

**Untersuchungen zur Inaktivierung und Reaktivierung der
Coenzym B₁₂-abhängigen Glycerin-Dehydratasen aus *Citrobacter
freundii* und *Clostridium pasteurianum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Corinna Seifert
aus Göttingen

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Korreferent: Prof. Dr. B. Bowien

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Mai. 2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	8
2.1 Organismen und Plasmide	8
2.2 Zellanzucht	14
2.2.1 Nährmedien	14
2.2.1.1 LB-Medium	14
2.2.1.2 DYT-Medium	14
2.2.1.3 SOB-Medium	15
2.2.1.4 <i>Citrobacter</i> -Mineralmedium mit Hefeextrakt	15
2.2.1.5 Spurenelementelösung SL-4	16
2.2.1.6 Minimalmedium nach KELL et al. (1981; modif.)	17
2.2.1.7 Synthetisches Medium für <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	18
2.2.1.8 Yeast-Pepton-Dextrose (YPD)-Medium	18
2.2.1.9 Synthetisches Dropout (SD) Medium	19
2.2.1.10 10 x „Dropout Solution“ (Aminosäurestammlösung)	19
2.2.1.11 Feste Medien	20
2.2.1.12 Medienzusätze	20
2.3 Zellanzucht	20
2.3.1 Aerobe Anzucht	20
2.3.2 Anaerobe Anzucht	20
2.3.3 Anzucht von rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämmen zur heterologen Genexpression	21
2.3.3.1 Expression auf Basis des Vektors pKK223-3	21
2.3.3.2 Expression auf Basis des Vektors pET-19b	23
2.3.3.3 Expression auf Basis des Glutathion S-Transferase Genfusionssystems	24
2.3.3.4 Expression mit <i>E. coli</i> K38/pGP1-2	25
2.3.4 Stammhaltung	25
2.3.5 Bestimmung der Wachstumsparameter	26
2.3.5.1 Messung der optischen Dichte	26
2.3.5.2 Bestimmung des pH-Wertes	26
2.3.5.3 Reinheitskontrolle	26

2.4	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	27
2.4.1	Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit DNA	27
2.4.2	Puffer und Lösungen	27
2.4.3	Reinigung und Konzentrierung von DNA	28
2.4.3.1	Fällung von DNA	28
2.4.3.2	Mikrodialyse	28
2.4.3.3	Lithiumchloridfällung	29
2.4.3.4	Gelfiltration von DNA-Lösungen	29
2.4.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.5	Isolierung von Nukleinsäuren	30
2.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. freundii</i> und <i>Cl. pasteurianum</i>	30
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA	30
2.5.2.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	30
2.5.2.2	Minipräparation mittels „Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System“	31
2.5.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten mittels „Qiaquick Gelextraction“-Kit	31
2.5.2.4	Reinigung von PCR-Produkten	32
2.6	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	32
2.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.6.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	33
2.6.3	Ethidiumbromid-Färbung und Photographie von Agarosegelen	34
2.6.4	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.7	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	35
2.7.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	36
2.7.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	36
2.7.3	Ligation	36
2.7.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	37
2.8	Übertragung von DNA und Selektion rekombinanter Klone	38
2.8.1	Herstellung kompetenter Zellen nach INOUE et al. (1990)	38
2.8.2	Herstellung von kompetenten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	39
2.8.3	Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.8.4	Transformation der kompetenten <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	40
2.8.5	Elektroporation	41
2.8.6	Der X-Gal Test zur Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	41
2.8.7	-Galaktosidase-Filterassay	42
2.9	Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	43
2.9.1	Herstellung von Filtern für die Koloniehybridisierung	43

2.9.2	Northern-Blot	44
2.10	Hybridisierungsmethoden	44
2.10.1	DNA-RNA-Hybridisierungen	45
2.11	Autoradiographie	45
2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.13	Sequenzierung und Analyse von Sequenzdaten	48
2.14	Herstellung von Rohextrakten	49
2.14.1	Zellaufschluß mit der Frenchpresse	49
2.14.2	Zellaufschluß durch Ultraschall	50
2.15	Proteinbestimmung nach BRADFORD	50
2.16	Methoden zur Proteinanreicherung	51
2.16.1	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie	51
2.16.1.1	Vorbereitung der Säule	51
2.16.1.2	Reinigung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen	52
2.16.1.3	Regeneration der Säule	53
2.16.2	Affinitätschromatographie an einer Vitamin B ₁₂ -Agarose	53
2.16.3	Entsalzen von Proteinlösungen	54
2.16.4	Dialyse von Proteinlösungen	54
2.17	Bestimmung von Enzymaktivitäten	54
2.17.1	Glycerin-Dehydratase	55
2.17.2	Adenosyltransferase-Test	56
2.17.3	ATP-Hydrolyse	57
2.18	Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen	58
2.19	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	59
2.19.1	SDS-PAGE nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987)	59
2.19.2	„Milde SDS-PAGE“ zur Lokalisierung Cobamid enthaltender Proteine	61
2.19.3	Native Gradienten PAGE	61
2.20	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	63
2.20.1	Coomassie-Färbung	63
2.20.2	Unspezifische Proteinfärbung mit Silber	63

2.21	Proteintransfer von Proteinen auf Membranen	65
2.21.1	Western-Blot	65
2.21.2	Protein-, „Dot-Blot“-Verfahren	66
2.22	Färbung von Proteinen auf Blotmembranen	67
2.22.1	Ni ²⁺ -NTA-Konjugat-Färbung	67
2.23	Molekularmassenbestimmung	68
2.23.1	Molekularmassenbestimmung durch SDS-PAGE	68
2.23.2	Molekularmassenbestimmung durch Gradienten-PAGE	69
2.23.3	Gelfiltration an Superdex 200 HR	70
2.24	Synthese von ¹⁴C-markiertem Coenzym B₁₂	71
2.24.1	Synthese von 5,6-Dimethyl (2- ¹⁴ C) benzimidazol	71
2.24.2	Synthese von Coenzym B ₁₂ durch <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	72
2.24.3	Nachweis und Isolierung des ¹⁴ C-markierten Coenzym B ₁₂ durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	72
2.25	Bindungsstudien von Proteinen	74
2.25.1	B ₁₂ -Bindung von Proteinen	74
2.25.2	ATP-Bindung von Proteinen	75
2.26	Bezugsquellen	75
3	Experimente und Ergebnisse	78
3.1	Stand der Vorarbeiten	78
3.2	Expression und Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus <i>C. freundii</i>	79
3.2.1	Expression und Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus <i>C. freundii</i> nach der Methode von SEYFRIED et al. (1996)	79
3.2.2	Heterologe Expression der Strukturgene der Glycerin-Dehydratase mit dem <i>lac</i> -Promotor des Plasmids pSK+	81
3.2.2.1	Klonierung der Glycerin-Dehydratase-Gene in den Vektor pSK+	81
3.2.2.2	Heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus <i>C. freundii</i> mit Hilfe des Plasmids pCS120	82
3.2.3	Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus <i>C. freundii</i> mittels Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	83
3.2.4	Zusammenfassung der Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus <i>C. freundii</i>	85

3.3	Expression und Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus <i>Cl. pasteurianum</i>	86
3.3.1	Heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus <i>Cl. pasteurianum</i>	87
3.3.1.1	Klonierung der Glycerin-Dehydratase-Gene aus <i>Cl. pasteurianum</i> in den Vektor pSK+	87
3.3.1.2	Heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus <i>Cl. pasteurianum</i> mit Hilfe des Plasmids pCS220	88
3.3.2	Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus <i>Cl. pasteurianum</i> mittels Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	89
3.4	Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus <i>C. freundii</i> und <i>Cl. pasteurianum</i> durch Glycerin	90
3.5	Reaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus <i>C. freundii</i> und <i>Cl. pasteurianum</i>	93
3.5.1	Transkriptionsanalyse von <i>dhaF</i> und <i>dhaG</i> aus <i>C. freundii</i>	95
3.5.2	Transkriptionsanalyse von <i>dhaF</i> und <i>dhaG</i> aus <i>Cl. pasteurianum</i>	97
3.5.3	Heterologe Expression und Reinigung von DhaF und DhaG aus <i>C. freundii</i>	99
3.5.3.1	Heterologe Expression von <i>dhaF</i> mit dem Expressionsvektor pKK223-3	100
3.5.3.2	Heterologe Expression von <i>dhaG</i> mit dem Expressionsvektor pKK223-3	101
3.5.3.3	Heterologe Expression des <i>dhaG</i> -Gens aus <i>C. freundii</i> mit dem Glutathion S-Transferase Genfusionssystem	102
3.5.3.4	Heterologe Expression des <i>dhaG</i> -Gens aus <i>C. freundii</i> mit dem pET-System	105
3.5.3.5	Heterologe Koexpression der Gene <i>dhaF</i> und <i>dhaG</i> mit dem Expressionsvektor pKK223-3	107
3.5.3.6	Reinigung von DhaF, DhaG und DhaFG aus <i>C. freundii</i> mittels Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	108
3.5.4	Heterologe Expression und Reinigung von DhaF und DhaG aus <i>Cl. pasteurianum</i>	112
3.5.5	Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus <i>C. freundii</i>	116
3.5.5.1	Reaktivierung der Glycerin-inaktivierten Glycerin-Dehydratase	116
3.5.5.2	Reaktivierung von O ₂ -inaktivierter Glycerin-Dehydratase	120
3.5.5.3	Reaktivierung von Cyano-B ₁₂ -inaktivierter Glycerin-Dehydratase	121
3.5.5.4	Reaktivierung von Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus verschiedenen Organismen durch den Reaktivierungsfaktor aus <i>C. freundii</i>	123
3.5.6	Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus <i>Cl. pasteurianum</i>	124

3.6	Untersuchungen zum Mechanismus der Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase durch DhaFG aus <i>C. freundii</i>	125
3.6.1	Adenosyltransferase-Aktivität des Reaktivierungsfaktors aus <i>C. freundii</i>	125
3.6.1.1	Adenosyltransferase-Aktivität von DhaH aus <i>C. freundii</i>	126
3.6.2	Austausch des modifizierten Coenzym durch den Reaktivierungsfaktor	130
3.6.3	Komplexbildung zwischen dem Reaktivierungsfaktor DhaFG und der Glycerin-Dehydratase	132
3.6.4	Untersuchungen zu Wechselwirkungen von DhaF und DhaG untereinander und mit anderen Proteinen mittels Zweihybrid-Analyse	134
3.6.5	Coenzym B ₁₂ -Bindung des Reaktivierungsfaktors DhaFG	138
3.6.6	ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse von DhaF und DhaFG	142
4	Diskussion	146
4.1	Inaktivierung von B₁₂-abhängigen Proteinen	146
4.2	Regeneration von inaktivierten B₁₂-abhängigen Enzymen durch einen Reaktivierungsfaktor	156
4.2.1	Reaktivierung der Dehydratase durch Adenosylierung des gebundenen modifizierten Coenzym	159
4.2.2	Reaktivierung der Dehydratase durch den direkten Austausch des gebundenen, modifizierten Coenzym durch freies Coenzym B ₁₂	162
4.3	Bindung von Coenzym B₁₂ durch Enzyme	163
4.4	Der Reaktivierungsfaktor der Dehydratase- ein Chaperon?	173
4.5	Ausblick	179
5	Zusammenfassung	183
6	Literaturverzeichnis	187

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^r	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
C.	<i>Citrobacter</i>
C-	Carboxy
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBI	Cobinamid
CBL	Cobalamin
Ci	Curie
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
d	Küvettschichtdicke; desoxy
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DBI	Dimethylbenzimidazol
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
	Delta; Deletion
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DHA; <i>dha</i>	Dihydroxyaceton; (-Regulon)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithioerythrit
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat

