeführt. Dazu wurde die Extinktion einer Probe bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt.  $E_{260} = 1$  entspricht dabei etwa 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Der Quotient

$E_{260}/E_{280}$  gibt den Grad der Verunreinigung durch Proteine an. Reine Präparationen sollten einen Quotienten von 1,8-2,0 aufweisen.

Bei Verwendung eines quantitativ bestimmten DNA-Standards wurden DNA-Konzentrationen in Banden nach gelelektrophoretischer Trennung mit Hilfe des Computerprogrammes „GelPro Analyzer“ kalkuliert.

### 2.19.2. Isolierung von Gesamt-DNA

Gesamt-DNA wurde mit der CTAB-Methode nach AUSUBEL et al. (1990) unter Verwendung des biologischen Detergenz´ Hexadecyltrimethylammoniumbromid gewonnen. Für Corynebakterien war dabei eine 2 stündige Vorbehandlung mit Lysozym (30 mg/mL TE-Puffer) nötig.

**2.19.3. Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979) nach dem Protokoll von MANIATIS et al. (1982). Abweichend hiervon wurde der GET-Lösung (50 mM Glc, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) 4 mg/mL Lysozym zugegeben und die doppelte Zellmenge eingesetzt. Alternativ hierzu wurde sehr reine Plasmid-DNA über Qiagen-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

**2.19.4. DNA-Fragmentisolierung**

Bei allen präparativen Gelen wurde die DNA nur mit einer UV-Handlampe, Fluotest Piccolo 254 (Original Hanau Quarzlampen GmbH, Hanau) sichtbar gemacht, um keine Schädigungen durch zu hohe UV-Dosen zu verursachen.

In der Regel wurden die gewünschten DNA-Banden aus den Standard Agarosegelen ausgeschnitten und unter Verwendung des Qiaex-Kits der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Insbesondere große Fragmente über 15 kb wurden aus 0,7 %igen LMP-Agarosegelen ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und geschmolzen (10 min bei 65°C). Nach dem Einstellen auf 0,5 M NaCl mit 5 M NaCl-Lösung und Versetzen mit der gleichen Menge Phenol-NaCl (gesättigt mit 1 M Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5 M NaCl) wurde zur Extraktion der DNA 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min 10.000 U/min) wurde der Überstand zweimal mit einem Aliquot Diethylether zur Entfernung von Phenolresten extrahiert und mit zwei Volumen Ethanol abs. zur Fällung der DNA bei -20°C über Nacht oder 45 min bei -70°C aufbewahrt. Anschließend wurde 10 min mit 10.000 U/min zentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren die DNA getrocknet. Resuspendiert wurde diese in einem Zehntel des Volumens des ausgeschnittenen Agarosestücks TE 10.01 (10 mM Tris-HCl und 0,1 mM EDTA pH 8,0).

**2.19.5. DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen**

Zur analytischen oder präparativen Spaltung von DNA wurden entsprechend den Angaben des Herstellers pro µg DNA 1 bis 3 Einheiten Restriktionsenzym zugegeben und bei der erforderlichen Temperatur (meist 37°C) 1 bis 2 Stunden inkubiert. Optimale Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe von 10fach konzentriertem Reaktionspuffer geschaffen. Bei der Restriktion mit mehr als einem Enzym wurde der günstigste Inkubationspuffer ausgewählt oder die Verdauungen wurden nacheinander mit dazwischen geschalteter Phenolextraktion und Ethanol-fällung durchgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Zugabe 5fach konzentrierten GLB-Puffers.

### 2.19.6. Inaktivierung von Restriktionsenzymen

Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte 15 min bei 65°C, bzw. bei Hitze-resistenten Enzymen durch Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung.

### 2.19.7. Dephosphorylierung der 5'-Enden geschnittener Vektor-DNA

Für die Dephosphorylierung der 5'-Enden geschnittener Vektor-DNA zur Verhinderung der Religation wurde Die Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) von Boehringer Mannheim benutzt. Dazu wurden in einem 30 µL-Ansatz mit ca. 50 pmol phosphorylierten Enden 3 U SAP eingesetzt und bei 37°C mindestens 1h inkubiert.

Danach erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase durch 15 minütiges Erhitzen auf 65°C. So behandelte Vektor-DNA konnte direkt in den Ligationsansätzen eingesetzt werden

### 2.19.8. Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA

Für die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen nach MANIATIS et al. (1982) mit 0,7 %igen Agarosegelen durchgeführt. Die Agarose wurde in 1fach TAE-Puffer suspendiert, bis zum vollständigen Lösen aufgekocht, auf etwa 50°C abgekühlt und dann in die Gelvorrichtung oder auf eine horizontale Glasplatte mit darüber hängendem Kamm gegossen. Dauer und angelegte Spannung richtete sich nach Größe und Art der verwendeten Elektrophoresesysteme (Renner GmbH, Dannstadt oder Pharmacia LKB, Freiburg). Als Standard zum Größenvergleich der aufgetrennten DNA-Fragmente diente die "1 kb DNA-Leiter" der Firma Gibco BRL oder mit *HindIII* verdaute DNA des Phagen λ (Boehringer, Mannheim). Nach einer 15 minütigen Färbung im Ethidiumbromidbad wurde das Agarosegel auf einem UV-Leuchttisch, Transilluminator IL-350 M (Bachhofer, Reutlingen) mit einem Sofortbildkamerasystem (Durst Laborator, Italien) im Bild festgehalten. Die digitale Dokumentation von Agarosegelen erfolgte mit einer Anlage „Digit Store“ der Firma Intas (Göttingen).

### 2.19.9. Ligation

Die zu ligierenden DNA-Fragmente stammten entweder aus präparativen Agarosegelen oder direkt aus einem inaktivierten Restriktionsansatz. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit 3'- oder 5' überlappenden Enden wurde 1 µg DNA mit 1 Einheit T4-Ligase (Gibco BRL, Eggenstein, oder Boehringer, Mannheim) in Ligasepuffer 14 - 20 Stunden bei 16°C oder 3 Stunden bei RT inkubiert, dabei wurde das zu klonierende Fragment in 5fachem Überschuß zum Zielvektor eingesetzt. Bei Ligationsansätzen von DNA-Fragmenten mit glatten Enden betrug das Verhältnis von Fragment zu Vektor 10 : 1. Ligationsansätze wurden direkt transformiert.

**2.19.10. Methoden zum Gentransfer****2.19.10.1 Elektrotransformation von *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* und *Corynebacterium ammoniagenes***

Zur Elektrotransformation (Elektroporation) werden vorbehandelte Zellen mit Plasmid-DNA gemischt und in Elektroporationsküvetten durch eine definierte Kondensatorentladung einem elektrischen Puls mit einer Feldstärke von 12,5 bis 19,5 kV/cm ausgesetzt, wodurch es zur Aufnahme der Plasmid-DNA kommt (DOWER et al., 1988). Die Entladungszeiten sind von der Feldstärke abhängig und liegen in einem Bereich von 2 bis 5 msec. Wesentliche Voraussetzungen für die hohe Effizienz dieser Transfermethode sind eine logarithmische Wachstumsphase der verwendeten Zellen sowie die Konzentrierung und Entionisierung der Zellsuspension während der Vorbehandlung. Dadurch wird die Entstehung eines homogenen elektrischen Feldes zwischen den parallelen Küvettenelektroden gewährleistet. Die Elektroporationen wurden mit einem Electro Cell Manipulator ECM<sup>®</sup> 600 der Firma BTX Inc. (San Diego, USA) durchgeführt. Elektroporationsküvetten wurden ebenfalls von BTX oder von EUROGENTEC (Liege, Belgien) bezogen.

Die Elektroporation der Corynebakterien bedarf einer besonderen Vorbereitung der Zellen, die darauf abzielt, den komplexen Zellwandaufbau dieser Bakterien zu schwächen. Hierzu werden dem Anzuchtmedium Glycin, Tween 80 und Isonicotinsäurehydrazid zugegeben (HAYNES & BRITZ, 1989).

Vorbereitung von *E. coli*-Zellen:

- *E. coli*-Vorkultur in 10 mL LBG-Medium animpfen und über Nacht bei 37°C inkubieren
- Vorkultur 1 : 100 in LBG-Medium überimpfen und unter Schütteln mit 150 U/min bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 - 0,7 anziehen
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen, alle weiteren Schritte bei 4°C durchführen
- 250 mL Kultur 15 min bei 6000 U/min in einer Sorvall Kühlzentrifuge pelletieren
- Überstand vollständig abziehen
- Zentrifugenbecher zweimal mit H<sub>2</sub>O bidest. ausspülen, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet in 5 mL H<sub>2</sub>O bidest. resuspendieren und in 250 mL H<sub>2</sub>O bidest. waschen
- Zellen 15 min bei 5000 U/min pelletieren
- Überstand abgießen und Zellen im Rücklauf resuspendieren
- Suspension aufteilen und jeweils 25 mL 15 % Glycerin zugeben
- Zellen 15 min bei 5000 U/min zentrifugieren und Überstand vollständig abziehen
- Pellet in 1 mL 15 % Glycerin aufnehmen und in kleinen Portionen bei -70°C einfrieren

Vorbereitung von Corynbakterien (HAYNES & BRITZ, 1989):

- Vorkultur in 10 mL LBG-Medium animpfen und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubieren
- 0,2 - 0,8 mL der Vorkultur in 100 mL Elektroporationsmedium geben, in 1000 mL Erlenmeyerkolben überimpfen und über Nacht im Luftschüttler mit 200 U/min bei 30°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 anziehen
- alle weiteren Schritte bei 0°C durchführen
- mindestens 10<sup>9</sup> Zellen in PE-Röhrchen überführen und 10 min bei 6.000 U/min in einer Kühlzentrifuge pelletieren, Überstand vollständig abziehen
- Pellet im gleichen Volumen 15% Glycerin waschen und erneut pelletieren
- Pellet in 1 mL 15 % Glycerin resuspendieren und in Eppendorf-Gefäß überführen
- Zellen zweimal mit 1 mL 15 % Glycerin waschen und durch kurzes Zentrifugieren in der Eppendorf-Zentrifuge 5414 pelletieren
- Zellen in 60 µL 15 % Glycerin aufnehmen und bei -80°C lagern

Elektroporation von *E. coli*, *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes*:

- portionierte Zellen auf Eis auftauen, Küvetten und DNA auf Eis stellen
- DNA zu den Zellen geben, gut mischen und Ansatz 1 min auf Eis stellen
- Suspension in die Küvette geben, in die Apparatur stellen und den elektrischen Puls auslösen (entspricht einer elektrischen Feldstärke von 12,5 kV/cm)
- sofort 1 mL SOC-Medium zugeben und gut mischen
- E. coli*-Zellen 1 h bei 37°C, *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum*-Zellen 3 h bei 30°C regenerieren und anschließend auf Selektionsmedium ausplattieren

### **2.19.10.2. Transformation von *E. coli*-Zellen**

Transformationen mit Plasmid-DNA wurden nach MANIATIS et al. (1982) durchgeführt. Alternativ dazu wurde nach einem vereinfachten Transformationsprotokoll gearbeitet, bei dem 5 mL LB-Medium mit 0,2 mL ÜNK des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in einer Labofuge (Hareus Christ GmbH, Osterode) abzentrifugiert (10 min 5.000 U/min), in 0,2 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und mindestens 15 min auf Eis gestellt. Mit diesen kompetenten Zellen wurde entsprechend der CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>-Methode weitergearbeitet.

### **2.19.10.3. RP4 vermittelte Konjugation für den Gentransfer von *E. coli* nach *Corynebacterium***

Für den Gentransfer von *E. coli* nach *Corynebacterium* wurde als Donorstamm *E. coli* S17-1 (SIMON et al., 1983) verwendet, welcher ein in das Chromosom integriertes RP4-Derivat trägt, so daß Plasmide mit entsprechender mob-Region nach der von SCHÄFER et

al. (1990) beschriebenen Prozedur in die Gram-positiven Rezipienten übertragen werden konnten.

Zuvor mußten die Vektoren allerdings nach den oben aufgeführten Methoden in den Donorstamm eingebracht werden.

### **2.19.11. DNA-DNA Hybridisierung**

#### **2.19.11.1. DNA-Transfer vom Agarosegel auf Nylonmembranen (nach SOUTHERN, 1975)**

Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA und der fotografischen Dokumentation wurde das Gel für den Transfer vorbereitet, indem die DNA zuerst 2 x 15 min mit 0,25 N HCl hydrolysiert und dann 2 x 15 min mit 0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl denaturiert wurde. Anschließend erfolgte eine Neutralisierung mit 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 + 1,5 M NaCl für 30 min.

Die Übertragung auf Nylonmembranen (Schleicher und Schüll, Dassel) wurde nach dem Kapillarverfahren (MANIATIS et al., 1982) über Nacht oder im Vacuumverfahren (Hybaid Vacuum-blotting Apparatur) für 2 h mit 20fach SSC-Puffer als Laufmittel durchgeführt. Nach der Übertragung wurde das Gel erneut gefärbt und der DNA-Transfer unter UV-Licht kontrolliert. Die DNA wurde dann mittels „UV-crosslink“ (Stratagene, Heidelberg) an die inzwischen luftgetrocknete Membran gebunden.

Membranen mit fixierter DNA konnten einige Tage im Dunkeln aufbewahrt oder sofort bei der Hybridisierung eingesetzt werden.

#### **2.19.11.2. DNA-DNA Hybridisierung (MANIATIS et al., 1982)**

Membranen mit UV fixierter DNA wurden zuerst 2 min in 5 x SSC gewaschen und dann in 0,2 mL/cm<sup>2</sup> Hybridisierungslösung (5 x SSC; 0,1 % N-Laurylsarcosin; 0,02 % SDS; 1 % BSA) bei 68°C für mindestens 1 h vorhybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die Sonde durch 5 minütiges Kochen und rasches Abkühlen im Eisbad in Einzelstränge zerlegt. Zu je einem mL der auf 68°C erwärmten Hybridisierungslösung (0,05 mL/cm<sup>2</sup> Membran) wurden etwa 50 ng der denaturierten Sonde gegeben und sofort mit der Membran in einem verschweißten Plastikbeutel bei 68°C über Nacht leicht geschüttelt.

Nach zweimaligem Waschen mit jeweils ca. 100 mL 2 x SSC + 0,1 % SDS, erfolgte das „spezifische Waschen“ der Membran bei 68°C mit 100 mL 0,1 x SSC + 0,1 % SDS für 100 % Homologie. Durch Erhöhung der Salzkonzentration (z.B. 0,6 SSC + 0,1 % SDS für 70 % Übereinstimmung) und auchh durch Senken der Hybridisierungstemperatur konnte die Spezifität herabgesetzt werden. Anschließend wurde die Membran bei RT getrocknet.

**2.19.11.3. Immunologischer Nachweis Digoxegenin-markierter Sonden**

Für den immunologischen Nachweis Digoxegenin-markierter Sonden mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpern mußte die Membran nach dem Befeuchten mit TBS mit 0,5 % BSA in TBS geblockt werden und dann zweimal mit TBS für je 10 min gewaschen werden. Danach wurde 1 µL Anti-DIG-Antikörperkonjugat (Boehringer, Mannheim) je 20 mL TBS für 30 min zusammen mit der Membran bei RT leicht geschüttelt und schließlich erneut zweimal gewaschen.

Die Farbreaktion wurde in Phosphatasepuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>) durchgeführt. Es empfiehlt sich eine kurze Equilibrierungsphase vor der Färbung. Zu je 20 mL Phosphatasepuffer wurden 45 µL NBT und 35 µL X-Phosphat (beides Boehringer) gegeben und zusammen mit der Membran bei RT im Dunkeln bis zur Färbung inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1 mM EDTA.

Alle Schritte wurden in verschweißter Schlauchfolie durchgeführt.

**2.19.11.4. Markierung von DNA-Sonden mit Digoxegenin**

Alle Sonden wurden mittels PCR hergestellt. Hierbei wurde das PCR-Protokoll lediglich dadurch abgewandelt, daß im üblichen dNTP-Mix (1,25 mM je dNTP) die Konzentration von dTTP auf 1 mM verringert war und mit 0,3 mM DIG-dUTP (Boehringer, Mannheim) ergänzt wurde.

**2.19.12. Amplifikation von DNA mit der „polymerase chain reaction“ (PCR) (SAIKI et al., 1985)**

Alle PCR-Versuche wurden in einem Thermocycler „Omn E“ der Firma Hybaid (Teddington, UK) durchgeführt. Die verwendeten Taq-Polymerasen (Quiagen, Boehringer, Appligene/Oncor) wurden nach den Angaben des Herstellers zusammen mit normalerweise ca. 100 ng Template-DNA und 400 ng je Primer (Biometra, Göttingen; MWG Biotech, Ebersfelde) eingesetzt. Im Standardprotokoll einer spezifischen Reaktion wurde die DNA zuerst bei 94°C für 2 min denaturiert, dann folgten in der Regel 30 Zyklen, bei denen nach dem Denaturieren der DNA bei 94°C für 30 sec die Primerbindung bei einer Temperatur folgte, die 1°C unter dem niedrigsten T<sub>m</sub>-Wert lag und 1 min gehalten wurde. Die Temperatur für die Elongation (70°C oder 72°C) hing von der verwendeten Taq-Polymerase ab. Dabei wurde je Kilobase des zu amplifizierenden DNA-Bereichs 1 min gerechnet.

Die Bedingungen für die unspezifischen Reaktionen sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

**2.19.13. Erstellung von größenabhängigen Teilgenbanken**

Nach der Identifizierung von Restriktionsfragmenten, die das CA1-Gen trugen, wurden für *C. ammoniagenes* größenabhängigen Teilgenbanken erstellt. Dazu wurden *EcoRI*-

Fragmente der Größe zwischen 4 und 5 kb und Fragmente von *Hind*III bzw. *Pst*I zwischen 3 und 4 kb ausgewählt, da die CA1-positiven Banden in diesen Größenbereichen lagen.

Chromosomale DNA von *C. ammoniagenes* wurde in separaten Ansätzen mit *Eco*RI, *Hind*III, und *Pst*I über Nacht verdaut und dann elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die Banden der gewünschten Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QiaexII-Kit isoliert. Danach wurden sie in pUC18 ligiert und in JM109 transformiert.

#### **2.19.14. Herstellung der CA2-spezifischen Sonden aus *M. tuberculosis* DNA**

Die Primer für die Amplifizierung der Gene von R2-1 und R2-2 aus *M. tuberculosis* hatten folgende Sequenzen:

5'-ATGACCGGCAAGCTCGTT-3' und 5'-GAAGTCCCAGTCGGTGTC-3' für R2-1  
5'-GTGACTGGAAACGCAAAG-3' und 5'-GAAGTCCCAGTCATCGTT-3' für R2-2

Die beiden Primerpaare wurden in getrennten Ansätzen zusammen mit DNA aus *M. tuberculosis* in einem Standard PCR-Programm eingesetzt. Dabei entstanden jeweils nur Produkte der erwarteten Größe in allerdings sehr geringer Konzentration, so daß sie auf dem Kontrollgel nur äußerst schwer zu erkennen waren. Um eine Anreicherung zu erhalten wurden die erhaltenen Fragmente ihrerseits als Vorlage bei einer weiteren PCR unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Die Ausbeute an PCR-Produkten war jetzt ausreichend, so daß die Markierung mit Dig-dUTP durchgeführt werden konnte und so die Sonden vervollständigt waren.

#### **2.19.15. Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits oder BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (beide Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Danach wurden die Sequenzen mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer bestimmt.

#### **2.20. Computerprogramme zur Auswertung von DNA/Protein-Gelen und Sequenzen**

Zur Rechner gestützten Bestimmung des Molekulargewichts und der DNA- oder Proteinmenge in Gelbanden nach elektrophoretischer Trennung wurde das Programm „GelPro Analyzer“ benutzt.

Der Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen mit Datenbanken erfolgte über den „Blast server“ des National Institute for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die Programme „Omiga 1.0.1“, „Clustal 1.5b“ und „Clone-Manager“ wurden für den Vergleich ausgesuchter Sequenzen sowie der Auswertung und Bearbeitung von Sequenzierdaten verwendet.

Für die dreidimensionale Darstellung von Proteinen wurden die Aminosäuresequenzen mit Hilfe des „Swiss-model“-Servers mit bekannten Sekundär- und Tertiärstrukturen verglichen und anschließend unter Verwendung des Programms „RasMol 2.6“ in Bilder umgesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Eingangsexperimente für die Klonierung der Gene der Mn-RRase von *C. ammoniagenes*

##### 3.1.1. Experimente zur Schrotschußklonierung des Gens des CA1-Proteins

Der wichtigste Ansatzpunkt für die Klonierung der Gene der Mn-RRase-Untereinheiten (CA1 und CA2) von *C. ammoniagenes* waren zu Beginn dieser Arbeit die von LUO (1994) isolierten und charakterisierten Mutanten CH31, CH32 und CH33 (siehe Einleitung).

Da diese Mutanten auf Grund einer defekten katalytischen Untereinheit (CA1) der Mn-RRase bei 37°C nicht wachsen können, boten sie eine gute Möglichkeit, bei einer Schrotschußkomplementation mit Wildtyp-DNA das Gen des CA1-Proteins zu identifizieren. Wählt man nach einem partiellen Verdau der DNA von *C. ammoniagenes* entsprechend große Fragmente von 4-6 kb, so wäre es vielleicht sogar möglich, auch das Gen der kleinen metallhaltigen Untereinheit (CA2) mitzuklonieren. Es ist nämlich zu vermuten, daß die Gene beider Mn-RRase-Untereinheiten, wie für die RRase-Gene von *E. coli* (CARLSON et al., 1984) und *B. subtilis* (A. ALBERTINI, persönliche Mitteilung) beschrieben, in einem Operon zusammenliegen.

Vor Beginn der Schrotschußexperimente sollten die drei von LUO (1994) isolierten ts-Mutanten hinsichtlich ihrer Reversionsrate untersucht werden. Sie sind über einen Zeitraum von drei Jahren als stabil beschrieben worden (LUO et al., 1997), aber sie sind aus einer MNNG-Mutagenese hervorgegangen, bei der einzelne Basenaustausche erzeugt werden. Diese Austausche können durch Fehler bei der Replikation rückgängig gemacht werden, so daß wieder der Phänotyp des Wildstammes auftritt. Solche Revertanten könnten als falsch positive Klone in der Selektion auf Erhalt der Gene der Mn-RRase stören. Die Überprüfung der Mutanten ergab, daß bei CH31 und CH33 die Reversionsrate kleiner als  $1 : 10^{10}$  war, während CH32 im Bereich von 5 Revertanten pro  $10^7$  Zellen lag. Deshalb wurde für die Klonierungsexperimente nur mit CH31 und CH33 gearbeitet.

Mit dem 10,2 kb großen *E. coli/C. glutamicum* shuttle-Vektor pECM2 (JÄGER et al., 1992) stand ein Plasmid zur Verfügung, das eine singuläre *Bam*HI-Schnittstelle besitzt. In diese können Fragmente chromosomaler DNA von *C. ammoniagenes* inseriert werden, die nach partiellem Verdau mit dem häufig schneidenden Restriktionsenzym *Sau*3A erhalten wurden. *Sau*3A ist eine Endonuklease mit einer 4er Erkennungsstelle und erzeugt überhängende Enden, die kompatibel zu denen von *Bam*HI sind.

Nachdem pECM2 mittels Elektroporation in *C. ammoniagenes* eingebracht worden war (LUO, persönliche Mitteilung), konnte dieses Plasmid nach Reisolierung aus *C. ammoniagenes* mit einer Rate von maximal  $2,5 \times 10^4$  Transformanten/ $\mu\text{g}$  DNA ebenfalls durch Elektroporation auch in die ts-Mutanten eingebracht werden. Jedoch sank nach Restriktionsverdau und anschließender Ligation mit den zu klonierenden DNA-Fragmenten die Transformationsrate auf weniger als  $1 \times 10^2$  Transformanten/ $\mu\text{g}$  DNA. Dabei überwogen trotz Dephosphorylierung der Vektor-DNA die Anzahl von Plasmiden ohne Insert, so daß auf Grund statistischer Überlegungen die Wahrscheinlichkeit, auf diese Weise das Gen für CA1 zu finden, gleich null war. Deshalb war ein weiterer Gedanke, durch den Verzicht auf die „shuttle“-Eigenschaft bei Verwendung eines dadurch kleineren Vektors die Transformationshäufigkeit zu verbessern. Dafür wurde der *C. glutamicum* Vektor pCV22 (SEEP-FELDHÄUS et al., 1991) ausgewählt, der mit 4,55 kb nur knapp halb so groß war wie pECM2. Nachdem pCV22 aus *C. glutamicum* isoliert war, wurden 8 Elektroporationsversuche benötigt, bis es gelang, pCV22 in *C. ammoniagenes* zu etablieren. Nach Isolierung aus diesen Transformanten ließ sich pCV22 mit nahezu gleicher Rate wie pECM2 zurück in *C. ammoniagenes* und die ts-Mutanten einbringen. Aber auch mit diesem kleineren Vektor konnte nach Restriktionsverdau und Ligation mit chromosomalen DNA-Fragmenten von *C. ammoniagenes* kein besserer Transfer erreicht werden als mit pECM2.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß bei *C. ammoniagenes* die Transformationsrate offensichtlich mit Auflösung der superhelikalen Plasmidstruktur durch den Restriktionsverdau und anschließender Ligation mit inserierter DNA so drastisch verringert wird, daß bei diesem Stamm eine Schrotschußklonierung nicht möglich scheint. Durch eine deutlich effizientere Zwischentransformation der Klonierungskonstrukte in *E. coli* oder *C. glutamicum* könnte man dann „supercoiled“ Plasmid-DNA isolieren und mit dieser die Elektrotransformation der *C. ammoniagenes*-Stämme versuchen. Aber bei der Etablierung der Vektoren in *C. ammoniagenes* hatte sich gezeigt, daß diese nach Isolierung aus *E. coli* oder *C. glutamicum* nur sehr vereinzelt aufgenommen wurden, was an einem sehr effektiven Restriktionssystem liegen mußte, das den interspezifischen Gentransfer entscheidend behindert. Ähnliches gilt für die konjugative Übertragung des „shuttle“-Vektors. Auch hier sind die Transferraten zu niedrig, um eine Schrotschußkomplementation erfolgreich durchzuführen. Es gibt Hinweise darauf, daß in Corynebakterien auch einzelsträngige DNA bei konjugativer Übertragung von der Restriktion betroffen ist (SCHÄFER et al., 1994b), was normalerweise nicht üblich ist (BOYER, 1971; DAVIES, 1990).

### 3.1.2. Versuche zur biochemischen Charakterisierung der metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase von *C. ammoniagenes*

Die sich abzeichnenden Schwierigkeiten bei der Schrotschußkomplementierung der thermosensitiven Mutanten offenbarten die Notwendigkeit eines alternativen Weges zur Klonierung der Mn-RRase-Gene. Deshalb sollte die Reinigung des CA2-Proteins weiterbetrieben werden, um über die Sequenzierung des N-Terminus und/oder interner Peptide degenerierte Primer für die PCR-Klonierung des Gens der kleinen metallhaltigen Untereinheit zu erhalten. Mit abgeleiteten Primern könnte es über PCR möglich sein, nach erfolgreicher Amplifizierung eines Teils des CA2-Gens mit dem erhaltenen Fragment als Sonde direkt das Gen der Metall- und Radikal-haltigen Untereinheit zu identifizieren, wie es bei der Klonierung der B<sub>12</sub>-abhängigen RRase von *L. leichmannii* erfolgreich praktiziert wurde (BOOKER & STUBBE, 1993). Eine derartige direkte Nachweismethode wäre besonders dann wichtig, wenn die Anordnung der *nrd*-Gene nicht der von *E. coli* sondern der von *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994) entspräche, was auf Grund der relativ nahen Verwandtschaft mit *C. ammoniagenes* (PASCUAL et al., 1995) durchaus im Bereich des Möglichen ist. *M. tuberculosis* war zu diesem Zeitpunkt die einzige bekannte Spezies, in der die Gene für die Untereinheiten der RRase nicht zusammen in einem Operon liegen, sondern durch mehrere Kilobasenpaare getrennt sind (YANG et al., 1994).

WILLING et al. (1988a) hatten das Molekulargewicht für die metallhaltige Untereinheit der Mn-RRase mit ca. 50 kDa angegeben und gezeigt, daß das Protein auch bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf der Höhe des 50 kDa Markers erscheint.

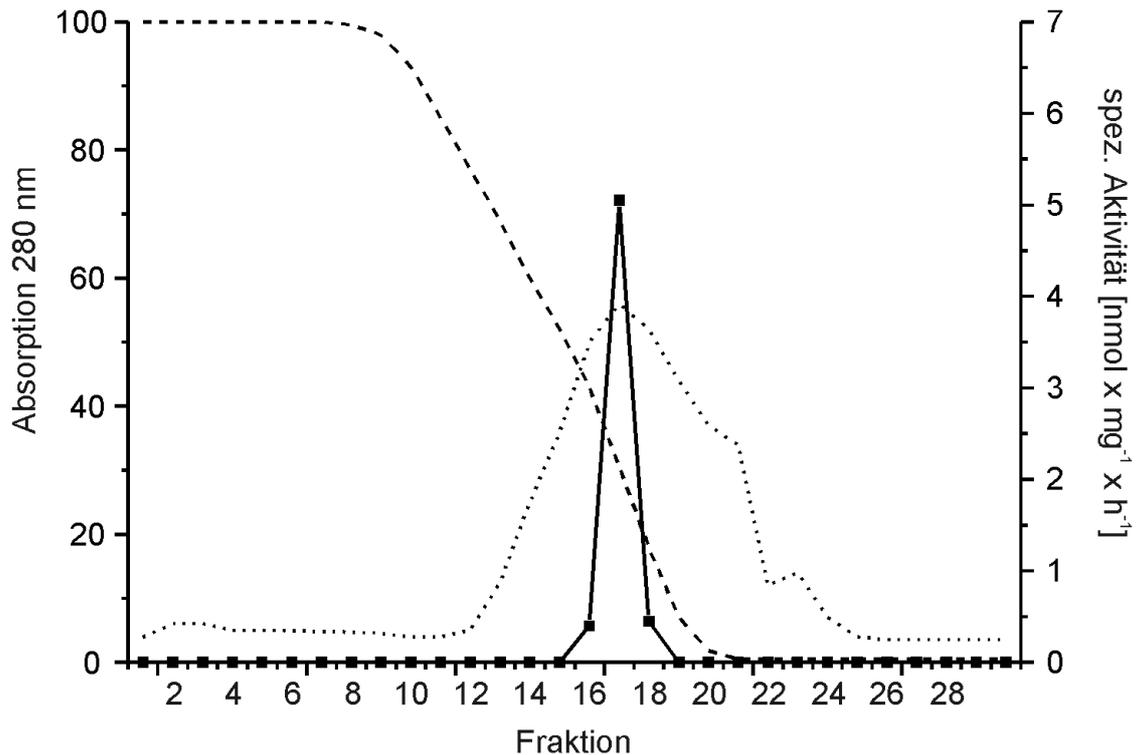
Die beabsichtigte Reinigungsprozedur (Kap. 2.10.) lehnte sich an die von GRIEPENBURG et al. (1996) etablierte an. Dem Zellaufschluß und der fraktionierten Ammoniumsulfat-fällung (40-60% Sättigung) folgte die Affinitätschromatographie an 2'5'ADP Sepharose (Kap. 2.10.2.1.), bei der CA1 und CA2 voneinander getrennt werden. Man erhält das spezifische Eluat mit CA1, das allein keine RRase-Aktivität hat, aber bei der späteren biochemischen Komplementation (Kap. 2.18.1.1.) nötig für den Nachweis von CA2 ist. Der unspezifische Durchbruch enthält neben CA2 auch nicht gebundene CA1-Reste und über 90% des Proteins der Ammoniumsulfatfraktion. Durch die Affinitätschromatographie wird keine Anreicherung von CA2 erzielt, sondern sie dient lediglich der Gewinnung von CA1 für den Komplementationstest und wurde deshalb im präparativen Reinigungsgang weggelassen.

Hier wurde eine Gelfiltration mit Superdex G200 mit CA2-Protein aus der Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Diese führte insgesamt zu einer 38fachen Anreicherung (Tab. 3.1). Die schon von WILLING et al. (1988a) beschriebene Dissoziation des Holoenzym im Laufe der Gelfiltration in das ca. 80 kDa CA1-Protein und das 100 kDa Homodimer

der CA2-Proteine zeigte sich jetzt erneut. Die beiden Untereinheiten eluierten gemeinsam in den Fraktionen 10-12, in denen die 80-100 kDa Proteine erwartet wurden. Als Folge der gemeinsamen Elution wiesen diese Fraktionen eine hohe RRase-Aktivität auf, die durch Zugabe von zusätzlichem CA1 nicht mehr erhöht werden konnte. Durch das Fehlen der Affinitätschromatographie war der Anteil von CA1 nicht reduziert worden, das natürliche Verhältnis der beiden Untereinheiten zueinander blieb erhalten und die Fähigkeit zur Ribonucleotid-Reduktion wurde nicht beeinträchtigt. Die Fraktionen mit RRase-Aktivität wiesen bei der SDS-PAGE noch zu viele Banden im 50 kDa-Bereich auf, um dort eine einzelne Bande für die Bestimmung der Aminosäuresequenzen ausschneiden zu können. Deshalb sollte mit der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) ein zusätzlicher Reinigungsschritt eingesetzt werden.

Für die Durchführung der hydrophoben Interaktionschromatographie mit Phenyl Superose (Pharmacia) wurden die Gelfiltrationsfraktionen mit der höchsten RRase-Aktivität vereinigt. Anschließend wurden sie zur Dehydratisierung der Proteine mit 3 M Ammoniumsulfat in Standardpuffer (Tab. 2.2) auf eine Endkonzentration von 1,5 M (entspricht 35 % Sättigung) eingestellt. Somit sollte der Salzgradient während der Chromatographie von 1,5 M Ammoniumsulfat über 12 mL linear bis auf 0 M abnehmen. Im ersten Anlauf wurden so 5 mg Protein aus der Gelfiltration getrennt. Der anschließende RRase-Test zeigte in keiner Fraktion Aktivität, weil die Untereinheiten der Mn-RRase wahrscheinlich bei verschiedenen Salzkonzentrationen von der Säule gewaschen wurden. Nach Komplementation mit CA1 aus der Affinitätschromatographie konnte in den Fraktionen 16-18 RRase-Aktivität gemessen werden (Abb. 3.1). Dies bedeutete, daß sich das CA2-Protein nach Absenken der Ammoniumsulfatkonzentration auf 30 % von der Säule löste. Dieses Verhalten ließ sich in weiteren Versuchen auch bei Veränderungen der Steilheit des Gradienten reproduzieren. Die Berechnung der Anreicherung des CA2-Proteins zeigte jedoch gegenüber der Gelfiltration keine nennenswerte Verbesserung (Tab. 3.1).

Es konnte zwar keine Anreicherung erzielt werden, aber es stand jetzt mit der HIC-Fraktion 17 Proteinmaterial von CA2 zur Verfügung, das nur nach Komplementation mit CA1 die Fähigkeit zur Reduktion von Ribonucleotiden hatte. Mit diesem Material war es jetzt möglich, den Defekt der großen katalytischen Untereinheit (CA1) der *C. ammoniagenes* Mutanten CH31, CH32 und CH33 mit Werten für die spezifische Aktivität zu untermauern (LUO et al., 1997), da LUO (1994) zwar eindeutig aber nur an Hand der relativen RRase-Aktivität die Thermosensitivität der Mutanten demonstriert hatte.