E	Extinktion
E	Extinktionsänderung
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
	Extinktionskoeffizient
E-cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ed(s).	Herausgeber
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
Fa.	Firma
g	Gramm
x g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/sek ²)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GTP	Guanosintriphosphat
GWGD	Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen
h	Stunde
HF	Haptocorrin
HMW	„high molecular weight“ (hohes Molekulargewicht)
Hrsg.	Herausgeber
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
IF	Intrinsic Faktor
IPTG	Isopropyl- -thiogalactopyranosid
k	Kilo
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
kb	Kilobasenpaare
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KP	Kaliumphosphat
l	Liter
	Bakteriophage Lambda
LB	Luria Bertani
LMW	„low molecular weight“ (geringes Molekulargewicht)
m	Meter; milli (10 ⁻³)
M	Molar
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
min	Minute
modif.	modifiziert
mol	Mol
N-	Amino-
NAD	Nicotinadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinadenindinukleotid, reduziert
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
	Ohm

orf	„open reading frame“ (offener Leserahmen)
<i>P.</i>	<i>Propionibacterium</i>
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pers. Mitteilung	persönliche Mitteilung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Rf	elektrophoretische Mobilität
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces; Salmonella</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SL	Stammlösung
<i>sp</i>	<i>species</i>
SSC	Standard-Saline-Citrat
t	Zeit
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Transcobalamin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tertamethylethyldiamin
™	Trademark
T _m	Schmelztemperatur
TRICINE	N-[Tri(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
U	U; „unit“ (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Probenvolumen
V	Volt; Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Aminosäuren

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

1 Einleitung

Glycerin- und die dazu verwandten Diol-Dehydratasen können Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den korrespondierenden Aldehyden umsetzen (SEYFRIED et al., 1996; TORAYA et al., 1976). Sie werden sowohl von Gram-positiven als auch von Gram-negativen Mikroorganismen gebildet. Zu diesen gehören Vertreter der Enterobakterien, Propionsäurebakterien, lösungsmittelbildenden Clostridien und Lactobacilli (TORAYA et al., 1979; FORAGE und FOSTER, 1979; DABROCK et al., 1992; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 1996; TORAYA et al., 1980; BOBIK et al., 1997; BARBIRATO et al., 1997; SMILEY und SOBOLOV, 1962; TALARICO et al., 1990; SCHÜTZ und RADLER, 1984). Mit einer Ausnahme sind alle bisher charakterisierten Dehydratasen Coenzym B₁₂-abhängig. In *Costridium glycolicum* wurde eine B₁₂-unabhängige Diol-Dehydratase entdeckt. Diese unterscheidet sich von den Coenzym B₁₂-abhängigen Dehydratasen durch ihre extreme Sauerstoffempfindlichkeit und ihr Unvermögen, Glycerin als Substrat zu nutzen (HARTMANIS und STADTMAN, 1986). Innerhalb der Enterobakterien wurden die Coenzym B₁₂-abhängigen Dehydratasen in den Gattungen *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter* gefunden.

Die bekannten Diol-Dehydratasen sind in den anaeroben Abbau von 1,2-Propandiol involviert. 1,2-Propandiol ist ein Produkt der Fermentation von Rhamnose und Fucose. Diese Zucker sind u. a. in der Zellwand von Pflanzen vorhanden. Bei der 1,2-Propandiol-Fermentation durch *Salmonella*- und *Klebsiella*-Arten wird 1,2-Propandiol zunächst durch die Diol-Dehydratase zu Propionaldehyd dehydratisiert (s. Abbildung 1; LEE und ABELES, 1963). Propionaldehyd wird im weiteren zu 1-Propanol und Propionsäure umgesetzt. Diese Reaktionen werden durch eine Coenzym A-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase, Phosphotransacetylase und Alkohol-Dehydrogenase katalysiert (TORAYA et al., 1979; BADIA et al., 1985). In *S. typhimurium* sind die Strukturgene für die Diol-Dehydratase (*pduCDE*) im *pdu*-Operon lokalisiert. In Gegenwart von 1,2-Propandiol wird die Expression der Gene induziert. Zusätzlich ist die Induktion des *pdu*-Operons mit dem *cob*-Operon

gekoppelt, das die Gene für die Cobalaminbiosynthese enthält. Neben *S. typhimurium* besitzt auch *K. oxytoca* ATCC 8724 eine Diol-Dehydratase (TOBIMATSU et al., 1995; BOBIK et al., 1997). Im Gegensatz zu *S. typhimurium* ist *K. oxytoca* in der Lage, auf Glycerin zu wachsen. Bei der Fermentation von Glycerin tritt die isofunktionelle Diol-Dehydratase an die Stelle der Glycerin-Dehydratase (TORAYA und FUKUI, 1977; TORAYA et al., 1980). Der Stamm *K. pneumoniae* ATCC 25955 besitzt neben der Diol-Dehydratase auch eine Glycerin-Dehydratase (TORAYA und FUKUI, 1977).

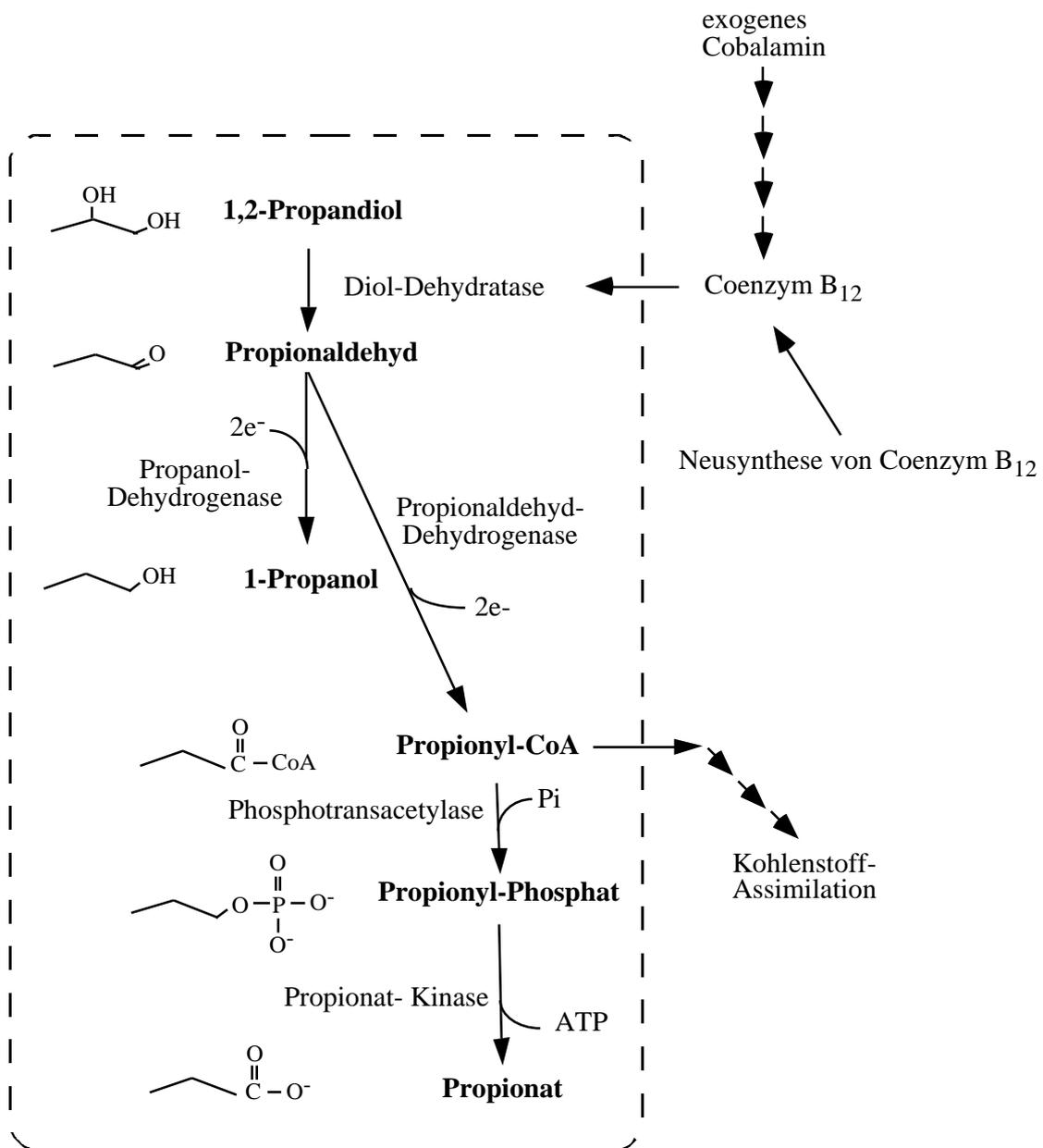


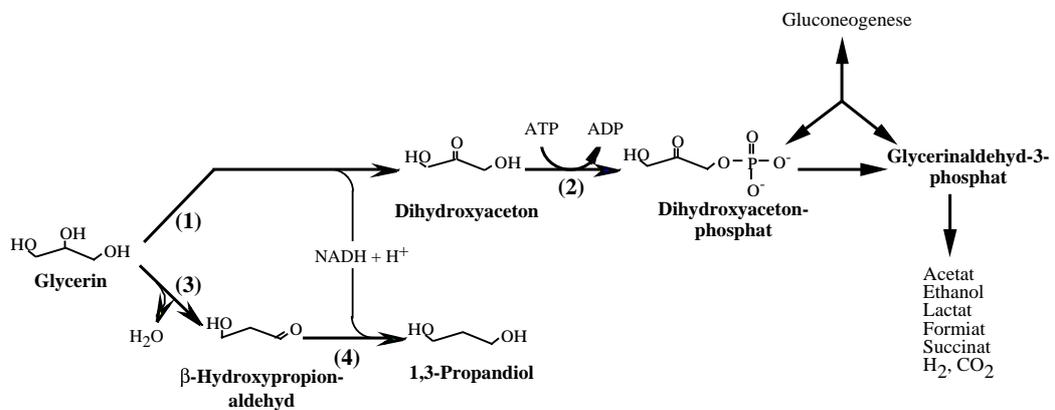
Abbildung 1: Schema der 1,2-Propandiolfermentation (nach DANIEL et al., 1998).

Glycerin-Dehydratasen sind in den anaeroben Abbau von Glycerin involviert. Dieser Stoffwechselweg wurde in *C. freundii* und *K. pneumoniae* aufgeklärt. Glycerin wird dabei zu 1,3-Propandiol umgesetzt. Als Nebenprodukte können Ethanol, 2,3-Butandiol, Essigsäure und Milchsäure auftreten. In der Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren unterliegt Glycerin einer Disproportionierung (s. Abbildung 2). Im oxidativen Zweig des Stoffwechselweges wird Glycerin unter Reduktion von NAD⁺ durch die Glycerin-Dehydrogenase zu Dihydroxyaceton oxidiert. Die Dihydroxyaceton-Kinase setzt dieses Produkt zu Dihydroxyacetonphosphat um, das dann in den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg eingeschleust wird (DANIEL et al., 1995 b). Der reduktive Zweig des Stoffwechsels beginnt mit der Dehydratisierung des Glycerins durch die Coenzym B₁₂-abhängige Glycerin-Dehydratase (SEYFRIED et al., 1996). In dieser Reaktion entsteht -Hydroxypropionaldehyd, das durch die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase zu 1,3-Propandiol reduziert wird (ABELES et al., 1960), und die während der Glycerinoxidation anfallenden Reduktionsäquivalente werden verbraucht. Die Gene für die Schlüsselenzyme sind bei *C. freundii* im *dha*-Regulon organisiert, dessen Genexpression durch Glycerin oder Dihydroxyaceton induziert wird. Letzteres wird als der eigentliche Induktor angenommen (RUCH et al., 1974, MÜLLER, 1990). Die vier Schlüsselenzyme der Glycerinfermentation aus *C. freundii* konnten bereits gereinigt und charakterisiert werden (DANIEL et al., 1995 a; SEYFRIED et al, 1996).

Im Gegensatz zu den Enterobakterien ist bisher nur sehr wenig über die Gene und Enzyme für die Glycerinfermentation von Clostridien und Lactobacilli bekannt. In Clostridien treten bei der Glycerinfermentation vermehrt Buttersäure, Butanol und Ethanol als Nebenprodukte auf (DABROCK et al., 1992; HEINDRICKX et al., 1991). Die Aktivitäten der vier Schlüsselenzyme des Stoffwechselweges, die bei den 1,3-Propandiol-produzierenden Enterobakterien identifiziert wurden, konnten auch in Rohextrakten von *Cl. pasteurianum* und *Cl. butyricum* nachgewiesen werden (LUERS et al., 1997; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 1996). Dies zeigte, daß Clostridien Glycerin wahrscheinlich auf dem selben Weg

abbauen wie Enterobakterien, was durch die molekulare Analyse der Gene für die Schlüsselenzyme des reduktiven Zweiges der Glycerinverwertung in *Cl. pasteurianum* bestätigt werden konnte (LUERS et al., 1997; MACIS et al., 1998). Der Nachweis einer Glycerin-Dehydratase- und 1,3-Propandiol-Dehydrogenase-Aktivität konnte auch in *Lactobacillus reuteri*, *L. buchneri* und *L. brevis* erbracht werden (SMILEY und SOBOLOV, 1962; TALARICO et al., 1990; SCHÜTZ und RADLER, 1984). Im Gegensatz zu den Enterobakterien und Clostridien können Lactobacilli nicht mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Sie benötigen ein Co-Substrat, da sie die Enzyme des oxidativen Zweiges des Stoffwechselweges nicht besitzen.

(A)



(B)



Abbildung 2: (A) Schema der Glycerinfermentation durch *C. freundii* und (B) Aufbau des *dha*-Regulons (nach Daniel, 1994; DANIEL et al., 1998)

(A) (1): Glycerin-Dehydrogenase; (2): Dihydroxyaceton-Kinase; (3): Glycerin-Dehydratase; (4): 1,3-Propandiol-Dehydrogenase.

(B) *dhaK*: Gen für Dihydroxyaceton-Kinase; *dhaD*: Gen für Glycerin-Dehydrogenase; *dhaR*: potentiell Transkriptionsaktivator-Gen; *dhaT*: Gen für 1,3-Propandiol-Dehydrogenase; *dhaB*, *dhaC* und *dhaE*: Gene für die Glycerin-Dehydratase; *dhaF*, *dhaG*, *dhaH* und *dhaI*: offene Leserahmen mit unbekannter Funktion.

Das Endprodukt der Glycerinfermentation 1,3-Propandiol ist von großem wirtschaftlichem Interesse. Es kann zur Herstellung von Polyestern, Polyethern und Polyurethanen herangezogen werden. Da die chemische Herstellung aus Ethylen über Etylenoxid nach dem Verfahren der Fa. Shell sehr kostenintensiv ist, wird ein biotechnologisches Verfahren zur Produktion von 1,3-Propandiol erstrebenswert (CHOTANI et al., 2000). Bei der mikrobiellen Herstellung von 1,3-Propandiol hat sich gezeigt, daß die Dehydratase-Aktivität der limitierende Schritt im Rahmen des Produktionsprozesses ist (BOENIGK et al., 1993; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 1996). Dies hat seine Ursache darin, daß Dehydratasen während der Umsetzung von Glycerin inaktiviert werden (SEYFRIED et al., 1997; TORAYA et al., 1976; POZNANZKAYA et al., 1977).

Die Glycerin-Dehydratasen aus *K. pneumoniae* und *C. freundii* und die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* sind biochemisch gut charakterisiert. Die Enzyme setzen, wie bereits erwähnt, Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden um (LEE und ABELES, 1963; SCHNEIDER et al., 1970; TORAYA et al., 1976; DANIEL, 1994). Dabei bevorzugt die Glycerin-Dehydratase Glycerin als Substrat, die Diol-Dehydratase dagegen 1,2-Propandiol. Beide Dehydratasen werden jedoch während der Umsetzung von Glycerin inaktiviert. Diese sogenannte „Suicide“-Inaktivierung wird durch eine irreversible Spaltung der Co-C-Bindung des Coenzym B₁₂ hervorgerufen (BACHOVCHIN et al., 1977). Für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* wurde bereits gezeigt, daß das inaktivierte Enzym durch einen Komplex aus den beiden Proteinen DdrA und DdrB reaktiviert werden kann (MORI et al., 1997; TORAYA und MORI, 1999). Diese beiden Proteine stellen damit einen Reaktivierungsfaktor für die Diol-Dehydratase dar. Alle Dehydratasen bestehen aus drei strukturellen Untereinheiten und bilden im nativen Zustand einen Komplex aus $\alpha_2\beta_2$ (SEYFRIED et al., 1996; TOBIMATSU et al., 1997). Dabei ist die native Molekularmasse der Glycerin-Dehydratase mit 190 kDa etwas geringer als die der Diol-Dehydratase von 230 kDa (SEYFRIED et al., 1996; MACIS et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1970; TOBIMATSU et al., 1997; POZNANSKAJA et al., 1979). Beide Enzyme benötigen für ihre Aktivität monovalente Kationen wie K⁺, NH₄⁺ oder Rb⁺

(SEYFRIED, 1997; TORAYA et al., 1971). Im Gegensatz zur Glycerin-Dehydratase ist die Diol-Dehydratase auch mit Na⁺- oder Cs⁺-Ionen aktiv. Desweiteren unterscheiden sich die Dehydratasen durch ihre K_m-Werte für Coenzym B₁₂. Dieser ist bei der Diol-Dehydratase im Vergleich zur Glycerin-Dehydratase 60 mal höher (SEYFRIED, 1997; FORAGE und FOSTER, 1979; TOBIMATSU et al., 1997; POPPE und RETEY, 1997). Ferner können beide Enzyme aufgrund ihrer immunochemischen Eigenschaften unterschieden werden (TORAYA und FUKUI, 1977). Die Sequenz der Diol-Dehydratasen aus *K. oxytoca* und *S. typhimurium* sind ebenso wie die der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii*, *Cl. pasteurianum* und *K. pneumoniae* bekannt (SEYFRIED et al., 1996; TOBIMATSU et al., 1995; TOBIMATSU et al., 1996; BOBIK et al., 1997; MACIS et al., 1998). Für jedes Enzym sind drei Gene notwendig, die für die Untereinheiten der Dehydratasen kodieren. Die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten zeigen hohe Übereinstimmung zu den analogen Untereinheiten aus anderen Organismen. Die Identitäten auf Aminosäureebene der Untereinheiten von *C. freundii* mit analogen Untereinheiten aus anderen Organismen liegen in einem Bereich von 41 bis 93 % (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Identität von DhaB, DhaC und DhaE aus *C. freundii* zu den analogen Dehydratase-Untereinheiten aus anderen Organismen

<i>C. freundii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Cl. pasteurianum</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>S. typhimurium</i>				
Unter- einheit	Bezeich- nung	Identität (%)	Bezeich- nung	Identität (%)	Bezeich- nung	Identität (%)	Bezeich- nung	Identität (%)
(DhaB)	GldA	93	DhaB	77	PddA	70	PduC	70
(DhaC)	GldB	89	DhaC	62	PddB	49	PduD	49
(DhaE)	GldC	85	DhaE	57	PddC	41	PduE	41

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die „Suicide“-Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* zu untersuchen. Im weiteren sollten anhand der Reaktivierung von Glycerin- und O₂-inaktivierter Dehydratase und der Aktivierung des inaktiven Cyano-B₁₂-Dehydratase-Komplexes beteiligte Proteine und die dazu korrespondierenden Gene identifiziert und charakterisiert werden. Schwerpunkte der Arbeiten waren dabei die Rekonstruktion der Reaktivierungsreaktion *in vitro* und der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Im folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Organismen (Tabelle 2), Klonierungsvektoren und rekombinanten Plasmide (Tabelle 3) aufgeführt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 2: Organismen

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>Citrobacter freundii</i>	Wildtyp	DSM 30040
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Wildtyp	DSM 525
<i>Escherichia coli</i> DH5	F ⁻ , <i>endA1</i> , 80d, <i>lacZ</i> M15, (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K -m _{K+}), <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , -, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	HANAHAN,1983
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _K -m _{K+}), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , -, (<i>lac-</i> <i>proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacF</i> ^l , <i>lacZ</i> M15]	YANNISCH-PERRON et al., 1985
<i>Escherichia coli</i> K38	<i>hfrC</i> ()	RUSSEL und MODEL,1984
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdF</i> , <i>gal</i> (cIts857 <i>ind1</i> Sam7 nin5 <i>lacUV5-T7 gene1</i>), <i>ompTr</i> ⁻	STUDIER und MOFFAT, 1986

<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> ⁻ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	STRATAGENE, San Diego, USA
<i>Escherichia coli</i> ECL707	F ⁻ , <i>gld</i> :: Tn10 <i>glpK</i> :: Tn10, <i>ptsD</i> :: Tn10, <i>araD139 flbB</i> , (<i>lacU169</i>), <i>ptsF25, relA, rpsL, thi</i>	SPRENGER et al., 1989
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	Wildtyp	DSM 20271
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Wildtyp	DSM 4902
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Wildtyp	DSM 4798
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	Wildtyp	DSM 4799
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HF7c	MATa, <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS::GAL1-HIS3, URA:GAL4 17 mers</i>) ₃ - <i>CYC1-lacZ</i>	FEILROTTER et al., 1994

Tabelle 3: Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevantes Merkmal	Referenz
pBluescript SK ⁺ (pSK+)	Ap ^r , lacPOZ ⁺	STRATAGENE, San Diego, USA

pGP1-2	Km ^r , T7-RNA-Polymerase	TABOR und RICHARDSON, 1985
pKK223-3	Ap ^r	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg
pMPM-K4	Ap ^r	MEYER, 1995
pGEX-2T	Ap ^r , <i>gst</i>	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg
pET-19b	Ap ^r , ColE1 ori R, T7lac Promotor, f1 ori, His ₆ -Tag	NOVAGEN Inc., Madison, USA
pGAD GL	GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, LEU2, Ap ^r	VAN AELST et al., 1993
pGBT9	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, AP ^r	BARTEL et al., 1993
pRD1	Ap ^r , <i>dhaK</i> , <i>dhaD</i> , <i>dhaR</i> , <i>dhaH</i> , <i>dhaG</i> , <i>dhaT</i> , <i>dhaI</i> , <i>dhaB</i> , <i>dhaC</i> , <i>dhaE</i> , <i>dhaF</i>	DANIEL und GOTTSCHALK, 1992
pRD14	Apr, <i>dhaT</i> , <i>dhaG</i> , <i>dhaH</i>	DANIEL, 1994
pMS2	Ap ^r , <i>dhaB</i> , <i>dhaC</i> , <i>dhaE</i> , <i>dhaF</i>	SEYFRIED et al., 1996
pFL1	Ap ^r , <i>dhaT</i> , <i>dhaI</i> , <i>dhaH</i> , <i>dhaG</i> , <i>dhaF</i>	LUERS et al., 1997
PLM3	Ap ^r , <i>dhaB</i> , <i>dhaC</i> , <i>dhaE</i>	MACIS et al. , 1998
pWE15	Ap ^r , P _{lac}	WAHL et al., 1987
pCS100	pKK223-3::1,835-kb- <i>EcoRI</i> - Fragment mit <i>dhaF</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS110	pKK223-3::377-bp <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>dhaG</i> aus <i>C freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit

pCS111	pKK223-3::2,212-kb- <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>dhaFG</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS112	pGEX-2T::379-bp- <i>BamHI</i> - <i>EcoRI</i> - Fragment mit <i>dhaG</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS113	pET19b::362-bp- <i>NdeI</i> - <i>BamHI</i> - Fragment mit <i>dhaG</i> aus <i>C. freundii</i>	diese Arbeit
pCS120	pSK+::2,731-kb- <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> - Fragment mit <i>dhaBCE</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS130	pKK223-3::561 bp- <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>dhaH</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS200	pSK+::2,688-kb- <i>BamHI</i> -Fragment mit <i>dhaBCE</i> aus <i>Cl. pasteurianum</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS211	pKK223-3::2,243-kb- <i>SmaI</i> - Fragment mit <i>dhaFG</i> aus <i>Cl. pasteurianum</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS300	pGBT9:: 1,833-kb- <i>EcoRI</i> - Fragment mit <i>dhaG</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
pCS301	pMPM-K4:: 377-bp <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit

pCS302	pGAD GL:: 377-bp <i>EcoRI-XhoI</i> - Fragment mit <i>dhaG</i> aus <i>C. freundii</i> (3'His ₆ -Tag)	diese Arbeit
--------	--	--------------