**Abbildung 3.1** Verlauf der hydrophoben Interaktionschromatographie und Identifizierung der Fraktionen mit CA2. Die spezifische Aktivität (—) konnte nur nach Komplementation mit CA1-Protein bestimmt werden, wurde hier aber nur für die CA2-Protein berechnet. Ammoniumsulfatgradient (-----), Absorption (.....).

**Tabelle 3.1** Reinigung der Mn-RRase von *C. ammonigenes*

Die Tabelle gibt die Durchschnittswerte für die Reinigungsschritte an.

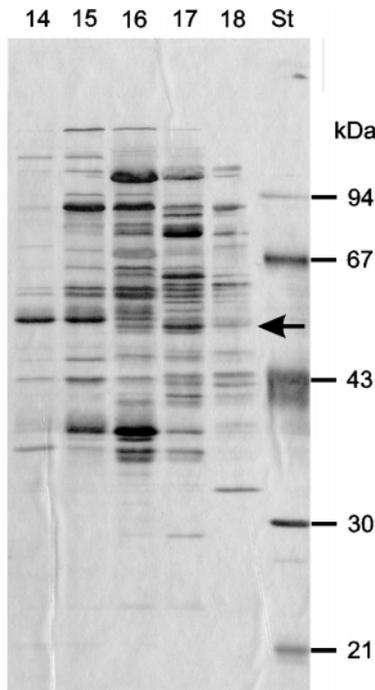
Fraktion	Protein mg	Gesamtaktivität nmol x h <sup>-1</sup>	spezifische Aktivität nmol x mg <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>	Wieder- gewinnung %	Anreicherungs- faktor
zellfreier Extrakt	3312	745	0,225	100	1
Ammonium- sulfatfällung (40-60%)	795	1062,9	1,337	142	6
Superdex G200	59,6	514,6	9,093	69	38
Phenyl Superose	13,76	129,91	9,138 <sup>a</sup>	17	41

<sup>a</sup> Aktivität nur nach biochemischer Komplementation mit CA1-Protein erhalten, die spezifische Aktivität wurde aber nur für das CA2-Protein berechnet.

### 3.1.3. Versuche zur Gewinnung von Peptidinformationen vom 50 kDa CA2-Protein

Mit dem Proteinmaterial aus der HIC-Reinigung wurde auch die Sequenzierung des N-Terminus der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* durchgeführt. Die Proteine der Fraktion 17 wurden mittels SDS-PAGE getrennt (Abb. 3.2). Nach dem Übertragen auf eine PVDF-Membran wurde die 50 kDa Bande ausgeschnitten und zur Bestimmung des N-

Terminus benutzt. Die resultierende Aminosäuresequenz bestand aus 21 Resten (Met-Leu-Glu-Ile-Pro-Arg-Val-Glu-Glu-Gly-Gly-His-Ile-Gly-Pro-Val-Asn-Ser-Ala-Leu-Val). Sie wurde in Datenbanken mit dort deponierten Proteinprimärstrukturen verglichen, wobei keine Übereinstimmungen mit bekannten Ribonucleotid-Reduktasen gefunden wurde.



Die einzige gefundene Ähnlichkeit bestand mit einem internen Stück eines eukaryotischen Rezeptors, aber auch nur in einer Teilsequenz von 9 Aminosäureresten. Da deutlichere Übereinstimmungen ausblieben, war dieser Versuch erfolglos. Jedoch bestand die 50 kDa-Bande nicht aus einem Protein allein, denn schon bei der Sequenzierung trat ein Hintergrund auf, der auf ein zweites Protein mit blockiertem N-Terminus hinwies (R. SCHMID, persönliche Mitteilung). Das Protein mit blockiertem N-Terminus konnte CA2 sein.

**Abbildung 3.2** SDS-Polyacrylamidgel der Proteinfraktionen 14-18 nach hydrophober Interaktionschromatographie. Der Pfeil markiert das Molekulargewicht 50 kDa.

In einem zweiten Anlauf, Peptidinformationen über die metallhaltige Untereinheit der Mn-RRase zu erhalten, sollte die 50 kDa-Bande diesmal aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten werden, dann aber in einem *in gel* Verdau (Kap. 2.16.) mit der Endoproteinase LysC in Peptide zerkleinert werden. Die schließlich erhaltenen Peptide stammten dann von den in der 50 kDa Bande enthaltenen Proteinen. Bei der Sequenzierung mehrerer Peptide sollte es möglich sein nach einem Vergleich der Aminosäurefolgen, auch Peptide von CA2 zu identifizieren.

Um genügend Protein für die Sequenzierung zu erhalten, wurde ein Dutzend 50 kDa Banden aus SDS-Gelen ausgeschnitten und vor dem *in gel* Verdau elektrophoretisch wie in Kapitel 2.15.3. beschrieben konzentriert. Bei dem Proteinverdau mit LysC entstanden jedoch so viele Peptide, daß sie mit der Säule, die bei der HPLC-Trennung verwendet wurde, nicht mehr getrennt werden konnten und erste Sequenzierungsversuche fehlschlagen. Daraufhin wurde vermutet, daß die Bande mehr als nur zwei Proteine enthielt (H. THOLE, persönliche Mitteilung). Diese Vermutung konnte durch eine 2-D Gelelektrophorese bestätigt werden. Nach Trennung auf Grund des isoelektrischen Wertes und nachfolgender SDS-PAGE konnten vier Proteine im Bereich 50 kDa angefärbt werden.

Zu diesem Zeitpunkt führten die Ergebnisse aus den genetischen Arbeiten eine Wende in der Sichtweise über die Mn-RRase herbei, die Anlaß dazu gab, die Strategie, über Peptidinformationen zur Klonierung zu gelangen aufzugeben (vergleiche Diskussion).

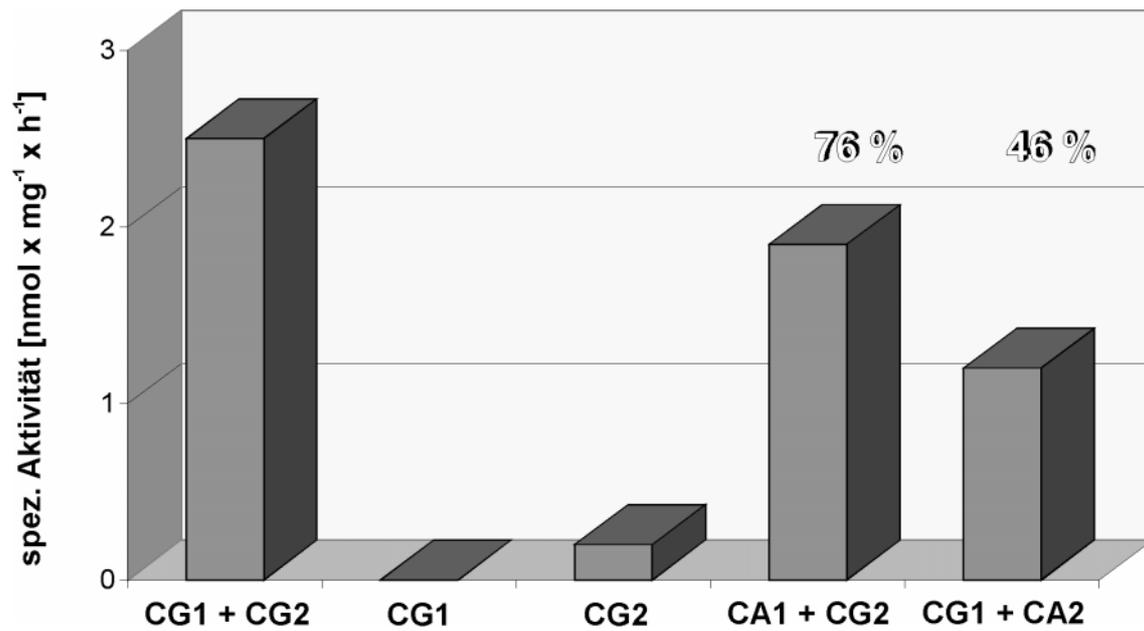
### **3.1.4. Heterologe biochemische Komplementation partiell gereinigten Untereinheiten von den RRasen aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum***

Die nahe Verwandtschaft der Spezies *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* und die Manganabhängigkeit der DNA-Synthese in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt (siehe auch Einleitung) hatte dazu Anlaß gegeben, auch die Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* zu untersuchen. Sowohl die Enzymzusammensetzung aus zwei verschiedenen Untereinheiten (CG1, CG2) als auch die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion durch Hydroxyharnstoff konnten als grundsätzliche Gemeinsamkeiten der Enzyme beider Spezies gefunden werden (WALTER, 1996). Es wurde vermutet, daß *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* RRasen der gleichen Enzymklasse besitzen. Sollte die Ähnlichkeit der RRasen beider Corynebakterien so groß sein, daß die heterologen Untereinheiten miteinander kooperieren, müßte es möglich sein, die Aktivität dieser Hybridenzyme in einem Kreuzkomplementationstest zu bestimmen.

Die HIC-Reinigung von CA2 hatte es ermöglicht, die metallhaltige Untereinheit von der „CA1-Verunreinigung“ zu befreien, so daß jetzt sowohl CA1 (nach Affinitätschromatographie) als auch CA2 separat und ohne Aktivität vorlagen. Dieses Proteinmaterial wurde im Kreuzkomplementationstest zusammen mit der entsprechenden Untereinheit der *C. glutamicum* RRase eingesetzt. Bei der Komplementation von CA1 mit CG2 konnten etwa 75 % der Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität des *C. glutamicum* Holoenzym gemessen werden. Die Hybrid-RRase aus CG1 und CA2 war ebenfalls aktiv und schaffte einen Substratumsatz von knapp 50 % im Vergleich zum *C. glutamicum* Holoenzym (Abb. 3.3).

Die Bildung funktioneller Hybrid-RRasen bedeutet, daß die Untereinheiten der Enzyme aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* so miteinander kooperieren, daß die Übertragung des für den Reaktionsstart notwendigen Radikals stattfinden kann. Dies setzt auch eine große Ähnlichkeit in der Raumstruktur der Proteine voraus, damit die am Elektronentransfer beteiligten Aminosäurereste in Kontakt treten können. Da auch der gebundene Cofaktor die Raumstruktur beeinflussen kann, ist es sehr wahrscheinlich, daß wie in der *C. ammoniagenes* RRase auch in der von *C. glutamicum* ein Manganzentrum an der Radikalbildung beteiligt ist.

Diese Ergebnisse aus der Kreuzkomplementation gaben den Ausschlag zur ebenfalls betriebenen Klonierung der Gene der RRase aus *C. glutamicum*.



**Abbildung 3.3** Kreuzkomplementation der RRase-Untereinheiten von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum*. Die Untereinheiten der RRase von *C. glutamicum* wurden von A. Walter zur Verfügung gestellt (Walter, 1996).

### 3.2. Klonierung der Gene der Mn-RRase von *C. ammoniagenes*

Für die Vorgehensweise bei der Klonierung eines bestimmten Gens kann man je nach den vorhandenen Voraussetzungen drei verschiedene Strategien wählen. Eine Möglichkeit ist die genetische Komplementation von Mutanten mit einem Defekt im gesuchten Gen. Für die Klonierung der Mn-RRase-Gene schien dieser Weg nicht durchführbar (Kap. 3.1.1.). Eine zweite Möglichkeit ist, das interessierende Protein soweit zu reinigen, daß die Bestimmung N-terminaler und interner Aminosäuresequenzen möglich wird. Aus den Peptidinformationen können dann Primer für die PCR-Klonierung abgeleitet werden. Auch dieser Weg wurde für die Mn-RRase eingeschlagen, führte aber am Ende nicht zum Ziel. Eine dritte Möglichkeit existiert, sofern die Gene funktionell gleicher oder ähnlicher Proteine aus anderen Organismen bereits kloniert und sequenziert sind. Ein Vergleich der bekannten Sequenzen erlaubt dann vielleicht die Identifizierung stark konservierter Bereiche in den Primärstrukturen der Proteine. Unter der Annahme, daß diese Bereiche in allen diesen funktionsgleichen Proteinen erhalten sind, können aus den übereinstimmenden Aminosäureabfolgen Primer für die PCR-Klonierung abgeleitet werden.

Dieser dritte Weg zur Klonierung der Mn-RRase-Gene von *C. ammoniagenes* erschien möglich, als die Sequenz des Gens der R1 Untereinheit der RRase aus *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994) veröffentlicht wurde und wenig später die Genomsequenzierung von *Bacillus subtilis* das *nrdEF*-Operons zugänglich machte (A. ALBERTINI, persönliche Mitteilung, 1995). Bei beiden Organismen wurden die Enzyme, die von den genannten Genen kodiert werden, als essentiell für die Ribonucleotid-Reduktion beschrieben (YANG et al., 1994; A. ALBERTINI, persönliche Mitteilung, 1995). Dies war besonders deshalb von Bedeutung, weil beide Spezies durchaus eine Mangan-abhängige DNA-Synthese haben konnten. *M. tuberculosis* ist zusammen mit *C. ammoniagenes* innerhalb der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt in einer Gruppe von Organismen, in der die Manganabhängigkeit der DNA-Synthese gezeigt werden konnte (siehe Einleitung). Ein ähnlicher Einfluß von Mangan konnte ebenfalls für *B. subtilis* gezeigt werden (GVOZDIK et al., 1996). Auch in der Familie der *Enterobacteriaceae* gibt es zusätzlich neben *nrdAB*, den Genen der Klasse I Fe-RRase, auch *nrdEF* (JORDAN et al., 1994a). Den Genprodukten von *nrdEF*, R1E und R2F, konnte jedoch in diesen Gram-negativen Bakterien noch keine *in vivo* Funktion nachgewiesen werden. *In vitro* wurde die Fähigkeit zur Ribonucleotid-Reduktion gezeigt (JORDAN et al., 1994b).

Die Vermutung, daß die wenig charakterisierte Genklasse *nrdEF* für eine eigene Klasse von Enzymen, vielleicht der Mn-RRase, zuständig ist, gab den Anlaß, ausgehend von den verfügbaren Sequenzen der RRase-Gene der beiden Gram-positiven Bakterien einen

Aminosäuresequenzvergleich zu machen. Dazu wurden die großen Untereinheiten der bekannten Fe-RRasen von *E. coli* (CARLSON et al., 1984; NILSSON et al., 1988), Mensch (PARKER et al., 1991), Maus (THELANDER & BERG, 1986) und *Plasmodium falciparum* (RUBIN et al., 1993) bzw. der *nrdE*-Genprodukte von *S. typhimurium* (JORDAN et al., 1994a) und eben *B. subtilis* (SCOTTI et al., 1996) sowie der R1-Untereinheit der RRase aus *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994) miteinander verglichen.

Als Resultat wurden fünf Bereiche gefunden, in denen zwei oder mehr Aminosäuren neben konservativen Austausch in allen betrachteten Proteinen übereinstimmten. Auf Grund der funktionellen Gleichheit der großen katalytischen Untereinheit von Fe- und Mn-RRasen bei Verwendung derselben Substrate und Effektoren konnte man diese Ähnlichkeiten der dafür nötigen Bindestellen erwarten.

Die Analyse der fünf konservierten Bereiche nach dem Vergleich der pro- und eukaryotischen RRase-Sequenzen ließ zwei dieser Domänen besonders attraktiv erscheinen, da sie in allen herangezogenen Aminosäurefolgen identisch erhalten waren. Aus diesen Bereichen könnten Primer abgeleitet werden, mit denen mittels PCR eine CA1-spezifische Gensonde erhalten werden könnte. Mit dieser wäre dann eine Vorauswahl der DNA möglich. Dadurch könnte die Anzahl der für die Klonierung in Frage kommenden Fragmente deutlich verringert werden, so daß dann nach Anreicherung dieser Klone wieder eine Komplementation der *ts*-Mutanten zur endgültigen Identifizierung führen würde. Die Auswahl ausreichend großer Fragmente chromosomaler DNA von *C. ammoniagenes* könnte dann gleichzeitig zur Klonierung des Gens der kleinen Untereinheit führen. Die Gene aller bekannten RRasen der Klasse I sind in einem Operon hintereinander angeordnet, so daß eine komplexe Zellzyklus-abhängige Regulation, wie für *E. coli* beschrieben (Sun & Fuchs, 1992), begünstigt wird. Die getrennte Anordnung der Gene in *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994) wurde zu diesem Zeitpunkt als Ausnahme angesehen werden, die vielleicht sogar mit dem extrem langsamen Wachstum von *M. tuberculosis* in Verbindung gebracht werden kann.

### **3.2.1. Entwicklung und Anwendung degenerierter PCR-Primer für die Herstellung einer spezifischen Sonde für das Gen des CA1-Proteins**

Für die Entwicklung der Klonierungsprimer waren zwei in allen betrachteten RRasen hoch konservierte Bereiche ausgewählt worden. Eine der beiden Regionen mit 5 übereinstimmenden Positionen (SNLCXE) befindet sich etwa in der Mitte der katalytischen Untereinheiten und enthält den Cysteinrest, der für die Übertragung des Radikals auf das Substratmolekül verantwortlich gemacht wird (UHLIN & EKLUND, 1994). Die zweite mit 4 gleichen Aminosäuren (KTXYY) befindet sich am C-terminalen Ende. Hier befinden sich die beiden Tyrosinreste, die bei den RRasen bestehend aus zwei Untereinheiten an der Übertragung des Radikals von der kleinen Untereinheit auf die große katalytische benötigt werden (UHLIN & EKLUND, 1994). Es handelt sich also um

zwei Domänen, die für RRasen, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehen, also sowohl für die Fe-RRase als auch die Mn-RRase von *C. ammoniagenes*, für die Enzymaktivität der von essentieller Bedeutung sein können.

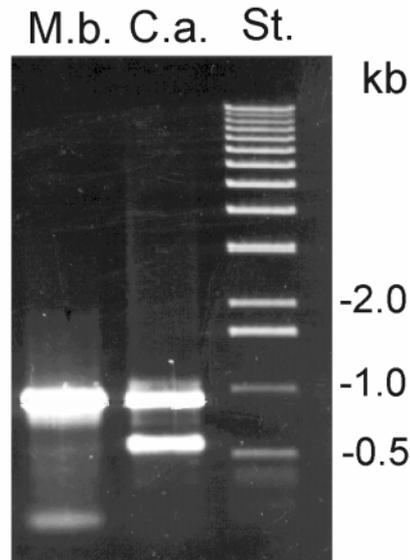
Für die reverse Translation der Aminosäuresequenzen in die Basenfolge der Primer (BROCK et al., 1994) wurden die Informationen der eukaryotischen RRasen nicht berücksichtigt. Wichtiger erschien die schon genannte phylogenetische Nähe von *C. ammoniagenes* zu den Mykobakterien. Deshalb kam gerade der Sequenz von *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994) bei der Entwicklung der degenerierten Primer für die Herstellung einer Sonde für das Gen des CA1-Proteins besondere Bedeutung zu. Von den verglichenen prokaryotischen Sequenzen von *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* wurden auf jeden Fall die bei allen vier übereinstimmenden Positionen für die Basenfolge der Primer ausgewählt (Abb. 3.4). Die Besetzung der variablen Stellen richtete sich nach dem „codon-usage“ für *C. glutamicum* (FOLLETTIE & SINSKEY, 1986; EIKMANN, 1992) und wenn dieser für zwei Codons in etwa dieselbe Verwendungshäufigkeit angab, diente die *M. tuberculosis*-Sequenz als Vorlage.

				<b>Ser</b>	<b>Asn</b>	<b>Leu</b>	<b>Cys</b>		<b>Glu</b>				
<i>E. c.</i>	<sup>1300</sup>	CGT	CAG	TCT	<b>AAC</b>	<b>CTG</b>	<b>TGC</b>	CTG	<b>GAG</b>	ATA	GCC	CTG	CCG <sup>1335</sup>
<i>S. t.</i>	<sup>1147</sup>	AAT	ATG	AGC	<b>AAC</b>	<b>CTG</b>	<b>TGC</b>	TCA	<b>GAA</b>	ATT	TTA	CAG	GTC <sup>1182</sup>
<i>B. s.</i>	<sup>1129</sup>	AAA	TTT	TCT	<b>AAC</b>	<b>CTT</b>	<b>TGC</b>	TCT	<b>GAA</b>	GTG	CTG	CAG	GCA <sup>1164</sup>
<i>M. t.</i>	<sup>1174</sup>	ACG	CAC	AGC	<b>AAC</b>	<b>CTG</b>	<b>TGC</b>	TCG	<b>GAG</b>	ATC	CTG	CAA	GTG <sup>1209</sup>
Primer 1		<u>5'-AGC <b>AAC CTG TGC</b> TCG <b>GAG AT</b>-3'</u>											
				<b>Lys</b>	<b>Thr</b>		<b>Tyr</b>	<b>Tyr</b>					
<i>E. c.</i>	<sup>2173</sup>	<b>GGG</b>	GTC	<b>AAA</b>	ACA	CTG	<b>TAT</b>	<b>TAT</b>	CAG	AAC	ACC	CGT	GAC <sup>2208</sup>
<i>S. t.</i>	<sup>2059</sup>	<b>GGT</b>	ATT	<b>AAG</b>	TCC	CTG	<b>TAT</b>	<b>TAC</b>	ATC	CGG	CTT	CGC	CAG <sup>2094</sup>
<i>B. s.</i>	<sup>2032</sup>	<b>GGA</b>	ATT	<b>AAA</b>	ACC	ATT	<b>TAC</b>	<b>TAT</b>	GCA	AGA	ACG	AAA	GAT <sup>2067</sup>
<i>M. t.</i>	<sup>2086</sup>	<b>GGG</b>	ATC	<b>AAG</b>	ACG	CTG	<b>TAC</b>	<b>TAC</b>	ATC	CGG	CTG	CGG	CAG <sup>2111</sup>
						CTG	<b>TAC</b>	<b>TAC</b>	ATC	CGG	CTG	CG	
Primer 2		<u>3'-GAC <b>ATG ATG</b> TAG GCC GAC GC-5'</u>											

**Abbildung 3.4** Vergleich besonders konservierter Bereiche der Ribonucleotid-Reduktase-Gene von *E. coli nrdA* (CARLSON et al., 1984), *S. typhimurium nrdE* (JORDAN et al., 1994a), *B. subtilis nrdE* (A. ALBERTINI, persönliche Mitteilung) und dem *M. tuberculosis* Gen der R1-Untereinheit (YANG et al., 1994) für die Entwicklung von degenerierten Primern. In allen Sequenzen übereinstimmende Basen sind fett hervorgehoben. Die Primersequenzen sind unterstrichen. Die Zahlen geben jeweils die Position der ersten und letzten Base einer Zeile im entsprechenden Gen an.

Die so entwickelten Primer wurden bei der PCR mit Gesamt-DNA von *C. ammoniagenes* eingesetzt, um einen Teil des Gens des CA1-Proteins zu amplifizieren, der voraussichtlich etwa 920 bp lang sein mußte. Dies gelang schließlich, nachdem die Anlagerungstemperatur beginnend bei 50°C in weiteren Ansätzen bis auf 47°C abgesenkt wurde. Auf einem Agarosegel (Abb. 3.5) wurden in dem Ansatz von *C. ammoniagenes*

zwei Banden gefunden. Die größere befand sich auf einer Höhe mit der Bande des Vergleichsansatzes, in dem DNA von *Mycobacterium bovis* BCG mit den gleichen Primern amplifiziert wurde (Bahn 1), und entsprach der erwarteten Größe von ca. 920 bp. Das kleinere Amplifikat war etwa 540 bp lang.



**Abbildung 3.5** Agarosegel mit den PCR-Produkten von *C. ammoniagenes* (C.a.) und *M. bovis* BCG (M.b.) nach Amplifikation mit den abgeleiteten Primern. St. = Molekulargewichtsstandard.

### 3.2.2. Sequenzierung und Sequenzvergleich des 935 bp PCR-Produktes

Zur Klärung, ob das erhaltene etwa 920 bp große PCR-Produkt einem Teil des Gens des CA1-Proteins entsprach, sollte es sequenziert werden. Dazu wurde es in pUC57/T (MBI Fermentas) kloniert und dann der Sequenzierung zugeführt (Abb. 3.6).

Der anschließende Vergleich mit in Datenbanken gespeicherten DNA-Sequenzen (GenBank) zeigte für die Basenfolge des PCR-Produktes große Übereinstimmung mit dem C-terminalen Bereichen der katalytischen Untereinheiten bekannter RRasen (Tab. 3.2). Ein durchgehendes Leseraster konnte nicht gefunden werden, was sicherlich an Fehlern bei der PCR liegt. Außerdem wurde das PCR-Produkt nicht komplett doppelsträngig sequenziert, so daß auch dadurch nicht alle Fehler beseitigt wurden. Aber lange Abschnitte der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wiesen große Übereinstimmung mit den Produkten der in Tabelle 3.2 angegebenen Gene auf. Bei einer so großen Ähnlichkeit konnte man davon ausgehen, daß das amplifizierte DNA-Fragment tatsächlich Teil eines RRase-Gens war und dieses Gen ebenfalls in die *nrdEF*-Familie eingeordnet werden muß. Darum sollte es nach Markierung mit Digoxigenin gekoppeltem dUTP als Sonde für das Gen des CA1-Proteins eingesetzt werden.

1 Primer 1

**AGCAACCTGTGCTCGGAGAT**TCTGCAGGTCAACTCCCCATCCTCTTTCAACGATGACTTGAGCTACGAGG  
 TCGTTGGACACGAGCCTCTAAGACGTCCAGTTGAGGGGTAGGAGAAAGTTGCTACTGAACTCGATGCTCC  
 71  
 GGCAGTGACATCTCCTGCAACCTCGGCTCCATGAACATTGCTTTGGCGATGGATTCTCCAGACTTAAATG  
 CCGTCACTGTAGAGGTCGTTGGAGCCGAGGTACTTGTAAACGAAACCGCTACCTAAGAGGTCTGAATTTAC  
 141  
 GTCGAAGCTGCTATTTCGTGGCCTGACCGCAGTAGCGGACAAGACCGCTATCGATTCCGTCCGGTGGCAGC  
 CAGCTTCGACGATAAGCACCCGGACTGGCGTCATCGCCTGTTCTGGCGATAGCTAAGGCAGGCCACCGTGC  
 211  
 GGCAATGACCAGTCTCATGCCATCGGCCTGGGCCAGATGAACCTCCACGGCTACTCCATCGATCCGCCAC  
 CCGTTACTGGTCAGAGTACGGTAGCCGGACCCGGTCTACTTGGAGGTGCCGATGAGGTAGCTAGGCGGTG  
 281  
 TACGGCTCTGAAGAAGGCTTGGACTTTACCAATGCTTACTTCGCGGCAGTTGGGCCGCGAGCACATCTAC  
 ATGCCGAGACTTCTTCCGAACCTGAAATGGTTACGAATGAAGCGCCGTCAACCCGGCGCTCGTGTAGATG  
 351  
 AACCAAGATTGCCAAGGAGCGCGGCAGACCTTTAGTGAGTTTAAGTTTGTACGCAGCACTGCGTGCTTCC  
 TTGTTCTAACGGTTCCTCGCGCCGCTCTGGAAATCACTCAAATTCAAACATGCGTCTGTGACGCACGAAGG  
 421  
 GATAACTACGATCCAGCAGAGTTTGCACCACAGACCGATAGACTCCGACTACGCCCTCTGGGGTATTCTTC  
 CTATTGATGCTAGGTCTCTCAAACGTGGTGTCTGGCTATCTGAGGCTGATGCGGAGACCCATAAGAAG  
 491  
 ACTCCAAGTGCGGAAGACTGGGCAGATCTAAAGGCAGGTCAAGGAGCTTTTCGCTAACTCCACAATCCAC  
 TGAGGTTACGCCTTCTGACCCGTCTAGATTTCCGTCCAGTTCCTCGAAAAGCGATTGAGGTGTTAGGTG  
 561  
 GCAGTTCACCAACCGGTTTCGATCTCCTACTGAGGTTATGGAGCACGGTCTCTACAACCGCAACCTGCAG  
 CGTCAAGGTGGTTGGCCAAGCTAGAGGATGACTCCAATACCTCGTGCCAGAGATGTTGGCGTTGGACGTC  
 631  
 GAGATTCGCAAGGAAGGCAAGATTGATCAACAACCTACTTCTCGATTACCCCAATCGCTTCCAAGATT  
 CTCTAAGCGTTTCTTCCGTTCTAACTAGTTGTTGAGATGAAGGAGCTAAGTGGGTTAGCGAAGGTTCTAA  
 701  
 TTCCAGGATGCATACGAAGTGTCGTGCTACTACCCAGCTCCACACATGGACAACGACAACCTTGATTAC  
 AAGGTCCTACGTATGCTTCACAGCACAGATGATGGGTCGAGGTGTGTACCTGTTGCTGTTGGAACATAATG  
 771  
 GGCTTGTCTTTGACCCGGTCACGAAAAGATCATCGACACCTATGCAGTTGCTACGAAGTACGTCGACCAG  
 CCGAACAGAACTGGGCCAGTGCTTTTCTAGTAGCTGTGGATACGTCAACGATGCTTCATGCAGCTGGTC  
 841  
 TTGTTCTTCAAGGACACCGCGACCACCCGCGACATCAACCGCGCGCAGATCTACGCATGGCGCAAGGGCA  
 AACAAGAAGTTCTGTGGCGCTGGTGGGCGCTCTAGTTGGCGCGCTCTAGATGCGTACCGCGTTCCCGT  
 911  
 TTAAGACCCTGTACTACATCCGGCTGCG  
 AATTCTGG**GACATGATGTAGGCCGACGC**

Primer2

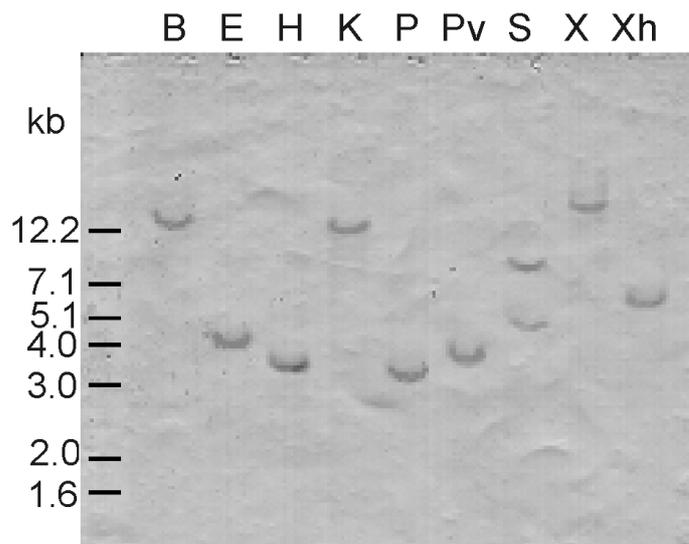
**Abbildung 3.6** Sequenz des 935 bp großen PCR-Produktes von *C. ammoniagenes*. Die Sequenzen der Primer, die zur Amplifizierung eines Teils des Gens für CA1 verwendet wurden, sind fett hervorgehoben.

**Tabelle 3.2** Sequenzähnlichkeit der CA1-Sonde mit Teilen bekannter Genen in Prozent

Organismus	Gen	identische Basen	Referenz
<i>M. tuberculosis</i>	R1-Gen	72 %	YANG et al. 1994
<i>E. coli</i>	<i>nrdE</i>	69 %	BLATTNER et al. 1997
<i>S. typhimurium</i>	<i>nrdE</i>	67 %	JORDAN et al. 1994a
<i>B. subtilis</i>	<i>nrdE</i>	59 %	SCOTTI et al. 1996

### 3.2.3. Identifizierung von Restriktionsfragmenten chromosomaler DNA von *C. ammoniagenes* mit der CA1-Sonde durch Southern Hybridisierung

Der nächste Arbeitsschritt galt der Identifizierung von Restriktionsfragmenten, die das Gen des CA1-Proteins tragen. Deshalb wurde chromosomale DNA von *C. ammoniagenes* mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Xba*I und *Xho*I in getrennten Ansätzen gespalten und bei einer Southern Hybridisierung mit der CA1-Sonde verwendet (Abb. 3.7).



**Abbildung 3.7** Southern blot chromosomaler DNA aus *C. ammoniagenes* mit der CA1-Sonde. B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; K = *Kpn*I; P = *Pst*I; Pv = *Pvu*II; S = *Sal*I; X = *Xba*I; Xh = *Xho*I.

Als Ergebnis der Hybridisierung waren Banden zwischen 3 und 16 kb angefärbt. Bis auf den *Sal*I-Verdau mit zwei Banden hatte in allen Ansätzen nur ein Fragment mit der CA1-Sonde hybridisiert. Die Verdau mit *Bam*HI, *Kpn*I und *Xba*I ließen eine Hybridisierung der Sonde mit Fragmenten erkennen, die größer als 12 kb waren und wegen ihrer Größe für die weitere Arbeit als unzweckmäßig angesehen wurden. Beim Verdau mit *Sal*I entstanden wie erwartet zwei Fragmente, da der Sondenbereich eine Erkennungssequenz dieses Restriktionsenzym enthält. Die Größe der beiden DNA-Stücke beträgt etwa 4,8 und 7 kb. Die restlichen Ansätze ließen jeweils nur eine positive Bande mit Größen zwischen 3,3 und 5,3 kb erkennen. Da die Fragmentgrößen, die bei den Verdau mit *Eco*RI, *Hind*III, und *Pst*I entstanden waren, ausreichten, um möglicherweise beide Gene der Mn-RRase zu tragen, wurde mit ihnen eine größenabhängige Teilgenbank von *C. ammoniagenes* erstellt (Kap. 2.19.13.).

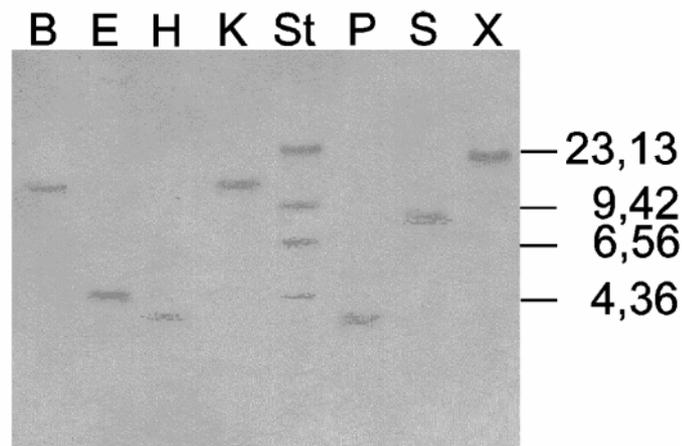
**3.2.4. Sondenentwicklung für das Gen des CA2-Proteins von *C. ammoniagenes***

Die nahe Verwandtschaft von *C. ammoniagenes* zu *M. tuberculosis*, die sich auch in den mehr als 70 % identischen Nucleotide der Gene der katalytischen RRase-Untereinheiten zeigte, konnte auch für *C. ammoniagenes* bedeuten, daß die RRase Gene wie bei *M. tuberculosis* getrennt liegen (YANG et al., 1994) und deshalb nicht auf einem Restriktionsfragment gemeinsam kloniert werden konnten. Als dann die Sequenzen der beiden Gene für die kleine metallhaltige Untereinheit (R2-1, R2-2) der *M. tuberculosis* RRase veröffentlicht wurden (YANG et al., 1997), war die Überlegung, daß die ausgeprägte Ähnlichkeit der Sequenz der Gene der katalytischen Untereinheiten auch für die Gene der zweiten Untereinheit zutreffen müßte. Diese Ähnlichkeit der DNA ausnutzend sollte eine Sonde für das CA2-Gen direkt aus der Amplifikation von *M. tuberculosis*-DNA mit Primern, spezifisch für die Enden der Gene von R2-1 und R2-2, gewonnen werden. YANG et al. (1997) berichten, daß nur aus einem der beiden Gene eine funktionsfähige Untereinheit der RRase gebildet wird, aber trotzdem sollten beide Gene als Sonde bei der Suche nach dem entsprechenden Gen von *C. ammoniagenes* eingesetzt werden, um eventuellen Variationen in der *C. ammoniagenes* Sequenz eher begegnen zu können.