Tabelle 4: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
dhaBCf1	5'-CCGAATTCCTAAGGAGGCCATAACTATGAGAAGATCA AAACGATTCGAAGTGCTTGCCC-3'
dhaBCf2	5'- TCCTTGTCTTGTCTTGTCTTGTCTTGTCTTGTCTTCGA TCCGAGCCGGGCTGAACCACGC-3'
dhaECf1	5'-GGACAAGGACAAGGACAAGGACAAGGACAAGGAAT GAACGACAACATCATGACCGCGCAG-3'
dhaECf2	5'-GCGCGGAAGCTTATTAATGGTGATGGTGATGGTGCTG GCTGCCTTTACGCA-3'
dhaBCp1	5'-CCGGGATCCAAGGAGGATTATATATGAAGTCAAA-3'
dhaECp2	5'-GCGCGGGGATCCATTAATGGTGATGGTGATGGTGTT CCTCTATTCTAACTTTATTCCTC-3'
dhaFCf1	5'-CGCGAATTCTCATGCCCGTTAATTGCAGGGATTGATA TC-3'
dhaFCf2	5'-CGCGAATTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGATTGCG TATCCCGGCCAAAACCAGCCC-3'
dhaFCf1- pGBT9	5'-CGCGAATTCATGCCGTTAATTGCAGGATTGATATC-3'
dhaGCf1	5'-GCGGAATTCTCATGTCACTTTCATCACCGGGCGTACA TCTGTTTTATCACTCACGCTGGC-3'

dhaGCf2	5'-GCGCGGAAGCTTATTAATGGTGATGGTGATGGTGTT TTATCTCGCTGAAGGGAAGAACTT-3'
dhaGCf-pET1	5'-CGACAAGCATATGTCACCTTCATC-3'
dhaGCf2- pET2	5'-GCCGGATCCTTATTTTATCTC-3'
dhaGCf-GST1	5'-GGCATTCTGAGGATCCATGTCACCTTCATCACCGGG CGTACATCTGTTTTATCACTCACG-3'
dhaGCf-GST2	5'-GCGCGGGAATTCATTAATGGTGATGGTGATGGTGTT TTATCTCGCTGAAGGGAAGAACTT-3'
dhaFCp1	5'-GAATTC CCCGGGCTAAGGAGGGG GAAATTATGAAAT TCGTTGCTGG-3'
dhaGCp2	5'-GCGCGG CCCGGG ATTAATGTGATGGTGATGGTGTA CATGAAATCCATGTTTTTAAAGGG-3'
dhaHCf1	5'-GCGGAATTCTCATGTACCGCATCTATAACCCG-3'
dhaHCf2	5'-CGCAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGCGCA AACTCTGGAGTAG-3'
pkk223-3a	5'-GCGCCGACATCATAACGGTT-3'
pKK223-3b	5'-GCCGCCAGGCAAATTCTGTT-3'
pGEX-2T forw.	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
pGEX-2T rev.	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
pGAD GL	5'-TACCACTACAATGGATG-3'
pGBT9-5	5'-GGACATCATCATCGGAAGAGAG-3'

Die Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktionsenzym ist in der Oligonukleotidsequenz fett gedruckt. Die kodierende Sequenz für einen His₆-Tag ist unterstrichen. Enthält die Oligonukleotidsequenz eine Shine-Dalgarno-Sequenz, so ist diese grau hinterlegt.

2.2 Zellanzucht

2.2.1 Nährmedien

Alle aufgeführten Medien wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert. Die Herstellung anaerober Medien erfolgte nach der als „HUNGATE-Technik“ bezeichneten Methode unter Begasung mit sauerstofffreiem Stickstoff (HUNGATE, 1969; BREZNAK und COSTILOW, 1994). Kohlenstoffquellen wie Glucose und Glycerin wurden separat autoklaviert und den Medien unmittelbar vor dem Animpfen zugegeben.

2.2.1.1 LB-Medium (SAMBROOK et al., 1989)

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

2.2.1.2 DYT-Medium (SAMBROOK et al., 1989)

Trypton	16	g
Hefeextrakt	10	g
NaCl	5	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

2.2.1.3 SOB-Medium (HANAHAN, 1993)

Trypton	20	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	0,58	g
KCl	0,18	g
MgCl ₂ x H ₂ O	2,03	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,41	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

Aus den Mg²⁺-Salzen wurde eine 1 M Stammlösung hergestellt, sterilfiltriert und vor Gebrauch zugesetzt.

2.2.1.4 Citrobacter-Mineralmedium mit Hefeextraktzusatz (AVERHOFF, 1988; modif.)

K ₂ HPO ₄	14	g
KH ₂ PO ₄	6	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	g
Hefeextrakt	0,2	g
CoCl ₂ (50mM)	85	µl
SL-4 (s. 2.2.1.5)	1	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

zusätzlich bei anaeroben Medien:

Resazurin	1	mg/l
Cystein-HCl	0,2	g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Dem Medium wurde Glycerin, Glucose oder 1,2-Propandiol in einer Konzentration von 100 mM zugesetzt.

2.2.1.5 Spurenelementlösung SL-4 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)

EDTA-Na ₂	5	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2	g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,03	g
H ₃ BO ₄	0,3	g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,2	g
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,01	g
NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,02	g
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,03	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt und die Lösung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.2.1.6 Minimalmedium nach KELL et al. (1981; modif.)

K_2HPO_4	1,74	g
NH_4Cl	0,66	g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,20	g
KCl	0,60	g
$FeSO_4 \times 7H_2O$	46	mg
Na_2 -EDTA	62	mg
p-Aminobenzoesäure	4	mg
Biotin	0,24	mg
Hefeextrakt	2	g
Resazurin	1	mg
Cystein-HCl	0,50	g
$NaHCO_3$	6	g
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Dem Medium wurde Glycerin oder Glucose in einer Konzentration von 100 mM zugesetzt.

2.2.1.7 Synthetisches Medium für *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (RENZ, pers. Mitteilung)

K ₂ HPO ₄	2	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,2	g
Na-Lactat	10	g
Na-Dithionit	0,1	g
K-Pantothenat	0,04	g
Hefeextrakt	4	g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,2	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	40	mg
CoSO ₄ x 7H ₂ O	12	mg
Glucose	10	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

Glucose, MgCl₂ x 6H₂O, FeSO₄ x 7H₂O und CoSO₄ x 7H₂O wurden getrennt autoklaviert.

Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,8 erfolgte durch Zugabe eines Gemischs aus konzentriertem Ammoniumhydroxid und H₂O_{dest.} (1:1).

2.2.1.8 Yeast-Pepton-Dextrose (YPD)-Medium

Pepton	20	g
Hefeextrakt	10	g
Glucose	20	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

2.2.1.9 Synthetisches Dropout (SD) Medium

Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	6,7	g
Saccharose (40 % [w/v])	50	ml
10 x „Dropout Solution“ (s. 2.2.1.10)	100	ml
3-Aminotriazol (M)	20	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

2.2.1.10 10 x „Dropout Solution“ (Aminosäurestammlösung)

Welche der Aminosäuren weggelassen wurde, hing vom jeweilig gewünschten Selektionsmedium ab. Die Lösungen konnten, sofern kein Tryptophan enthalten war, autoklaviert und bei 4°C gelagert werden.

L-Isoleucin	300	mg
L-Valin	1500	mg
L-Adenin-Hemisulfat	200	mg
L-Arginin	200	mg
L-Histidin HCl-Monohydrat	200	mg
L-Leucin	1000	mg
L-Lysin HCl	300	mg
L-Methionin	200	mg
L-Phenylalanin	500	mg
L-Threonin	2000	mg
L-Tryptophan	200	mg
L-Tyrosin	300	mg
L-Uracil	200	mg
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

2.2.1.11 Feste Medien

Zur Herstellung fester Medien wurde dem Medium 1,5 % oder im Fall der Hefemedien 2 % Agar zugesetzt.

2.2.1.12 Medienzusätze

Die Stammlösungen aller Medienzusätze wurden bei - 20°C gelagert.

Verwendete Medienzusätze	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml Medium
Chloramphenicol	34 mg/ml H ₂ O _{dest.}	34 µg/ml Medium
IPTG	40 mg/ml H ₂ O _{dest.}	40 µg/ml Medium
X-Gal	40 mg/ml N,N'-Dimethylformamid	40 µg/ml Medium

2.3 Zellanzucht

2.3.1 Aerobe Anzucht

Die aerobe Anzucht von *E. coli* erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Das Kulturvolumen betrug ca. 20 % des Füllvolumens der Reagenzgläser bzw. Erlenmeyerkolben. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 30°C oder 37°C inkubiert.

2.3.2 Anaerobe Anzucht

Anaerobe Kulturen wurden mit einem 1 bis 10 %igen (v/v) Inokulum aus einer Stammkultur (s. 2.3.3) oder Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C oder 37°C. Für Kulturen mit einem Volumen bis zu 10 ml wurden Hungate-Röhrchen (Anaerobe Test Tubes,

Hungate Type, 16 × 125 mm, Fa. Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA) und für Anzuchten bis 50 ml 125-ml-Serumflaschen („Hypovials“, Fa. Pierce, Rockford, England) verwendet. Bei einem Kulturvolumen von bis zu 500 ml fanden 1-l-Serumflaschen (Fa. Müller und Krempel AG, Bülach, Schweiz) Verwendung. Für das Überimpfen wurden sterile Einwegspritzen benutzt.

2.3.3 Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Stämmen zur heterologen Genexpression

2.3.3.1 Expression auf Basis des Vektors pKK223-3

Der Expressionsvektor pKK223-3 (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) wird für heterologe high-level Expression von Proteinen genutzt. Er besitzt einen starken *tac*-Promoter, der in einem geeigneten Wirtstamm durch den *lac*-Repressor reguliert und durch die Zugabe von IPTG zum Medium induziert wird. Unmittelbar stromabwärts des *tac*-Promotors ist die multiple pUC8 Klonierungsstelle und der starke ribosomale Terminator *rmB* lokalisiert. Gene, die eine Ribosomenbindestelle und ein ATG-Startcodon besitzen, können für die anschließende Expression in die *Pst*I- und *Hind*III-Schnittstellen kloniert werden. Die Ribosomenbindestelle des Plasmids kann bei einer Klonierung der Gene in die *Eco*RI- und *Sma*I-Schnittstellen genutzt werden, wenn das Startcodon des Gens nicht mehr als 10 bis 15 bp davon entfernt lokalisiert ist.

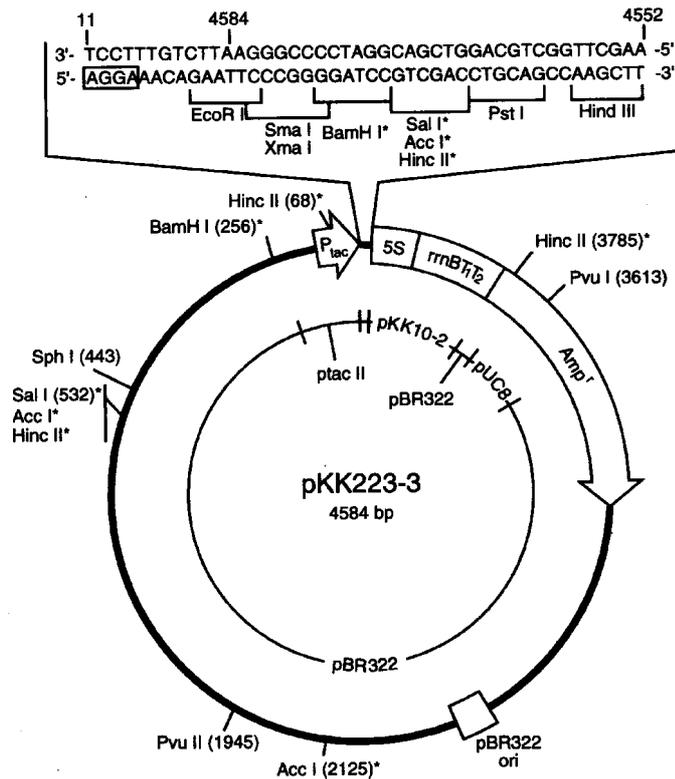


Abbildung 3: Physikalische Karte des Vektors pKK223-3

Für Expressionsversuche mit dem Expressionsvektor pKK223-3 wurden rekombinante *E. coli*-Stämme aerob in DYT-Medium (s. 2.2.1.2) mit entsprechendem Antibiotikum bei 30°C angezogen.

5 ml-Übernachtskulturen wurden jeweils aus der Stammkultur angeimpft. Die Anzucht der Hauptkulturen (Inokulum 1 %, Kulturvolumen 100 ml bzw. 1 l) wurde bei 30°C durchgeführt, bis eine OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,5 erreicht war. Es erfolgte eine Induktion der Expression der Gene mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Anschließend wurde eine weitere Inkubation über einen Zeitraum von 3 h durchgeführt. Der Wachstumsverlauf der Kulturen wurde anhand der OD₆₀₀ kontinuierlich verfolgt; parallel wurden Proben (1 ml) zur späteren Analyse durch SDS-PAGE (s. 2.19.1) entnommen.

Expressionen im 10 l-Maßstab wurden in einer 20 l-Steilbrustflasche durchgeführt. Als Medium wurde DYT-Medium (s. 2.2.1.2) mit 0,87 % Glycerin (v/v) verwendet. Die Kulturen wurden mit 250 Upm bei 30°C gerührt und kontinuierlich mit Druckluft durchgast.

Um Schaumbildung zu vermeiden, wurde 1 ml Polypropylenglykol zugesetzt. Als Vorkultur diente eine 1 l-Übernachtskultur. Nach der Induktion erfolgte eine weitere Inkubation über einen Zeitraum von 3 h, der eine Inkubation über Nacht bei 4°C folgte.

2.3.3.2 Expression auf Basis des Vektors pET-19b

Für Expressionsversuche mit dem Expressionsvektor pET-19b (Fa. Novagin Inc., Madison, USA) wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) herangezogen. Dieser Stamm enthält den defekten, lysogenen Bakteriophagen DE3 des λ -Phagen. In das *int*-Gen des λ -Phagen wurde das Gen der T7-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors inseriert. Aufgrund des inaktivierten *int*-Gens benötigt DE3 zur Exzision oder Integration einen Helferphagen (STUDIER et al., 1990). Die Expression der T7-Polymerase läßt sich durch Zugabe von IPTG induzieren.

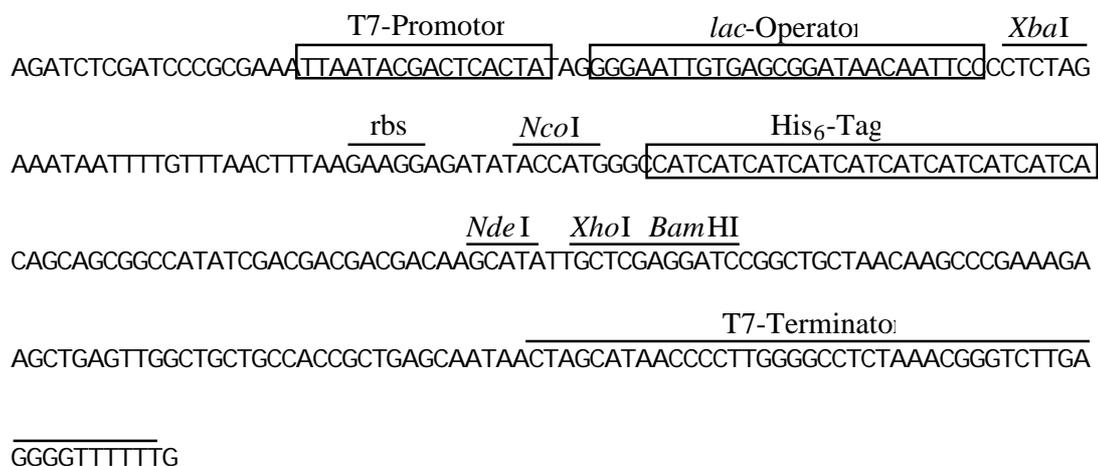


Abbildung 4: T7-Transkriptionsregion von pET19b

Der T7-Promotor, *lac*-Operator, His₆-Tag und T7-Terminator sind durch Kästchen markiert. Die Erkennungssequenzen der aufgeführten Restriktionsenzyme sind durch Balken gekennzeichnet.

Der Expressionsvektor pET19b minimiert aufgrund seiner Konstruktion den Basal-Transkriptionslevel der T7-Polymerase. Der Vektor verfügt über den T7-Promotor, über eine *lac*-Operator Sequenz stromabwärts des Promotors und über das Gen des *lac*-

Repressors (*lacI*) mit seinem natürlichen Promoter. Wenn dieser Vektor in einem DE3-lysogenen Stamm etabliert wird, wirkt der gebildete *lac*-Repressor zum einen an dem *lacUV5*-Promotor im Wirtschromosom und reprimiert dort die Transkription der T7-Polymerase und zum anderen am T7-Promotor des Vektors. Letzteres verhindert die Transkription der inserierten Gene. Erst durch Induktion mit 1mM IPTG werden dann die inserierten Gene transkribiert. Das Plasmid verfügt weiterhin über eine für den His₆-Tag kodierende Sequenz, so daß an die exprimierten Proteine N-terminal 6 Histidin-Reste angehängt werden. Aufgrund dieser Sequenz ist eine Reinigung der heterolog produzierten Proteine mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Agarose möglich (s. 2.16.1). Die Wahl der Medienzusammensetzung sowie die Kulturvolumina sind der Vorschrift unter 2.3.3.1 zu entnehmen.

2.3.3.3 Expression auf Basis des Glutathion S-Transferase Genfusionssystems

Das Glutathion S-Transferase Genfusionssystem (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) ist ein integriertes System zur Expression, Reinigung und Detektion von Fusionsproteinen in *E. coli*. Die dafür konstruierten pGEX-Plasmide ermöglichen eine induzierbare, „high-level“ Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusion mit der Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum*. Alle verfügbaren pGEX-Vektoren besitzen einen *tac*-Promotor für eine induzierbare Expression und das *lacI*^r Gen, so daß kein spezielles Wirtsbakterium genutzt werden muß. Für eine spätere Abspaltung des produzierten Proteins von der Glutathion S-Transferase enthält der hier genutzte Vektor pGEX-2T eine Thrombin-Erkennungssequenz.

Die Wahl der Medienzusammensetzung sowie die Kulturvolumina sind der Vorschrift unter 2.3.3.1 zu entnehmen. Die Induktion erfolgte ebenfalls durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Medium.

2.3.3.4 Expression mit *E. coli* K38/pGP1-2

Bei diesem System erfolgt die Induktion nicht durch IPTG-Zugabe, sondern durch Hitzeschock, da das Gen für die T7-RNA-Polymerase in diesem Fall auf dem Plasmid pGP1-2 unter Kontrolle eines thermophilen Repressors lokalisiert ist. Für die Expression wurde das jeweilige rekombinante Plasmid in den *E. coli*-Stamm K38 transferiert, der bereits das Plasmid pGP1-2 enthielt. Die Wahl der Medienzusammensetzung sowie die Kulturvolumina sind der Vorschrift unter 2.3.3.1 zu entnehmen, jedoch wurde keine Expression in 20 l-Steilbrustflaschen durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte bei 30°C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,2 erfolgte die Induktion der Zellen durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C für 30 min. Im Anschluß daran wurde bei 30°C inkubiert und die Zellen 3 h nach Induktion geerntet.

2.3.4 Stammhaltung

Über kürzere Zeiträume erfolgte die Anzucht der Zellen in Mineral- bzw. Komplexmedium mit den entsprechenden Antibiotika in einem Volumen von 3 ml. Mindestens alle 4 Wochen wurden die Stammkulturen 10 %ig (v/v) überimpft und nach dem Wachstum bei 4°C gelagert.

Zur Stammhaltung wurden die Zellen in Komplexmedium mit den entsprechenden Antibiotika bis zur exponentiellen Phase herangezogen, mit sterilem Glycerin 10 %ig (v/v) versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Stammkulturen erfolgte bei -70°C.

Die Stammhaltung von *Cl. pasteurianum* und *C. freundii* erfolgte in 5 ml Mineralmedium bei 4 °C.

2.3.5 Bestimmung der Wachstumsparameter

2.3.5.1 Messung der optischen Dichte

Das Wachstum von Flüssigkulturen konnte anhand der Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) photometrisch verfolgt werden (UV-VIS Spektrophotometer V-550, Fa. Jasco, Jena). Die Messungen erfolgten gegen Medium als Leerwert. Falls die Extinktion den Wert 0,3 überschritt, wurde die Probe entsprechend mit Medium verdünnt.

Die OD von Hungate-Kulturen oder Kulturen in Reagenzgläsern konnte direkt im Röhrchen mit Hilfe eines Photometers der Fa. Milton Roy (Spectronic 21, Rochester, New York, USA) bei 600 nm in einem Extinktionsbereich zwischen 0 und 2,0 verfolgt werden. Als Referenz dienten Röhrchen mit unbeimpftem Medium.

2.3.5.2 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit einem WTW pH-Meter pH 526 (Fa. WTW GmbH, Weilheim) mit einer Glas-Calomel-Elektrode (Fa. Cahn-Ingold, Frankfurt) bestimmt. Vor den Messungen wurde das Gerät für den entsprechenden Meßbereich mit Eichlösungen (pH 4,0 und pH 7,0 der Fa. Riedel de Haen AG, Hannover) geeicht.

2.3.5.3 Reinheitskontrolle

Die verwendeten Stämme wurden zur Überprüfung der Reinheit einer makroskopischen Prüfung der Koloniemorphologie nach Vereinzlungsausstrich auf geeignetem Medium unterzogen.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit DNA

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren. Hitzelabile Biochemikalien wurden den sterilen Lösungen in pulverisierter Form zugefügt. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gespült, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

2.4.2 Puffer und Lösungen

Im folgenden sind die Zusammensetzungen einiger Puffer und Lösungen aufgeführt, die im nachfolgenden Text nicht näher erläutert werden. Die Herstellung niedrigerer Pufferkonzentrationen erfolgte durch Verdünnung des Puffers mit H₂O_{dest.}.

0,5 M EDTA (pH 8,0)

Na ₂ EDTA	46,5	g
H ₂ O _{dest.}	ad 250	ml

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit

10 M NaOH

1 M Tris-Puffer (pH 8,0)

Tris	121,1	g
HCl konz.	42	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

Zur Einstellung anderer pH-Werte wurde die Zugabe von HCl konz. entsprechend variiert.

50 x TAE-Puffer

Tris	242	g
Eisessig	57	ml

0,5 M EDTA (pH 8,0)	100	ml
---------------------	-----	----

H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
-----------------------------------	---------	----

10 x TBE-Puffer

Tris	108	g
Borsäure	55	g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40	ml

H ₂ O _{dest.}	ad 1000
-----------------------------------	---------

<u>10 x TE-Puffer</u>			<u>20 x SSC-Puffer</u>		
1 M Tris-Puffer (pH 8,0)	100	ml	NaCl	175	g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10	ml	Na ₃ Citrat	88	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml	H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

2.4.3 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.4.3.1 Fällung von DNA

Zur Entsalzung oder Konzentrierung von DNA-Lösungen erfolgte eine Fällung mit Ammoniumacetat. Dazu wurde die Konzentration monovalenter Kationen durch Zugabe von 1 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung erhöht. Nach Mischen des Ansatzes wurden zur Fällung 2,5 Volumina eiskalter Ethanol (96 % [v/v]) zugegeben, der Ansatz erneut gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde dann durch 20-minütige Zentrifugation bei 15000 Upm (Biofuge 15, Fa. Heraeus, Osterode) und RT sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen, die DNA anschließend unter Vakuum getrocknet (Univapo 150 H, Fa. Zubus, Osterode) und im letzten Schritt in TE-Puffer, pH 8,0 bzw. H₂O_{dest.} aufgenommen.