**3.2.5. Identifizierung von Restriktionsfragmenten chromosomaler DNA von *C. ammoniagenes* mit Sonden für das Gen des CA2-Proteins durch Southern Hybridisierung**

Die Sonden für das Gen des CA2-Proteins (Kap. 2.19.14.) wurden zuerst in einer Hybridisierung nach Southern zusammen mit Gesamt-DNA von *C. ammoniagenes* eingesetzt, um zu sehen, ob es sich überhaupt lohnte, sie zur Identifizierung des CA2-Gens einzusetzen. Es zeigte sich, daß mit beiden Sonden die gleichen Banden markiert wurden, aber die aus dem Gen von R2-1, der inaktiven Untereinheit von *M. tuberculosis*, hervorgegangene Sonde führte zu einer deutlich schwächeren Färbung als die R2-2-Sonde, da sie wahrscheinlich weniger mit dem Gen des CA2-Proteins übereinstimmte. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen nur noch die Sonde aus dem R2-2 Gen eingesetzt. Zur Identifizierung von Restriktionsfragmenten, die das Gen der metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* trugen, war die DNA mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I und *Xba*I geschnitten worden. Da etwa 70 % der Base die Sonden mit dem gesuchten Gen, wurde die Hybridisierung unter wenig stringenten Bedingungen durchgeführt (Kap. 2.19.11.). Bei der Färbung wurden die markierten Banden bei mehr als 12 kb in den Ansätzen mit *Bam*HI, *Kpn*I und *Xba*I, bei 7,5 kb mit *Sal*I, 4,3 kb mit *Eco*RI und etwa 3,6 kb mit *Hind*III sichtbar. Bei dem Verdau mit *Pst*I wurde eine ca. 3,6 kb Bande markiert, aber zusätzlich erschien noch eine zweite schwächere Bande von etwa 2 kb (Abb. 3.8). Die Betrachtung von Verteilung und Größe der positiven Fragmente aus der Hybridisierung mit der CA1-Sonde (Abb. 3.7) und der Fragmente, die jetzt mit der R2-2-Sonde eine Färbung ergaben, ließ eine sehr

große Übereinstimmung der beiden Bandenmuster erkennen. Abgesehen von einer zweiten Bande im *SalI*-Verdau, die auf eine Schnittstelle innerhalb der CA1-Sondensequenz zurückgeführt werden kann, war kein Unterschied festzustellen. Eine Erklärung dafür konnte nur sein, daß die beiden Gene auf dem Chromosom von *C. ammoniagenes* relativ eng beieinander, wenn nicht sogar direkt hintereinander liegen und deshalb auch auf einem Fragment lokalisiert sind. Daß bei der Hybridisierung unter wenig stringenten Bedingungen bei den sieben verschiedenen Verdauungen immer nur ein Fragment detektiert wurde, weist darauf hin, daß in *C. ammoniagenes* sehr wahrscheinlich nur ein Gen für die kleine Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase vorhanden ist.



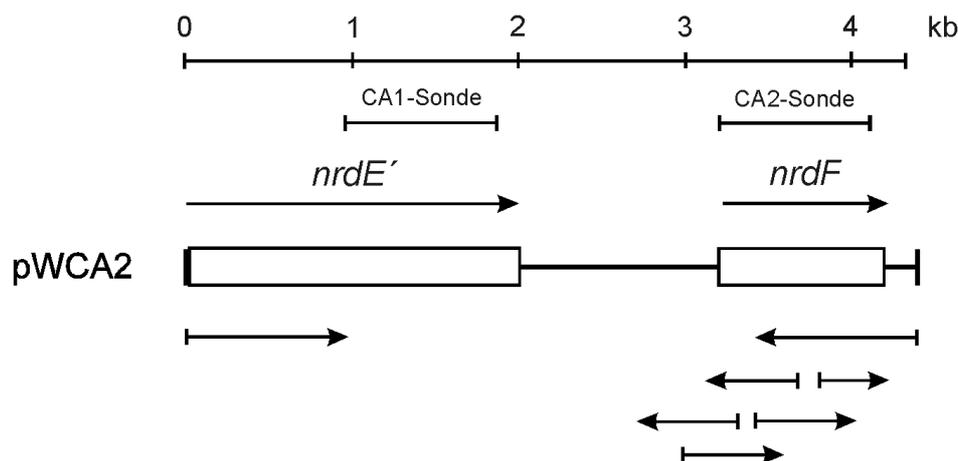
**Abbildung 3.8** Southern Blot chromosomaler DNA aus *C. ammoniagenes* mit der R2-2-Sonde. B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; K = *Kpn*I; P = *Pst*I; S = *Sal*I; X = *Xba*I; St = λ-Standard.

Die enge Kopplung der Gene für die beiden Untereinheiten der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* ließ deren gemeinsame Klonierung in einem Schritt möglich erscheinen. Jetzt konnte also auf die bereits angelegten Teilgenbanken zurückgegriffen werden (Kap. 3.2.3.). Die Teilgenbank, die die *Eco*RI-Fragmente enthielt (Kap. 2.19.13.), wurde für die weiteren Arbeiten ausgewählt, da das 4,3 kb *Eco*RI-Fragment von der Größe her gut handhabbar erschien und beide Gene darauf Platz finden konnten. Um möglichst viele Klone auf einmal nach dem richtigen *Eco*RI-Fragment durchsuchen zu können, wurde die Stammkultur, die die Genbank enthielt, verdünnt und zu Einzelkolonien ausgestrichen. Immer 10 Einzelkolonien wurden dann zu einer Mischkultur vereinigt und für die Plasmidisolierung angezogen. Nach dieser wurden die isolierten Plasmide mit *Eco*RI geschnitten, elektrophoretisch getrennt und anschließend durch Southern Hybridisierung mit den Sonden überprüft. In einer der Mischkulturen konnte so das Fragment mit den RRase-Genen gefunden werden. Aus dieser wurden nach erneuter Vereinzelung wieder Einzelkolonien für die Plasmidisolierung angezogen und nach

gleicher Methode, wie eben beschrieben, nach den RRase-Genen durchsucht. Schon unter den ersten 30 Isolaten befand sich ein Klon mit dem gesuchten DNA-Fragment, das mit beiden Gensonden hybridisierte.

### 3.2.6. Sequenzierung des Gens des CA2-Proteins der Mn-RRase von *C. ammoniagenes*

Die Sequenzierung des Gens des CA2-Proteins auf dem 4,3 kb *EcoRI*-Fragment wurde durch „primer walking“ (SLIGHTOM et al., 1994; VOSS et al., 1995; WIEMANN et al., 1995) bewerkstelligt. Dabei bestätigte sich, daß das Gen für CA1 nur teilweise auf dem Fragment vorhanden ist, denn die ersten ca. 200 Basenpaare fehlen auf dem Fragment. Abbildung 3.9 vermittelt eine Übersicht über die Lage der Gene auf dem Fragment und die Sequenzierstrategie. Die Besonderheit der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* liegt darin, daß in der metallhaltigen Untereinheit Mangan zur Bildung des proteingebundenen Radikals verwendet wird. Aus dem großen Interesse an CA2 wurde deshalb das CA2-Gen zuerst sequenziert (Abb. 3.10).



**Abbildung 3.9** Anordnung von *nrdE'* und *nrdF* auf dem 4,3 kb *EcoRI* Fragment von pWCA2. Die Pfeile im unteren Teil der Abbildung geben die sequenzierten Bereiche an.

### 3.2.7. Sequenzanalyse des *nrdF* Gens von *C. ammoniagenes*

Die Vergleiche der Sequenz des CA2-Gens (Abb. 3.10) mit den in Datenbanken (GenBank) gespeicherten Sequenzinformationen zeigte die erwartete große Übereinstimmung mit *nrdF2* von *M. tuberculosis* und den *nrdF*-Genen der *Enterobacteriaceae* und *B. subtilis*. Auf Proteinebene waren diese Ähnlichkeiten noch ausgeprägter (Tab. 3.3). Die Vergleiche der Sequenz der CA1-Sonde (siehe auch Kap. 3.2.2.) wie auch die des CA2-Gens bestätigten, daß die Gene der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* zur *nrdEF*-Familie gehören und dementsprechend als *nrdEF* bezeichnet werden sollen.

**Tabelle 3.3** Identische Aminosäuren der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Gens des CA1-Proteins mit anderen Proteinen in Prozent

Organismus	Protein	identische AS	Referenz
<i>M. tuberculosis</i>	R2F	87 %	YANG et al. 1997
<i>E. coli</i>	R2F	82 %	BLATTNER et al. 1997
<i>S. typhimurium</i>	R2F	80 %	JORDAN et al. 1994a
<i>B. subtilis</i>	R2F	52 %	SCOTTI et al. 1996

```

GCCACATTGAGATGCGGCACCCGAGCGGCTGAAGGGTTGGTTATTGGTATGCTGGGAGGCTGAAATGATA      70
      -35                               -10
AAACTTTTTCGAGGTAGAGCAGGGTAGGTTGATTTTCGTGTCGAATGAATATGACGAGTACATCGCTAACCA      140
      RBS                               M S N E Y D E Y I A N
CACAGATCCGGTAAAAGCGATTAAGTGAACGTCATTCCCGACGAGAAAGACTTGGAAAGTTTGGGACCGT      210
H T D P V K A I N W N V I P D E K D L E V W D R
CTGACTGGTAACTTCIGGTTGCCAGAAAAGATTCCAGTATCCAATGACATTCAGAGCTGGAACAAGATGA      280
L T G N F W L P E K I P V S N D I Q S W N K M
CTCCGCAAGAACAGCTAGCGACCATGCGTGTGTTTACCGGCTTGACACTCTTGGACACCATCCAGGGCAC      350
T P Q E Q L A T M R V F T G L T L L D T I Q G
GGTGGGCGCAATTTCTTTGCTGCCGATGTTGAAACCATGCATGAGGAAGGCGTGTACACCAACATTGCC      420
T V G A I S L L P D V E T M H E E G V Y T N I A
TTCATGGAATCCGTACACGCGAAGTCTTATTCCAATATCTTTATGACCTTGGCATCGACTCCGCAGATTA      490
F M E S V H A K S Y S N I F M T L A S T P Q I
ATGAAGCATTCCGCTGGTCTGAAGAAAACGAAAACCTTCAGCGTAAGGCAAAGATCATCATGTCTTACTA      560
N E A F R W S E E N E N L Q R K A K I I M S Y
CAACGGTGATGACCCACTGAAGAAGAAGGTAGCTTCCACGCTTTTGGAAATCCTTCTTGTCTACTCCGGT      630
Y N G D D P L K K K V A S T L L E S F L F Y S G
TTCTACCTGCCGATGTACCTGTCTCGCGCGCAAGCTGACTAATACCGCTGATATTATTCGCCTCATT      700
F Y L P M Y L S S R A K L T N T A D I I R L I
TTCGTGATGAATCCGTGCACGGCTACTACATTGGCTACAAGTACCAGCAGGGTGTGAAGAAGCTTTCTGA      770
I R D E S V H G Y I G Y K Y Q Q G V K K L S
GGCTGAGCAGGAAGAATAACAAGGCATACACCTTCGACCTTATGTACGATCTGTACGAAAACGAGATTGAG      840
E A E Q E E Y K A Y T F D L M Y D L Y E N E I E
TACACCGAGGATATCTACGATGACTTGGGCTGGACCGAAGACGTTAAGCGTTTCTGCGCTACAACGCTA      910
Y T E D I Y D D L G W T T E D V K R F L R Y N A
ATAAGCGCTAAACAACCTTGGGCTACGAAGGTCTCTTCCAACTGATGAGACCAAGGTATCGCCAGCGAT      980
N K A L N N L G Y E G L F P T D E T K V S P A
CTTGTCTTCGCTGAGCCCGAACGCTGACGAAAACCACGACTTCTTCTGTTCTGGTTCTTCTCTAGGTT      1050
I L S S L S P N A D E N H D F F S G S G S S Y V
ATTGGTAAGGCCGAAGACCACTGACGATGACTGGGACTTCTAAAATAGCCTGCTAGGCATAGGTGGTT      1120
I G K A E D T T D D W D F---
ATTGCCTGATAAGCGCGGATGATTCACGTAGTGAGCCTTCGCCGCTTTTGTGATCGCGGGGATTGCCCA      1190

GAGCATCGAAAATGCTTGTGATCGGCGAAAACGCCCATGAACTCACTCTTGGCAAGCTTTGCTAATGACC      1260

GCGCATCATTCTATTGGATGACAACAACCTGGGGGGTTGAAGCGGTGAGTTGGGGGAGGTTTTGCCCGGGA      1330

ATTCGTAATC      1340

```

**Abbildung 3.10** Sequenz von *nrdF* aus *C. ammoniagenes* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Das Startcodon und die möglichen Promotersequenzen sind fett gedruckt. Die mögliche Ribosomenbindestelle (RBS) ist unterstrichen. Die Sequenz ist unter der Zugangsnummer AF050168 in der GenBank Datenbank deponiert.

Der GC-Anteil des *nrdF* Gens von *C. ammoniagenes* ist mit 48,4 % sehr niedrig für Corynebakterien, doch gibt es bei *C. diphtheriae* und *C. xerosis* Beispiele für Gene mit ähnlich niedrigem Basenverhältnis. Die Werte für die meisten Gene liegen zwischen 50 und 65 % (MALUMBRES et al., 1993). Der Codon-Gebrauch von *C. ammoniagenes* (Tab. 3.4) ist dem von *C. glutamicum* sehr ähnlich (EIKMANN, 1992). Auf Grund des relativ

hohen AT-Gehaltes von *nrdF* sind allerdings für einige Aminosäuren die Anteile der AT-reichen Codons leicht erhöht.

**Tabelle 3.4** Codon-Gebrauch für das *C. ammoniagenes nrdF* Gen

Amino- säure	Codon	Anzahl der Codons in <i>nrdF</i>	Amino- säure	Codon	Anzahl der Codons in <i>nrdF</i>	Amino- säure	Codon	Anzahl der Codons in <i>nrdF</i>
Ala	GCU	6 (31,6)	Gly	GGU	8 (50,0)	Pro	CCU	0
	GCC	2 (10,5)		GGC	8 (50,0)		CCC	2 (16,6)
	GCA	5 (26,3)		GGA	0		CCA	5 (41,7)
	GCG	6 (31,6)		GGG	0		CCG	5 (41,7)
Arg	CGU	5 (55,6)	His	CAU	1 (20,0)	Ser	UCU	9 (36,0)
	CGC	4 (44,4)		CAC	4 (80,0)		UCC	9 (36,0)
	CGA	0	Ile	AUU	14 (66,7)		UCA	0
	CGG	0		AUC	7 (33,3)	UCG	5 (20,0)	
	AGA	0		AUA	0	AGU	0	
	AGG	0			AGC	2 (8,0)		
Asn	AAU	6 (28,6)	Leu	UUA	0	Thr	ACU	6 (27,3)
	AAC	15 (71,4)		UUG	11 (38,0)		ACC	12 (54,6)
Asp	GAU	10 (38,5)		CUU	4 (13,8)		ACA	2 (9,1)
	GAC	16 (61,5)		CUC	3 (10,3)	ACG	2 (9,1)	
					CUA	2 (6,9)	Trp	UGG
Cys	UGU	0	Lys	CUG	9 (31,0)	Tyr		UAU
	UGC	0		AAA	2 (10,5)		UAC	20 (90,9)
End	UAA	1 (100)	Met	AAG	17 (89,5)	Val	GUU	4 (25,0)
	UAG	0		AUG	8 (100)		GUC	1 (6,3)
	UGA	0	Phe	UUU	2 (14,3)		GUA	5 (31,2)
Gln	CAA	1 (11,1)		UUC	12 (85,7)		GUG	6 (37,5)
	CAG	8 (89,9)						
Glu	GAA	20						
	GAG	9						

Die Werte in den Klammern sind die Prozentangaben eines Codons für eine Aminosäure.

Das *nrdF* Gen umfaßt 993 bp und beginnt mit dem Codon GTG, das sehr wahrscheinlich als Methionin übersetzt wird (Abb. 3.10). Stromaufwärts in einem Abstand von 8 Basenpaaren findet man eine Purin-reiche Region (AGGGTAGG), die eine Ribosomenbindestelle sein kann, da sie teilweise komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA von *C. ammoniagenes* (PASCUAL et al., 1995) ist. Ein möglicher Promotor könnte zwischen 55 und 84 Basenpaaren stromaufwärts vom Startcodon liegen. Hier findet man Bereiche, die den Consensussequenzen von Promoterern der Corynebakterien (PÁTEK et al., 1996) sehr ähnlich sind. Stromabwärts von *nrdF* konnte kein Transkriptionsterminator ermittelt werden. Eine polycistronische mRNA der beiden *nrd* Gene von *C. ammoniagenes*, wie sie in *B. subtilis* (SCOTTI et al., 1996) oder *E. coli* (SUN & FUCHS, 1992) beschrieben wurde, ist schon wegen des Abstandes der Gene

unwahrscheinlich (Abb. 3.9) und da die gefundenen -10 und -35 Boxen für einen eigenen Promotor von *nrdF* sprechen, wäre dies ein weiterer Hinweis auf eine separate Transkription.

Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergibt sich für NrdF von *C. ammoniagenes* ein Molekulargewicht von 38,3 kDa, das damit deutlich hinter den 50 kDa, die von WILLING et al. (1988a) bestimmt wurden, zurückbleibt.

### 3.2.8. Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Genprodukte von *nrdE* und *nrdF*

Die Sequenzierung und die Vergleiche der Basenabfolgen sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen haben gezeigt, daß die in dieser Arbeit klonierten Gene aus *C. ammoniagenes* zur *nrdEF*-Familie gehören. Ob diese Gene wirklich die Gene der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* sind und ob sie überhaupt wie in *B. subtilis* oder *M. tuberculosis* für funktionsfähige Proteine kodieren, kann aus der Sequenzähnlichkeit nicht geschlossen werden. Deshalb mußte unbedingt nachgewiesen werden, daß die Genprodukte der klonierten Gene in *C. ammoniagenes* an der Ribonucleotid-Reduktion beteiligt sind.

*C. ammoniagenes* ist es nicht möglich, Desoxyformen von Nucleotiden oder Derivaten davon aus dem Medium aufzunehmen, um so einer gestörten Ribonucleotid-Reduktion zu begegnen (AULING & FOLLMANN, 1994; AULING et al., 1982; AULING, 1980). Deshalb kann man sehr leicht auch auf Vollmedium-Platten durch Zugabe von Hydroxyharnstoff (HU) die Ribonucleotid-Reduktase hemmen, so daß durch das Ausbleiben der DNA-Synthese die Zellteilung nicht mehr möglich ist. Der Inhibitor HU hemmt RRasen mit einem stabilen proteingebundenen Radikal, indem er das für die Ribonucleotid-Reduktion notwendige protein-gebundene Radikal in der metallhaltigen Untereinheit löscht (LABMANN et al., 1992). Ein erhöhter Pegel dieser Untereinheit führt zu mehr Radikalen in der Zelle und es sollte mehr HU benötigt werden, um alle zu löschen. Dieser Effekt führt bei rekombinanten *E. coli*-Stämmen, die für die gezielte Überexpression von *nrdB* benutzt werden, nach Induktion sogar zu einer Toleranz der 50fach erhöhten HU-Konzentrationen (SJÖBERG et al., 1986). Für *C. ammoniagenes* sollte hier nur der Gendosiseffekt ausgenutzt werden, bei dem die erhöhte Kopienzahl eines Gens in der Zelle das Vorhandensein von mehr Genprodukten zur Folge hat. Wenn *nrdF* aus *C. ammoniagenes* eine funktionsfähige metallhaltige Untereinheit kodiert, sollte ein ähnlicher Effekt wie bei *E. coli* zu erkennen sein.

Um *nrdF* in *C. ammoniagenes* einbringen zu können, wurde das *EcoRI*-Fragment in den mobilisierbaren *E. coli/Corynebacterium* shuttle Vektor pECM2 (JÄGER et al., 1992) kloniert. Das entstandene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pWCA5. Dieses Plasmid wurde danach in den *E. coli* Donorstamm S17-1 (SIMON et al., 1983) transformiert und schließlich durch RP4 vermittelte Konjugation (SCHÄFER et al., 1990) in den *C. ammoniagenes*-Wildtyp und die temperatursensitiven Mutanten CH31 und CH33 transferiert (Kap. 2.19.10.3.). Im ersten Schritt wurde auf den Erwerb der Vektor-

kodierten Kanamycinresistenz selektioniert, wobei 34, 11 bzw. 17 Transkonjuganten erhalten wurden. Diese Zellen wurden dann auf LB-Medium, das Kanamycin und verschiedene Konzentrationen HU enthielt, ausplattiert. Tatsächlich war es den Zellen, die pWCA5 enthielten, möglich, auf Platten mit 6 mM HU noch zu wachsen, während Kontrollstämme, die lediglich pECM2 erhalten hatten, nur 1 mM tolerierten und bei 2 mM nicht mehr zur Zellteilung fähig waren (Tab. 3.5). Grob überschlagen kann man hier von einer etwa 6fach erhöhten Toleranz gegenüber HU sprechen, wenn das Plasmid pWCA5 vorhanden ist, also mehrere Kopien des Gens für CA2, der Radikal-haltigen Untereinheit, vorliegen. In Corynebakterien liegen je nach Größe des Inserts etwa 10 Kopien des Vektors vor (J. KALINOWSKI, persönliche Mitteilung), was mit einer 6 fach erhöhten HU-Toleranz durchaus in Einklang zu bringen ist. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß das Plasmid pWCA5 eine funktionell aktive Metall- und Radikal-haltige Untereinheit von *C. ammoniagenes* kodiert.

Der gleiche Versuch wurde auch mit *C. glutamicum* R163 als Rezipient für pWCA5 durchgeführt. Das Ergebnis (Tab. 3.5) entsprach genau dem mit den *C. ammoniagenes*-Stämmen. Die Gegenwart von pWCA5 vermittelte im Vergleich mit Zellen, die pECM2 enthielten, eine etwa 6fache Erhöhung der HU-Toleranz. Daraus kann man schließen, daß die heterologe Expression des Gens für CA2 in *C. glutamicum* R163 ebenfalls zu der Bildung eines Proteins mit einem funktionellen Radikal führt. Dies ist ein Ergebnis, das in Hinsicht auf eine spätere heterologe Überexpression von Bedeutung ist.

**Tabelle 3.5** HU-Toleranz von *C. ammoniagenes* Stämmen und *C. glutamicum* R163 mit den Plasmiden pECM2 und pWCA5 auf LB-Medium und Vergleich der relativen RRase-Aktivität

Stamm	HU-Konzentration					rel. RRase Aktivität
	0 mM	1mM	2mM	4mM	6mM	
<i>C. ammonia. /pECM2</i>	+	+	-	-	-	100%
CH31/pECM2	+	+	-	-	-	n.b.
CH33/pECM2	+	+	-	-	-	n.b.
R163/pECM2	+	+	-	-	-	n.b.
<i>C. ammonia. /pWCA5</i>	+	+	+	+	+/-	125%
CH31/pWCA5	+	+	+	+	+/-	n.b.
CH33/pWCA5	+	+	+	+	+/-	n.b.
R163/pWCA5	+	+	+	+	+/-	n.b.

+ = Wachstum; - = kein Wachstum; +/- = schlechtes Wachstum; n.b.= nicht bestimmt

In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob der multi-copy-Effekt nach Transformation mit pWCA5 bei den *C. ammoniagenes* eine Auswirkung auf den Umsatz von Ribonucleotiden hat. Dazu wurden *C. ammoniagenes*-Zellen, die pECM2 bzw. pWCA5 durch Gentransfer erhalten hatten, nach dem Protokoll von LUO (1994) angezogen und mit Ether für Nucleotide permeabel gemacht. Der anschließende RRase-Standardtest offenbarte, daß die Zellen mit pWCA5 in der gleichen Zeit im Durchschnitt

etwa 25 % mehr Ribonucleotide reduzierten als der Kontrollstamm mit pECM2 (Tab. 3.5).

Obwohl *nrde*, das Gen der katalytischen Untereinheit, nicht vollständig auf dem Plasmid pWCA5 enthalten war und deshalb eine genetische Komplementation der Mutanten CH31 und CH33 nicht erwartet wurde, sollte die Auswirkung der Konjugation auf die Thermosensitivität untersucht werden. Auf LB-Platten ausgestrichen wurden die Plasmid-haltigen Stämme bei 37°C als nicht permissiver Temperatur und bei 27°C als permissiver Temperatur inkubiert. Dabei zeigte sich bei 37°C keine Komplementation der Mutanten. Jedoch traten bei den Mutanten mit pWCA5 Revertanten auf, die bei den Ausstrichen der Mutanten nur mit pECM2 fehlten. Der Grund für die Reversion muß auf homologe Rekombination zwischen dem verkürzten Gen für CA1 auf pWCA5 und dem Gen im Chromosom zurückgeführt werden. Dabei wurden die Bereiche, die für den Defekt von CA1 verantwortlich sind ausgetauscht, so daß offensichtlich wieder der Wildphänotyp entstand.

### 3.3. Klonierung der RRase-Gene von *C. glutamicum*

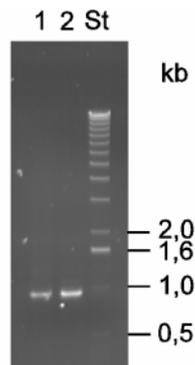
Aus der engen verwandtschaftlichen Beziehung von *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* konnte man eine große Bedeutung für die RRase von *C. glutamicum* ableiten. Die Gattung *Corynebacterium* befindet sich im phylogenetischen Zweig der mykolsäurehaltigen Bakterien (COLLINS & CUMMINS, 1986), bei denen eine Mangan-abhängige DNA-Synthese beschrieben wurde (WEBLEY, 1960; WEBLEY et al., 1962; LAMMERS & FOLLMANN, 1983) (siehe Einleitung). Deshalb lag der Gedanke nahe, daß auch *C. glutamicum* eine Mn-RRase besitzt, zumal die teilweise gereinigten Untereinheiten der *C. ammoniagenes* Mn-RRase mit denen der *C. glutamicum* RRase kooperierten (Kap. 3.1.4.), d.h. sie bildeten Hybridproteine, die zur Ribonucleotid-Reduktion befähigt waren. Gerade nachdem sich die Klonierungsarbeiten mit *C. ammoniagenes* langwieriger als erwartet gestalteten, bot sich mit der Möglichkeit, eine schon bestehende *C. glutamicum*-Cosmidbank (BATHE et al., 1996) zu durchsuchen, eine neue Gelegenheit, an die Gene einer Mn-RRase zu gelangen.

Mit der Entwicklung der degenerierten Primer (Kap. 3.2.1.) war auch schon das erste Werkzeug zur Erstellung einer Sonde für die *C. glutamicum* RRase vorhanden. Bei der Anwendung der Primer auf *C. glutamicum* galten schließlich die gleichen theoretischen Überlegungen wie für *C. ammoniagenes*.

#### 3.3.1. Entwicklung der CG1-Sonde und Anwendung beim Screening einer *C. glutamicum*-Cosmidbank

Für die Herstellung einer spezifischen Sonde für das Gen der katalytischen Untereinheit der RRase von *C. glutamicum* konnten dieselben Primer benutzt werden, die bereits für die CA1-Sonde erfolgreich verwendet wurden. Sie wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben zusammen mit Gesamt-DNA von *C. glutamicum* in der PCR eingesetzt. Es entstand ein einzelnes Produkt, welches auf dem Kontrollgel die gleiche Größe wie das von *C. ammoniagenes* offenbarte (Abb. 3.11). Ergänzende Versuche zeigten, daß dieses PCR-Produkt auch unter stringenteren Bedingungen, nach Erhöhung der Anlagerungstemperatur der Primer auf 49°C, gebildet wurde. Da es deshalb unwahrscheinlich erschien, daß mit den Primern, die nach dem *C. glutamicum*-Codongebrauch entwickelt worden waren, unter stringenteren Bedingungen ein gleich großes, aber zu einem gänzlich anderen DNA-Bereich gehörendes Fragment entstanden sein sollte, wurde eine Sequenzierung des Amplifikates zur Kontrolle nicht durchgeführt. Es wurde sofort mit Digoxigenin markiert und als Sonde benutzt.

Die Cosmidbank, die für die Suche nach dem Gen von CG1 benutzt werden sollte, war unter Verwendung von SuperCos1 (Stratagene) angelegt worden (BATHE et al., 1996). Mit diesem Vektor war es möglich pro Klon etwa 40 kb chromosomaler DNA des Zielorganismus zu verpacken. Bei einer Genomgröße von 3.080 kb (BATHE et al., 1996) sollte es ausreichend sein, 576 Cosmidklone (Cosmidnr. 501 -1076) zu untersuchen, um



**Abbildung 3.11** PCR-Produkt von *C. glutamicum* (Bahn 1) nach Amplifikation chromosomaler DNA unter Verwendung der abgeleiteten Primer (Kap. 3.1.2.1.). In Bahn 2 ist das gereinigte 935 bp PCR-Produkt von *C. ammoniagenes* und unter St ist der Molekulargewichtsstandard.

sicher zu sein, annähernd das gesamte Genom von *C. glutamicum* durchsucht zu haben. Für das Durchsuchen der *C. glutamicum* Genbank wurden die Klone, zwecks späterer Identifizierung, nach Überführung in Mikrotiterplatten in einem geordneten Raster auf Nylonmembranen übertragen und dann auf entsprechend großen Agarplatten mit Selektivmedium über Nacht inkubiert. In der darauf folgenden Koloniehybridisierung mit der CG1-Sonde konnten 19 positive Klone auffindig gemacht werden. Da es bei Koloniehybridisierungen häufig zu Kreuzreaktionen mit Zellresten kommt, wurden aus den 19 positiven Kulturen die Cosmide isoliert und mit *EcoRI* verdaut. Nach der elektrophoretischen Trennung der Fragmente wurde erneut eine Hybridisierung durchgeführt. Dabei hybridisierte die CG1-Sonde mit den Cosmiden 635, 636, 810 und 944 jeweils mit einem etwa 1,2 kb und einem 1,8 kb großen Restriktionsfragment, während die restlichen 15 Klone kein positives Signal gaben.

Die vier Cosmide, die mit der CG1-Sonde hybridisierten, wurden im nächsten Schritt mit *EcoRI* verdaut und die Restriktionsmuster auf einem Agarosegel verglichen. Weil das Restriktionsmuster von Cosmid 810 für die Isolierung des 1,2 kb *EcoRI*-Fragments am günstigsten war, wurde das Fragment von diesem Ansatz aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in pUC18 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde mit pWCG2 bezeichnet. Schließlich wurde das Insert von beiden Seiten ansequenziert, um zu kontrollieren, ob es sich hierbei wirklich um einen Teil des Gens des CG1-Proteins handelte. Der anschließende Sequenzvergleich offenbarte 71 % Übereinstimmung mit dem Gen der R1-Untereinheit aus *M. tuberculosis*, 66 % mit *nrdE* von *E. coli* und 63 % mit *nrdE* von *S. typhimurium* (Tab. 3.6). Es handelte sich jeweils um Bereiche in der hinteren Hälfte der Gene. Diese große Ähnlichkeit bekräftigte, daß das Gen der katalytischen Untereinheit der RRase von *C. glutamicum* auf dem Cosmid 810 liegen mußte. Deshalb wurde für die weiteren Klonierungsarbeiten das Cosmid 810 verwendet.

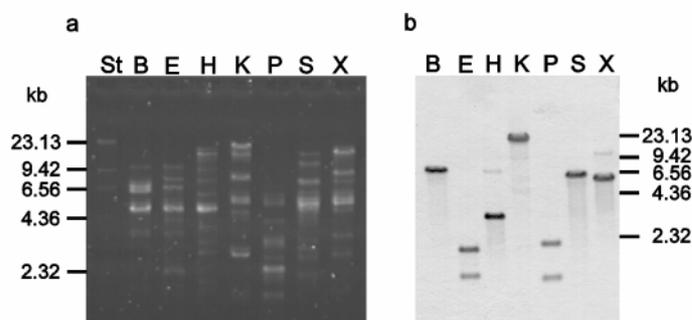
**Tabelle 3.6** Sequenzähnlichkeit des 1,2 kb *EcoRI*-Fragmentes mit Teilen bekannter Gene

Organismus	Gen	identische Basen	Referenz
<i>M. tuberculosis</i>	R1-Gen	71 %	YANG et al. 1994
<i>E. coli</i>	<i>nrdE</i>	66 %	BLATTNER et al. 1997
<i>S. typhimurium</i>	<i>nrdE</i>	63 %	JORDAN et al. 1994a

### 3.3.2. Subklonierung und Sequenzierung von *nrdH*, *nrdI* und *nrdE* aus *C. glutamicum*

Für die weiteren Arbeiten galt es jetzt von den etwa 40 kb chromosomaler DNA von *C. glutamicum*, die in dem CG1-positiven Cosmids 810 inseriert waren, zu einem kleineren Fragment zu gelangen, welches das ganze ca. 2,2 kb umfassende Gen des CG1-Proteins tragen konnte. Um solche kleineren Fragmente zu identifizieren, wurde das Cosmid in getrennten Ansätzen mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I und *Xba*I verdaut und nach Agarosegelelektrophorese mit der CG1-Sonde hybridisiert (Abb. 3.12a). Es wurden CG1-positive Banden zwischen 1 und ca. 6,2 kb auf dem Blot entdeckt. In den Bahnen, die die mit *Bam*HI, *Sal*I und *Xba*I geschnittene DNA enthielten, wurden Fragmente von etwa 6 kb mit der Sonde detektiert. Im *Hind*III-Ansatz war es ein ca. 3,1 kb langes Stück und im *Pst*I-Ansatz erschienen bei 1,1 kb und 2,0 kb Banden. Nach Verdau mit *Eco*RI zeigte sich wie erwartet wieder ein Signal bei 1,2 kb und eines bei 1,8 kb.

Interessant für die weitere Klonierung waren die Fragmente, die größer als 3 kb waren, da hier die Möglichkeit bestand, daß das gesamte Gen auf einem von diesen lag. In einem zusätzlichen Experiment wurde versucht, durch einen Doppelverdau mit *Bam*HI und *Xba*I ein Fragment von weniger als 6 kb zu erhalten. Tatsächlich konnte eines von etwa 4,3 kb Länge identifiziert werden.

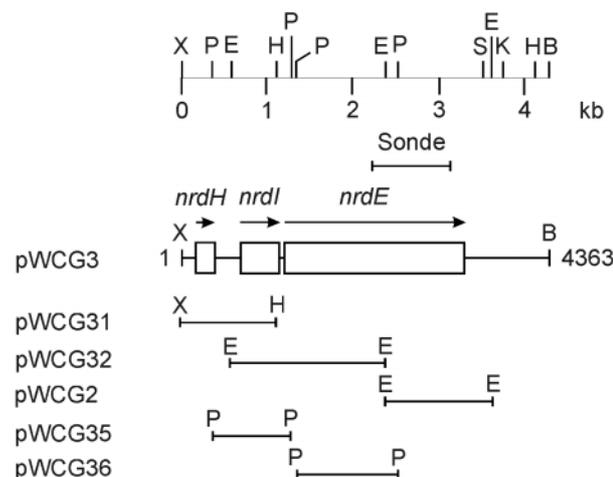


**Abbildung 3.12** Agarosegel nach Verdau des Cosmides 810 mit verschiedenen Restriktionsenzymen (a) und der anschließende „Southern blot“ mit der CG1-Sonde (b). B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; K = *Kpn*I; P = *Pst*I; S = *Sal*I; X = *Xba*I; St. =  $\lambda$  *Hind*III Standard.

Im Verlauf der Subklonierungen wurden das 6 kb *Sal*I- und das 4,3 kb *Bam*HI-*Xba*I-Fragment in pUC18 kloniert. Das Konstrukt aus pUC18 mit dem 4,3 kb *Bam*HI-*Xba*I-Fragment wurde als pWCG3 und das aus pUC18 mit dem *Sal*I-Fragment als pWCG4 bezeichnet (Kap. 2.2). Um sicher zu gehen, ob die klonierten Fragmente wirklich das Gen für CG1 enthielten, wurden pWCG4 und pWCG3 mit der CG1-Sonde

hybridisiert. Das Ergebnis war positiv. Im nächsten Schritt wurden die Inserts von pWCG3 und pWCG4 ansequenziert und die erhaltenen Basenfolgen mit Datenbanken abgeglichen. Im Fall des *Bam*HI-*Xba*I-Fragmentes konnte auf der *Bam*HI-Seite überhaupt keine Übereinstimmung mit bereits bekannten DNA-Abschnitten gefunden werden. Jedoch der Vergleich der *Xba*I-Seite zeigte 68 % Übereinstimmung mit dem offenen Leseraster eines möglichen Glutaredoxin aus *M. tuberculosis*, welches Teil eines Cosmidklons von *M. tuberculosis* war. Die Betrachtung der gesamten Sequenz offenbarte, daß auf diesem *M. tuberculosis* Cosmid etwa 500 bp hinter diesem offenen Leseraster das Gen der R1-Untereinheit beginnt. Zu *S. typhimurium* fanden sich über 60 % Übereinstimmung mit *nrdH*, einem Gen, das dort innerhalb des *nrdEF* Operons stromaufwärts von *nrdE* liegt. Diese Ergebnisse wurden als Bestätigung aufgefaßt, daß dieses *Bam*HI-*Xba*I-Fragment aus dem *C. glutamicum* Cosmid 810 das ganze Gen des CG1-Proteins beinhaltet, zumal ja auch die CG1-Sonde mit pWCG3 hybridisierte. Die Analyse der „forward“ Sequenz des *Sal*I-Fragmentes ergab fast 80 % Übereinstimmung mit dem C-terminalen Bereich des Gens für R1 von *M. tuberculosis*. Dies bedeutete, daß das CG1 ganz am Ende des Fragmentes lag und zwar mit dem hinteren Teil. Für das andere Ende des Fragmentes konnten keine Ähnlichkeiten gefunden werden. Da bei pWCG3 das Gen von CG1 zentral auf dem *Bam*HI-*Xba*I-Fragment lag, konnte möglicher stromabwärts von diesem ein Hinweis auf das Gen von CG2 gefunden werden. Deshalb wurde nur mit pWCG3 weiter gearbeitet.

Für die komplette doppelsträngige Sequenzierung des Gens von CG1 sollten jetzt Subklone von pWCG3 hergestellt werden, die dann von den Enden her sequenziert werden sollten. Für die danach gebliebenen Lücken müßten Primer erstellt werden, mit denen dann das endgültige Ergebnis erhalten werden konnte. Eine Restriktionsanalyse von pWCG3, bei der das Plasmid mit *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I und *Pst*I geschnitten wurde, um nach geeigneten Fragmenten für die Subklonierung zu suchen, ist in Abbildung 3.13



**Abbildung 3.13** Restriktionskarte von pWCG3 mit der Anordnung der darauf gefundenen Gene *nrdH*, *nrdI* und *nrdE* von *C. glutamicum*. Darunter sind die Subklone von pWCG3 gezeigt, die für die Sequenzierung mit pUC-Standardprimern verwendet wurden.

dargestellt. Dabei wurden auch die Restriktionsschnittstellen berücksichtigt, die aus den inzwischen vorhandenen Sequenzinformationen abgeleitet werden konnten. Für die weitere Sequenzierung erschien die Subklonierung des 1,8 kb *EcoRI*-Fragmentes und der beiden 0,9 bzw. 1,1 kb großen *PstI*-Fragmente nützlich. Bei dieser wurden die genannten DNA-Stücke wieder in pUC18 umklont. Ebenfalls wurde pWCG3 mit *HindIII* verdaut und danach sofort religiert, so daß nur ein etwa 1 kb großes Stück auf der *XbaI* zugewandten Seite im Vektor verblieb. Diese Konstrukte wurden der Sequenzierung zugeführt (Abb. 3.15). Anschließend wurden die erhaltenen Basenfolgen miteinander verglichen, um festzustellen, welche Bereiche schon bestimmt waren. (Abb. 3.13).

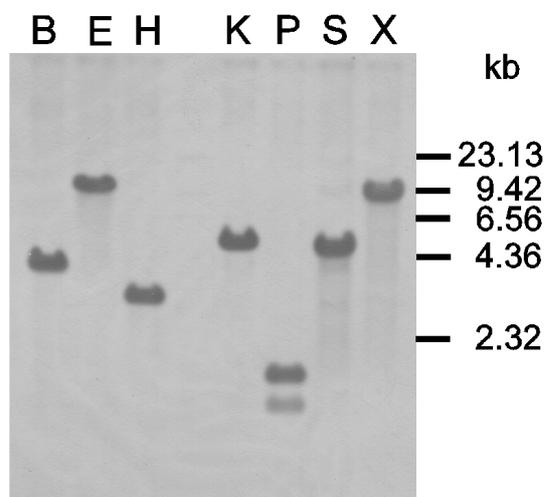
### **3.3.3. Identifizierung und Sequenzierung von *nrdF* aus *C. glutamicum***

Die Sequenzierung des 4,3 kb *BamHI-XbaI*-Fragmentes hatte keinen Hinweis auf das Gen für CG2 (*nrdF*) erbracht. Um aber auch dieses zu finden, sollte die gleiche Strategie wie bei der Klonierung von *nrdF* aus *C. ammoniagenes* angewendet werden (Kap. 3.2.4.). Die Ähnlichkeit der bereits klonierten *nrd*-Gene von *C. glutamicum* zu denen von *M. tuberculosis* war schließlich ebenso groß, so daß der Einsatz der aus der *M. tuberculosis*-DNA gewonnenen R2-2-Sonde erfolgversprechend schien.

Im ersten Teilschritt der Identifizierung von *nrdF* aus *C. glutamicum* sollten die Cosmidklone 635, 636, 810 und 944, die auch schon mit der CG1-Sonde hybridisiert hatten, untersucht werden. Dafür wurden die Cosmide mit *SalI* geschnitten und nach Southern mit der R2-2-Sonde hybridisiert. Nur bei dem Cosmid 810 erschien eine gefärbte Bande. Zur weiteren Untersuchung wurde Cosmid 810 mit *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SalI* und *XbaI* geschnitten und wieder mit der Sonde hybridisiert (Abb. 3.14). Es traten abgesehen von einem Verdau nur markierte Einzelbanden zwischen 3 und 9 kb auf. Im *PstI*-Ansatz erschienen zwei Banden von etwa 1 bzw. 1,4 kb. Da diese wegen des günstigen Restriktionsmusters am leichtesten zu isolieren waren, wurden sie für die ersten Sequenzierschritte ausgewählt. Nach erfolgter Isolierung wurden sie in pUC18 kloniert, so daß mit den Standardprimern zumindest von einer Seite sofort in RRase-Sequenzen hineingelesen werden konnte.

Die obligatorischen Sequenzvergleiche brachten die Bestätigung, daß im Fall des 1 kb *PstI*-Fragmentes 72 % Identität mit etwa 400 Basen des vorderen Teil des Gens der R2-2 Untereinheit von *M. tuberculosis* besteht, während das größere Fragment die gleiche Übereinstimmung mit knapp 560 Basen des hinteren Teils hat. Zusammen entspricht das in etwa der Größe des R2-2 Gens. Um aber beide Genbruchstücke doppelsträngig sequenziert zu haben, wurden wieder Primer aus den bereits bestimmten Basenfolgen abgelesen und dann zur abschließenden Sequenzierung eingesetzt (Abb. 3.16). Der Vergleich der aus *nrdF* von *C. glutamicum* abgeleiteten Aminosäuresequenz mit CA2 und anderen NrdF-Proteinen (Abb. 4.4) verdeutlichte, daß die beiden *PstI*-Fragmente

direkt nebeneinander liegen, da die CG2-Sequenz in dem Bereich der *PstI*-Schnittstelle mit den anderen *NrdF*-Proteinen sehr stark übereinstimmt. Es scheint keine Aminosäure in diesem Bereich zu fehlen.



**Abbildung 3.14** Southern blot nach Restriktionsverdau von Cosmid 810 mit der R2-2-Sonde. B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; K = *Kpn*I; P = *Pst*I; Pv = *Pvu*II; S = *Sall*I; X = *Xba*I.

```

TCTAGAGTTTGGTGGAGCAAAGGATCGCTACATGTGGTGGCTGAAGAAGTCCATCCTGGGAATACTCAC      70
CATGTAAGTACTATATGTAGTGTAGTTGCGCTTATTCCACCACAAAGTATAGTGTGGTTGTGTCGCCTT      140
                                     -35
GAGCGATGCAAAGACTTTTAAAAACAGATCTAAAAAAGTGAGATGAGGCATTAGCGTCAACCGCTAAAGCC      210
                                     -10  nrdH
GATAAGGGGAAGGTCCAAAAAATGGCAATCACCGTTTTACACCAAGCCAGCTTGCCTCCAGTGCAATGCCAC      280
      RBS      M A I T V Y T K P A C V Q C N A
CAAGAAGGCCCTCGACCGCGTCTTGAGTATGACCTCGTTGATATCAGCCTTGATGAAGAGGCACGT      350
T K K A L D R A G L E Y D L V D I S L D E E A R
GAGTACGTCTCGCACTTGGCTACCTGCAGGCACCGTGTGCGTTGCAGATGGCTCCCACTGGTCCGGTT      420
      E Y V L A L G Y L Q A P V V A D G S H W S G
TCCGCCAGAGCGCATCCGTGAAATGGCAACCGCAGCTGCCTAAACTGCACCTTCGTGGCACGACCTGTTT      490
      F R P E R I R E M A T A A A ---
AATCGAACAGGTGAGCCATGCACGTCACACCATTTGTGACCTTCCCCAACGCTCGTCGCCTAATATTTGG      560

CGGCGTTTTCGTATTTACCCTAATTCCCGTGAATTCAGCAAATCACCTACGGGTTGAAACCACGCGGCC      630

GTGAAATCGGGAAACAATAGAAGTTCAGTTCTTCCCTTCAACGCCCTTGAAGGGGGAAACTGATACCAGCA      700
                                     nrdI
AGCACACTAGGCTTGCGCACAAACGGTATTTAGAAGGGAAGTGAGTTCGAGGATGCTAATCGTGTATTTT      770
                                     RBS      M L I V Y F
TCCTCGGCCACCGACAACACGCATCGTTTTGTACAAAAGCTCGATTTACCCAACGTGCGCATCCCCCTCA      840
      S S A T D N T H R F V Q K L D L P N V R I P L
CTAGGGTGGAGAACCGCTGAAAATCAACGAGCCCTACGTGCTAATCACCCCGACCTATGGTGGTGGAGT      910
      T R V E E P L K I N E P Y V L I T P T Y G G G
CTCCATGACTGGAGAAAACCTCCCGCCCGGTCCCACCACAAGTCATCAGGTTTTTAAATGATGAACACAAC      980
      V S M T G E N S R P V P P Q V I R F L N D E H N
CGCAGCTTCATCAGGGCAGTTGTTGCAGGTGGAAACTCAAACCTTCGGCTCCGATTTTGGGTTGGCAGCGG      1050
      R S F I R A V V A G G N S N F G S D F G L A G
AGATCATTTCCAAGAAATGTAAAGTGCCTATGTCTACCGTTTCGAGCTCATGGCAATGAGGAAGATGT      1120
      E I I S K K C K V P Y V Y R F E L M G N E E D
AAGTATCCTTCGTGGAGGTCTTACTCAAACGCCCAAGCTTTGGGGCTGGAACCACAAGAACCAGTTACC      1190
      V S I L R G G L T I Q N A Q A L G L E P Q E P V T
TCGCGATAAACCTTAAACTTAATCAATCAATACAAAGTTCACACCTCTTTTGAAGGGACATTCCTTTG      1260
      S R ---      nrdE
ACTGCATCGGGAAACCACCGTCGTGCCACGCGGAGACCAGATGGACTTCCACGCTCTTAACGCGTTGCTCA      1330
      RBS      M P R G D Q M D F H A L N A L L
ACCTTTACGATGACAACGGCAAGATCCAGTTTGAGAAAAGACCGTGAAGCTGCAAACCACTACTTCTCTGCA      1400
      N L Y D D N G K I Q F E K D R E A A N Q Y F L
GCACGTCAACCAGAACACCGTCTTCTTCCACAACCTGCAGAAAAGATCGACTACCTGGTTGAAAACAAG      1470
      Q H V N Q N T V F F H N L Q E K I D Y L V E N K
TACTATGACCCAATCGTTCTGGACAAGTACGACTTCCAGTTCATCAAGGACCTCTTCAAGCGCGCATACG      1540
      Y Y D P I V L D K Y D F Q F I K D L F K R A Y
    
```

GATTCAAGTTCCGCTTCCAGTCCTTCCCTCGGTGCATACAAGTACTACACTTCTACACCTGAAGACCTT	1610
G F K F R F Q S F L G A G Y K Y Y T S Y T L K T	
CGACGGTCGCGCTACCTCGAGCGTTTCGAAGACCGTGTCTGCATGGTTCGCCCTCACCTCGTACGGC	1680
F D G R R Y L E R F E D R V C M V A L T L A D G	
GACCGCGCATTGGCCGAGAACCTGGTCGATGAGATCATGTCTGGCCGTTTCCAACCAGCAACCCCACT	1750
D R A L A E N L V D E I M S G R F Q P A T P T	
TCCTGAACCTCCGGCAAGGCACAGCGCGGCGAGCCAGTATCTCTGCTTCTCTCGGTATCGAAGACAACAT	1820
F L N S G K A Q R G E P V S C F L L R I E D N	
GGAGTCCATCGGACGTTCCATCAACTCTGCTCTTCCAGCTGTCCAAGCGTGGCGGTGGCGTAGCGTTGCTG	1890
M E S I G R S I N S A L Q L S K R G G G V A L L	
CTGTCCAACCTTCGTGAAGCCGGTGCACCGATTAAGAAGATTGAAAACCGAGTCTTCCGGTGTATCCAG	1960
L S N L R E A G A P I K K I E N Q S S G V I P	
TGATGAACTTCTGAAGATGCTTCTCTACGCTAACCCAGTGGGTGCTCGTCAGGGTCAGGTGCTGT	2030
V M K L L E D A F S Y A N Q L G A R Q G A G A	
GTACCTCAACGCTCACACCCAGATATCTGTCTTCTGGATACCAAGCGTGAGAACGCCGATGAGAAG	2100
V Y L N A H H P D I L S F L D T K R E N A D E K	
ATCCGCATCAAGACCTGTCCCTGGGTGTTGTGATTCCGGACATCACCTTCGAGCTGGCTAAGCGCAACG	2170
I R I K T L S L G V V I P D I T F E L A K R N	
ATGACATGTACCTGTTTCTCCCATACGATGTGGAGCGCATTACGGCAAGCCTTTCGCAGACGTCTCAAT	2240
D D M Y L F S P Y D V E R I Y G K P F A D V S	
CACCGAGACTACGACGAGATGGTGGATGATGACCGCATCCGCAAGACCAAGATCAACGCGGTCACTTC	2310
I T E H Y D E M V D D D R I R K T K I N A R Q F	
TTCCAGACCTGGCAGAAATCCAGTTCGAGTCCGGTTACCCATACATCATGTATGAAGACACCGTGAATG	2380
F Q T L A E I Q F E S G Y P Y I M Y E D T V N	
CATCCAACCAATCGAAGGTGCGATCACCCACTCAAACCTGTGCTCTGAGATCCTTCAGGTGTCCACCCC	2450
A S N P I E G R I T H S N L C S E I L Q V S T	
ATCTGAATTCAACGATGACCTGACTTACGCAGAGGTGCGGCAAGACATTTCTTGTAACCTGGGTTCCCTC	2520
P S E F N D D L T Y A E P V G E D I S C N L S L	
AACGTTGCAATGGCTATGGATTACCAAACTTTGAGAAGACCATCGAAACCGCAATCCGCGGCTTAACTG	2590
N V A M A M D S P N F E K T I E T A I R G L T	
CAGTGTCTGAGCAGACCAGCATCGATTCCGTGCCTTCCATCCGTAAGGGCAACGAAGCAGCTCACGCCAT	2660
A V S E Q T S I D S V P S I R K G N E A A H A	
CGGCCTTGGCCAGATAACCTTACGGCTACTTCCGTGCGGAGCACATGCACTACGGCTCCGAGGAGCC	2730
I G L G Q M N L H G Y F G R E H M H Y G S E E A	
CTGGACTTACCAACGCATACTTTGCTGCCGTGCTGTACCAGTGCCTGCGTGCATCCAACAAGATCGCTA	2800
L D F T N A Y F A A V L Y Q C L R A S N K I A	
CTGAGCGTGGAGAGCGTTTCAAGAACTTCGAAAACCTCAAGTATGCAACCGGTGAGTACTTTCGATGATTT	2870
T E R G E R F K N F E N S K Y A T G E Y F D D	
CGATGCAAACGACTTTCGCACCAAAGTCCGACAAGGTCAAGGAACTCTTTGCCAAGTCAACATCCACACC	2940
F D A N D F A P K S D K V K E L F A K S N I H T	
CCAACCGTTGAGGACTGGGCTGCGCTGAAGGCCGACGTGATGGAGCACGGTCTGTTCAACCGTAACTGCTC	3010
P T V E D W A A L K A D A V M E H G L F N R N L	
AAGCGTITCCACCAACCGGTTTCGATCTCTACATCAACCACTCCACCTCGTGCATCCACCCAATCGCATC	3080
Q A V P P T G S I S Y I N N S T S S I H P I A	
CAAGATTGAGATCCGCAAGGAAGCAAGATCGGCCGCGTTTACTACCCAGCTCCACACATGGACAATGAC	3150
S K I E I R K E G K I G R V Y Y P A P H M D N D	
AACCTTGAGTACTTCGAGGACGCCCTACGAAATCGGCTACGAGAAGATCATTGACACCTACGCTGTGGCAA	3220
N L E Y F E D A Y E I G Y E K I I D T Y A V A	
CCAAGTACGTTGACCAGGGCCTGTCACTGACCTTGTCTTCAAGGACACTGCCACCACCCGTGACATCAA	3290
T K Y V D Q G L S L T L F F K D T A T T R D I	
CCGTGCGCAGATCTACGCATGGCGCAAGGGCATCAAGACCTTGTACTACATTGCGCTGCGCCAGGTTGCT	3360
N R A Q I Y A W R K G I K T L Y Y I R L R Q V A	
CTGGAAGGCACTGAAGTTGACGGCTGCGTCACTGCTGTAAAAGCACT <b>TAAAAATATCCCCGACCT</b>	3430
L E G T E V D G C V S C M L---	
<b>GCACAAGGTTGGGGATATTTTTTA</b> TGCCAGAACTTCTCCACATGGTGTGACGTGGTTGTTTGATCACT	3500
CAAACATCTTCTGTCCGTAGACACACGATTGCCAGCTGACACGATGTCTGTGCTGAAGGGGAGTAG	3570
CTGCACAAACGCGGTTGTCGACATACTGGCAGCAAGATCTGTGTACCCGGCCACGTGCCTAAAACCTAG	3640
GTGAGCGAGACCTTCGAGCAGTTCCTCGAAGGAGAGTATCCACCTATGTTTCCGCGAATTCGCTGGCA	3710
ATGTGTCTGTCGACGMAATCCCTGCTGTTGTGCTCAGGTTTTCTGAGCTGTCGGCGTCACCTGTGGCGA	3780
CCATGCTGATTTTTGGTACCGCAGTGGTTGCTGCCTCTTTTGTGTTGGVGTGGGCAGCTGAAGCTGTGCG	3850
CAAAGATATTTCTGGTGCCTGGCAGTGGCCTTGCTTGCCTTAGTTGCAGTGCCTTCTGAATATGCTTCT	3920
GAAACGGTTGTCGACACACTTATCAAACATCGGCGCGCAATTAAGAAGGTGAACAGTTGACGCGAGTGGG	3990
GTAATTCGAAATGTTGTGGAGACTATCTCACAGCACTTTCCGTGCAGAAGAATGGGATGAGGAACCAAC	4060
AACAGGAAAACCTCGTGAAGTAATTGGAGTTACCGCATCAACCGGTGTCGGCGACGCTCAAAAACTCAAC	4130
CCTGAGGGCTTCGTCATTACCGTCTACGGGGACATCGAGCTGACGCCCCGAGGTCGAGACATCGCCAT	4200
CAACGTGATCAGGCGCGCCGGATCATTGAGACCTATCTGTCTGAGAAGCTTGATTAGGCGCTCATGAA	4270
CTACACGGCGAGGAGATTTATTAGACACGCAGTGTCTCCACTGGTGTGGAGGAAGATGTTTCAGGCA	4340
GTGGGCTATCCAACGATGGATCC	4363

**Abbildung 3.15** Sequenz des *XbaI-BamHI*-Fragmentes mit *nrdH*, *nrdI* und *nrdE* von *C. glutamicum*. Unterstrichen sind die mögliche Ribosomenbindestelle (RBS) und die -10 und -35 Region eines möglichen Promoters. Die palindromische Sequenz eines möglichen Transkriptionsterminators ist fettgedruckt.

TCTCGTTGATTGTGCATGCCCTACGTACACACTTCCGCAAGCTGTCAGCATAGTTAGCGCAGCATAACCCG	70
CATTTTGGCTTTGATTGCTAGTTCCACTTTTGAAGCTGAAATGCCAGTTTGAGACCTGTTACATTAAA	140
GGTTTCTCTAAATGACGTGCTAGTGGCGATAATTTAGGCCAATAAGTTGGTTGAAGTTGAGGCTGATGGA	210
GATGGTCTTTGTGGCGTTAGTCTGACACTGAACCTGTGGGGCGTAATGGAAAATAAGTGACTAAGATCAC	280
<u>GTTTTGGGGTGGGGGATTGCGCTCTAAAGCTAGGTCTAAAGCTAGGCGACTTGACCAAAAATTGATAGGCT</u>	350
<u>-35</u> <u>-10</u>	
GGGGCGGGTCTTCTGAAGGGCTTCGGTTGGGGTAAGCTGGCGATCTGAAATCGCGCTGCATTGTGGCGTC	420
GAAAAGCAAAAAATTTGTAGAAAGGGAAGAGCGCACCTAATGGCTGCTGATTCTGATCTCAGTGTTCAGC	490
<u>RBS</u> M A A D S D L S V H	
ATGCTTACTTAAAGGAGCATGTTGCACCTGTAAAGGCGATCAACTGGAACCTCCATCCCAGATTCCAAAAGA	560
D A Y L K E H V A P V K A I N W N S I P D S K	
TCTTGAAGTCTGGGATCGTCTGACCGGTAACCTTCTGGCTCCAGAAAAGGTCAGTATCCAACGACATC	630
D L E V W D R L T G N F W L P E K V P V S N D I	
AAGAGCTGGGGAACCTCAACGAGTTGAAAAAGCCGCAACCATGCGCGTGTTCACCGGACTTACCTGTC	700
K S W G T L N E V E K A A T M R V F T G L T L	
TGGACACCATTCAGGGCACTGTCGGCGCAATCTCCCTGCTTCCAGACGCAGATTCAGTGCAGGAAGAGC	770
L D T I Q G T V G A I S L L P D A D S L H E E	
GGTGCTAACCAACATTGCGTTCATGGAATCCGTGCACGCAAAGAGTTACTCCAACATCTTCATGACTCTG	840
A V L T N I A F M E S V H A K S Y S N I F M T L	
GCCTCCACCGCGAAATCAACGATGCGTTCGGTTGGTCTGAGGAAAATGAAAACCTGCAGCGCAAGGCAA	910
A S T A E I N D A F R W S E E N E N L Q R K A	
AGATCATCCTGTCTTACTATGAGGGCGATGCCACTAAAGCGCAAGATCGCCTCCGTGATCCTGGAGTC	980
K I I L S Y Y E G D D P L K R K I A S V I L E	
CTTCCTGTTCTACTCCGGCTTCTACTCCCAATGTATTGGTCCAGCCACTCCAAGCTGACCAACACCGCC	1050
S F L F Y S G F Y L P M Y W S S H S K L T N T A	
GACGTGATCCCGCTGATCATCCGCGATGAGGCAGTGCACGGCTACTACATTGGCTACAAGTATCAAAGG	1120
D V I R L I I R D E A V H G Y Y I G Y K Y Q K	
CTGTCCGGAAGGAGACTCCAGAGCGTCAGGAAGAGCTGAAGGAGTACACCTTCGATCTGCTCTACGATCT	1190
A V A K E T P E R Q E E L K E Y T F D L L Y D	
TTACGATAACGAAACTCAGTACTCCGAAGATCTCTACGACGATCTTGGATGGACCGAGGATGTTAAGCGA	1260
L Y D N E T Q Y S E D L Y D D L G W T E D V K R	
TTCCTTCGCTACATCGCCAACAAGGCCCTCAACAACCTGGCTACGAAGGACTCTTCCCAGCGGATGAAA	1330
F L R Y I A N K A L N N L G Y E G L F P A D E	
CCAAGGTGTCCTCAACATCTTGTCTGCGCTGTCACCAACCGCTGATGAGAACCACGACTTCTTCCGG	1400
T K V S P N I L S A L S P N A D E N H D F F S	
CTCCGGTCTTACGTTATTGGTAAGGCAGAAAACCGAGGATGACTGGGACTTCTAACTTTTA	1470
G S G S Y V I G K A E N T E D D W D F	
AGAAGCTGAAGCGCTCTACGGCTGTAGTTAACTGCAACCGTTAGAGCGTTTTTTCGTTTTCTGGTGGGGG	1540
TTAAGGTGCGGGTTTTTCCGAAGCGCATATCGGGGTAGGGGAGCGCCAGGCGCCCGTGGACCCTCGCGG	1610
CACATCACGCTTTAGAAGAAACGCCCTGGAATGGGCGTCTCAACCATTGATTTGAACCCCGGGGGGG	1680
GAATTGTGAAATCTGTGGCAGGGGTTAAACGTGGTGGTAGGGCTTTCTGGGCGAAATGTCTGTCAAAAT	1750
TGTGAACCCCTTACCACCCTTTGGTTAAAGGTCTCTGGCCACAAGTG	1798

**Abbildung 3.16** Sequenz von *nrdF* aus *C. glutamicum*. Unterstrichen sind die Ribosomenbindestellen (RBS) und die -10 und -35 Region eines möglichen Promoters. Die *Pst*I-Schnittstelle ist grau unterlegt.

### 3.3.4. Analyse der Sequenz von *nrdHIE* und dem distalen *nrdF* aus *C. glutamicum*

Nachdem bereits die Sequenz des 1,2 kb *Eco*RI-Fragmentes große Übereinstimmung mit Teilen von bereits bekannten *nrdE*-Genen gezeigt hatte (Tab. 3.6; Kap. 3.3.1.), bestätigte sich nach Vorliegen der gesamten Nucleotidfolge des 4,3 kb *Bam*HI-*Xba*I-Fragmentes, daß das ganze Gen der katalytischen Untereinheit der RRase von *C. glutamicum* darauf enthalten ist. Es wurden aber noch zwei weitere offene Leseraster gefunden, die nach Sequenzvergleichen mit Genen in Verbindung gebracht werden konnten, deren Genprodukte wahrscheinlich als „Hilfsproteine“ an der Ribonucleotid-Reduktion beteiligt sind (JORDAN et al., 1997a). Insgesamt waren es drei offene Leseraster, für die nach den Vergleichen mit Genbanken eine Zuordnung möglich war (Abb. 3.13). Das *nrdF*-Gen lag zwar nicht mit auf dem 4,3 kb *Bam*HI-*Xba*I-Fragment aber immerhin noch auf dem

selben Cosmidklon wie *nrdHIE*. Es wurde in einem getrennten Ansatz kloniert und sequenziert.

Diese drei Leseraster sind *nrdH* (234 bp), *nrdI* (447 bp) und *nrdE* (2124 bp) von *C. glutamicum*. Der GC-Gehalt der drei Gene (*nrdH* 57.3%; *nrdI* 49,9%; *nrdE* 54.0%) liegt in dem Bereich, der für Corynebakterien bekannt ist (MALUMBRES et al., 1993). Betrachtet man den Codon-Gebrauch von *nrdHIE* (Tab. 3.7) erscheint dieser insgesamt im Einklang mit bereits publizierten Daten (EIKMANN, 1992), jedoch fällt der von *nrdI* gerade für die Aminosäuren Asp, Gln, Lys, Phe und Tyr deutlich aus der Reihe, da häufig das A+U-reichere Codon gewählt wird. Sicher ist dies auch eine Folge des relativ niedrigen GC-Gehaltes des Gens.

In einem getrennten Ansatz konnte *nrdF* von *C. glutamicum* kloniert werden (Kap. 3.3.3). Der GC-Gehalt von 51,7 % und der Condon-Gebrauch (Tab. 3.7) sind wie bei den drei anderen *nrd*-Genen im Bereich der für *C. glutamicum* üblichen Werte (MALUMBRES et al., 1993; EIKMANN, 1992). Das Gen, das 1005 bp umfaßt, beginnt mit ATG. Stromaufwärts davon findet man 10 Basenpaare entfernt eine mögliche Ribosomenbindestelle mit der Sequenz „AAGGGAAG“, die auch vor *nrdH* und *nrdI* zu finden ist. Ebenfalls sind Sequenzen vorhanden, die *C. glutamicum* Promotoren gleichen (PÁTEK et al., 1996) und als mögliche -10 Region 151 bp (TCTAAA) bzw. -35 Sequenz 166 bp (TTTTGG) stromaufwärts des Startcodons ATG liegen. Ein Terminationssignal für die Transcription konnte im Anschluß an das Gen nicht gefunden werden.

Die Leseraster von *nrdH* und *nrdI* beginnen sehr wahrscheinlich mit dem Startcodon ATG. Man findet 9 bzw. 11 Basenpaare stromaufwärts von diesen Genen jeweils die Sequenz „AAGGGAAG“ als mögliche Ribosomenbindestelle. Bei *nrdE* liegen ein GTG und ein ATG am voraussichtlichen Genanfang nur 15 bp auseinander und könnten beide als Start in Frage kommen. 8 Basenpaare vor dem GTG ist die Purin-reiche Region „GGGAA“ zu erkennen, während sich 4 bp vor dem ATG ein „GGAGA“ befindet. Da ersterer Bereich in Abstand und Sequenz eher mit den beiden schon genannten Stellen übereinstimmt, könnte das GTG das verwendete Startcodon sein.

Als Transkriptionsstart kommen 69 Basenpaare stromaufwärts vom ATG von *nrdH* ein „TTTAAA“ und 24 bp weiter ein „TTTGTT“ als -10 bzw. -35 Sequenz eines für *Corynebacterium glutamicum* möglichen Promoters in Frage (PÁTEK et al., 1996). Ein wahrscheinlicher Transcriptionsstop schließt sich in Form einer 41 bp langen palindromischen Sequenz dem Stopcodon von *nrdE* an. Da vor *nrdI* und *nrdE* keine weiteren Promotersequenzen erkannt werden konnten, werden die drei *nrd*-Gene wahrscheinlich als polycistronische mRNA abgelesen.

**Tabelle 3.7** Codon-Gebrauch für die *C. glutamicum nrdH, nrdI, nrdE* und *nrdF* Gene

Amino-		Gesamtanzahl der Codons					Amino-		Gesamtanzahl der Codons				
säure	Codon	<i>nrdH</i>	<i>nrdI</i>	<i>nrdE</i>	<i>nrdF</i>	gesamt <sup>a</sup>	säure	Codon	<i>nrdH</i>	<i>nrdI</i>	<i>nrdE</i>	<i>nrdF</i>	gesamt
Ala	GCU	3	1	18	5	27 (25.7)	Leu	UUA	0	2	1	1	4 (3.5)
	GCC	3	2	11	6	22 (21.0)		UUG	0	2	6	1	9 (8.0)
	GCA	7	3	24	8	42 (40.0)		CUU	3	2	9	7	21 (18.6)
	GCG	0	0	6	8	14 (13.3)		CUC	3	3	10	8	24 (21.3)
Arg	CGU	2	3	18	3	26 (41.3)	CUA	0	2	0	2	4 (3.5)	
	CGC	3	3	20	6	32 (50.8)	CUG	1	2	33	15	51 (45.1)	
	CGA	0	1	0	1	2 (3.2)	Lys	AAA	0	3	2	2	7 (10.3)
	CGG	0	0	0	0	0 (0.0)		AAG	3	2	38	18	61 (89.7)
	AGA	0	0	0	0	0 (0.0)	Met	AUG	2	3	15	5	25 (100)
	AGG	0	3	0	0	3 (4.7)		Phe	UUU	0	4	4	0
	Asn	AAU	1	2	2	1	6 (8.5)		UUC	1	3	36	14
AAC		0	8	39	18	65 (91.5)	Pro	CCU	0	0	2	1	3 (6.3)
Asp	GAU	3	4	16	21	44 (48.9)		CCC	0	4	0	0	4 (8.3)
	GAC	2	1	35	8	46 (51.1)		CCA	3	4	19	10	36 (75.0)
Cys	UGU	0	1	1	0	2 (20.0)		CCG	0	3	2	0	5 (10.4)
	UGC	2	0	6	0	8 (80.0)	Ser	UCU	0	0	7	5	12 (14.3)
End	UAA	1	1	1	1	4 (100.0)		UCC	2	5	26	17	50 (59.6)
	UAG	0	0	0	0	0 (0.0)		UCA	0	1	4	2	7 (8.3)
	UGA	0	0	0	0	0 (0.0)		UCG	0	2	4	0	6 (7.1)
Gln	CAA	0	5	2	1	8 (21.6)		AGU	0	1	0	2	3 (3.6)
	CAG	2	0	23	4	29 (78.4)		AGC	1	1	2	2	6 (7.1)
Glu	GAA	2	7	22	15	46 (48.4)		Thr	ACU	0	3	6	4
	GAG	4	4	28	13	49 (51.6)	ACC		4	4	30	14	52 (78.8)
Gly	GGU	2	4	16	3	25 (33.8)	ACA		0	0	0	0	0 (0.0)
	GGC	2	3	22	8	35 (47.3)	ACG		0	1	0	0	1 (1.5)
	GGA	0	4	4	4	12 (16.2)	Trp	UGG	1	0	2	8	11 (100)
	GGG	0	2	0	0	2 (2.7)		Tyr	UAU	1	3	3	3
His	CAU	0	1	0	1	2 (8.0)	UAC		3	2	36	16	57 (85.1)
	CAC	1	1	15	6	23 (92.0)	Val	GUU	4	3	11	5	23 (31.1)
Ile	AUU	0	1	8	4	13 (16.7)		GUC	3	4	9	4	20 (27.0)
	AUC	3	8	39	15	65 (83.3)		GUA	0	2	2	2	6 (8.1)
	AUA	0	0	0	0	0 (0.0)		GUG	0	5	13	7	25 (33.8)

<sup>a</sup> *nrdH, nrdI, nrdE* und *nrdF* Gene zusammen. Die Werte in Klammern geben die Prozentzahlen der einzelnen Codons für eine Aminosäure an.