2.4.3.2 Mikrodialyse

DNA-Lösungen mit einem Volumen bis zu 40 µl wurden auf Membranfiltern (Porengröße 0,025 µm, Fa. Millipore, Eschborn) gegen 30 ml H₂O_{dest.} für 1 h dialysiert.

2.4.3.3 Lithiumchloridfällung

Niedermolekulare DNA und RNA (tRNA und 5sRNA) wurde aus RNA-Präparationen durch eine LiCl-Fällung entfernt. RNA-Lösungen wurden mit einem Vol. 8 M Lithiumchlorid-Lösung versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Daran schloß sich eine Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Fa. Eppendorf, Hamburg) bei 14000 Upm und 4°C für 30 min an. Die sedimentierte hochmolekulare RNA wurde mit Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen und in einem geeigneten Vol. $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst.

2.4.3.4 Gelfiltration von DNA-Lösungen

Die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile, wie z.B einzelner Nukleotide von DNA-Fragmenten, erfolgte durch eine Gelfiltration mit NAP-5-Säulen (Fa. Pharmacia LKB GmbH, Freiburg). Die Säulen wurden mit 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ äquilibriert. Danach wurde 0,5 ml DNA-Lösung aufgetragen und mit 1,0 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eluiert.

2.4.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bestimmt (UV-VIS Spektrophotometer V-550, Fa. Jasco, Jena). Dazu wurden für eine OD_{260} von 1 folgende Konzentrationen angenommen (SAMBROOK et al., 1989):

doppelsträngige DNA	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
einzelsträngige DNA	31 $\mu\text{g}/\text{ml}$
RNA	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Die Reinheit der Nukleinsäuren konnte ebenfalls photometrisch überprüft werden. Bei proteinfreien DNA- oder RNA-Lösungen sollte das Verhältnis von $A_{260}:A_{280}$ bei 1,8 bis 2,0 liegen (SAMBROOK et al., 1989).

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der Quiagen „RNeasy™ Total RNA“-Kit eingesetzt. Mit dieser Methode konnten bis zu 30 µg RNA aus den Zellen einer 5-ml-Kultur isoliert werden. Alle Schritte wurden wie vom Hersteller beschrieben bei RT durchgeführt. Die eingesetzten Zellen wurden entweder direkt vor der RNA-Isolierung geerntet oder bis zur Isolierung als Pellet bei -70°C gelagert. Da bei der RNA-Isolierung Kontaminationen möglich waren, wurde eine Lithiumchloridfällung (s. 2.4.3.3) angeschlossen.

Um größere Mengen an RNA zu isolieren, wurde der Qiagen® RNA/DNA Maxi Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Für die Isolierung von RNA aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* wurden 500 ml anaerobes Mineralmedium (s. 2.2.1.4 und 2.2.1.6) angeimpft. Die Zellen wurden dann in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte in 500 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ unter Schütteln für 10 h.

2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

2.5.2.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA (HOLMES und QUICKLEY, 1981; RIGGS und Mc LACHLAN, 1986)

Für die Isolierung von „high-copy“ Plasmiden wurde *E. coli* über Nacht in 1,5 ml LB-Medium angezogen.

Im ersten Isolierungsschritt wurden die *E. coli*-Zellen mit 8000 Upm für 3 min (Biofuge 15, Fa. Heraeus, Osterode) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 350 µl STET-Puffer suspendiert und mit 30 µl Lysozymlösung (10 mg in 1 ml Tris/HCl-Puffer, pH 8,0) versetzt.

Anschließend wurde der Ansatz 1 min gekocht. Das nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (15000 Upm, 10 min, Biofuge 15, Fa. Heraeus, Osterode) erhaltene Pellet aus Zelltrümmern und Proteinen wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA wurde mit 40 µl Na-Acetat (2,5 M, pH 5,2) und 420 µl Isopropanol gefällt und erneut zentrifugiert (15000 Upm, 10 min, Biofuge 15, Fa. Heraeus, Osterode). Das Pellet wurde anschließend mit 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 20 bis 50 µl H₂O_{dest.} aufgenommen.

STET-Puffer

NaCl	5,8	g
Tris	121	mg
EDTA	29,2	mg
Triton X-100	5	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100	ml
pH 8,0		

2.5.2.2 Minipräparation mittels „WizardTM Plus Minipreps DNA Purification System“

Eine schnelle Plasmidisolierung zum Erhalt sehr sauberer DNA erfolgte unter der Verwendung des „WizardTM Plus Minipreps DNA Purification Systems“ (Fa. Promega Deutschland GmbH, Mannheim). Die Elution der DNA von der Matrix erfolgte durch Zugabe von 50 µl H₂O_{dest.}, 1-minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (30 s, 12000 x g). Bei der Isolierung von Plasmiden > 7 kb erfolgte die Inkubation bei 65 °C.

2.5.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels „Qiaquick Gelextraction“-Kit

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde der „Qiaquick Gelextraction“-Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) herangezogen. Die Methode beruht auf der Bindung der DNA an eine

Silica-Membran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Der Kit kann zur Extraktion von DNA-Fragmenten von einer Größe von 0,1 bis 10 kb aus Agarosegelen in TAE-Puffer genutzt werden. Die Extraktion erfolgte nach den im Herstellerprotokoll beschriebenen Arbeitsschritten. Die DNA wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde der „Qiaquick PCR Purification“-Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) genutzt. Wie auch beim „Qiaquick Gelextraction“-Kit (s. 2.5.2.3) wird die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silica-Membran gebunden. Die Reinigung wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$. Die so gereinigten PCR-Produkte wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von DNA wurden Agarosegelelektrophoresen in Gelkammern eigener Bauart durchgeführt. Die verwendeten Gele wurden aus 10 ml 0,8 %iger (w/v) Agaroselösung in TAE-Puffer hergestellt. Der TAE-Puffer diente dabei gleichzeitig als Elektrodenpuffer. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 20 bis 50 % (v/v) Stop-Mix versetzt. Die Trennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 20 bis 80 V. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Stop-Mix

Saccharose	50	% (w/v)
Harnstoff	7	M
EDTA	1	mM
Bromphenolblau	0,1	% (w/v)

2.6.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese (SAMBROOK et al., 1989; modif.)

Sollten RNA-Proben zur späteren Hybridisierung auf Nylonmembranen übertragen werden, mußten diese zuvor unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel in Abhängigkeit ihrer Größe getrennt werden. Durch die Anwesenheit von Formaldehyd in den Proben, im Gel und in allen verwendeten Puffern kann das Auftreten von Sekundärstrukturen weitgehend verhindert und damit ein denaturierter Zustand der RNA aufrechterhalten werden. Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 1,5 g Agarose in 133 ml H₂O_{dest.} autoklaviert und in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 2,7 ml Formaldehyd (37 %; v/v) und 15 ml 10 x Laufpuffer zugegeben und das Gel in eine zuvor vorbereitete Gelkammer gegossen.

Die RNA-Proben, einschließlich des Längenstandards, wurden mit 5 x RNA-Auftragspuffer im Verhältnis 4 : 1 gemischt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Dem Längenstandard wurde zusätzlich 1 µl einer Ethidiumbromidlösung (1mg/ml H₂O_{dest.}) zugesetzt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Laufpuffer mit 0,22 M Formaldehyd bei konstant 80 V, bis die Bromphenolbande des Auftragspuffers das untere Drittel des Gels erreicht hatte (ca. 3 bis 4 h). Nach dem Photographieren (s. 0) des Längenstandards wurde das Gel zur partiellen Hydrolyse der RNA für 5 min in 50 mM Na-Hydroxidlösung inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Denaturierungslösung entfernt und das Gel zur Neutralisierung für 5 min in

0,1 M Tris-Puffer (pH 7,4) inkubiert. Das Gel wurde danach einem Kapillar-Blot (s 2.9.2) unterzogen.

10 x Laufpuffer

MOPS	41,8	g
Na-Acetat	4,1	g
Na ₂ EDTA	3,7	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Der Puffer war nach dem Autoklavieren gelb gefärbt, was seine Eigenschaften jedoch nicht beeinflusste.

5 x RNA-Auftragspuffer

gesättigte Bromphenolblau-Lösung	16	µl
0,5 M EDTA (pH 8,0)	80	µl
Formaldehyd (37 %; v/v)	0,7	ml
Glycerin (86 %; v/v)	2,3	ml
Formamid	3,1	ml
10 x Laufpuffer	4	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 10	ml

2.6.3 Ethidiumbromid-Färbung und Photographie von Agarose-Gelen

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 bis 30 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg Ethidiumbromid/ml H₂O_{dest.}) gefärbt, kurz gewässert und die Banden auf einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 254 nm, Intas, Fa. Sony, Japan) sichtbar gemacht und eventuell ausgeschnitten. Zur Auswertung und Dokumentation wurden die Gele unter UV-Beleuchtung entweder mit einer Polaroid-Kamera unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert (Polaroid MP-4 Land Camera, Fa. Polaroid, Cambridge, USA) oder über einen Thermodrucker, der an eine Videokamera angeschlossen war (Fa. Intas, Göttingen), abgebildet. Als Filmmaterial wurden Polaroidfilme vom Typ 667 (Fa. Kodak, Stuttgart) bzw. Thermopapier (K75HM, Fa. Mitsubishi, Japan) verwendet.

2.6.4 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Als Größenstandard für lineare DNA-Fragmente wurde der „Ladder-Mix“ (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Größen der Fragmente betragen in kb:

10,0	3,0	0,9
8,0	2,5	0,8
6,0	2,0	0,7
5,0	1,5	0,6
4,0	1,2	0,5
3,5	1,03	0,4

und 3 weitere kleinere Fragmente, die meist im Gel nicht mehr sichtbar waren.

Für die Größenbestimmung von RNA in denaturierenden Formaldehydgelen wurde eine RNA-Ladder (Fa. New England Biolabs GmbH, Freiburg) aus *in vitro* synthetisierten Fragmenten mit folgenden Größen (in kb) eingesetzt: 9, 7, 5, 3, 2, 1 und 0,5.

2.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.7.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen lieferte lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden. Die Spaltung erfolgte in den von den Herstellern der Restriktionsenzyme mitgelieferten Puffersystemen bei den entsprechenden Temperaturen. In den Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 1 bis 10 µg DNA und 3 bis 5 U Enzym/µg DNA für 3 bis 18 h inkubiert. Waren Restriktionen mit mehr als einem Enzym nicht in dem gleichen Puffersystem möglich, wurde zunächst ein Einfachverdau in dem Puffersystem mit der niedrigsten Ionenstärke durchgeführt. Für die weiteren Enzyme wurde die Ionenstärke dann entsprechend erhöht. War eine Inaktivierung

der Restriktionsenzyme nötig, schloß sich eine Hitzeinaktivierung nach Angaben des Herstellers an.

2.7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Vor der Ligation von Vektor-DNA mit zu klonierenden DNA-Fragmenten (2.7.3) wurde die Vektor-DNA an den 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Durch diese Behandlung der Vektor-DNA sollte die Ligation linearer Vektorfragmente mit sich selbst unterbunden werden (SAMBROOK et al., 1989). Die Dephosphorylierung erfolgte im Restriktionsansatz, nachdem der Restriktionsverdau abgestoppt worden war. Für die Dephosphorylierung wurde 1 U alkalische Phosphatase zum Ansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierung wurde anschließend durch Inkubation bei 65°C für 15 min abgestoppt und die DNA für die Ligation (s. 2.7.3) einer Mikrodialyse (s. 2.4.3.2) oder einer Reinigung (s. 2.5.2.3) unterzogen.

2.7.3 Ligation

Die Ligation von dephosphorylierter Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller gelieferten Puffersystem in 20 µl Ansätzen durchgeführt. Die folgenden Bestandteile wurden vereinigt und bei 16°C über Nacht inkubiert:

Vektor-DNA	0,2 bis 2	µg
DNA-Fragmente	0,2 bis 3	µg
10 x T4-Ligase-Puffer	2	µl
T4-DNA-Ligase	2	µl
H ₂ O _{dest.}	ad 20	µl

Alternativ erfolgte die Inkubation auch bei RT für 3 bis 4 h.