Aus der DNA-Sequenz lassen sich die hypothetischen Genprodukte ableiten. Die berechneten Molekulargewichte von NrdH (77 Aminosäurereste) und NrdI (148 Aminosäurereste) sind 8,0 kDa bzw. 16,4 kDa. Für das 707 Aminosäuren umfassende NrdE wurden 74,1 kDa errechnet. In *Enterobacteriaceae* stellt NrdH als Glutaredoxin *in vitro* den Elektronendonator für *nrdEF* dar (JORDAN et al., 1996), während für NrdI nur ein stimulatorischer Effekt auf die Ribonucleotid-Reduktion gezeigt wurde, die genaue Funktion bleibt jedoch ungewiß (JORDAN et al., 1997a).

Da *nrdF* nicht mit auf pWCG3 liegt, kann es in *C. glutamicum* nicht innerhalb von etwa 1 kb stromabwärts von *nrdE* lokalisiert sein (vergleiche auch Abb. 3.15). Die *nrd* Gene

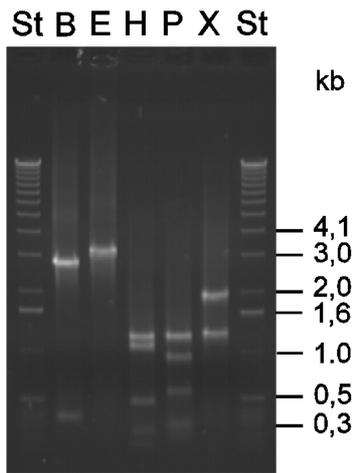
können ähnlich wie in *C. ammoniagenes* (Abb. 3.9) oder auch *M. tuberculosis* angeordnet sein, wo sie deutlich getrennt sind (YANG et al., 1997). Jedenfalls unterscheidet sich die Anordnung von der in *Enterobacteriaceae* (JORDAN et al., 1994b) oder *B. subtilis* (SCOTTI et al., 1996), bei denen *nrdF* in direktem Anschluß an *nrdE* folgt.

Bei *C. glutamicum* entspricht die maximale Distanz von *nrdF* zu *nrdHIE* der Größe des Cosmids 810, auf dem alle vier *nrd*-Gene lokalisiert sind, und das sind etwa 40 kb. Die minimale Entfernung der Gene läßt sich kalkulieren, wenn man die Fragmente vergleicht, die bei den Southern Experimenten detektiert wurden. Es konnte kein Fragment entdeckt werden, das sowohl mit der CG1-Sonde als auch mit der R2-2-Sonde hybridisierte (Abb. 3.12 und 3.14). Wenn man unter Einbeziehung der Sequenzdaten und der Restriktionsanalyse die Lage von *nrdHIF* auf den Fragmenten mit einer Größe von mehr als 5,5 kb berücksichtigt, sowie die Position von *nrdF* auf den beiden *PstI*-Fragmenten, ergibt sich ein Mindestabstand von 2,8 kb (Abb. 3.18).

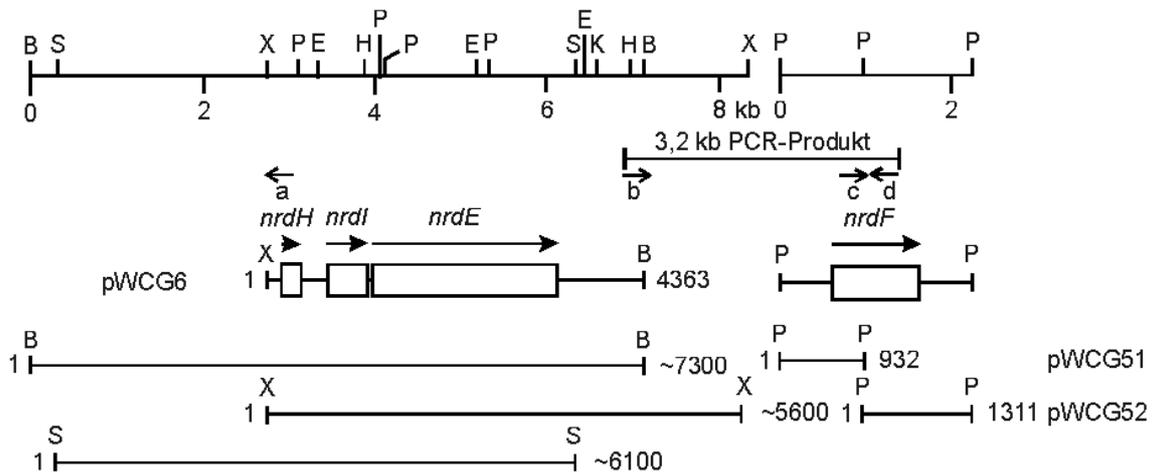
Wenn der Abstand von *nrdF* zu den anderen Genen nicht viel mehr als 4 kb war, bestand vielleicht die Möglichkeit, mittels PCR bei Verwendung der Sequenzierprimer ein Fragment zu amplifizieren, das eine genauere Bestimmung zuließe. Da nicht bekannt war, ob *nrdF* stromaufwärts oder -abwärts bzw. in welcher Orientierung zu *nrdHIE* lokalisiert war, mußten die Primer so gewählt werden, daß alle Variationsmöglichkeiten abgedeckt waren. Zwei Primer (a und b) waren jeweils an den Enden von pWCG3 plaziert und nach außen gerichtet; die beiden Primer für *nrdF* (c und d) lagen innerhalb des Gens in entgegengesetzter Orientierung (Abb. 3.18).

In der PCR konnte mit den Primern b und d ein 3,2 kb Fragment amplifiziert werden. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Produktes und Agarosegelelektrophorese (Abb. 3.17) konnten die Fragmente wiedergefunden werden, die auf Grund der bereits bekannten Informationen aus Sequenzierung und den Southern-Experimenten erwartet wurden. Beim Verdau mit *BamHI* wurde nur ein etwa 0,35 kb Stück vom PCR-Produkt abgetrennt. *EcoRI* schnitt gar nicht und auch das erwartete 0,25 kb Fragment nach *HindIII*-Verdau trat auf. In der Bahn mit dem *PstI*-Ansatz konnte das 0,93 kb Fragment wiedergefunden werden und auch bei *XbaI*-Behandlung entstand das prognostizierte 1,4 kb DNA-Stück. Die übrigen Fragmente sind auf die Schnittstellen zurückzuführen, die in den nicht sequenzierten Bereichen außerhalb von pWCG3 und pWCG51 liegen und daher noch nicht mit in die Restriktionskarte aufgenommen werden konnten.

Aus der Tatsache, daß Primer b und d die Bildung eines PCR-Produktes ermöglichten, läßt sich der Abstand und die Orientierung von *nrdF* zu *nrdHIE* recht genau ermitteln. Unter Berücksichtigung der Lage der Primer muß *nrdF* etwa 3,2 kb stromabwärts von *nrdE* liegen und zwar in der gleichen Orientierung (Abb. 3.18)



**Abbildung 3.17** Agarosegel des 3,2 kb PCR-Produktes nach Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen. B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; P = *Pst*I; X = *Xba*I; St. = Molekulargewichtsstandard.

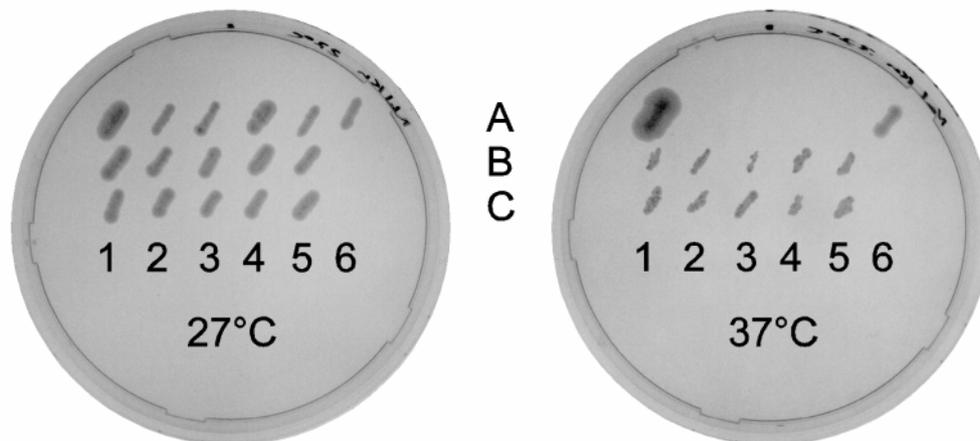


**Abbildung 3.18** Restriktionskarte des 4,3 kb *Xba*I-*Bam*HI Fragmentes aus pWCG3 und der *Pst*I-Fragmente aus pWCG51 und pWCG52. Im unteren Bildteil sind die DNA-Fragmente abgebildet, die für die Abstandskalkulation benutzt wurden. Die kleinen Pfeile, die mit a, b, c und d gekennzeichnet sind, geben die Position der Primer an, die in der PCR für die Abstandbestimmung eingesetzt wurden. B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; K = *Kpn*I; P = *Pst*I; S = *Sal*I; X = *Xba*I; St. =  $\lambda$  *Hind*III Standard.

### 3.3.5. Genetische Komplementation der thermosensitiven Mutanten CH31 und CH33 mit pWCG6

Wie in Kapitel 3.1.4. gezeigt werden konnte, ist es möglich, daß CG1 nach der biochemischen Komplementation mit der kleinen Metall- und Radikal-haltigen Untereinheit von *C. ammoniagenes* ein Hybridprotein bilden kann, das zur Ribonucleotid-Reduktion befähigt ist. Deshalb sollte nach Gentransfer auch die genetische Komplementation der thermosensitiven Mutanten CH31 und CH33 mit dem Gen von CG1 möglich sein. Dazu wurde das klonierte *Xba*I-*Bam*HI-Fragment von pWCG3, das komplette *nrdE*-Gen von *C. glutamicum*, in pECM2 umkloniert. Das entstandene Plasmid pWCG6 wurde in *E. coli* S17-1 transformiert und anschließend

mittels Konjugation (SCHÄFER et al., 1990) in CH31 und CH33 übertragen. Die erhaltenen Transkonjuganten wurden dann auf LB-Medium ausgestrichen und sowohl bei 27°C als auch bei für die Mutanten nicht permissiven 37°C inkubiert. Alle getesteten Transkonjuganten (ca. 250 pro Stamm) wuchsen bei beiden Temperaturen (Abb.3.19). Die Kontrollausstriche der Mutanten mit pECM2 wuchsen nur bei 27°C und nicht bei 37°C. Allerdings war das Wachstum der komplementierten Mutanten bei der höheren Temperatur schlechter als bei 27°C.

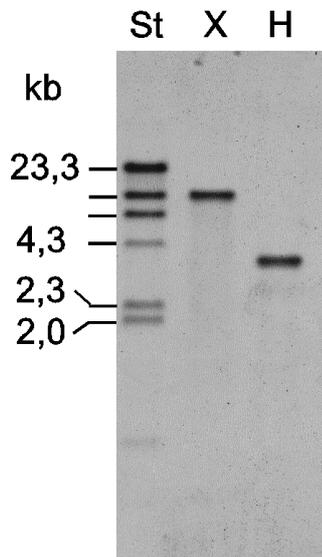


**Abbildung 3.19** Wachstum der thermosensitiven Mutanten CH31 und CH33 bei 27°C und 37°C nach genetischer Komplementation mit *nrdE* von *C. glutamicum*. A1 = *C. ammoniagenes*/pECM2; A2 + 3 = CH31/pECM2; A4 + 5 = CH33/pECM2; A6 = *C. glutamicum*/pECM2; B1-5 = CH31/pWCG6; C1-5 = CH33/pWCG6.

### 3.3.6. Überprüfung der Kopienzahl für das *nrdF* Gen im Chromosom von *C. glutamicum*

Die *nrd*-Gene sind bei *Enterobacteriaceae* (JORDAN et al., 1994a) und *B. subtilis* (SCOTTI et al., 1996) hintereinander in einem Operon angeordnet. Dies scheint bei den Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt anders zu sein, denn bei *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* liegen *nrdE* und *nrdF* getrennt. Außerdem variieren bei diesen drei Spezies die Abstände zwischen den Genen. Bei *M. tuberculosis* wurden sogar zwei *nrdF* Gene gefunden, von denen allerdings nur eines ein funktionelles Protein bildet (YANG et al., 1997). Für *C. ammoniagenes* war ja bereits im Verlauf der Klonierung gezeigt worden, daß dort wahrscheinlich nur ein *nrdF* Gen vorhanden ist (Kap. 3.2.5.). Ob dies auch für *C. glutamicum* zutrifft, mußte noch überprüft werden, da schließlich die Klonierarbeiten nur mit wenigen Cosmidklonen durchgeführt wurden. Chromosomale DNA wurde jetzt mit *Xba*I und *Hind*III geschnitten, da diese Schnittstellen nicht in dem sequenzierten Gen enthalten sind. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Hybridisierung unter wenig stringenten Bedingungen

mit der aus *M. tuberculosis* DNA gewonnenen Sonde durchgeführt. Es wurde dabei jeweils nur eine Bande angefärbt (Abb. 3.20), woraus man schließen kann, daß es sehr wahrscheinlich in *C. glutamicum* nur ein *nrdF* Gen gibt.



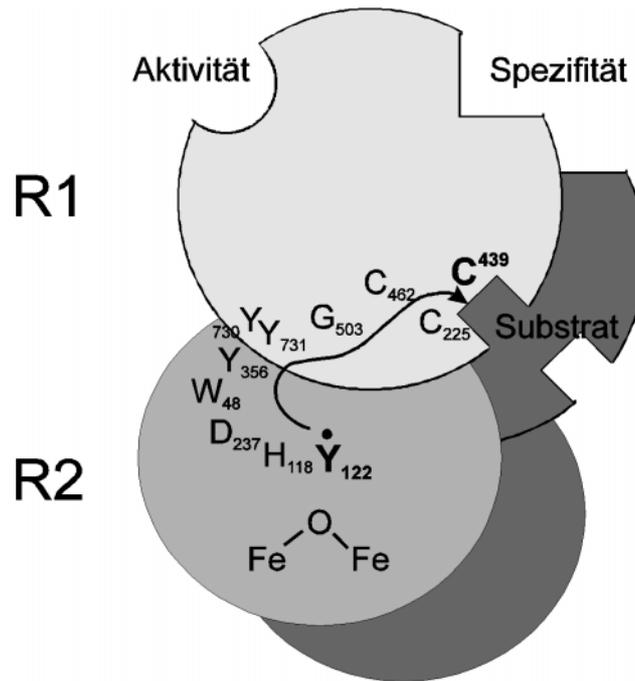
**Abbildung 3.20** Southern blot nach Verdau chromosomaler DNA von *C. glutamicum* mit der R2-2-Sonde. H = *Hind*III; X = *Xba*I; St. =  $\lambda$  *Hind*III-Molekulargewichtsstandard.

## 4. Diskussion

Der komplexe radikalische Mechanismus der Reduktion der vier Ribonucleotide zu Desoxyribonucleotiden und eine ebenso komplexe allosterische Regulation durch die Reaktionsprodukte als Effektoren gaben Anlaß dazu, die Übernahme dieser Reaktion durch Proteine als einmaligen Schritt in der Evolution der Ribonucleotid-Reduktasen zu sehen. Daraus ergibt sich das Hauptargument für einen monophyletischen Ursprung der katalytisch regulatorischen Proteine der RRasen aller vier Klassen (Abb. 1.1). Die Diversität der heutigen RRasen geht dagegen auf die Nutzung verschiedener Cofaktoren und den damit verbundenen Unterschieden in der Radikalbildung zurück (FOLLMANN, 1982; REICHARD, 1993). Der Gedanke, daß der monophyletische Ursprung in konservierten Strukturen des katalytischen Proteins der RRasen wiedergefunden werden könnte, war der Schlüssel zu der in dieser Arbeit beschriebenen Klonierung der RRase-Gene von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum*.

Geleitet von dem Gedanken über den monophyletischen Ursprung der RRasen baute die Strategie für die erfolgreiche PCR-Klonierung der RRase-Gene von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* auf einem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener bekannter NrdA- bzw. NrdE-Proteine auf (Kap. 3.2.1.). Besonders wertvoll für diesen Vergleich war die Sequenz des Gens der katalytischen Untereinheit der RRase von *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994), nach deren Veröffentlichung auch die Sequenz eines Organismus aus dem phylogenetischen Zweig der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt zur Verfügung stand. Die Primärstrukturen der untersuchten Proteine wiesen mehrere konservierte Bereiche auf, von denen die zwei auffälligsten Aminosäurefolgen für die Entwicklung von Primern benutzt wurden, die schließlich zu der in dieser Arbeit beschriebenen Klonierung der gesuchten Gene führte. Rückblickend auf den Grundgedanken der Strategie unterstreicht die Sequenz „SNLCXE“, aus der Primer 1 abgeleitet wurde (Abb. 3.4), die Argumentation für den monophyletischen Ursprung der katalytischen Proteine der RRasen, denn hier ist ein funktionell äußerst wichtiger Cysteinrest erhalten (siehe Einleitung). In der Fe-RRase wurde dieser Cysteinrest mit der Übertragung des Radikals auf die Substrate in Verbindung gebracht (UHLIN & EKLUND, 1994; 1996). Er ist das letzte Glied in einer Kette von Aminosäuren, die am Elektronentransport beteiligt sind und das unter Beteiligung des Cofaktors gebildete Radikal zum aktiven Zentrum leiten (Abb. 4.1).

An diesem Langstreckentransport sind im R1-Protein der Fe-RRase von *E. coli* zwei weitere Cysteinreste beteiligt (SJÖBERG, 1997), die innerhalb der beim Vergleich der NrdA- und NrdE-Proteine gefundenen konservierten Bereiche liegen. Bezieht man in dieses Proteinalignment auch die inzwischen klonierten und sequenzierten B<sub>12</sub>-abhängige



**Abbildung 4.1** Schematische Darstellung des Elektronentransportes vom Tyrosylradikal in der metallhaltigen Untereinheit zur Substratbindestelle in der katalytischen Untereinheit. Die Nummerierung der in allen RRasen konservierten Aminosäuren richtet sich nach der Fe-RRase.

RRasen von *L. leichmannii* (BOOKER & STUBBE, 1993) und verschiedener anderer *Eubacteria* (JORDAN et al., 1997b) sowie des Archaeobacteriums *Thermoplasma acidophila* (TAUER & BENNER, 1997) mit ein, findet man auch in diesen Sequenzen (die Gene sind in Tab.4.1 angegeben) diese Bereiche wieder (Abb. 4.2). Genauso ist eine andere Domäne erhalten, die für die Effektorbindung vorgeschlagen wird (ORMÖ & SJÖBERG, 1996). Geht man wie TAUER & BENNER (1997) noch einen Schritt weiter und vergleicht zusätzlich die prognostizierte Sekundärstrukturen der RRasen, kann dadurch die Ähnlichkeit größerer Bereiche zwischen Fe- und B<sub>12</sub>-RRasen gezeigt werden, deren Kernregionen jeweils die in Abbildung 4.2 hervorgehobenen identischen Aminosäuren bilden. Aus den Sekundärstrukturen können sogar Übereinstimmungen zwischen B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen und dem anaeroben Klasse III Enzym abgeleitet werden (TAUER & BENNER, 1997). Interessanterweise findet man bei allen in der hier vorgelegten Arbeit verglichenen RRasen im N-terminalen Teil der betrachteten Proteine Ähnlichkeiten, die den monophyletischen Ursprung der katalytisch-regulatorischen Domänen widerspiegeln. Die Cofaktor-bedingte Diversität der RRasen zeigt sich dagegen insbesondere im C-terminalen Drittel der katalytischen Proteine. Hier sind auch die Aminosäuren „KTXYY“, aus denen Primer 2 abgeleitet wurde, lokalisiert (Abb 3.4). Sie sind in allen NrdA- und NrdE-Proteinen konserviert (Kap. 3.1.2.1.), können aber in den B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen nicht entdeckt werden (Abb. 4.2). Die beiden Tyrosinreste stellen wahrscheinlich eine spezielle Anpassung der aeroben RRasen aus zwei verschiedenen Untereinheiten an die besondere Nutzung ihres Cofaktors dar, weil die Erhaltung eines stabilen proteingebun-

**Tabelle 4.1** Die verschiedenen RRase-Typen, ihre Gene und ihrer Funktion

RRase-Typ	Klasse	Gene	Bezeichnung der Untereinheiten	Funktion der Genprodukte
Fe-RRase	I	<i>nrdA</i> <i>nrdB</i>	R1 R2	Ribonucleotid-Reduktion in <i>Enterobacteriaceae</i> (CARLSON et al., 1984; JORDAN et al. 1994a), in Eukaryoten (z.B. <i>H. sapiens</i> (PARKER et al., 1991 <i>M. musculus</i> (CARAS et al. 1984), <i>A. thaliana</i> (PHILIPPS et al., 1995) und deren Viren
Fe?	Ib	<i>nrdE</i> <i>nrdF</i>	R1E R2F	Ribonucleotid-Reduktion in <i>M. tuberculosis</i> (YANG et al., 1997) und <i>B. subtilis</i> (SCOTTI et al., 1996); keine Funktion in <i>Enterobacteriaceae</i> nachgewiesen (JORDAN et al., 1994b)
B <sub>12</sub> -abhängige RRase	II	<i>nrdJ</i>		aerobe und/oder anaerobe Ribonucleotid Reduktion in verschiedenen <i>Eubacteria</i> (HOGENKAMP, 1984; BOOKER & STUBBE 1993; JORDAN et al., 1997b) und <i>Archaea</i> (TAUER & BENNER 1997)
anarobe RRase	III	<i>nrdD</i>		anaerobe Ribonucleotid-Reduktion in <i>E. coli</i> (FONTECAVE et al., 1989)
Mn-RRase	IV	<i>nrdE</i> <i>nrdF</i>	CA1/CG1 CA2/CG2	<b>Ribonucleotid-Reduktion in <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> (diese Arbeit)</b>

denen Radikals die Bindung des Cofaktors in einem separaten Protein zu erfordern scheint. Von diesem muß das Radikal auf die katalytische Untereinheit übertragen werden, wo es in der Fe-RRase von den beiden Tyrosinresten übernommen wird (UHLIN & EKLUND, 1994; EKBERG et al., 1996). Sie haben deshalb wohl eine spezifische funktionelle Bedeutung in den RRasen, die den Cofaktor in einer separaten Untereinheiten integriert haben, was nur bei den Klasse I und IV RRasen zutrifft.

So betrachtet wurde nur einer der beiden hier benutzten Klonierungsprimer aus einem konservierten Bereich abgeleitet, der auf Grund seiner funktionellen Bedeutung in allen RRasen vorhanden ist und mit dem monophyletischen Ursprung dieser Enzyme erklärt werden kann. Die Sequenz des zweiten Primers ist einer spezifischen Region der RRasen entnommen, die das Radikal von einer Untereinheit auf die andere übertragen müssen, zu denen auch die Mn-RRase von *C. ammoniagenes* gehört. Die erfolgreiche Amplifizierung

C.g.	-----MPR---GDQMDFH-----	10
C.a.	-----MTQQLGKTVAEPVKN---SEKLDHF-----	22
E.c.a	-----MNQNLLVTKRDGSTERINLDKIHRVLD---WAAEGLHNVSISQ	40
L.l.	MSEEIS---LSAEF IDRVKASVKPHWGKLGWVYKRTYARWLPEKGRSENWDETVKRVVE	57
T.a.	MIKEVVKRDGTVPFEKNKITMAIYKAMLSVKNGTMKDAEQ LADKVVARLKDKERPSVEE	60
	:	
C.g.	-ALNALLNLYD-----DNGKIQFEKDREAANQYFLQHVNQNTVFFHN-----	51
C.a.	-ALNALLNLYD-----EDGKIQFDKDREAANQYFLQHVNQNTVYFHD-----	63
E.c.a	VELRSHIQFYDG-----IKTSDIHETIIKAAADLISRDPDYQYLAARLAIHFLRKKAYG	95
L.l.	GNINLDPRLQDS-----PSLELKQSLTEEAERLYKLIYGLGATPSGRNLWISGTDYQR	110
T.a.	IQDVVEDVLMTSKIDGKFTTDVAKSYI LYREKRAIREEKELMGVKDDLKLT LNAVKVLE	120
	:	
C.g.	-----LQEKIDYLVENKYYDPIVLDKYDFQFIKDL-----FKRAYGFKFR---FQSFLG	97
C.a.	-----LEEKIEYLVENKYYEPEVIEAYDWEFIKSL-----FKRAYSFKFR---FKSFLG	109
E.c.a	QFEPALYDHVVKMVMEMGKYDNHLLDYTEEEFKQMDTFIDHRRDMTFSYA--AVKQLEG	153
L.l.	RTGDSLNNCFVAIRPQKYGDSKIVPSYLGKQEKAVSMPFSCLEFDEIMKGGGV--GFSVAR	169
T.a.	ARYLLKDEDGKIIETPRQMFRR--VASHIGIVEALYDIKYKKTGKVPENAEI-IGKVSP	177
	: : . .	
C.g.	AYKYYSYTLKTFDGRRYLERFEDRVCMVALTADGDRALAE NLVDEIMSGRFQPATPTF	157
C.a.	AYKYYSYTLKTFDGRRYLERFEDRVSMTALFLADGDTAVAESMVDEIMSGRFQPATPTF	169
E.c.a	KYLVQNRVTGEIYESAQFLY-ILVAACLF SNYPRETRLQYVKRFYDAVSTFKISLPTPIM	212
L.l.	SNISQIPRVDF AIDLQLVVD ETSYDASVKVGAVGKNELVQDADSIYYRLPDTREGWVL	229
T.a.	TQEEVLRRAF GYMKEDGII EGTFF EFMDFIQTKGTSAGHYINRFE EVMSSLD FVPNSPTL	237
	: . . : . .	
C.g.	LNSGKAQRGEPVSCFLLRIEDNMESIGRSINSALQLSKRGGGVALLLSNLREAGAPIKKI	217
C.a.	LNAGKAQRGELVSCFLLRIEDNMESIGRAINSSLQLSKRGGGVALLLSNIRESGAPIKHI	229
E.c.a	SGVRTPTR-QFSSCVLIECGDSLDSINATSSAIVKYVSRAGIGINAGRIRALGSPIRGG	271
L.l.	ANA-----LLIDLHFAQTNPDRKQK----LILDLSDIRPYGAEIHGF	277
T.a.	MNAGTKLG-QLSACFVLPVGD SIEDIFETLKN TALIHKSGGGTGF SFSRLRPKDDIVGST	296
	: : . . : . . : . . *	
C.g.	ENQSSGVI PVMKLEDAFSYANQLGARQGAGAVYLN AHPDILSFLDTKRENADEKIRIK	277
C.a.	ENQSSGIIPIMKLEDAFSYANQLGARQGAGAVYLN AHPDILNFLDTKRENADEKIRIK	289
E.c.a	EAFHTGCI PFYKHFQTAVKSCSQGGV RGAATLFYPMWHLEVESLLVLKNNR GVEGNRVR	331
L.l.	GGTASGPMPLISMLLDVNEVLNNKAGGR-----LTAVDAADICNLIGKAV---VAGNVR	329
T.a.	KGVASGPVSMKIFDVTTDVIKQGGKRRGANMGI LNYNHPDIMEFILSKD---SENKVLS	353
	* : . . . : . . : . . : . .	
C.g.	TLSLGVIPDITFELAKRND-DMYLFSPYDVERIY GKPFDVSI-ITEHYDEMVD DDIRIK	335
C.a.	TLSLGVIPDITFDLAKRNE-DMYLFSPYDVERIY GKPFGDIS-VSDHYAEMVEDPRITK	347
E.c.a	HMDYGVQINKLMYTRLLKGE-DITLFS P SDV PGLYDAFFADQEEFERLYTKYEK D DSIRK	390
L.l.	SAELALGSNDDQDFISMKQDQ-----EKL MHRWASNN SV	364
T.a.	NFNISVGVTDD-FFDKLDND-----DYVDLVNPRITKIM	386
	. : . . : . .	
	Primer1	
C.g.	TKINARQFFQTLAEIQFESGYPI MYEDTVNASNPIEG-----RITHSNLCSEILQV	387
C.a.	KKINARHFFQTVAEIQFESGYPI MFEDTVNNANPVKTG-----RINMSNLCSEILQV	400
E.c.a	QRVKAVELFSLMMQERASTGRIYIQNV DHCNTHSPFDPAI----APVRQSNLCLEIALP	445
L.l.	AVDSAFSGYQPIAAGIRENGEPGIVNLDSLKNYGRIVDGYQAGIDGDVEGTNPGCEISLA	424
T.a.	KRIKAREIWD AIIDQAWKTADPGLIFLDEINRKNPVKN-----VGDIESTNPGCEQPLL	440
	.* : . . : . . : . . : . . : . . *	
C.g.	STPSEFNDDLTYAEVGEDISCNLGS LNVMAMDSP-----NFEKTIETAIRGLTAVSEQ	441
C.a.	NSPSSFNDDL SYEEMGSDISCNLGS MNIALAMDSP-----DFGGTVEAAIRGLTAVADK	454
E.c.a	TKP--LNDVN--DENGEIALCTLSAFNLGAINNLD-----ELEELAILAVRALDALLDY	495
L.l.	NGE-----PCNLFEVFLIAEEQG-----WDLQEVFALAAARYAKRVTF S	453
T.a.	PYE-----SCNLGSINLSKYVVDGKKIDFDR LRET VWTATRF LDDVIDA	484
	* . * . : . . : . . : . .	
C.g.	TSIDSVPSIRKGNAAAHAIGLQMN LHGYFGR-EHMHYGSE EALDFTNAYFAAVLYQC-L	499
C.a.	TAIDSVPSIRHGNDQSHAIGLQMN LHGYLGR-EHIYYGSE EGLDFTNAYFAAVLYAA-L	512
E.c.a	QDYP-IPAAKRGAMGRRTLIGIVINFAYY LAK-HGKRYSDGSANNLTHKTFEAIQYYL-L	552
L.l.	-PYDWEISREIIQK-NRRIGISMSG IQDWLLTRLGNRVVTGFKDDDFDPTHEAIKVPVYD	511
T.a.	NKFPVEQIKKVTRM-TRKIGLGVMGFADMLIK-LEIPYNSWEALEIGEKVMSFINDES-H	541
	. : * : . . : . . : . . : . .	
C.g.	RASNKIATERGERFKNFENSKYATGEYDFDDFDANDFAPKSDVKELFAKSNIH-----	552
C.a.	RASNKIAKERGETFSEFKSDSYASGV FFDNYDPAEFAPQTDVKELFANSTIH-----	565
E.c.a	KASNELAKEQG-ACPWFNETTYAKGILPIDTYKKDLDT-----IAN-----	592
L.l.	KRAIKMVDQLYKAVVKADQDYSKTLGCNESIKHTTVKPSGTVAKLAGASEGMHFHYGAYL	571
T.a.	KASQALAEERAVFP AWYGSEWEKEG IKMRNSTTTTIAPTGTISI IAGCSSSIEP IFALAF	601
	: : . . : . . : . . : . .	

C.g.	-----TPTVEDWAALKADVMEHGLFNRLQAVPPTGSISYINNSTSSIHHP-IASKIEI	604
C.a.	-----TPSAEDWADLKAEVMEHGLYNRNLQAVPPTGSISYINNSTSSIHHP-IASKIEI	617
E.c.A	-----EPLHYDWEALRESIKTHGLRNLSTLSALMPSETSSQISNATNGIEP-PRGYVSI	644
L.l.	IQRIR----FQSDP LLP-ALKACGYRTEADIYTTENTTCVEFFIKAVGADNPNFASAGTV	626
T.a.	VRHVLNGQELLEVNPLFEEKTRELGIYSEELMRQVAETGNLENVKINEEVKKIFVTAHEI	661
	: * . : . :	
C.g.	RKEGKIGRVYYPAPHMDNDNLEYFEDAYEIGYEKIIDTYAVATK-----YVDQGLS	655
C.a.	RKEGKIGRVYYPAPHMDNDNLDYFQDAYEVGHEKIIDTYAVATK-----YVDQGLS	668
E.c.A	KAS-KDGILRQVVPDYEHLLDAYELLWEMPGNDGYLQLVGMQK-----FIDQSSIS	694
L.l.	SIAEQFATQAF LQTYWSDNAVSC TITFQ-DSEGDQVESLLRQYR-----FITKSTS	677
T.a.	DPQWHVLMQATFQRY-CDSGVSKTINMRSDATREDIARAYRMAKDLHCKGITVYRDKSKT	720
	: . . : : : : . : . :	
	Primer2	
C.g.	LTLFFKDT-----ATTRDINRAQIYAWRKGIKTLLYYIRLRQVALEG-----TEVDGC	702
C.a.	LTLFFRDT-----AATRDINRAQIFAWRKGIKTLLYYIRLRQMALAG-----TEIEGC	715
E.c.A	ANTNYDPSRFPSGKVPMQQLLKDLLTAYKFGVKTLLYYQNTRDGAEDAQDDLVP SIQDDGC	754
L.l.	LLPYFGGSLQQAP-KEP IDKETYEKRSQEITGNVEEVFSQLNSDVKDLE----LVDQTDC	732
T.a.	VQVLTAGTAETK---KPEEKEVIELVT-KMPDKYLKIDSTDFPACRRES----AINEKIL	772
	: : : . : : :	
C.g.	VS--CML-----	707
C.a.	VS--CML-----	720
E.c.A	ESGACKI-----	761
L.l.	EGGACPIK-----	740
T.a.	I IYICIFIFKIIFAVGSCFRNAPMGISPFKGVQTASRVLICRLYAPVPYVSVLKVTFDLV	832
	* :	
T.a.	ERYLWPVLLAEVSQYYPHIIRGHP	857

**Abbildung 4.2** Vergleich der Aminosäuresequenzen der katalytischen Untereinheiten von *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* (OEHLMANN et al., 1998; FIESCHI et al., 1998) mit R1 der Fe-RRase von *E. coli* (NILSSON et al., 1988) und den B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen von *L. leichmannii* (BOOKER & STUBBE, 1993) und *T. acidophila* (TAUER & BENNER, 1997). Die in der Fe-RRase am Elektronentransfer beteiligten Regionen (SJÖBERG, 1997) sind grau unterlegt. Eine konservierte Region, die vermutlich an der Effektorbindung beteiligt ist (ORMÖ & SJÖBERG, 1996), ist umrandet.

eines Teils von *nrdE* aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* mit den degenerierten Primern bestätigte die Überlegungen zur Klonierungsstrategie.