Bei „Blunt end“-Ligationen wurden die folgenden Komponenten zusammenpipettiert und für 1 h bei RT inkubiert:

Vektor-DNA	0,2 bis 2	µg
DNA-Fragmente	0,2 bis 3	µg
PEG 50 %(w/v)	2	µl
10 x T4-Ligase-Puffer	2	µl
T4-DNA-Ligase	4	µl
H ₂ O _{dest.}	ad 20	µl

2.7.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die als Sonden für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe des „Random Primed Labeling Kits“ (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) unter Verwendung von [-³²P]-dATP radioaktiv markiert. Zur Denaturierung wurden 25 bis 50 ng DNA in 25 µl H₂O_{dest.} in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel für 10 min bei 95 °C inkubiert und danach schnell auf Eis abgekühlt. Die folgenden Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden dann auf Eis zusammenpipettiert:

denaturierte DNA-Lösung	25	µl
dCTP, dGTP, dTTP	je 2	µl
Reaktionspuffer	15	µl
[- ³² P]-dATP (3000 Ci/mol, 10 µCi/ml)	3	µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Klenow-Fragment (2 U/µl) gestartet und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde die DNA-Lösung über NAP-5-Säulen (s. 2.4.3.4) gelchromatographisch gereinigt.

2.8 Übertragung von DNA und Selektion rekombinanter Klone

2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen nach INOUE et al. (1990)

Die Zellen wurden in 250 ml SOB-Medium (s. 2.2.1.3) bei 18°C in einem Schüttelwasserbad bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 angezogen. Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur 10 min in einem Eisbad geschwenkt und in vorgekühlten GSA-Zentrifugenbechern für 10 min bei 6000 Upm (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer suspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Zentrifugieren (4000 Upm, 10 min, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) wurden die Zellen in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und 1,5 ml DMSO langsam unter leichtem Schwenken zugesetzt. Die Zellen wurden zügig in 200 µl Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der so erhaltenen Zellen war bei -70°C über mehrere Monate ohne Verlust der Kompetenz möglich.

TB-Puffer

PIPES	10	mM
MnCl ₂	55	mM
CaCl ₂	15	mM
KCl	250	mM

Alle Komponenten mit Ausnahme des Mangansalzes wurden zusammengegeben und der pH-Wert von 6,7 mit KOH eingestellt. Erst nach dem Autoklavieren wurde MnCl₂ steril zugegeben.

2.8.2 Herstellung von kompetenten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Die LiAc-Methode zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen wurde von SCHIESTL und GIETZ (1989) entwickelt und nach ITO et al. (1993), HILL et al. (1991) und GIETZ et al. (1992) modifiziert, um eine höhere Transformationshäufigkeit zu erzielen (10^4 bis 10^5 Transformanten pro μg DNA).

Einige rotgefärbte Kolonien des *S. cerevisiae*-Stammes HF7c von 2 bis 3 mm Durchmesser wurden in 1 ml YPD-Medium (s. 2.2.1.8) suspendiert. Mit diesem Inokulum wurde eine Vorkultur von 50 ml für 16 bis 18 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur (300 ml) wurde mit ca. 20 ml der Übernachtskultur angeimpft, so daß eine OD_{600} von 0,2 bis 0,3 erreicht wurde. Es schloß sich eine Inkubation bei 30°C für 3 h unter Schütteln an. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g und RT. Das Pellet wurde in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen, ein weiteres Mal 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und in 1,5 ml TE/LiAc aufgenommen.

TE/LiAc

10 x TE	1	ml
1 M LiAc	1	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 10	ml

2.8.3 Transformation von *E. coli* (INOUE et al., 1990)

Die gemäß 2.8.1 hergestellten und gelagerten 200 μl Zellaliquots wurden auf Eis aufgetaut. Die, wie unter 2.8.1 beschrieben, hergestellten kompetenten Zellen konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden. Nach Zugabe des Ligationsansatzes bzw. von 3 bis 5 μl Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen wurde der gesamte Ansatz 45 min auf Eis inkubiert, dann 45 s bei 42°C hitzegeschockt und nach 2-minütiger Inkubation auf Eis mit 500 μl LB-Medium versetzt. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C inkubiert und der gesamte

Transformationsansatz in 100 µl Aliquots auf Selektivplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

2.8.4 Transformation der kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen

Die wie unter 2.8.2 beschrieben, hergestellten kompetenten Zellen konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden. Der Transformationsansatz enthielt folgende Komponenten:

- 50 µl DNA des Vektors mit der GAL4-Bindedomäne
- 50 µl DNA des Vektors mit der GAL4-Aktivierungsdomäne
- 0,2 ml kompetente Zellen
- 1,2 ml PEG/LiAc-Lösung

Die Ansätze wurden gut geschüttelt und anschließend für 30 min bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden 0,1 Vol. DMSO hinzugegeben und die Reaktionsgefäße mehrmals geschwenkt. Während des 15-minütigen Hitzeschocks bei 42°C wurden die Reaktionsgefäße regelmäßig geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt und für 30 s bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in TE-Puffer suspendiert. Die Zellen wurden auf SD-Medium-Platten (s. 2.2.1.9) ausplattiert und für 4 bis 7 d bei 30°C inkubiert.

PEG/LiAc

PEG 4000 (50 % [w/v])	8	ml
1 M LiAc	1	ml
10 x TE	1	ml

2.8.5 Elektroporation (DOWER et al., 1988)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Permeabilisierung der Zellmembran durch Elektroschock. Dieser verursacht einen kurzfristigen reversiblen lokalen Zusammenbruch des Membranpotentials bzw. eine Deorganisation der Membranstruktur (CHASSY et al., 1988) und erleichtert damit die Aufnahme von Makromolekülen ,wie z. B. Plasmid-DNA, in die Zelle.

Die Anzucht zur Herstellung von kompetenten Zellen erfolgte in 250 ml LB-Medium (s. 2.2.1.1) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1. Die Kultur wurde 10 bis 20 min auf Eis inkubiert, die Zellen zentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C) und nacheinander zweimal mit 1 Vol. eiskaltem H₂O_{dest.} und dann mit 10 ml Glycerin (10%, v/v) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 0,5 ml Glycerin (10%, v/v) suspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Zur Elektroporation wurden pro Ansatz 40 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut, in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt und mit 1 bis 5 µl dialysierter DNA-Lösung (s. 2.16.4) versetzt. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser™ (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 25 µF, 200 und 2,5 kV, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und eine Zeitkonstante von 3,5 bis 4,5 ms erreicht wurde. Nach dem Stromimpuls wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

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

Bei Klonierungen ist es entscheidend insertfreie Klone von denen, die ein Plasmid mit Insert tragen, zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde ein zusätzliches Screeningsystem neben der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz benutzt. Plasmide der pBluescript-Reihe enthalten neben dem Promotor- und Operator-Bereich des *lac*-Operons auch das 5'-Ende

des *lacZ*-Gens (VIEIRA und MESSING, 1982). Dieses kodiert für das sogenannte β -Peptid, welches die inaktive β -Galaktosidase von Wirtsstämmen wie *E. coli* DH5 komplementieren kann. Da sich die multiple Klonierungsstelle der verwendeten Vektoren innerhalb des aminoterminalen Bereichs des *lacZ*-Gens befindet, ist eine β -Komplementation nur möglich, wenn das Plasmid kein Insert besitzt. Der Nachweis der aktiven β -Galaktosidase auf Agarplatten erfolgte durch Zugabe des Induktors IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid) und des Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoyl- β -D-galaktosid), welches durch das Enzym gespalten wurde. Dabei entstand in Anwesenheit von Sauerstoff der blaue Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo, welcher der Indikator für rekombinante *E. coli*-Stämme ist, die ein Plasmid ohne Insert tragen.

2.8.7 β -Galaktosidase-Filterassay

Das Zweihybrid-System dient der Quantifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. Mit Hilfe des β -Galaktosidase-Filterassays können Transformanten auf mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden. Dabei wird ein steriles, trockenes Whatman-Papier von der Größe einer Petrischale auf die Oberfläche einer Agarplatte gelegt, die mit Transformanten bewachsen ist. Zur Orientierung des Filters auf der Platte werden in asymmetrischer Anordnung Löcher in den Filter gestochen. Das nun mit Zellmaterial versehene Whatmanpapier wird für 10 s mit flüssigen Stickstoff schockgefroren. Durch das Auftauen werden die Zellen permeabilisiert. Anschließend wird das Papier luftblasenfrei auf ein weiteres zuvor mit Z-Puffer und X-Gal getränktes Whatmanpapier gelegt, wobei die Seite mit dem Zellmaterial nach oben liegt. Die Filter werden bei 30°C inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen auf eine Blaufärbung hin untersucht.

Z-Puffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	16,1	g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	5,5	g
KCl	750	mg
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	246	mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000	ml
pH 7,0		

Die Lösung konnte autoklaviert und anschließend bei RT für 1 Jahr aufbewahrt werden. Kurz vor Gebrauch wurden 0,27 ml β -Mercaptoethanol und 1,67 ml X-Gal (20 mg/ml DMSO) pro 100 ml Z-Puffer zugegeben.

2.9 Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

2.9.1 Herstellung von Filtern für die Koloniehybridisierung (BULUWELA et al., 1989)

Zur Analyse einer großen Anzahl rekombinanter Klone in Hybridisierungsexperimenten (s. 2.10) dienten runde Nylonmembranen mit 8,2 cm Durchmesser (HybondTM-N, Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg).

Je 100 Klone wurden auf eine LB-Platte (s. 2.2.1.1) mit entsprechendem Antibiotikum übertragen. Nach ca. 20 h Inkubation bei 37 °C wurde die Membran aufgelegt, leicht angedrückt und wieder abgezogen, um so das Zellmaterial auf die Membran zu übertragen. Die Inkubation der Platten erfolgte dann für weitere 20 h bei 37°C. Anschließend wurde die Nylonmembran mit den Impfstrichen nach oben für 2 min auf Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, das mit 2-fachem SSC-Puffer und 5 % SDS (w/v) getränkt war und anschließend für 2,5 min bei 600 W im Mikrowellenherd gebacken. Die auf diese Weise für die Hybridisierung vorbereitete Membran wurde vor der Prähybridisierung mit 5-fachem SSC-Puffer und 0,1 % SDS (w/v) 1 h gewaschen.

2.9.2 Northern-Blot (ALWINE et al., 1977; modif.)

Zur Bestimmung von Transkriptlängen wurde die zu analysierende RNA einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese unterzogen (s. 2.6.2). Anschließend wurde die RNA partiell hydrolysiert und das gesamte Gel neutralisiert (s. 2.6.2), um den Transfer zu erleichtern. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte mit Hilfe eines Kapillar-Blots, bei dem die RNA mit einem Transfer-Puffer mittels kapillarer Kräfte durch ein Gel gesaugt wird. Dabei wird die RNA auf eine darüberliegende Membran transferiert. Der Transfer auf die Membran erfolgte in einer Plexiglaskammer eigener Bauart, die mit 10 x SSC gefüllt wurde. Zwei Lagen Chromatographiepapier (Whatman 3MM, Fa. Whatman LTD., Maidstone, England) wurden in 10 x SSC getränkt und auf die Erhebung in die Kammer gelegt, so daß sie in das Pufferreservoir eintauchten. Dann wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf das Chromatographiepapier gelegt. Die Nylonmembran wurde nun unter Vermeidung von Luftblasen auf dem Gel positioniert. Danach folgten 5 Lagen angefeuchtetes Chromatographiepapier und ein ca. 10 cm hoher Stapel Saugpapier in der Größe des Gels. Der Aufbau wurde mit einer Plexiglasplatte beschwert.

Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte innerhalb von 16 h, wobei in gewissen Abständen Puffer nachgefüllt werden mußte. Im Anschluß diente kurzes Schwenken der Membran in 5 x SSC der Entfernung von Gelresten. Danach wurde die Membran für 2 h bei 80°C inkubiert, um das Formaldehyd zu entfernen und die RNA auf der Membran zu fixieren.