Die Tatsache, daß bei der Anwendung der Klonierungsprimer etwaige Nebenprodukt ausblieben, spricht für die Qualität der Primer, die bei den gewählten PCR-Bedingungen wenig bzw. keine Fehlpaarungen eingingen. Vergleicht man die Sequenz der Primer (Abb. 3.4) mit denen, die nach der Klonierung und Sequenzierung des gesamten *nrdE*-Gens (Abb. 3.15) für die entsprechenden Bindungsstellen bestimmt wurde, so findet man im Fall von *C. glutamicum*, daß bei den Klonierungsprimern von den 20 Basen nur 3 bzw. 4 nicht richtig rückübersetzt worden waren. Ein Grund für diese niedrige Fehlerquote ist, daß in den Bereichen, die für die Primerentwicklung genutzt wurden, mit Asparagin, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure und Tyrosin viele Aminosäuren mit nur zwei möglichen Codons enthalten waren. In Corynebakterien wird von den beiden Codons jeweils das mit höherem GC-Anteil deutlich bevorzugt (FOLLETTIE & SINSKEY, 1986; EIKMANN, 1992). Aber auch bei den Aminosäuren Arginin und Serin, die ebenfalls in den Bereichen für die Primerentwicklung enthalten waren, wird bei

Corynebakterien die Mehrzahl der möglichen Codons in ihrem Gebrauch diskriminiert, so daß nur ein oder zwei in Frage kamen.

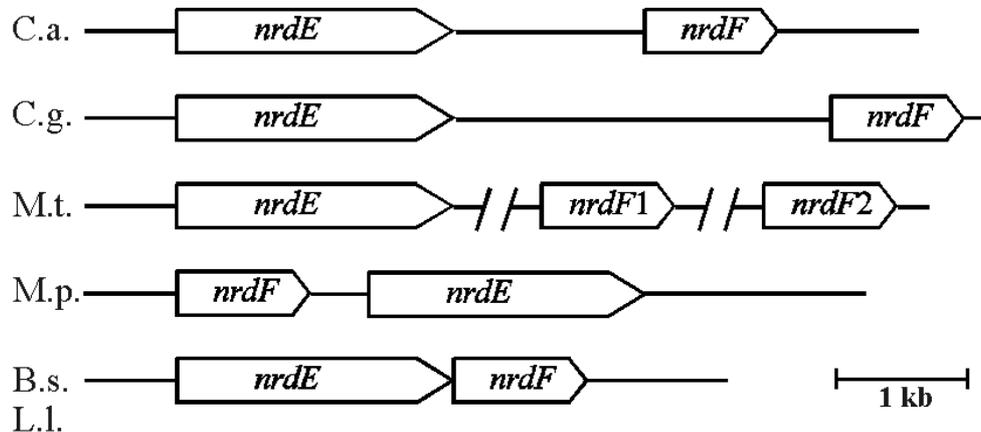
Nachdem die Schrotschußkomplementation wegen zu niedriger Gentransferraten aufgegeben werden mußte, deutete sich nach der erfolgreichen PCR mit den degenerierten Primern der Durchbruch bei den Klonierungsarbeiten an. Neben dem proteinbiochemischen Arbeitsansatz hatte sich insgesamt eine dritte Vorgehensweise bei der Klonierung der Mn-RRase-Gene eröffnet (siehe Problemstellung). Nach der PCR standen für *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* Sonden zur Verfügung, mit denen das Screening nach den Genen von CA1 und CG1 durchgeführt werden konnte. Denn die Sequenz des PCR-Produktes von *C. ammoniagenes* ließ eindeutig große Ähnlichkeit mit bekannten RRase-Genen erkennen, was dazu ermutigte, die Klonierungsexperimente fortzusetzen, aber andererseits Zweifel an der Richtigkeit des Weges über die Peptidinformationen aufkommen ließ. Der Anlaß zu diesen Zweifel begründete sich in der Sequenzähnlichkeit der PCR-Produkte zu den *nrde*-Genen von *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994) und *S. typhimurium* (JORDAN et al., 1994a), die so groß war, daß die Amplifikate Fragmente der *nrde*-Gene der Corynebakterien sein mußten. Welche Bedeutung dies im Hinblick auf die Reinigung von CA2 hatte, geht aus der Klärung der Frage hervor, ob *nrde* wirklich das Gen der katalytischen Untereinheit einer Mn-RRase sein konnte.

Die DNA-Synthese einer Vielzahl von Gram-positiven Bakterien steht bekanntlich unter dem Einfluß von Mangan (WEBLEY, 1960; WEBLEY et al., 1962; AULING, 1980; SCHIMPF-WEILAND et al., 1981; LAMMERS & FOLLMANN, 1983; AULING & FOLLMANN, 1994). Bei *M. tuberculosis* läßt sich dabei mit der Verwandtschaft zu *Corynebacterium* und anderen mykolsäurehaltigen Bakterien argumentieren (COLLINS & CUMMINS, 1986). Außerdem bilden NrdEF die essentielle RRase in *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994;1997; SCOTTI et al., 1996) und ebenfalls in *B. subtilis* einem weiteren Gram-positiven Bakterium, für das der Einfluß von Mangan auf die DNA-Synthese gezeigt werden konnte (GVOZDIK et al., 1996; MOHAMMED et al., 1998). Deshalb lag der Gedanke nahe, daß die Gen-Familie *nrdeF* im Gegensatz zu *nrdaB* für eine andere biochemisch wenig untersuchte Enzym-Klasse kodiert.

Wenn *nrde* das Gen der katalytischen Untereinheit der RRase in Corynebakterien war, stand zu erwarten, daß *nrdf* das Gen der metallhaltigen Untereinheit ist. Diese Überlegung war der Grund für die genannten Zweifel an der Richtigkeit der Voraussetzungen zur Reinigung von CA2. Nach den biochemischen Daten von WILLING et al. (1988a; 1988b), basierend auf den Ergebnissen von Gelfiltration und SDS-Polyacrylamidgelelektrophores, besaß die Mn-RRase von *C. ammoniagenes* ein Molekulargewicht von 50 kDa, während die in dieser Arbeit durchgeführten Berechnung der von bekannten *nrdf* abgeleiteten Aminosäuresequenzen Molmassen zwischen 35 und 38 kDa ergab.

Sicherlich besitzen die biochemischen Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen Ungenauigkeiten, aber diese große Diskrepanz zwischen gemessenem und berechnetem Wert ließ befürchten, daß sich die Reinigung auf das falsche Protein konzentriert hatte. Als die Sequenzen von *nrdF1* und *nrdF2* aus *M. tuberculosis* bekannt wurden (YANG et al., 1997), bot sich ein neuer vielversprechender genetischer Ansatz zur Klonierung von *nrdF* aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum*. Daraufhin wurde der Weg über die Proteinreinigung aufgegeben. Der erfolgreiche Einsatz eines PCR-Amplifikats von *nrdF2* aus *M. tuberculosis* als Sonde führte zur Klonierung von *nrdF* aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum*. Dabei stellte sich heraus, daß *nrdE* und *nrdF* in *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* wie auch in *M. tuberculosis* (YANG et al., 1994; YANG et al., 1997) getrennt liegen (Abb. 3.9 und 3.18). Die durch Untersuchungen der 16S rRNA belegte nahe Verwandtschaft von *Corynebacterium* zu *M. tuberculosis* (PASCUAL et al., 1995) war der Grund, daß diese getrennte Anordnung der *nrd*-Gene nur wenig bemerkenswert war, aber es überraschte schon, daß die *nrd*-Gene unterschiedliche Abstände zueinander aufwiesen. Diese drei Gram-positiven Bakterien Spezies mit hohem GC-Gehalt haben drei verschiedene Genanordnungen bezüglich *nrd*. Berücksichtigt man alle derzeit bekannten *nrdEF*-Operon Strukturen innerhalb des Taxons der Gram-positiven Bakterien, findet man mindestens fünf grundsätzlich unterschiedliche Anordnungen der *nrdEF*-Gene (Abb. 4.3). Zwei Varianten bilden *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum*, bei denen lediglich der Abstand zwischen *nrdE* und *nrdF* unterschiedlich ist. Außerdem fehlt bei *C. glutamicum* ein offenes Leseraster, das bei *C. ammoniagenes* zwischen *nrdE* und *nrdF* gefunden wurde (FIESCHI et al., 1998). In *M. tuberculosis* ist der Abstand zwischen den beiden *nrd*-Genen noch größer als bei *C. glutamicum* und *nrdF* ist sogar in zwei Kopien vorhanden, von denen aber nur eine für ein intaktes Protein verantwortlich ist (YANG et al., 1997). In diesen drei beschriebenen Fällen erscheint auf Grund der doch recht großen Genabstände unwahrscheinlich, daß die *nrd*-Gene als polycistronische mRNA abgelesen werden. In *B. subtilis* (SCOTTI et al., 1996) und *Lactococcus lactis* (JORDAN et al., 1996) liegen *nrdEF* direkt hintereinander und es ist zu erwarten, daß sie gemeinsam als ein mRNA-Strang transkribiert werden. Eine fünfte Variante existiert in *Mycoplasma pneumoniae*. Hier ist die Reihenfolge von *nrdE* und *nrdF* vertauscht. Zwischen *nrdF* und *nrdE* liegt bei *M. pneumoniae* das Gen *nrdI* (FRASER et al., 1995), das bei allen anderen genannten Spezies auch immer stromaufwärts von *nrdE* zu finden ist. In diesem Vergleich Gram-positiver Bakterien darf *L. leichmannii* natürlich nicht vergessen werden. Die B<sub>12</sub>-abhängige RRase von *L. leichmannii* besteht im Gegensatz zu Fe- und Mn-RRase nur aus einer Untereinheit, so daß auch nur ein Gen benötigt wird (BOOKER & STUBBE, 1993). Außerdem sind die B<sub>12</sub>-Enzyme auch unter Sauerstoffausschluß funktionsfähig und ermöglichen so den Organismen, die Ribonucleotid-Reduktion unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen durchzuführen (BLAKLEY, 1982).

Noch vielfältiger wird die Variation der *nrd*-Genorganisation, wenn man bei den Gram-positiven Organismen die Gene für eine zweite RRase mit einbezieht. So ist in *L. lactis* auch das Gen *nrdD* (Tab. 4.1) für eine anaerobe KlasseIII RRase vorhanden (JORDAN et al., 1996). Und für *M. tuberculosis* wird berichtet, daß neben *nrdEF* noch *nrdJ* für eine B<sub>12</sub>-abhängige RRase vorhanden ist (JORDAN et al., 1997b; FIESCHI et al., 1998).



**Abbildung 4.3** Organisation der *nrd*-Gene in Gram-positiven Bakterien *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum*, *M. tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *B. subtilis* und *L. lactis*.

Betrachtet man die Verbreitung der *nrdEF*-Gene, findet man sie bei einem breiten Spektrum der Gram-positiven Bakterien sowohl bei denen mit hohem als auch mit niedrigem GC-Gehalt und auch bei Gram-negativen Bakterien. Im Vergleich dazu sind *nrdAB* bislang nur bei *Enterobacteriaceae* und dem nah verwandten *Haemophilus influenza* (FLEISCHMANN et al., 1995) entdeckt worden. Daraus kann man schließen, daß NrdEF die vorherrschende strikt aerobe Ribonucleotid-Reduktase bei den Mikroorganismen ist (JORDAN et al., 1996).

Auch wenn die Manganabhängigkeit der DNA-Synthese bei den Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt weit verbreitet ist (WEBLEY, 1960; WEBLEY et al., 1962; OKA et al., 1968; SCHIMPF-WEILAND et al., 1981; LAMMERS & FOLLMANN, 1983; PLÖNZIG & AULING, 1987), darf man nicht außer Acht lassen, daß innerhalb dieses phylogenetischen Zweiges in den Gattungen *Propionibacterium* (JORDAN & PETHUKNOVA, 1995) und *Streptomyces* (PRYANISHNIKOVA & JORDAN, 1998) auch Organismen mit B<sub>12</sub>-abhängiger RRase gefunden wurden. Deshalb wäre es denkbar, daß auch in *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* wie in *M. tuberculosis* (JORDAN et al., 1997b; FIESCHI et al., 1998) oder den *Enterobacteriaceae* (JORDAN et al., 1994b) mehr als eine Ribonucleotid-Reduktase vorkommen kann. Da die B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen gegen HU als Inhibitor unempfindlich sind (LAMMERS & FOLLMANN, 1983), die Ribonucleotid-Reduktion in *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* aber durch HU vollständig gehemmt werden kann (AULING, 1980; WILLING et al. 1988a; WALTER, 1996; LUO et al., 1997),

muß die Beteiligung einer Klasse II RRase unter aeroben Bedingungen in diesen beiden Spezies ausgeschlossen werden.

CA1 und CA2 bzw. CG1 und CG2 sind die in den biochemischen Tests untersuchten Komponenten, die die essentielle Ribonucleotid-Reduktase in *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* bilden. Bei der Klärung, ob *nrdEF* die Gene der essentiellen RRase in den Corynebakterien sind, ist für die Argumentation von Bedeutung, daß nur Untereinheiten des gleichen RRase-Typs miteinander binden und ein aktives Enzym bilden. Bestimmend für die Kooperation der Untereinheiten scheint das C-terminale Ende des metallhaltigen Proteins zu sein, wie aus der Kristallstruktur der Fe-RRase abgeleitet wurde (UHLIN & EKLUND, 1994; 1996). Es ist sogar möglich, mit Heptapeptiden, deren Sequenz dem C-Terminus von R2 entspricht, die Bindestelle so zu blockieren, daß kein Holoenzym gebildet werden kann und dadurch die Enzymaktivität gehemmt wird (YANG et al., 1990; LAPLANTE et al., 1994). Die Hemmung durch Heptapeptide wurde auch an der Ribonucleotid-Reductase von *M. tuberculosis* demonstriert, wobei die Effizienz der Hemmung abnahm mit zunehmendem Unterschied des Peptides zum natürlichen C-Terminus von R2F, weil auch die Bindung zu R1E schlechter wurde (YANG et al., 1997). Mit der fehlenden Kooperation der Untereinheiten verschiedener RRase-Typen kann man die Beobachtung von JORDAN et al. (1994a, 1994b) erklären, daß bei der Klonierung von *nrdEF* aus *S. typhimurium nrdA*- oder *nrdB*-Mutanten von *E. coli* nur dann komplementiert wurden, wenn *nrdE* und *nrdF* gemeinsam transformiert wurden. Die Genprodukte von *nrdEF* stellten zusammen die benötigte Funktion in den Mutanten wieder her. Einzeln waren sie nicht in der Lage mit der Untereinheit des anderen RRase-Typs kooperieren und der Defekt konnte nicht komplementiert werden. Vergleicht man die C-Termini von R2 aus *E. coli* und R2F von *S. typhimurium* (Abb. 4.4), fällt sofort der gravierende Unterschied der letzten Aminosäuren ins Auge. Abgeleitet auf die in dieser Arbeit gezeigte genetische Komplementation der in CA1 defekten thermosensitiven Mutanten CH31 und CH33 mit dem einzelnen *nrdE* Gen aus *C. glutamicum* (Kap. 3.3.5.) bedeutet dies, daß die Komplementation bei 37°C nur möglich war, weil CA2 mit dem Genprodukt von *nrdE* kooperierte und ein funktionsfähiges Hybridprotein bildete. Das Genprodukt von *nrdE* übernahm die gleiche Funktion wie CG1 in der biochemischen Kreuzkomplementation (Kap. 3.1.4.). Man kann daraus schließen, daß *nrdE* aus *C. glutamicum* das Gen für CG1 ist.

Durch das Einbringen von *nrdE* waren die Mutanten bei 37°C wieder zur Ribonucleotid-Reduktion befähigt und dadurch zur Zellteilung. Die komplementierten Mutanten wuchsen bei 37°C allerdings nicht so gut wie der Wildtyp (Abb. 3.19). Da sich bei CA2 und CG2 wenige Aminosäuren im C-terminalen Bereich unterscheiden, könnte dadurch die Bindung von CA2 der Mutanten mit dem komplementierenden CG1 weniger effektiv sein als mit CA1. Aber größere Bedeutung dürfte der Konkurrenz zwischen defektem

CA1, das in den Mutanten schließlich noch synthetisiert wird, und dem heterolog exprimierten CG1 um die Bindung mit CA2 zukommen. Auf jeden Fall erkennt man aus den genetischen Komplementationstests, daß das Einbringen von *nrdE* aus *C. glutamicum* die Lebensfähigkeit der Mutanten von *C. ammoniagenes* bei 37°C wieder herstellt und das gebildete heterologe Genprodukt *in vivo* die gleiche Funktion übernimmt wie CG1 *in vitro* ist. Dies läßt den Schluß zu, daß *nrdE* von *C. glutamicum* das Gen für CG1 ist.

Die Bedeutung des Genproduktes von *nrdF* aus *C. ammoniagenes* zeigte sich nach der Erhöhung der Kopienzahl von *nrdF* durch Einbringen des Plasmids pWCA5 (Abb. 3.9) in den *C. ammoniagenes* Wildtyp, der anschließend eine etwa 6fach erhöhte Toleranz gegenüber dem RRase-spezifischen Hemmstoff HU zeigte. Anders als die gesteigerte HU-Toleranz spiegelte die RRase-Aktivität in permeabilisierten Zellen, die pWCA5 enthielten, die Erhöhung der Kopienzahl nicht so klar wider (Tab. 3.3). Ein Grund dafür ist, daß die Anzahl der katalytischen Untereinheiten CA1 in den transformierten Zellen limitierend für die RRase-Aktivität war. Außerdem unterlag das plasmidkodierte *nrdF* der natürlichen Regulation (SUN & FUCHS, 1992; BIANCHI et al., 1997) der Wildtypzelle, so daß wahrscheinlich die Anzahl der CA2-Moleküle nicht um den Faktor erhöht wurde, der der Kopienzahl des Gens in pWCA5 (ca. 10 Kopien pro Zelle; J. KALINOWSKI, persönliche Mitteilung) entspricht. Anders verhält sich das allerdings in dem HU-Experiment, bei dem der Hemmstoff durch das Löschen des proteingebundenen Radikals CA2 inaktiviert. Hier muß *C. ammoniagenes*, um weiterhin Ribonucleotide reduzieren zu können, mehr CA2 mit intaktem Radikal produzieren und kann dabei den multi-copy-Effekts ausnutzen, so daß im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte HU-Toleranz erreicht werden kann. Der Einfluß von *nrdF* auf die Ribonucleotid-Reduktion ist klar zu erkennen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Komplementationversuche haben den Einfluß von *nrdEF* aus *C. ammoniagenes* bzw. *C. glutamicum* auf die Mangan-abhängige Ribonucleotid-Reduktion in *C. ammoniagenes* gezeigt. Besonders wichtig ist dabei, daß anders als bei der Klonierung von *nrdEF* aus *S. typhimurium* (JORDAN et al., 1994a; 1994b) *nrdE* bzw. *nrdF* der Corynebakterien unabhängig voneinander diesen Einfluß auf die Ribonucleotid-Reduktion von *C. ammoniagenes* ausüben, weil dies verdeutlicht, daß *nrdE* und *nrdF* die Gene für CA1 und CA2 bzw. CG1 und CG2, die Untereinheiten der biochemisch nachgewiesenen RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* (AULING, 1980; WILLING et al., 1988a; BLASCZYK, 1994; GRIEPENBURG et al., 1998), sind. Es besteht aber die Möglichkeit, daß in *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* wie im Fall von *nrdEF* in *Enterobacteriaceae* (JORDAN et al., 1994a; 1994b) vielleicht auch die Gene eines anderen RRase-Typs vorhanden sind, der allerdings biochemisch nicht nachgewiesen werden kann. Hinweise darauf, daß außer *nrdEF* noch Gene weiterer

RRasen in *C. ammoniagenes* vorkommen, wurden bislang nicht gefunden (OEHLMANN et al., 1998; FIESCHI et al., 1998).

Durch die Klonierung und Sequenzierung der Gene der RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* war es möglich, neben dem biochemischen Vergleich (siehe Einleitung) die Mn-RRase auch in den molekularen Vergleich der RRasen einzubeziehen. Die in der Klonierungsstrategie (siehe Problemstellung) formulierte Annahme, bei der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* handle es sich um eine eigene Klasse von Enzym, die sich wegen ihrer spezifischen Eigenschaften von den anderen bekannten RRasen unterscheiden sollte, bestätigte sich mit der Identifizierung von *nrdEF* als den Genen der Mn-RRase. Einerseits zeigte der molekulare Vergleich von Mn- und Fe-RRase, in Form der abgeleiteten Primärstrukturen der Proteine (Abb 4.2), die Gemeinsamkeiten beider Enzyme in den konservierten Domänen der katalytischen Untereinheiten. Andererseits findet man für CA1 und R1 aber insgesamt nur etwa 30 % identische Aminosäuren, und auch das Molekulargewicht ist unterschiedlich. Das gleiche Bild findet man schon auf den ersten Blick bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen von CA2, CG2 und anderer NrdF-Proteine mit R2 der Fe-RRase (Abb. 4.4). Ob und welche der entdeckten konservierten Bereiche genau wie in den katalytischen Untereinheiten auf mechanistische Gemeinsamkeiten von Mn- und Fe-RRasen zurückzuführen sind, war die erste Fragestellung. Besonderes Interesse galt dem proteingebundene Radikal, das GRIEPENBURG et al. (1996) in der Mn-RRase nachgewiesen hatten. Absorptionsspektren über einen Bereich von 300 - 600 nm zeigen bei 410 nm das Absorptionmaximum des Tyrosylradikals der Fe-RRase (PETERSSON et al., 1980; LARSSON & SJÖBERG, 1986; SJÖBERG, 1997). Das Maximum eines Differenzspektrums von nativer und durch HU gehemmter Mn-RRase von *C. ammoniagenes* wurde bei 437 nm gefunden (AULING et al., 1997; GRIEPENBURG, 1998; OEHLMANN et al., 1998). Da diese Messungen mit partiell gereinigtem CA2 durchgeführt wurden, kann es durch die Verunreinigungen zu der leichten Verschiebung im Vergleich mit dem Fe-Enzym gekommen sein und es sich sehr wohl um gleichartige Radikale in Fe- und Mn-RRase handeln. Das proteingebundene Radikal der Fe-RRase ist, wie aus ihrer Kristallstruktur hervor geht, an Tyr<sub>122</sub> (hier und bei folgenden Angaben ist immer die Nummerierung der Fe-RRase von *E. coli* aufgeführt) lokalisiert (SAHLIN et al., 1995; NORDLUND et al., 1990). Einen entsprechenden Tyrosinrest findet man auch in der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* und ebenso in allen anderen hier verglichenen NrdF-Produkten (Abb. 4.4). Zusätzlich sind drei hydrophobe Aminosäurereste in allen hier verglichenen metallhaltigen Untereinheiten erhalten (Abb.4.4), denen im *E. coli* Enzym eine große Bedeutung für die Stabilität des Radikals beigemessen wird (ORMÖ et al., 1995). Ein Austausch dieser hydrophoben Reste durch „site-directed mutagenesis“ verkürzt die Halbwertszeit des Radikals in R2 aus *E. coli* von mehreren Tagen auf wenige Minuten. Die drei Aminosäurereste Phe<sub>208</sub>,

		#     ↓	
C.g.	--MAADSDLSVHDAYLKEHVAPVKAINWNSIPDSKDLEVDWRLTGNFWLPEKVPVSNDI		57
C.a.	-----SNEYDEYIANHTDPVKAINWNVIPDEKDLEVDWRLTGNFWLPEKIPVSNDI		51
M.t.R2-2	-----MTGNAKLIDRVSAINWNRLQDEKDAEVDWRLTGNFWLPEKVPVSNDI		47
S.t.	-----MKLSRISAINWNKIQDDKDLEVWNRLLTSNFWLPEKVPVLSNDI		42
E.c.	-----MKLSRISAINWNKISDDKDLEVWNRLLTSNFWLPEKVPVLSNDI		42
B.s.	-----MTKIYDAANWSKHEDDFTQMFYNQNVKQFWLPEEIALNGDL		41
E.c.B	AYTTFSQTKNDQLKEPMFFGQPVNVARYDQQKYDIFEKLEIKQLSFFWRPEEVDVSRDR		59
	. . . . .     . . . . .     * * * * * : : . . *		
		#     ↓	
C.g.	KSWGTLNEVEKAATMRVFTGLTLLD <b>T</b> IQGTVGAI <b>S</b> LLPDADSLH <b>E</b> EAVLT <b>N</b> IA <b>F</b> ME--SVH		116
C.a.	QSWNKMTPQEQLATMRVFTGLTLLD <b>T</b> IQGTVGAI <b>S</b> LLPDVETM <b>H</b> EEGVY <b>T</b> NIA <b>F</b> ME--SVH		110
M.t.R2-2	PSWGTLTAGEKQLTMRVFTGLTLLD <b>T</b> IQGTVGAV <b>S</b> LIPDAL <b>T</b> P <b>H</b> EEAVLT <b>N</b> IA <b>F</b> ME--SVH		106
S.t.	PAWQTL <b>S</b> AAEQQLTIRVFTGLTLLD <b>T</b> IQ <b>N</b> IAGAP <b>S</b> LMADAI <b>T</b> P <b>H</b> EEAVL <b>S</b> NI <b>S</b> F <b>M</b> E--AVH		101
E.c.	PAWQTL <b>T</b> VVEQQLTMRVFTGLTLLD <b>T</b> LQ <b>N</b> VIGAP <b>S</b> LMPDAL <b>T</b> P <b>H</b> EEAVL <b>S</b> NI <b>S</b> F <b>M</b> E--AVH		101
B.s.	LTWKYLGKNEQDTYMKVLAGL <b>T</b> LLD <b>T</b> EQG <b>N</b> TGMP <b>I</b> VAEHVD <b>G</b> HQRKAVL <b>N</b> F <b>M</b> AM <b>M</b> ENAVH		101
E.c.B	IDYQALPEHEKHIFISNLKYQ <b>T</b> LLD <b>S</b> I <b>Q</b> GRSP <b>N</b> VALL <b>P</b> LIS <b>I</b> PELET <b>W</b> ET <b>W</b> AF <b>S</b> E-- <b>T</b> I <b>H</b>		118
	: : * : : : * : * : * : * : : : : * : * : *		
	↓		
C.g.	AK <b>S</b> Y <b>S</b> NI <b>F</b> MT <b>L</b> AST <b>A</b> EIN <b>D</b> AF <b>R</b> W <b>S</b> EEN <b>E</b> N <b>L</b> Q <b>R</b> KAK <b>I</b> I <b>L</b> S <b>Y</b> Y <b>E</b> GD <b>D</b> P-----		162
C.a.	AK <b>S</b> Y <b>S</b> NI <b>F</b> MT <b>L</b> AST <b>P</b> Q <b>I</b> NE <b>A</b> FR <b>S</b> EEN <b>E</b> N <b>L</b> Q <b>R</b> KAK <b>I</b> I <b>M</b> S <b>Y</b> Y <b>N</b> GD <b>D</b> P-----		156
M.t.R2-2	AK <b>S</b> Y <b>S</b> Q <b>I</b> F <b>S</b> T <b>L</b> C <b>S</b> T <b>A</b> E <b>I</b> DD <b>A</b> FR <b>S</b> EEN <b>R</b> N <b>L</b> Q <b>R</b> KAE <b>I</b> V <b>L</b> Q <b>Y</b> R <b>G</b> D <b>E</b> P-----		152
S.t.	AR <b>S</b> Y <b>S</b> S <b>I</b> F <b>S</b> T <b>L</b> C <b>Q</b> T <b>K</b> EV <b>D</b> AA <b>Y</b> AW <b>S</b> EEN <b>P</b> L <b>Q</b> R <b>K</b> QA <b>I</b> I <b>L</b> A <b>H</b> Y <b>V</b> S <b>D</b> E <b>P</b> -----		147
E.c.	AR <b>S</b> Y <b>S</b> S <b>I</b> F <b>S</b> T <b>L</b> C <b>Q</b> T <b>K</b> D <b>V</b> DA <b>A</b> Y <b>A</b> W <b>S</b> EEN <b>A</b> P <b>L</b> Q <b>R</b> KQA <b>I</b> I <b>Q</b> Q <b>H</b> Y <b>R</b> G <b>D</b> D <b>P</b> -----		147
B.s.	AK <b>S</b> Y <b>S</b> NI <b>F</b> MT <b>L</b> AP <b>T</b> ET <b>I</b> NE <b>V</b> FE <b>W</b> V <b>K</b> Q <b>N</b> K <b>Y</b> L <b>Q</b> KA <b>Q</b> M <b>I</b> V <b>G</b> LY <b>K</b> A <b>I</b> Q <b>K</b> D <b>D</b> -----		149
E.c.B	S <b>R</b> S <b>Y</b> <b>T</b> H <b>I</b> I <b>R</b> N <b>I</b> V <b>N</b> D <b>P</b> SV-- <b>V</b> F <b>D</b> D <b>I</b> V <b>T</b> NE <b>Q</b> I <b>Q</b> K <b>R</b> A <b>E</b> G <b>I</b> S <b>S</b> Y <b>D</b> E <b>L</b> I <b>E</b> M <b>T</b> S <b>Y</b> W <b>H</b> L <b>L</b> G <b>E</b> G <b>H</b> T		176
	: : * : : : : : * : * : * : : *		
	! ! !		
C.g.	-----L <b>R</b> KK <b>I</b> ----- <b>A</b> S <b>V</b> IL <b>S</b> FL <b>F</b> Y <b>S</b> G <b>F</b> Y <b>L</b> P <b>M</b> Y <b>S</b> S <b>H</b> SK <b>L</b> T <b>N</b> T <b>A</b> D <b>V</b> IR <b>L</b> I <b>I</b> R		205
C.a.	-----L <b>K</b> KK <b>V</b> ----- <b>A</b> S <b>T</b> LL <b>S</b> FL <b>F</b> Y <b>S</b> G <b>F</b> Y <b>L</b> P <b>M</b> Y <b>L</b> S <b>S</b> R <b>A</b> K <b>L</b> T <b>N</b> T <b>A</b> D <b>I</b> IR <b>L</b> I <b>I</b> R		199
M.t.R2-2	-----L <b>R</b> KK <b>V</b> ----- <b>A</b> S <b>T</b> LL <b>S</b> FL <b>F</b> Y <b>S</b> G <b>F</b> Y <b>L</b> P <b>M</b> Y <b>S</b> S <b>R</b> A <b>K</b> L <b>T</b> N <b>T</b> A <b>D</b> M <b>I</b> R <b>L</b> I <b>I</b> R		195
S.t.	-----L <b>K</b> KK <b>I</b> ----- <b>A</b> S <b>V</b> FL <b>S</b> FL <b>F</b> Y <b>S</b> G <b>F</b> W <b>L</b> P <b>M</b> Y <b>F</b> S <b>S</b> R <b>G</b> K <b>L</b> T <b>N</b> T <b>A</b> D <b>L</b> I <b>R</b> L <b>I</b> I <b>R</b>		190
E.c.	-----L <b>K</b> KK <b>I</b> ----- <b>A</b> S <b>V</b> FL <b>S</b> FL <b>F</b> Y <b>S</b> G <b>F</b> W <b>L</b> P <b>M</b> Y <b>F</b> S <b>S</b> R <b>G</b> K <b>L</b> T <b>N</b> T <b>A</b> D <b>L</b> I <b>R</b> L <b>I</b> I <b>R</b>		190
B.s.	----- <b>E</b> I <b>S</b> L <b>F</b> K <b>A</b> M <b>V</b> ----- <b>A</b> S <b>V</b> Y <b>L</b> S <b>F</b> L <b>F</b> Y <b>S</b> G <b>F</b> Y <b>P</b> L <b>F</b> Y <b>G</b> Q <b>K</b> L <b>M</b> Q <b>S</b> G <b>E</b> I <b>N</b> L <b>I</b> L <b>R</b>		196
E.c.B	V <b>N</b> G <b>K</b> T <b>V</b> T <b>V</b> S <b>L</b> R <b>E</b> L <b>K</b> K <b>K</b> L <b>Y</b> L <b>C</b> L <b>M</b> S <b>V</b> N <b>A</b> L <b>A</b> I <b>R</b> F <b>Y</b> V <b>S</b> F <b>A</b> C <b>S</b> F <b>A</b> F <b>A</b> E <b>R</b> E <b>L</b> M <b>E</b> G <b>N</b> A <b>K</b> I <b>I</b> R <b>L</b> I <b>A</b> R		236
	: : * : * : * . * : : : : . . . : * . * *		
	↓		
C.g.	DE <b>A</b> V <b>H</b> G <b>Y</b> Y <b>I</b> G <b>Y</b> K <b>Y</b> Q <b>K</b> A <b>V</b> A <b>K</b> E <b>T</b> P---- <b>E</b> R <b>Q</b> E <b>E</b> L <b>K</b> E <b>Y</b> T <b>F</b> D <b>L</b> L <b>Y</b> D <b>L</b> Y <b>D</b> N <b>E</b> T <b>Q</b> Y <b>S</b> E <b>D</b> L <b>Y</b> D <b>D</b> ---		258
C.a.	DE <b>S</b> V <b>H</b> G <b>Y</b> Y <b>I</b> G <b>Y</b> K <b>Y</b> Q <b>Q</b> G <b>V</b> K <b>K</b> L <b>S</b> E---- <b>A</b> E <b>Q</b> E <b>Y</b> K <b>A</b> Y <b>T</b> F <b>D</b> L <b>M</b> Y <b>D</b> L <b>Y</b> E <b>N</b> E <b>I</b> E <b>Y</b> T <b>E</b> D <b>I</b> Y <b>D</b> D---		252
M.t.R2-2	DE <b>A</b> V <b>H</b> G <b>Y</b> Y <b>I</b> G <b>Y</b> K <b>F</b> Q <b>R</b> G <b>L</b> A <b>L</b> V <b>D</b> D---- <b>V</b> T <b>R</b> A <b>E</b> L <b>K</b> D <b>Y</b> T <b>Y</b> E <b>L</b> L <b>F</b> E <b>L</b> Y <b>D</b> N <b>E</b> V <b>E</b> Y <b>T</b> Q <b>D</b> L <b>Y</b> D <b>E</b> ---		248
S.t.	DE <b>A</b> V <b>H</b> G <b>Y</b> Y <b>I</b> G <b>Y</b> K <b>Y</b> Q <b>I</b> A <b>L</b> Q <b>K</b> L <b>S</b> A---- <b>I</b> E <b>R</b> E <b>L</b> K <b>L</b> F <b>A</b> L <b>D</b> L <b>L</b> M <b>E</b> L <b>Y</b> D <b>N</b> E <b>I</b> R <b>Y</b> T <b>E</b> A <b>L</b> Y <b>A</b> E---		243
E.c.	DE <b>A</b> V <b>H</b> G <b>Y</b> Y <b>I</b> G <b>Y</b> K <b>Y</b> Q <b>K</b> N <b>M</b> E <b>K</b> I <b>S</b> L---- <b>G</b> Q <b>R</b> E <b>E</b> L <b>K</b> S <b>F</b> A <b>D</b> L <b>L</b> L <b>E</b> L <b>Y</b> D <b>N</b> E <b>L</b> Q <b>Y</b> T <b>D</b> E <b>L</b> Y <b>A</b> E---		243
B.s.	DE <b>A</b> I <b>H</b> G <b>V</b> Y <b>V</b> G <b>L</b> L <b>A</b> Q <b>E</b> I <b>Y</b> N <b>K</b> Q <b>T</b> E---- <b>E</b> K <b>K</b> A <b>E</b> L <b>R</b> E <b>F</b> A <b>I</b> D <b>L</b> L <b>N</b> Q <b>L</b> Y <b>E</b> N <b>E</b> L <b>E</b> Y <b>T</b> E <b>D</b> L <b>Y</b> D <b>Q</b> ---		249
E.c.B	DE <b>A</b> L <b>H</b> L <b>T</b> G <b>T</b> Q <b>H</b> M <b>L</b> N <b>L</b> R <b>S</b> G <b>A</b> D <b>D</b> P <b>E</b> M <b>A</b> E <b>I</b> A <b>E</b> E <b>C</b> K <b>Q</b> E <b>C</b> Y <b>D</b> L <b>F</b> V <b>Q</b> A <b>Q</b> Q <b>E</b> K <b>D</b> W <b>A</b> D <b>Y</b> L <b>F</b> R <b>D</b> G <b>S</b> M		296
	* : : * : : : : * : * : * : * : : : : *		
C.g.	L <b>G</b> W <b>T</b> E <b>D</b> V <b>K</b> - <b>R</b> F <b>L</b> R <b>Y</b> I <b>A</b> N <b>K</b> A <b>L</b> N <b>N</b> L <b>G</b> Y <b>E</b> G <b>L</b> F <b>P</b> A <b>D</b> E <b>T</b> K <b>V</b> S <b>P</b> N <b>I</b> L <b>S</b> A <b>L</b> S <b>P</b> N <b>A</b> D <b>E</b> N <b>H</b> D <b>F</b> F <b>S</b> G <b>S</b> G <b>S</b>		317
C.a.	L <b>G</b> W <b>T</b> E <b>D</b> V <b>K</b> - <b>R</b> F <b>L</b> R <b>Y</b> N <b>A</b> N <b>K</b> A <b>L</b> N <b>N</b> L <b>G</b> Y <b>E</b> G <b>L</b> F <b>P</b> T <b>D</b> E <b>T</b> K <b>V</b> S <b>P</b> A <b>I</b> L <b>S</b> S <b>L</b> S <b>P</b> N <b>A</b> D <b>E</b> N <b>H</b> D <b>F</b> F <b>S</b> G <b>S</b> G <b>S</b>		311
M.t.R2-2	V <b>G</b> L <b>T</b> E <b>D</b> V <b>K</b> - <b>K</b> F <b>L</b> R <b>Y</b> N <b>A</b> N <b>K</b> A <b>L</b> M <b>N</b> L <b>G</b> Y <b>E</b> A <b>L</b> F <b>P</b> R <b>D</b> E <b>T</b> D <b>V</b> N <b>P</b> A <b>I</b> L <b>S</b> A <b>L</b> S <b>P</b> N <b>A</b> D <b>E</b> N <b>H</b> D <b>F</b> F <b>S</b> G <b>S</b> G <b>S</b>		307
S.t.	T <b>G</b> W <b>N</b> D <b>V</b> K- <b>A</b> F <b>L</b> C <b>Y</b> N <b>A</b> N <b>K</b> A <b>L</b> M <b>N</b> L <b>G</b> Y <b>E</b> A <b>L</b> F <b>P</b> E <b>M</b> A <b>D</b> V <b>N</b> P <b>A</b> I <b>L</b> A <b>A</b> L <b>S</b> P <b>N</b> A <b>D</b> E <b>N</b> H <b>D</b> F <b>F</b> S <b>G</b> S <b>G</b> S		302
E.c.	T <b>P</b> W <b>A</b> D <b>D</b> V <b>K</b> - <b>A</b> F <b>L</b> C <b>Y</b> N <b>A</b> N <b>K</b> A <b>L</b> M <b>N</b> L <b>G</b> Y <b>E</b> P <b>L</b> F <b>P</b> A <b>E</b> M <b>A</b> E <b>V</b> N <b>P</b> A <b>I</b> L <b>A</b> A <b>L</b> S <b>P</b> N <b>A</b> D <b>E</b> N <b>H</b> D <b>F</b> F <b>S</b> G <b>S</b> G <b>S</b>		302
B.s.	V <b>G</b> L <b>S</b> H <b>D</b> V <b>K</b> - <b>K</b> F <b>I</b> R <b>Y</b> N <b>A</b> N <b>K</b> A <b>L</b> M <b>N</b> L <b>G</b> F <b>D</b> P <b>Y</b> F <b>E</b> E <b>E</b> -- <b>D</b> I <b>N</b> P <b>I</b> V <b>L</b> N <b>G</b> L <b>N</b> - <b>T</b> K <b>T</b> K <b>S</b> H <b>D</b> F <b>F</b> S <b>M</b> K <b>G</b> N		305
E.c.B	I <b>G</b> L <b>N</b> K <b>D</b> I <b>L</b> C <b>Q</b> Y <b>V</b> E <b>Y</b> I <b>T</b> N <b>I</b> R <b>M</b> Q <b>A</b> V <b>G</b> L <b>D</b> L <b>F</b> Q <b>T</b> R-- <b>S</b> N <b>P</b> I <b>P</b> W <b>I</b> N <b>T</b> W <b>L</b> V <b>S</b> D <b>N</b> V <b>Q</b> V <b>A</b> P <b>Q</b> E <b>V</b> E <b>V</b> S		354
	. * : : * : * : * : * : * : : : . . . . .		
	↓		
C.g.	S <b>Y</b> V <b>I</b> G <b>K</b> A <b>E</b> N <b>T</b> E <b>D</b> D <b>D</b> W <b>D</b> F-----		334
C.a.	S <b>Y</b> V <b>I</b> G <b>K</b> A <b>E</b> D <b>T</b> T <b>D</b> D <b>D</b> W <b>D</b> F-----		328
M.t.R2-2	S <b>Y</b> V <b>I</b> G <b>K</b> A <b>V</b> T <b>E</b> D <b>D</b> W <b>D</b> F-----		324
S.t.	S <b>Y</b> V <b>M</b> G <b>K</b> T <b>V</b> E <b>T</b> E <b>D</b> E <b>D</b> W <b>N</b> F-----		319
E.c.	S <b>Y</b> V <b>M</b> G <b>K</b> A <b>V</b> E <b>T</b> E <b>D</b> E <b>D</b> W <b>N</b> F-----		319
B.s.	G <b>Y</b> K <b>K</b> A <b>T</b> V <b>E</b> P <b>L</b> K <b>D</b> D <b>D</b> F <b>Y</b> F <b>E</b> D <b>E</b> K <b>E</b> Q <b>I</b>		329
E.c.B	S <b>Y</b> L <b>V</b> G <b>Q</b> I <b>D</b> S <b>E</b> V <b>D</b> T <b>D</b> D <b>L</b> S <b>N</b> F <b>Q</b> L---		375
	* *		

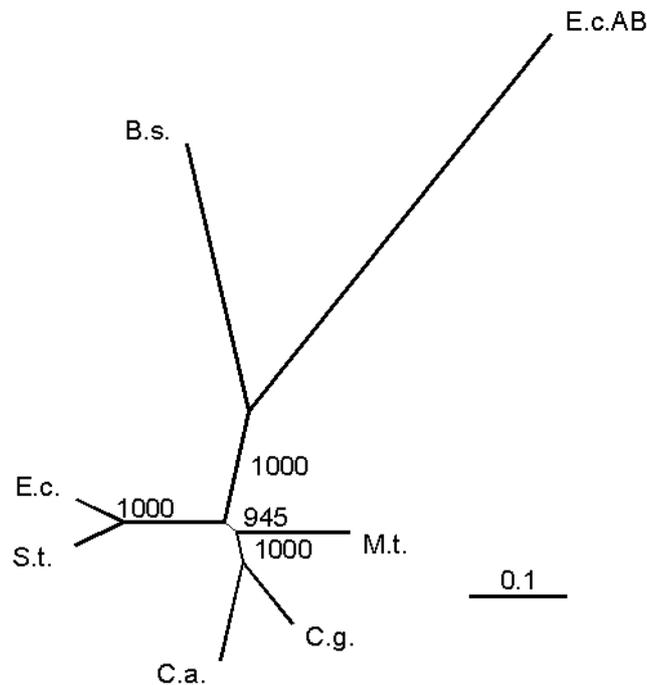
**Abbildung 4.4** Alignment von CA2 und CG2 mit R2F von *M. tuberculosis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis* und R2 der Fe-RRase von *E. coli*. Der Tyrosinrest, der vermutlich das proteingebundene Radikal trägt ist fett gedruckt. Die Aminosäuren, die in der Fe-RRase für die Eisenbindung verantwortlich gemacht werden, sind grau unterlegt, andere an der Radikalstabilisierung beteiligte Positionen sind mit einem ! gekennzeichnet. ↓ markiert Aminosäurereste, die am Elektronentransfer beteiligt sind. # weist auf ausgetauschte Reste der zweiten Koordinationssphäre hin.

Phe<sub>212</sub> und Ile<sub>234</sub> bilden eine hydrophobe Tasche, die wahrscheinlich dem Schutz des Radikals vor H<sub>2</sub>O dient (ORMÖ et al., 1995), wie aus Untersuchungen der Verteilung von Wassermolekülen in R2 hervorgeht (NORDLUND & EKLUND, 1993).

Weitere konservierte Aminosäurereste (Trp<sub>46</sub> und Asp<sub>237</sub>) sind im Fe-Enzym am Elektronentransport vom proteingebundenen Radikal in der kleinen Untereinheit zum katalytischen Zentrum in der großen Untereinheit beteiligt (Abb. 4.1), wie an Hand der dreidimensionalen Struktur der Fe-RRase gezeigt wurde (NORLUND & EKLUND, 1993; NORDLUND et al., 1990). Im C-terminalen Bereich der metallhaltigen Untereinheiten ist ein Tyrosinrest (Tyr<sub>356</sub>) konserviert. Dieser Teil des Proteins ist für die Interaktion der Untereinheiten wichtig (siehe Seite 82) und Tyr<sub>356</sub> ist beim Elektronentransport das Bindeglied von R2 zu den beiden Tyrosinresten (Abb. 4.1 und 4.2) in der katalytischen Untereinheit (NORDLUND et al., 1990). Zusammenfassend gesagt sind alle funktionellen, für Radikal und Elektronentransfer notwendigen Positionen in den metallhaltigen Untereinheiten erhalten (Abb. 4.4) und können mit den biochemisch, physikalischen Gemeinsamkeiten von Mn- und Fe-RRase in Einklang gebracht werden.

Der molekulare Vergleich der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* und der Fe-RRase von *E. coli* hat gezeigt, welche Aminosäuren, denen im Klasse I Enzym eine funktionelle Bedeutung beigemessen wird, in der Mn-RRase erhalten sind. Insgesamt findet man 35 % identische Aminosäuren in den abgeleiteten Primärstrukturen dieser Proteine (Abb. 4.2 und 4.4). Ein Vergleich der NrdEF Sequenzen von *C. ammoniagenes* und *E. coli* zeigt einen deutlich höheren Wert von 66 %. Die NrdEF Proteine sind untereinander überhaupt sehr ähnlich. In einen phylogenetischen Baum umgesetzt (Abb. 4.5) findet man die Verwandtschaft der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt untereinander genauso wieder wie die der *Enterobacteriaceae*. Vergleicht man jedoch die Stellung der beiden Gruppen zueinander, so erscheint ihre Verwandtschaft auf NrdEF bezogen sehr nah, während der ebenfalls Gram-positive *B. subtilis* in diesem Stammbaum eine deutlich größere Distanz zu *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* aufweist. Es drängt sich sofort der Gedanke auf, daß *nrdEF* ursprünglich bei den Gram-positiven Bakterien vorkommt und über horizontalen Gentransfer von einer mit *Corynebacterium* oder *Mycobacterium* nah verwandten Spezies in die *Enterobacteriaceae* eingetragen wurde. Für diese Annahme spricht, daß *nrdEF* bislang außer in *E. coli* und *S. typhimurium* in keinem anderen Gram-negativen Bakterium gefunden wurden. Alle derzeit zugänglichen Sequenzen dieser Gene-Familie stammen aus Gram-positiven Bakterien (FIESCHI et al., 1998). Außerdem wird berichtet, daß die Expression von *nrdEF* in den *Enterobacteriaceae* unterdrückt wird und nicht ausreicht um *nrdAB*-defekte Mutanten unter nicht permissiven Bedingungen wachsen zu lassen, es sei denn die Kopienzahl von *nrdEF* wird erhöht (JORDAN et al., 1994a; 1997a). Die schlechte bzw. fehlende Expression kann darauf zurück zu führen sein, daß die Promotoren der Bakterien mit hohem GC-Gehalt in den *Enterobacteriaceae* nur unzureichend genutzt

werden können. So enthalten die Promotersequenzen der Corynebakterien oft einen höheren Anteil der Basen „G“ und „C“ (PÁTEK et al., 1996) während *E. coli* AT-reiche Sequenzen bevorzugt.



**Abbildung 4.5** Phylogenetischer Baum verschiedener NrdEF Proteine . C.a. = *C. ammoniagenes*, C.g = *C. glutamicum*, M.t. = *M. tuberculosis*, B.s. = *B. subtilis*, S.t. = *S. typhimurium*, E.c. = *E. coli* und A.c.AB = NrdAB von *E. coli*.

Nach der Betrachtung der in Fe- und Mn-RRase konservierten Aminosäuren (Abb. 4.4), ist nun die Frage nach der Metallbindung in der Mn-RRase interessant. Natürlich konnte nicht erwartet werden, die zuständigen Aminosäuren aus der Sequenz ablesen zu können, da die Metallzentren von Fe- und Mn-RRase sehr verschieden sind (siehe Einleitung). Desto überraschender war der Befund, daß alle sechs an der Koordination des di-Eisenzentrums der Fe-RRase beteiligten Aminosäurereste (NORLUND & EKLUND, 1993; NORDLUND et al., 1990) in allen NrdF-Proteinen wiedergefunden werden konnten. Bei den Metalliganden der Fe-RRase von *E. coli* handelt es sich um Asparaginsäure, Glutaminsäure und Histidin (NORLUND & EKLUND, 1993; NORDLUND et al., 1990). Das sind drei der sieben am häufigsten in Metalloproteinen als Liganden verwendeten Aminosäuren, deren zusätzliche funktionellen Gruppen für die Koordination von Metallen in Proteinen genutzt werden können (KAIM & SCHWEDERSKI, 1995; LIPPARD & BERG, 1995). Versuche mit der Fe-RRase, bei denen das Apo-Enzym zusammen mit  $MnCl_2$  inkubiert wurde, zeigten, daß wirklich zwei Manganatome mit den Aminosäuren, die zuvor als Eisenliganden identifiziert wurden, in Kontakt treten, ohne daß ein aktives Enzym entsteht (ATTA et al., 1992). Dieses Manganzentrum in der so substituierten *E. coli* RRase weist aber doch Unterschiede zu dem natürlichen  $\mu$ -oxo verbrückten di-Eisenzentrum auf. Die Bindung der Manganatome in der *E. coli* RRase entspricht der

reduzierten Form des Eisenzentrums, womit die fehlende Aktivität der Mn-substituierten Fe-RRase erklärt wird. Auch kann im Gegensatz zur natürlichen Form kein Radikal gebildet werden (ATTA et al. 1992).

Eine umfassendere Betrachtung von Proteinen, die Mangan für die Enzymaktivität benötigen, läßt erkennen, daß diese bevorzugt Asparaginsäure und Histidin aber auch Glutaminsäure und andere Aminosäuren am Metallzentrum positioniert haben (CHRISTIANSON, 1997). In der Arginase aus der Rattenleber ist das di-Manganzentrum durch sechs Aminosäuren koordiniert (KHANGULOV et al., 1998; KHANGULOV et al., 1995). Die Anzahl der Liganden dieses Manganzentrums entspricht der des Eisenzentrums der *E. coli* RRase. Gegen ein zweikerniges Metallzentrum in der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* sprechen allerdings die Beobachtungen von BLASCZYK (1994), der als Folge einer quantitativen Manganabschätzung in der Mn-RRase ein Einkern-Metallzentrum postulierte. Q-Band EPR-Studien mit CA2 deuten zudem auf ein einkerniges Mn(II)-Zentrum hin (GRIEPENBURG et al., 1998). Zu einem gleichen Ergebnis gelangten FIESCHI et al. (1998), die den Mangan Gehalt nach Denaturierung der Mn-RRase im Atom Absorption Spektrometer bestimmten. Dem Argument, daß ein zweikerniges Manganzentrum möglicherweise sehr labil in der Mn-RRase gebunden ist und dadurch Mangan im Verlauf der Proteinreinigung verloren geht, kann widersprochen werden. Die Mn-RRase ist sehr widerstandsfähig gegenüber Chelatoren wie EDTA, die nur eine schwache Hemmwirkung ( $I_{50} = 10$  mM) zeigen (WILLING et al., 1988a; AULING et al., 1997) und auch das charakteristische Q-Band ESR-Spektrum nicht verändern (GRIEPENBURG et al., 1998).

Beispiele für einkernige Mn- und Fe-Zentren findet man in der Enzymklasse der Superoxid Dismutasen. Auch bei diesen sind Histidin und Asparaginsäure für die Koordination der Metalle zuständig. Jedoch werden nur vier Liganden benötigt (BEYER et al., 1991; GRAEFF-WOHLLEBEN et al., 1997). Sogar fünf an der Metallbindung beteiligte Aminosäurereste findet man in der Mangan-3,4-Dihydroxyphenylacetat 2,3-Dioxygenase von *Arthrobacter globiformes* (BOLDT et al., 1997). Da  $Mn^{2+}$  ein oktaedrisches, sechsfach koordiniertes Ion ist (COTTON & WILKINSON, 1982), wäre es theoretisch denkbar, daß ein Manganion alle sechs Liganden in der Mn-RRase besetzen könnte. Die ist unwahrscheinlich, da das Metallzentrum mit dem proteingebundenen Radikal interagieren muß, woran in der Fe-RRase labil gebundene Wassermoleküle beteiligt sind (EHRENBERG, 1988). Ein einkerniges Manganzentrum in der RRase von *C. ammoniagenes* (GRIEPENBURG et al., 1998; BLASCZYK, 1994) unter Beibehaltung der sechs Metallliganden aus dem *E. coli* Enzym erscheint dann möglich, wenn z.B. die Doppelfunktion von His<sub>118</sub> bei der Metallbindung und dem Elektronentransport (SJÖBERG, 1997; NORLUND & EKLUND, 1993; NORDLUND et al., 1990) auf den

Elektronentransport „reduziert“ wird, so daß His<sub>118</sub> noch eine essentielle Bedeutung für die Aktivität der Mn-RRase behielt. In diesem Fall könnte das Mangan über fünf Liganden wie bei der Dioxygenase von *Arthrobacter globiformes* (BOLDT et al., 1997) im Protein gebunden sein und immer noch über die sechste Koordinationsstelle mit dem Tyrosylradikal zusammenwirken. Eine solche Problemlösung der Integration eines einkernigen Manganzentrums in die RRase muß nicht generell bei allen NrdF-Proteinen verwirklicht sein, darf aber für *C. ammoniagenes* wegen dessen Mangan kontrollierter DNA-Synthese (siehe Einleitung) vermutet werden. Man erkennt, daß die Bildung unterschiedlicher Metallzentren durch dieselben Liganden möglich ist und durchaus eine individuelle Lösung der Organismen an die Verfügbarkeit des verwendeten Metalls in ihrem Lebensraum darstellen können (TAUER & BENNER, 1997). Deshalb sollte man im Einzelfall doch den Metallgehalt des Proteins bestimmen und darf nicht über Sequenzvergleiche und -ähnlichkeiten argumentieren.

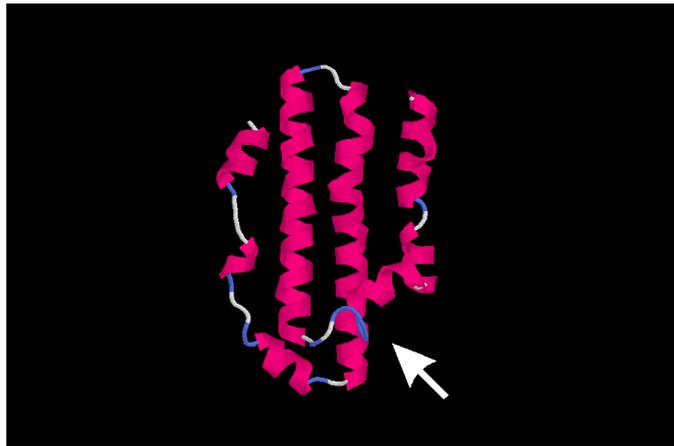
Da im Gegensatz zu CA2 der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* in R2F aus *S. typhimurium* analog zum *E. coli* Klasse I Enzym ein di-Eisenzentrum vorhanden ist (JORDAN et al., 1994b), müssen der Fähigkeit, verschiedene Metalle binden zu können, in den untereinander stark konservierten NrdF-Proteinen andere Eigenschaften zu Grunde liegen. Überlegungen dazu, wo die Gründe für die unterschiedlichen Metallzentren zu suchen sind, führen zurück zu den Superoxid Dismutasen, die entweder nur mit Eisen oder nur mit Mangan ihre enzymatische Aktivität ausüben können (BEYER et al., 1991; GRAEFF-WOHLLEBEN et al., 1997). Die Superoxid Dismutase von *Propionibacterium shermanii* kann allerdings mit beiden Metallen umgehen (SCHMIDT et al., 1996). Vergleiche der 3-dimensionalen Strukturen zeigten Unterschiede in der zweiten Koordinationsphäre der Metalle und nicht bei den direkten Liganden (GABBIANELLI et al., 1997). Zu einem ähnlichen Resultat führte der Vergleich verschiedener Eisen bindender Katechol-Dioxygenasen mit der Mangan-3,4-Dihydroxyphenylacetat 2,3-Dioxygenase von *Arthrobacter globiformes*, die sich auch nur in der zweiten Koordinationsphäre von den Eisen-Enzymen dieser Familie unterscheidet (BOLDT et al., 1997). Für die RRasen haben erste diesbezügliche Betrachtungen schon zwei Veränderungen zu Tage gefördert. Verglichen mit R2 der *E. coli* RRase sind die Aminosäuren Gln<sub>43</sub> und Ser<sub>114</sub> in allen bekannten NrdF-Proteinen gegen Leucin bzw. Methionin ausgetauscht (FIESCHI et al., 1998). Aber dieser Befund erklärt nicht die unterschiedlichen Metallzentren der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* und NrdEF von *S. typhimurium*, das nachweislich Eisen enthält (JORDAN et al., 1994b).

Vielleicht muß man sich zur Lösung dieser Fragestellung noch weiter vom Metallzentrum lösen und die gesamte 3-dimensionale Struktur der Proteine berücksichtigen. Ein hier vorzustellender Versuch in diese Richtung ist die Modellierung

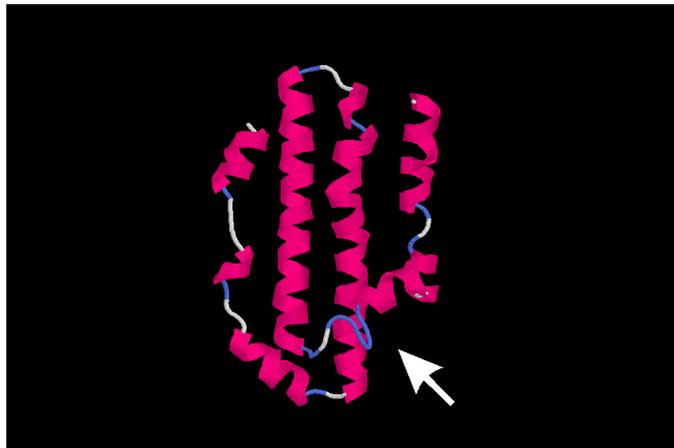
der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* unter Verwendung des „swiss-model Server“ (PEITSCH, 1996; GUEX & PEITSCH, 1997). Ausgehend von Teilmodellen kann man bestimmte Domänen der Proteine vergleichen, um so kleine Unterschiede in den Ausmaßen von  $\alpha$ -Helices und der Ausprägung von „turn“-Motiven ausfindig zu machen. Die hier gezeigten Teilmodelle (Abb. 4.6), die jeweils aus den Aminosäuren zwischen den Positionen 28 und 158 (*E. coli* Nummerierung) der metallhaltigen Untereinheiten abgeleitet wurden, also den Bereich mit dem Tyrosylradikal und drei der Metallliganden enthalten, geben einen ersten Eindruck über die feinen Abweichungen dieser Proteine voneinander. Man erkennt die unterschiedliche Länge der Helices und auch ein „turn“-Motiv erscheint in den RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* ausgeprägter als in den Fe-RRasen von *E. coli* und *S. typhimurium*. Ob dieser Bereich eine Bedeutung für die Metallbindung hat, könnte durch den gezielten Austausch von Aminosäuren in diesem auffälligen Bereich bestimmt werden. Interessant bei der Suche nach Unterschieden der RRasen ist auch die Einbeziehung der vom Computerprogramm berechneten Beweglichkeit einzelner Bereiche, da diese die „Gelenke“ sind, um die sich die starreren Helices drehen können und zu einer Veränderung der 3-dimensionalen Struktur der Proteine führen können. Die hier gezeigten Teilmodelle deuten an, daß möglicherweise die NrdF-Proteine flexibler sind als die Fe-RRase von *E. coli* (Abb. 4.6 B) und sich dadurch möglicherweise den unterschiedlichen Metallzentren besser anpassen können. Die Darstellung komplexerer Modelle (Abb. 4.7) soll einen Eindruck über die Lage der vermuteten Metallliganden und des proteingebundenen Radikals in Mn- und Fe-RRase vermitteln. Das Modell der Mn-RRase ist unter Verwendung nur weniger bekannter Kristallstrukturen, darunter auch die Fe-RRase, entstanden, so daß der Einfluß zum Beispiel eines anderen gebundenen Metalls auf die Gesamtstruktur des Proteins vielleicht nicht genügend berücksichtigt wird. Solche Modelle und gerade übersichtlichere Teilmodelle können auf divergierende Bereiche in den verglichenen Proteinen hinweisen und so einen Anhaltspunkt dafür geben, an welcher Position eine gezielter Aminosäureaustausch sinnvoll ist. Nicht zu vergessen ist, daß wie bei den Metalloproteasen von *B. subtilis* noch andere Proteine oder Zellbestandteile an der Metallbindung beteiligt sein können (SONENSHEIN et al., 1993). Eine endgültige Lösung, welche Bedingungen bei den Ribonucleotid-Reduktasen über die Metallbindung entscheiden, kann deshalb wohl erst nach der Auflösung der Kristallstrukturen im Vergleich mit den Auswirkungen von gezielten Mutationen bestimmt werden.

**Abbildung 4.6** Vergleich der Teilmodelle von CA2 und CG2 mit R2F von *S. typhimurium* und R2 der Fe-RRase von *E. coli*. Die Pfeile weisen auf Unterschiede in den Proteinen hin. Gezeigt ist der Bereich von Position 28-158 (CA-Nummerierung). In A sind die Sekundärstrukturen farblich hervorgehoben.  $\alpha$ -Helices (pink), „turns“ (blau),  $\beta$ -sheets (gelb), alle anderen Aminosäurereste (weiß). In B wurde der Wert der anisotropischen Temperatur berücksichtigt, der Aussagen über die Beweglichkeit eines bestimmten Moleküls erlaubt. Hoher Wert (rot), niedriger Wert (blau). →

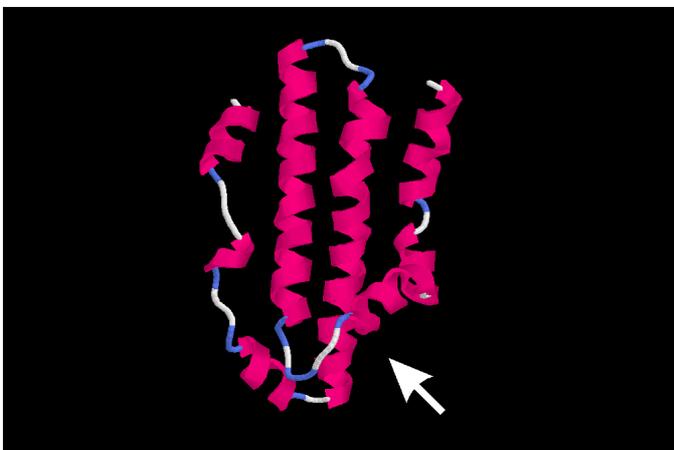
**A**



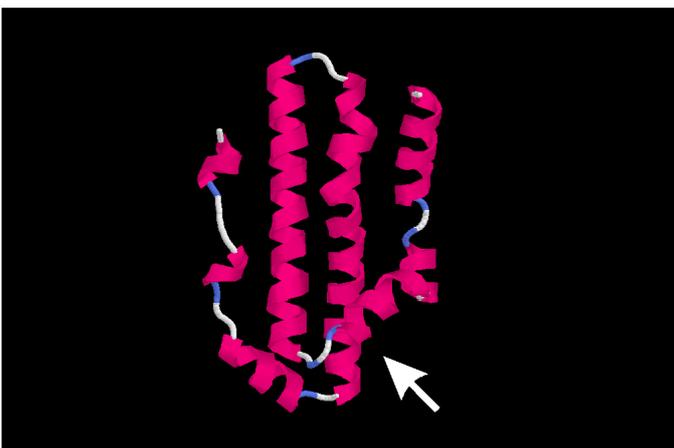
CA2



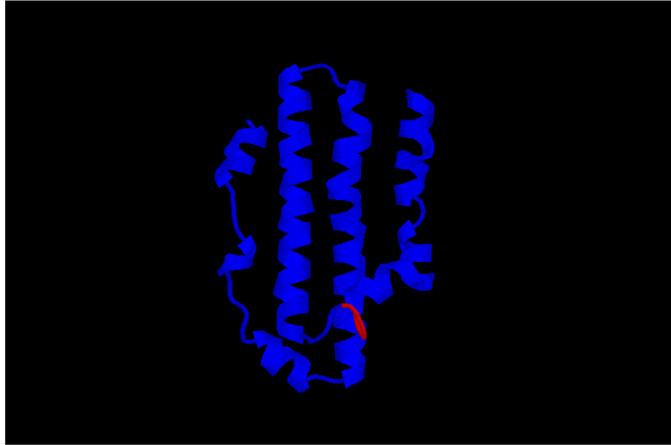
CG2



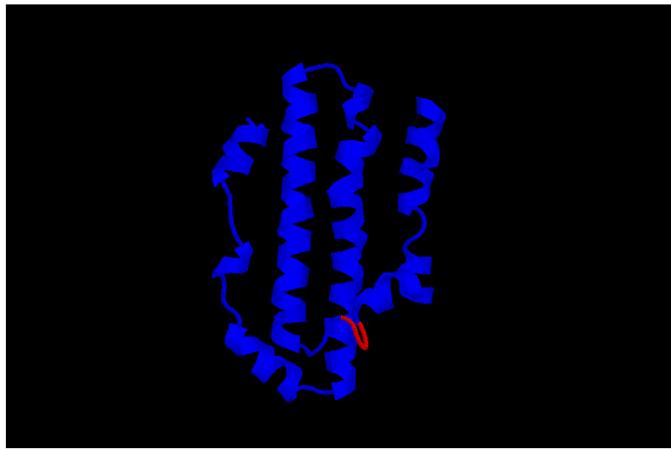
NrdF S.t.



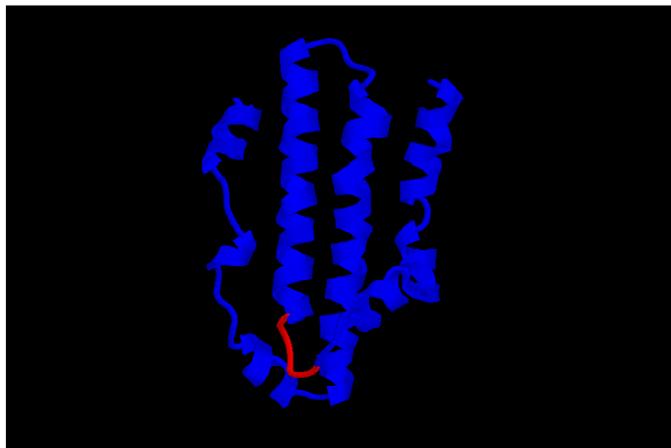
R2

**B**

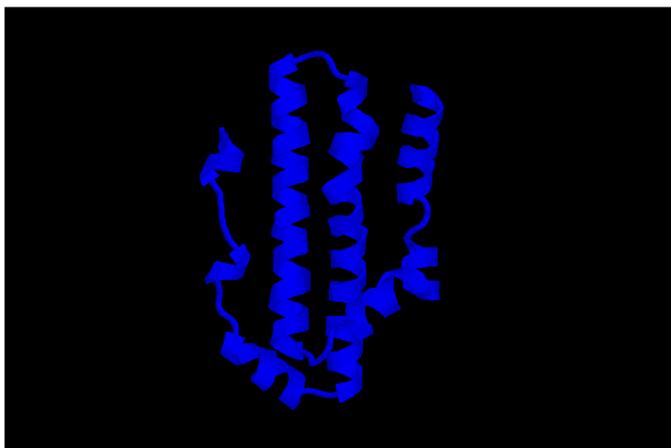
CA2



CG2



NrdF S.t.



R2



◀ **Abbildung 4.7** Vergleich der Modelle der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* (C.a.) mit der Fe-RRase von *E. coli* (E.c.B). Das Modell der Fe-RRase beruht auf den Daten aus der Kristallstrukturanalyse (NORLUND & EKLUND, 1993; NORDLUND et al., 1990), während die Mn-RRase aus den Strukturen von fünf verschiedenen Reduktasen, darunter auch die Fe-RRase, mittels „swiss-model“ abgeleitet wurde. Die grün dargestellten Aminosäurereste repräsentieren die möglichen Metalliganden. Das Radikal-tragende Tyrosin ist orange gefärbt.

## 5. Ausblick

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Klonierung der Gene der Ribonucleotid-Reduktasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* eröffnet sich die Möglichkeit, die bislang ungelöste Problematik der Metallbindung in den Mn-RRase von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* einer endgültigen Klärung zuzuführen. Erstes Ziel sollte die gezielte Überexpression des Gens der metallhaltigen Untereinheiten der RRasen von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* sein, um genügend aktives Protein für genauere physikalische Untersuchungen mittels ESR- und MCD-Spektroskopie zur Verfügung stellen zu können. Dadurch könnten weiterführende Erkenntnisse über den Mangangehalt und die Struktur des Metallzentrum der Mn-RRase gerade im Hinblick auf die beteiligten Liganden erzielt werden. Natürlich sollte auch die Kristallisation der Mn-RRase ein Ziel sein, um wie für die Fe-RRase von *E. coli* das Metallzentrums mit den beteiligten Liganden der ersten und zweiten Koordinationssphäre aufklären zu können (NORLUND & EKLUND, 1993; NORDLUND et al., 1990). Der Vergleich der Kristallstrukturen gibt dann möglicherweise den Aufschluß darüber, welche Faktoren die Metallbindung bestimmen. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Frage, ob die gezielte Überexpression im heterologen *E. coli*-System im Vergleich zur Expression in *C. ammoniagenes* oder *C. glutamicum* Unterschiede in der Funktionsfähigkeit bzw. Metallbindung nach sich ziehen. In diesem Fall müßte die Beteiligung z.B. zusätzlicher Proteine an der Einbindung des Metalls in die RRasen genauer diskutiert werden.

Für die Überexpression der RRase-Gene in *E. coli* sind genügend Expressionsvektoren (BUJARD et al., 1987; DÖBELI et al., 1990; YUASA & SUGIYAMA, 1995) beschrieben, die meist auch käuflich zu erwerben sind. Aber auch für die Expression in Corynebakterien existieren Vektoren wie z.B. pZ8-1 (TAUCH et al., 1998), der durch Konjugation von *E. coli* aus in *Corynebacterium* eingebracht werden kann (SCHÄFER et al., 1990) und dadurch leicht zu handhaben ist.

Neben den Erkenntnissen, die man mit Hilfe des überproduzierten Proteins erlangen kann, waren es für die Fe-RRase aus *E. coli* auch durch Mutagenese herbeigeführte gezielte Aminosäureaustausche, die zur Aufklärung der Funktion bestimmter Aminosäurereste in dem Eisenenzym geführt haben (LARSSON & SJÖBERG, 1986; ABERG et al., 1989; CLIMENT et al., 1992; ORMÖ et al., 1994; ECKBERG et al., 1996; ORMÖ &

SJÖBERG, 1996; KATTERLE et al., 1997). Diese Vorgehensweise erscheint auch für die Mn-RRase von *C. ammoniagenes* sinnvoll. Methoden für die gezielte Mutagenese basieren in der Regel auf den Verfahren nach HIGUCHI et al. (1988), KUNKEL et al. (1985; 1991) sowie LING & RIBINSON (1995) . Da auch für diese Methodik käufliche Kits (z.B. von der Firma BioRad) verfügbar sind, steh diesem Weg nichts entgegen

Die endgültige Aufklärung von Struktur und Metallzentrum der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* kann nur durch ein interdisziplinäres Vorgehen erreicht werden. Nur der Vergleich der physikalischen Untersuchungen mit den Ergebnissen aus der biologischen und biochemischen Chakterisierung von gezielt hergestellten Mn-RRase-Mutanten und dem daraus isolierten Protein kann eine Aufklärung ermöglichen, wie sie bereits für die Fe-RRase aus *E. coli* gelungen ist (SJÖBERG, 1997).

## 6. Literaturverzeichnis

**Abe, S., K.-I. Takayama and S. Kinoshita.** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 279-301.

**Atta, M., P. Nordlund, A. Åberg, H. Eklund and M. Fontecave.** 1992. Substitution of manganese for iron in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 20682-20688.

**Auling, G.** 1980. Nucleotidstoffwechsel in *Brevibacterium ammoniagenes* und *Micrococcus luteus*. Habilitationsschrift, Universität Hannover.

**Auling, G. and H. Follmann.** 1980. Manganabhängigkeit der Ribonucleotid-Reduktion: Ursache des unbalancierten Wachstums bei der Ribonucleotid-Fermentation mit *Brevibacterium ammoniagenes*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 361: 214.

**Auling, G. and H. Follmann.** 1994. Manganese-dependent ribonucleotide reduction and overproduction of nucleotides in coryneform bacteria, p. 131-164. *In* Sigel, H. and A. Sigel (eds.), Metal ions in biological systems. Vol. 30: Metalloenzymes involving amino acid-residues and related radicals, Marcel Dekker Inc., New York.

**Auling, G., H. Prella and H. Diekmann.** 1982. Incorporation of deoxyribonucleosides into DNA of coryneform bacteria and the relevance of deoxyribonucleoside kinases. *Eur. J. Biochem.* 121: 365-370.

**Auling, G., K. Blasczyk, U. Griepenburg, J. Hansen, C.H. Luo and W. Oehlmann.** 1997. The diversity of metal centers in ribonucleotide reductases. Studies of the bacterial manganese enzyme, p. 189-203. *In* Tautwein, A.X. (ed.), Bioinorganic chemistry - transition metals in biology and their coordination chemistry. Research Report-DFG, Wiley-VCH, Weinheim.

**Ausubel, F.A., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidemann, J.A. Smitz, K. Struhl (eds.)** 1990. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley Interscience. New York.

**Bathe, B., J. Kalinowski and A. Pühler.** 1996. A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 252: 255-265.

- Beyer, W., J. Imlay and I. Fridovich.** 1991. Superoxide and superoxide dismutases. *Prog. Nucl. Acid Res.* 40: 221-253.
- Bianchi, V., S. Borella, C. Rampazzo, P. Ferraro, F. Calderazzo, L.C. Bianchi, S. Skog and P. Reichard.** 1997. Cell cycle-dependent metabolism of pyrimidine deoxynucleoside triphosphates in CEM cells. *J. Biol. Chem.* 272: 16118-16124.
- Birnboim, H.C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Blakley, R.L.** 1982. Cobalamin-dependent ribonucleotide reductases, p.381-418. In Dolphin, D. (ed.), *B<sub>12</sub>*. Vol. 2, John Wiley, New York.
- Blakley, R.L. and H.A. Barker.** 1964. Cobamide stimulation of the reduction of ribotides to deoxyribotides in *Lactobacillus leichmannii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16: 391-397.
- Blasczyk, K.** 1994. Radikalstatus und Metallzentrum der 2'5'-Ribonucleotiddiphosphat-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872. Dissertation, Universität Hannover.
- Blattner, F.R., G. Plunkett III, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1474.
- Blum, H., H. Beier and H.J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boldt, Y.R., A.K. Whiting, M.L. Wagner, M.J. Sadowsky, L. Que and L.P. Wackett.** 1997. Manganese(II) active site mutants of 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* strain CM-2. *Biochemistry* 36: 2147-2153.
- Booker, S. and J.A. Stubbe.** 1993. Cloning, sequencing, and expression of the adenosyl-cobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8352-8356.
- Boyer, H.W.** 1971. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 25: 153-176.

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

**Brock, T.D., M.T. Madigan, J. Martinko and J. Parker.** 1994. *Biology of microorganisms*. 7th edition, Prentice-Hall International, Inc., New Jersey.

**Bujard, H., R. Gentz, M. Lanzer, D. Stüber, M. Müller, I. Ibrahimi, M.T. Häuptle and B. Dobberstein.** 1987. A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* 155: 416-433.

**Caras, I.W., B.B. Levinson, M. Fabry, S.R. Williams and D.W. Martin, Jr.** 1984. Cloned mouse ribonucleotide reductase subunit M1 cDNA reveals amino acid sequence homology with *Escherichia coli* and Herpesvirus ribonucleotide reductases. *J. Biol. Chem.* 260: 7015-7022.

**Carlson, J., J.A. Fuchs and J. Messing.** 1984. Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4294-4297.

**Christianson, D.W.** 1997. Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67: 217-252.

**Climent, I., B.-M. Sjöberg and C.Y. Huang.** 1992. Site-directed mutagenesis and deletion of the carboxyl terminus of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. Effects on catalytic activity and subunit interaction. *Biochemistry* 31: 4801-4807.

**Collins, M.D.** 1987. Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov.. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 37 (4): 442-443.

**Collins, M.D. and C.S. Cummins.** 1986. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1986, 350AL, p. 1266-1276. In Sneath, P.H.A, N.S. Mair, M.E. Sharp and J.G. Holt (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

**Cooper, T.G.** 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

**Cotton, F.A. and J. Wilkinson, Sir.** 1982. *Bioanorganische Chemie*. VCH, Weinheim.

- Davies, J.** 1990. Interspecific gene transfer: where next? *Trends Biotechnol.* 8: 198-203.
- Döbeli, H., A. Trecziak, D. Gillessen, H. Matile, I.K. Srivastava, L.H. Perrin, P.E. Jakob and U. Certa.** 1990. Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 259-268.
- Dower, W.J., J.F. Miller and C.W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6245.
- Ekberg, M., M. Sahlin, M. Eriksson and B.-M. Sjöberg.** 1996. Two conserved tyrosine residues in protein R1 participate in an intermolecular electron transfer in ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 271: 20655-20659.
- Ehrenberg, A.** 1988. Magnetic interaction in ribonucleotide reductase. *Chem. Scr.* 28A: 27-31.
- Eikmanns, B.** 1992. Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* 174: 6076-6086.
- Fernandez-González, C., J.A. Gil, L.M. Mateos, A. Schwarzer, A. Schäfer, J. Kalinowski, A. Pühler and J.F. Martin.** 1996. Construction of L-lysine-overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 554-558.
- Fieschi, F., E. Torrents, L. Touloukhanova, A. Jordan, U. Hellmann, J. Barbe, I. Gibert, M. Karlsson and B.-M. Sjöberg.** 1998. The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a Class Ib enzyme. *J. Biol. Chem.* 273: 4329-4337.
- Fitzpatrick, R., M. O'Donohue, J. Joy, D.M. Heery and L.K. Dunican.** 1994. Construction and characterization of *recA* mutant strains of *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 575-580.

**Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, R.A. Clayton, E.F. Kirkness, A.R. Kerlavage, C.J. Bult, J.-F. Tomb, B.A. Dougherty, J.M. Merrick, K. McKenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C.A. Fields, J.D. Gocayne, J.D. Scott, R. Shirley, L.-I. Liu, A. Glodek, J.M. Kelley, J.F. Weidman, C.A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M.D. Cotton, T.R. Utterback, M.C. Hanna, D.T. Nguyen, D.M. Saudek, R.C. Brandon, L.D. Fine, J.L. Fritchman, J.L. Fuhrmann, N.S.M. Geoghagen, C.L. Gnehm, L.A. McDonald, K.V. Small, C.M. Fraser, H.O. Smith and J.C. Venter.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* 269: 496-512.

**Follettie, M.T. and A.J. Sinskey.** 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Corynebacterium glutamicum pheA* gene. *J. Bacteriol.* 167: 695-702.

**Follmann, H.** 1982. Deoxyribonucleotide synthesis and the emergence of DNA in molecular evolution. *Naturwissenschaften* 69: 75-81.

**Fontecave, M., R. Eliasson and P. Reichard.** 1989. Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2147-2151.

**Fraser, C.M., J.D. Gocayne, O. White, M.D. Adams, R.A. Clayton, R.D. Fleischmann, C.J. Bult, A.R. Kerlavage, G. Sutton, J.M. Kelley, J.L. Fritchman, J.F. Weidman, K.V. Small, M. Sandusky, J.L. Fuhrmann, D.T. Nguyen, T.R. Utterback, D.M. Saudek, C.A. Phillips, J.M. Merrick, J.-F. Tomb, B.A. Dougherty, K.F. Bott, P.-C. Hu, T.S. Lucier, S.N. Peterson, H.O. Smith, C.A. Hutchison III and J.C. Venter.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397-403.

**Gabbianelli, R., A. Battistoni, F. Polticelli, B. Meier, M. Schmidt, G. Rotilio and A. Desideri.** 1997. Effect of Lys175 mutation on structure function properties of *Propionibacterium shermanii* superoxide dismutase. *Protein Engineering* 10: 1067-1070.

**Graeff-Wohlleben, H., S. Killat, A. Banemann, N. Guiso and R. Gross.** 1997. Cloning and characterization of an Mn-containing superoxide dismutase (SodA) of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 179: 2194-2201.

**Grant, S.G.N., J. Jessee, F.R. Bloom and D. Hanahan.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4645-4649.

**Gripenburg, U.** 1998. Das stabile freie Radikal und das mononukleare Manganzentrum im CA2-Protein der Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872. Dissertation, Universität Hannover.

**Gripenburg, U., G. Laßmann and G. Auling.** 1996. Detection of a stable free radical in the B2 subunit of the manganese ribonucleotide reductase (Mn-RRase) of *Corynebacterium ammoniagenes*. Free Rad. Res. 261: 473-481.

**Gripenburg, U., R. Kappl, J. Hüttermann and G. Auling.** 1998. A divalent metal site in the small subunit of the manganese-dependent ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes*. Biochemistry 37: 7992-7996.

**Guex, N. and M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. Electrophoresis 18: 2714-2723.

**Gvozdiak, O.R., G. Auling, U. Gripenburg, D. Stallmann and H. Follmann.** 1996. Two different types of ribonucleotide reductase in *Bacillus subtilis*. BIOSpektrum, special issue, Abstracts of the VAAM-meeting, March 24.-27.

**Hagihara, T., T. Fujio and K. Aisaka.** 1995. Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 724-729.

**Haynes, J.A. and M.L. Britz.** 1989. Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. FEMS Microbiol. Lett. 61: 329-334.

**Herbert, D., P.J. Philipps and R.E. Strange.** 1971. Chemical analysis of microbial cells, p.209-344. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds.), Methods in Microbiology, Vol. 5B. Academic Press, London.

**Higuchi, R., B. Krummel and R.K. Saiki.** 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res. 16: 7351-7367.

**Hogenkamp, H.P.C.** 1984. Nature and properties of the bacterial Ribonucleotide reductases. Pharmac. Ther. 23: 393-405.

**Hogenkamp, H.P.C., H. Follmann and R.K. Thauer.** 1987. Ribonucleotide reductase in cell extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. FEBS. Lett. 219: 197-201.

**Iordan, E.P. and N.I. Petukhova.** 1995. Presence of oxygen-consuming ribonucleotide reductase in corrinoid-deficient *Propionibacterium freudenreichii*. Arch. Microbiol. 164: 377-381.

**Jäger, W., A. Schäfer, A. Pühler, G. Labes and W. Wohlleben.** 1992. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 174: 5462-5465.

**Jerpseth, B., A. Greener, J.M. Short, J. Viola and P.L. Kretz.** 1993. New restriction minus derivatives of XL1-Blue *E. coli* cells. Strategies 6: 24.

**Jordan, A., I. Gibert and J. Barbe´.** 1994a. Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. J. Bacteriol. 176: 3420-3427.

**Jordan, A., E. Pontis, M. Atta, M. Krook, I. Gibert, J. Barbe and P. Reichard.** 1994b. A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: Characterization of the *Salmonella* enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12892-12896.

**Jordan, A., E. Pontis, F. Aslund, U. Hellman, I. Gibert and P. Reichard.** 1996. The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem. 271:8779-8785.

**Jordan, A., F. Aslund, E. Pontis, P. Reichard and A. Holmgren.** 1997a. Characterization of *Escherichia coli* NrdH. J. Biol. Chem. 272: 18044-18050.

**Jordan, A., E. Torrents, C. Jeanthon, R. Elisson, U. Hellman, C. Wernstedt, J. Barbé, I. Gibert and P. Reichard.** 1997b. B<sub>12</sub>-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13487-13492.

**Kaim, W. and B. Schwederski.** 1995. Bioanorganische Chemie. Teubner, Stuttgart.

**Katterle, B., M. Sahlin, P.P. Schmidt, S. Pötsch, D.T. Logan, A. Gräslund and B.-M. Sjöberg.** 1997. Kinetics of transient radicals in *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 272: 10414-10421.

**Khangulov, S.V., P.J. Pessiki, V.V. Barynin, D.E. Ash and G.C. Dismukes.** 1995. Determination of the metal ion separation and energies of the three lowest electronic states of dimanganese(II,II) complexes and enzymes: catalase and liver arginase. *Biochemistry* 34: 2015-2025.

**Khangulov, S.V., T.M. Sossong, Jr., D.E.Ash and G.C. Dismukes.** 1998. L-arginine binding to liver arginase requires proton transfer to gateway residue His141 and coordination of the guanidinium group to the dimanganese(II,II) center. *Biochemistry* 37: 8539-8550.

**Krämer, R.** 1993. Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 75-94.

**Kronmeyer, W., N. Peekhaus, R. Krämer, H. Sahm and L. Eggeling.** 1995. Structure of the GluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 177: 1152-1158.

**Kunkel, T.A.** 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492.

**Kunkel, T.A., K. Bebenek and J. McClary.** 1991. Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. *Methods Enzymol.* 204: 125-139.

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

**Laplante, S.R., N. Aubry, M. Liuzzi, L. Thelander, R. Ingemarson and N. Moss.** 1994. The critical C-terminus of the small subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is mobile and conformationally similar to C-terminal peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* 44: 549-555.

**Lammers, M. and H. Follmann.** 1983. The ribonucleotide reductases: a unique group of metalloenzymes essential for cell proliferation. *Struct. Bond.* 54: 27-91.

**Larsson, A. and B.-M. Sjöberg.** 1986. Identification of the stable free radical residue in ribonucleotide reductase. *EMBO J.* 5: 2037-2040.

**Laßmann, G., L. Thelander and A. Gräslund.** 1992. EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 188: 879-887.

**Licht, S.L., G.J. Gerfen and J. Stubbe.** 1996. Thiy radicals in ribonucleotide reductases. *Science* 271: 477-481.

**Liebl, W. and B. Schein.** 1990. Isolation of restriction deficient mutants of *Corynebacterium glutamicum*, p. 323-327. In Behrens and J. Krämer (eds.). DEHEMA Biotechnology conferences. Vol. 4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

**Liebl, W., R. Klammer and K.-H. Schleifer.** 1989. Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210.

**Ling, M. and B.H. Ribinson.** 1995. A one-step polymerase chain reaction site-directed mutagenesis method for large gene cassettes with high efficiency. *Anal. Biochem.* 230: 167-172.

**Lippard, S.J. and J.M. Berg.** 1995. *Bioanorganische Chemie.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

**Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

**Luo, C.-H.** 1994. Isolierung und Charakterisierung von thermosensitiven Mutanten der Mangan-Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872. Dissertation, Universität Hannover.

**Luo, C.-H., J.Hansen and G. Auling.** 1997. Temperature-sensitive mutants of *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 with a defective large subunit of the manganese-containing ribonucleotide reductase. *Arch. Microbiol.* 167: 317-324.

**Malumbres, M., J.A. Gil and J.F. Martín.** 1993. Codon preference in *Corynebacteria*. *Gene* 134: 15-24.

**Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

**Miller, J.H.** 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Miller, J.H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Miwa, K.,H. Matsui, M. Terabe, S. Makamori, K. Sano and H. Momose.** 1984. Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2901-2903.

**Miwa, K.,H. Matsui, M. Terabe, K. Ito, M. Ishada, H. Takagi, S. Makamori and K. Sano.** 1985. Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 39: 281-286.

**Mohamed, S., O.R. Gvozdiak, D. Stallmann, U. Gripenburg, H. Follmann and G. Auling.** 1998. Ribonucleotide reductase in *Bacillus subtilis* - evidence for a Mn-dependent enzyme. *BioFactors* (in press).

**Mulliez, E., M. Fontecave, J. Gaillard and P. Reichard.** 1993. An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 2296-2299.

**Nilsson, O., A. Åberg, T. Lundqvist, B.-M. Sjöberg.** 1988. Nucleotide sequence of the gene coding for the large subunit of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. Correction. *Nucleic Acids Res.* 16: 4174.

**Nordlund, P. and H. Eklund.** 1993. Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J. Mol. Biol.* 232: 123-164.

**Nordlund, P., B.-M. Sjöberg and H. Eklund.** 1990. Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345: 593-598.

**Oehlmann, W., U. Gripenburg and G. Auling.** 1998. Cloning and sequencing of the *nrdF* gene of *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 encoding the functional metallo-cofactor of the manganese-ribonucleotide reductase (Mn-RRase). *Biotechnol. Lett.* 20: 483-488.

**Ogata, K., S. Kinoshita, T. Tsunoda and K. Aida.** 1976. Microbial production of nucleic acid related substances. Wiley, New York.

**Oka, T, K. Udagawa and S. Kinoshita.** 1968. Unbalanced growth death due to depletion of  $Mn^{2+}$  in *Brevibacterium ammoniagenes*. J. Bacteriol. 96: 1760-1767.

**Ormö, M. and B.-M. Sjöberg.** 1996. The Cys292→Ala substitution in protein R1 of class I ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* has a global effect on nucleotide binding at the specificity-determining allosteric site. Eur. J. Biochem. 241: 363-367.

**Ormö, M., K. Regnström, Z. Wang, L. Que, Jr., M. Sahlin and B.-M. Sjöberg.** 1995. Residues important for radical stability in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 270: 6570-6576.

**Parker, N.J., C.G. Begley and R.M. Fox.** 1991. Human M1 subunit of ribonucleotide reductase: cDNA sequence and expression in stimulated lymphocytes. Nucleic Acids Res. 19: 3741.

**Pascual, C., P.A. Lawson, J.A.E. Farrow, M.N. Gimenez and M.D. Collins.** 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 724-728.

**Pátek, M., B.J. Eikmanns, J. Pátek and H. Sahm.** 1996. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. Microbiology 142: 1297-1309.

**Peitsch, M. C.** 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. Biochem. Soc. Trans. 24: 274-279.

**Petersson, L., A. Gräslund, A. Ehrenberg, B.-M. Sjöberg and P. Reichard.** 1980. The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255: 6706-6712.

**Philipps, G., B. Clement and C. Gigot.** 1995. Molecular characterization and cell cycle-regulated expression of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to the small subunit of ribonucleotide reductase. FEBS Lett. 358: 67-70.

**Plönzig, J. and G. Auling.** 1987. Manganese deficiency impairs ribonucleotide reduction but not replication in *Arthrobacter* species. Arch. Microbiol. 146: 396-401.

**Pryanishnikova, N.I. and E.P. Iordan.** 1998. Vitamin B<sub>12</sub>-dependent synthesis of DNA in Streptomyces. Microbiology 67: 19-22.

**Raleigh, E.A., N.E. Murray, H. Revel, R.M Blumenthal, D. Westaway, A.D. Reith, P.W.J. Rigby, J Elhai and D. Hanahan.** 1988. McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. Nucleic Acids Res. 16: 1563-1575.

**Reichard, P.** 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? Science 260: 1773-1777.

**Rubin, H., J.S. Salem, L.-S. Li, F.-D. Yang, S. Mama, Z.-M. Wang, A. Fisher, C.S. Hamann, and B.S. Cooperman.** 1993. Cloning, sequence determination, and regulation of the ribonucleotide reductase subunits of *Plasmodium falciparum*: a target for antimalarial therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9280-9284.

**Sahlin, M., G. Lassmann, S. Pötsch, B.-M. Sjöberg and A. Gräslund.** 1995. Transient free radicals in iron/oxygen reconstitution mutant Protein R2 Y122F. J. Biol. Chem. 270: 12361-12365.

**Saiki, R., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Ehrlich and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

**Schäfer, A., J Kalinowski, R Simon, A.H. Seep-Feldhaus and A. Pühler.** 1990. High frequency conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol. 172: 1663-1666.

**Schäfer, A., J. Kalinowski and A. Pühler.** 1993. Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergenic matings with *Escherichia coli* after stress exposure. Appl. Environ. Microbiol. 60: 756-759.

**Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Pühler.** 1994a. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene 145: 69-73.

**Schäfer, A., A. Schwarzer, J. Kalinowski and A. Pühler.** 1994b. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restrictionsystem from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergenic conjugation with *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176: 7309-7319.

**Schimpff-Weiland, G., H. Follmann and G. Auling.** 1981. A new manganese-activated ribonucleotide reductase found in Gram-positive bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1276-1282.

**Schmidt, M., B. Meier and F. Parak.** 1996. X-ray structure of the cambialistic superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* active with Fe or Mn. J. Biol. Inorg. Chem. 1: 532-541.

**Scotti, C., A. Valbuzzi, M. Perego, A. Galizzi and A.M. Albertini.** 1996. The *Bacillus subtilis* ribonucleotide reductase is similar to the second classI NrdE/NrdF enzymes of *Enterobacteriaceae*. Microbiology 142: 2995-3004.

**Seep-Feldhaus A. H., J. Kalinowski and A. Pühler.** 1991. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysI* gene involved in lysine uptake. Mol. Microbiol. 5: 2995-3005.

**Simon, R., U. Priefer and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Bio/Technology 1: 84-87.

**Singh, D., Y. Tamao and R.L. Blakley.** 1977. Allosterism, regulation, and cooperativity: the case of ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. Adv. Enz. Reg. 15: 81-100.

**Sjöberg, B.-M.** 1994. The ribonucleotide jigsaw puzzle: a large piece falls into place. Structure 2: 793-796.

**Sjöberg, B.-M.** 1997. Ribonucleotide reductases - a group of enzymes with different metallosites. Struct. Bond. 88: 139-173.

**Sjöberg, B.-M., T.M. Loehr and J. Sanders-Loehr.** 1982. Raman spectral Evidence for a  $\mu$ -oxo bridge in the binuclear iron center of ribonucleotide reductase. Biochemistry 21: 96-102.

- Sjöberg, B.-M., S. Hahne, M. Karlsson, H. Jörnvall, M. Göransson and B.E. Uhlin.** 1986. Overproduction and purification of the B2 subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261: 5658-5662.
- Slightom, J.L., D.R. Siemieniak, L.C. Sieu, B.F. Koop and L. Hood.** 1994. Nucleotide sequence analysis of 77.7 kb of the human V-beta T-cell receptor gene locus: Direct primer-walking using cosmid template DNAs. Genomics 20: 149-168.
- Sonenshein, A.L., J.A. Hoch and R. Losick.** 1993. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- Sun, L. and J.A. Fuchs.** 1992. *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. Mol. Biol. Cell 3: 1095-1105.
- Sun, X., J. Harder, M. Krook, H. Jörnvall, B.-M. Sjöberg and P. Reichard.** 1993. A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 577-581.
- Sun, X., R. Eliasson, E. Pontis, J. Andersson, G. Buist, B.-M. Sjöberg and P. Reichard.** 1995. Generation of the glycy radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. J. Biol. Chem. 270: 2443-2446.
- Stubbe, J. and W. van der Donk.** 1995. Ribonucleotide reductases: radical enzymes with suicidal tendencies. Chemistry & Biology 2: 793-801.
- Takayama, K., A. Furuya and S. Abe.** 1970. Isolation and characterization of mutants considerably devoid of 5'-nucleotide degrading ability from *Brevibacterium ammoniagenes*. Amino Acid Nucleic Acid 22: 15-22.
- Tauch, A., T. Hermann, A. Burkovski, R. Krämer, A. Pühler and J. Kalinowski.** 1998. Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product. Arch Microbiol. 169: 303-312.

**Tauer, A. and S.A. Benner. 1997.** The B<sub>12</sub>-dependent ribonucleotide reductase from the archaebacterium *Thermoplasma acidophila*: An evolutionary solution to the ribonucleotide conundrum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 53-58.

**Thaler, M. and H. Diekmann. 1979.** The effect of manganese deficiency on lipid content and Composition in *Brevibacterium ammoniagenes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6: 379-387.

**Thelander, L. and P. Berg. 1986.** Isolation and characterization of expressible cDNA clones encoding the M1 and M2 subunits of mouse ribonucleotide reductase. Mol. Cell. Biol. 6: 3433-3442.

**Tsai, P.K. and H.P.C. Hogenkamp. 1980.** The purification and characterization of an adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside diphosphate reductase from *Corynebacterium nephridii*. J. Biol. Chem. 255: 1273-1278.

**Uhlin, U. and H. Eklund. 1994.** Structure of ribonucleotide reductase protein R1. Nature 370: 533-539.

**Uhlin, U. and H. Eklund. 1996.** The ten-stranded  $\beta/\alpha$  barrel in ribonucleotide reductase protein R1. J. Mol. Biol. 262: 358-369.

**Voss, H., C. Schwager, S. Wiemann, J. Zimmermann, J. Stegemann, H. Erfle, A.M. Voie, H. Drzonek and W. Ansorge. 1995.** Efficient low redundancy large-scale DNA sequencing at EMBL. J. Biotechnol. 41: 121-129.

**Vandekerckhove, J., M. Rider, H.H. Rasmussen, S. De Boeck, M. Puype, J. Van Damme, B. Gesser and J. Celis. 1993.** Routine amino acid sequencing on two-dimensional gel separated proteins: a protein elution and concentration gel system, p. 11-19. In Imahori, K. and F. Sakiyama (eds.). Methods in protein sequencing analysis. Plenum Press, New York.

**Walter, A. 1996.** Der Vergleich der Ribonucleotid-Reduktion von *Corynebacterium glutamicum* und *Corynebacterium ammoniagenes*. Diplomarbeit, Universität Hannover.

**Webley, D. 1960.** The effect of deficiency of iron, zinc, and manganese on the growth and morphology of *Nocardia opaca*. J.Gen. Microbiol. 23: 87-92.

**Webley, D., R.B. Duff and G. Anderson.** 1962. The metabolism of iron-, zinc-, and manganese-deficient *Nocardia opaca*. J. Gen. Microbiol. 29: 179-187.

**Wiemann, S., T. Rupp, J. Zimmermann, H. Voss, C. Schwager and W. Ansorge.** 1995. Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7 DNA polymerase and internal labeling with fluorescein-15-dATP. Biotechniques 18: 688-697.

**Willing, A.** 1986. Die Ribonucleotidreduktase aus *Brevibacterium ammoniagenes*. Ein neuartiger Typ von Manganenzym. Dissertation, Universität Marburg.

**Willing, A., H. Follmann and G. Auling.** 1988a. Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme. Eur. J. Biochem. 170: 603-611.

**Willing, A., H. Follmann and G. Auling.** 1988b. Nucleotide and thioredoxin specificity of the manganese ribonucleotide reductase from *Brevibacterium ammoniagenes*. Eur. J. Biochem. 175: 167-173.

**Wohleben, W., G. Muth and J. Kalinowski.** 1993. Genetic engineering of Gram positiv bacteria. In Pühler, A. (ed.), Genetic engineering of microorganisms. VCH, Weinheim.

**Yamada, K., S. Kinoshita, T. Tsunoda and K. Aida.** 1972. The microbial production of amino acids. Wiley, New York.

**Yang, F., R.A. Spanevello, I. Celiker, R. Hirschmann, H. Rubin and B.S. Cooperman.** 1990. The carboxyl terminus heptapeptide of the R2 subunit of mammalian ribonucleotide reductase inhibits enzyme activity and can be used to purify the R1 subunit. FEBS Lett. 272: 61-64

**Yang, F., G. Lu and H. Rubin.** 1994. Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and cloning, expression, and purification of the large subunit. J. Bacteriol. 176: 6738-6743.

**Yang, F., S.C. Curran, L.-S. Li, D. Avarbock, J.D. Graf, M.-M. Chua, G. Lu, J. Salem and H. Rubin.** 1997. Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit. J. Bacteriol. 179: 6408-6415.

**Yanisch-Perron, C., J. Vieira, J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13 mp18 and pUC vectors. *Gene* 33: 103-119.

**Yuasa, K. and M. Sugiyama.** 1995. Bleomycin-induced beta-lactamase overproduction in *Escherichia coli* carrying a bleomycin-resistance gene from *Streptomyces verticillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 132: 61-66.

Danksagung:

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. Auling, der mit seiner ständigen Diskussionsbereitschaft und Kritik zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Diekmann gehört mein Dank für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung insbesondere bei den fruchtbaren Diskussionen zu meiner ersten Publikation.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Lengeler für die Übernahme der Gutachter-tätigkeit.

Für ihre Unterstützung bei der Peptidsequenzierung danke ich Herrn Dr. Hubert Thole und Dr. Roland Schmid.

Besonderer Dank gilt der Bielefelder Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Pühler. Für die ergie-bigen Diskussionen über genetische Probleme der Corynebakterien danke ich Dr. Jörn Kalinowski und Dr. Andreas Tauch. Und ebenfalls danke ich Lutz Wehmeier für seine Hilfe beim Screening der Cosmidbank und ein Dankeschön an Dr. Brigitte Bathe für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Bestimmung meiner *C. glutamicum*-Sequenzen.

Für seine Hilfe bei den Mykobakterien und der initialen Sequenzierung des so wichtigen PCR-Produktes danke ich Dr. Peter Sander und für die Einführung in die 2D-Elektrophorese danke ich Dr. Sanjay Mishra.

Von den Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie trifft mein besonderer Dank Herrn Dr. Plattner der mir den Umgang mit FPLC und den dazugehörigen Säulen näher brachte und außerdem für Probleme jeglicher Art ein offenes Ohr hatte.

Zum Glück gab es dann irgendwann auch Dr. Jochen Meens, mit dem ich molekularbio-logische Problematiken auch innerhalb des Institutes diskutieren konnte. Dafür danke. Auch dafür, daß ich von Zeit zu Zeit einen Schluck aus seinem Töpfchen trinken durfte.

Dem technische Stab des Instituts, Inge, Armgard und Herrn Schubert, danke ich für die Hilfe bei der Herstellung von Medien, der Instandhaltung von Geräten und den anderen nützlichen und unnützlichen Gefälligkeiten, die die Zusammenarbeit erleichterten.

Ulrich Gripenburg gilt mein Dank für die Einweisung in die Welt der Mn-Ribonu-cleotid-Reduktase und die fruchtbare Kooperation inner- und außerhalb des 006.

Weiterhin danke für die gute Zusammenarbeit Antje, Anne, Bouziane, Chuan-Hao, Jens, Oxana und Sahera, die alle Leidensgenossen im 006 waren.

Dem Rest des Instituts sei auch gedankt für die fachlichen und weniger fachlichen Gespräche sowohl während als auch außerhalb der Kernarbeitszeit. Da waren Annette, Astrid, Claudia H., Claudia K., Claudia W., Christine, Eike, Natascha, Nina, Sabine, Salwa, Sridevi, Stefanie, Cengiz, Detlef, Edzard, Eric, Haiming, Heshem, Matthias B., Matthias F., Matthias S., Ralf, Rolf, Yasser und natürlich Herr Zellner.

Ich danke meiner Mutter, meiner Tochter und Sabine für ihre Bemühungen, mir ein Leben außerhalb des Instituts zu bereiten.

# Lebenslauf

**Persönliche Daten:** Wulf Oehlmann

geb. 19.03.1965  
in Braunschweig

**Schulbildung:**

08.1971 - 07.1975      Grundschule an der Jahnschule in Diepholz  
08.1975 - 06.1984      Besuch des Gymnasium Graf Friedrich Schule in Diepholz,  
Abschluß: Abitur

**Wehrdienst:**

07.1984 - 06.1988      Soldat auf Zeit in einer Fernmeldeeinheit in Hamburg

**Studium:**

09.1988 - 04.1994      Studium der Biologie an der Universität Osnabrück  
Studienschwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie

Abschluß: Diplom-Biologe

Diplomarbeit: Der Galactitol-Stoffwechsel von *Escherichia coli*:  
Molekulargenetische Analyse der Regulation der *gat*-Gene

**Promotion:**

07.1994- 03.1998      Durchführung der experimentellen Arbeiten am Institut für  
Mikrobiologie der Universität Hannover zur hier vorgeliegenden  
Dissertation

Thema: Klonierung der Gene der Ribonucleotid-Reduktasen von  
*Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium*  
*glutamicum*

29.10.1998              mündliche Prüfung in den Fächern Genetik (Hauptfach) und  
Mikrobiologie (Nebenfach)