2.10 Hybridisierungsmethoden

Die Hybridisierungen erfolgten in Glasröhrchen in einem Hybridisierungssofen (Hybaid Mini Hybridization Oven; Fa. Biometra, Göttingen) bei den jeweils angegebenen Temperaturen. Die Membranen wurden mit der beladenen Seite nach innen in die Röhrchen gelegt und gegebenenfalls übereinandergestapelt.

2.10.1 DNA-RNA-Hybridisierungen

Hybridisierungen von Northern-Blots mit radioaktiv markierten Sonden (s. 2.7.4) erfolgten in Anwesenheit von 50% Formamid, da bei dieser Formamid-Konzentration keine RNase-Aktivität zu verzeichnen ist. Die Zugabe von Formamid ermöglichte es, die Temperatur für stringente Hybridisierungen auf 42°C herabzusetzen. Die Membran wurde zunächst in Formamid-haltiger Hybridisierungslösung für 2 bis 6 h prähybridisiert. Danach wurde die markierte (s. 2.7.4), denaturierte (5 min, 95°C) Sonde zugegeben und für 12 bis 16 h hybridisiert. Die Membran wurde dann mit autoklavierten Puffern wie folgt gewaschen:

- zweimal 5 min	2 x SSC	42°C
- zweimal 30 min	2 x SSC, 1 % (w/v) SDS	55°C
- zweimal 30 min	0,1 x SSC	25°C

Die noch feuchte Membran wurde in Frischhaltefolie verpackt und einer Autoradiographie unterzogen (s. 2.11).

Formamid-haltige Hybridisierungslösung

Dextransulfat (50 %; w/v)	2	ml
SDS-Lösung (10 %; w/v)	1	ml
Formamid	5	ml
Lachsspermien-DNA (10 mg/ml, denaturiert)	100	µl
H ₂ O _{dest.}	2	ml

Die Lösung wurde für 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 0,58 g NaCl und eine weitere Inkubation bei 50°C, bis sich das Salz gelöst hatte.

2.11 Autoradiographie

Die Autoradiographie erfolgte mit Hilfe von Autoradiographiekassetten (Storage Phosphor Screen GP, Fa. Kodak, Stuttgart) und eines Phosphoimagers (Storm 860, Fa. Molecular

Dynamics GmbH, Krefeld). Zur Quantifizierung wurde das Programm Image Quant für Macintosh Version 1.2 (Fa. Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) verwendet.

2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Herstellung spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen verwendet. Als Enzyme wurden die TakaraEx-Taq-Polymerase (Fa. Takara, Japan) und die thermostabile Tfl-DNA-Polymerase (Fa. Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf), die über einen weiten Temperaturbereich aktiv ist, eingesetzt. Durch Einsatz hoher Reaktionstemperaturen ist eine Minimierung von unspezifischen Oligonukleotidbindungen und von Synthese-Abbrüchen, die durch Sekundärstrukturen in der DNA-Matrize hervorgerufen werden, möglich. Durch die Einführung von Fehlpaarungen in die Starteroligonukleotide war es möglich, gezielt spezifische Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in das PCR-Produkt zu inserieren. Die Standard-Reaktion wurde in einem Volumen von 100 µl durchgeführt und enthielt folgende Bestandteile:

Template	0,5 bis 1,0	µg
Oligonukleotid 1	100	pmol
Oligonukleotid 2	100	pmol
dNTP-Gemisch	200	µmol
Reaktions-Puffer (10 x)	10	µl
MgCl ₂	6 bis 8	µl
Polymerase	1	U
H ₂ O _{dest.}	ad 100	µl

Die Komponenten wurden, bis auf das Enzym, auf Eis in einem 0,5-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Das Enzym wurde direkt vor dem Start der PCR zugegeben.

Die Temperaturzyklen wurden den jeweiligen Anforderungen in Bezug auf die Hybridisierungstemperatur (x) und die Dauer der Kettenverlängerung (y) angepaßt. Sie wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	95°C	2 min
<u>Beginn der Zyklen</u>		
Denaturierung	95°C	30 sek.
Hybridisierung	x°C	1 min
Kettenverlängerung	72°C	y min
<u>Ende der Zyklen</u>		
Kettenverlängerung	72°C	5 min

Für die Einstellung der Parameter waren die zu erwartende Fragmentlänge und die Schmelztemperatur T_m der verwendeten Oligonukleotide entscheidend. Für die Hybridisierung wurde entsprechend der zu erwartenden Fragmentlänge eine Zeit von ca. 1 min/ 1000 Bp gewählt. Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde nach der Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide festgelegt, die über folgende Formel errechnet wurde:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/L$$

L = Länge des Oligonukleotids

% GC-Gehalt = prozentualer GC-Gehalt des Oligonukleotids

Durch schrittweise Annäherung der Hybridisierungstemperatur an T_m , Verkürzung der Hybridisierungsdauer, Verringerung der Oligonukleotidkonzentration und Variation der $MgCl_2$ -Konzentration konnte die Spezifität bzw. Stringenz der PCR optimiert werden.

Die Temperaturzyklen wurden mit einem Primus-Cycler (Fa. MWG AG-Biotech, München) oder einer Gradienten-PCR (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.6.1) analysiert.

2.13 Sequenzierung und Analyse von Sequenzdaten

Die Isolierung der zu sequenzierenden Plasmide erfolgte unter Verwendung des „Wizard™ Plus Miniprep DNA Purification Systems“ (s 2.5.2.2). Die Sequenzierung wurde durch das „Göttingen Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) am ABI PRISM 337 DNA-Sequencer durchgeführt.

Die Fluoreszenzsignale wurden automatisch in Sequenzdaten umgewandelt. Dazu wurden die Programme DNA-Sequencer Datacollection 2.0 und Sequence Analysis 3.0 (Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Zusätzlich konnten die Sequenzdaten manuell aus den Kurvenverläufen mit dem Programm ABI Edit View 1.0.1 abgeleitet werden.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen DNA-Strider 1.2 (MARCK, 1988) und DNAid 1.8 auf einem Macintosh PowerPC (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, USA). Hiermit konnten offene Leserahmen gefunden, Restriktionskarten erstellt und die Kodon-Nutzung ermittelt werden. Ferner konnten mit diesen Programmen Proteinsequenzen abgeleitet und auf hydrophobe und hydrophile Eigenschaften untersucht werden. Weitergehende Analysen wurden mit dem GCG-Paket („Wisconsin Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package“), Version 8.0 (University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA; DEVEREUX et al., 1984) über einen UNIX-Computer (GWDG, Göttingen) und dem im Internet angebotenen Service der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Dazu zählte der Sequenzabgleich mit Daten der PIR-, NBRF-, SWISSPROT-, EMBL- und GenBank-Datenbanken (PEARSON und LIPMAN, 1988).

2.14 Herstellung von Rohextrakten

2.14.1 Zellaufschluß mit der Frenchpresse

Für die Herstellung von Rohextrakten mit der Frenchpresse wurde von einem Kulturvolumen mit mindestens 500 ml ausgegangen. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 Upm, 10 min, 4°C, GS3-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) geerntet und das Pellet in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in eine vorgekühlte French-Press-Apparatur (Fa. SLM Aminco, Urbana, USA) gefüllt. Der Aufschluß der Zellen fand bei einem Druck von 140 Mpa statt. Der Vorgang wurde viermal wiederholt, wobei vor dem ersten Mal eine Spatelspitze DNase I (Fa. Boehringer, Mannheim) zugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 Upm und 4°C für 30 min (SS34-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg). Der erhaltene Extrakt wurde als Rohextrakt bezeichnet und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Sollten anaerobe Rohextrakte hergestellt werden, wurden alle Zentrifugenröhrchen 24 h vor dem Aufschluß in eine Anaerobenkammer (Microflow Anaerobic System, Fa. Intermed M.D.H. GmbH, Rüsselsheim) geschleust. Vor dem Zellaufschluß wurde die Zellsuspension in der Anaerobenkammer in die vorgekühlte Frenchpresse gefüllt, die am Ausgang mit einem Isoversinic-Schlauch und einer Kanüle versehen war. Die Kanüle wurde in das Septum eines Hungate-Röhrchens eingeführt. Für eine Wiederholung des Preßvorgangs wurde die Suspension mit Hilfe des Stempels der Frenchpresse wieder aus dem Hungate-Röhrchen zurück in die Presse gezogen. Die Lagerung der nach der Zentrifugation erhaltenen Rohextrakte erfolgte bei -20°C in Hungate-Röhrchen, die zuvor für mindestens 30 min mit N₂ begast wurden.

2.14.2 Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung

Zum Zellaufschluss durch Ultraschall wurden die geernteten Zellen (6000 Upm, 10 min, 4°C, GS3-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) zunächst in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Das Gefäß mit der Zellsuspension wurde in die Halterung des Ultraschallgerätes (Ultraschallprozessor UP200S, Fa. Dr. Hielscher GmbH, Stahndorf) eingespannt. Um eine zu hohe Erwärmung der Zellsuspension zu vermeiden, wurde das Gefäß während der gesamten Prozedur durch ein Eisbad gekühlt. Es wurde viermal mit einer Amplitude von 80 Micron beschallt. Zwischen den Beschallungen wurde jeweils für eine halbe Minute pausiert. Nach der Ultraschallbehandlung wurde der Extrakt für 30 min bei 15000 Upm und bei 4°C in einem SS34-Rotor (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) zentrifugiert, um intakte Zellen abzutrennen. Die erhaltenen Extrakte konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.15 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Diese Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung von "Coomassie-Brilliant-Blue" an Proteine. 20 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 bis 20 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in 1 ml Plastikkuvetten in einem UV-VIS Spektralphotometer V-550 (Fa. Jasco, Jena) bei 585 nm gegen H₂O_{dest.} mit Bradford-Reagenz. Bei Proteinbestimmungen an ganzen Zellen wurden die Zellen vor Zugabe des Bradford-Reagenz mit 50 µl 1 N NaOH versetzt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin in einem Bereich von 0 bis 30 µg aufgenommen. Das Bradford-Reagenz hatte folgende Zusammensetzung:

Serva Blau G250	100 mg
Ethanol (96 %, vergällt)	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	100 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Serva Blau G250 wurde zunächst in Ethanol gelöst, bevor nacheinander die Phosphorsäure und das Wasser zugegeben wurden. Die resultierende rotbräunliche Lösung wurde durch einen Papierfilter filtriert und bei RT unter Lichtschutz gelagert.

2.16 Methoden zur Proteinanreicherung

2.16.1 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie beruht auf der Fähigkeit bestimmter Aminosäuren z. B. Histidin als Elektronendonator an Proteinoberflächen zu fungieren und so an Metallionen, wie Ni²⁺ und Cu²⁺, zu binden (HOCHULI et al., 1988; YIP et al., 1989). Die Metallionen wiederum sind über Chelatgruppen an ein Trägermaterial (Agarose oder Sepharose) gebunden.

Die Metall-Chelat-Chromatographie besitzt im neutralen pH-Bereich ihre größte Spezifität und Effizienz. Die Elution der Proteine findet unter Verwendung eines Imidazolgradienten statt. Imidazol führt zu einer kompetitiven Verdrängung des Histidins. Alternativ kann eine Elution durch einen pH-Gradienten erfolgen.

2.16.1.1 Vorbereitung der Säule

Für die Metall-Chelat-Chromatographie wurde Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure-Agarose (NTA-Agarose; Fa. Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Nach dem Einsetzen der unteren Fritte wurden 6 ml Ni²⁺-NTA-Agarose in eine PD 10-Säule (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg)

eingefüllt. Nach der Sedimentation des Trägermaterials wurde die Säule mit dem Zellaufschlußpuffer (s. 2.16.1.2) gespült und bei 4°C aufbewahrt.

2.16.1.2 Reinigung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen

Zur Reinigung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen wurde der Rohextrakt mit der Ni²⁺-NTA-Agarose, die mit Zellaufschlußpuffer äquilibriert worden war, unter Rühren bei 4°C für 1 h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung in den Säulenkörper einer PD-10 Säule gefüllt. Nach dem Absetzen der Agarose wurde diese zunächst mit einem geeigneten Volumen Zellaufschlußpuffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit Puffer I. Die Elution der Proteine erfolgte in mehreren Schritten mit Puffer II.

Vor einer erneuten Verwendung der Säule wurde das Chromatographiematerial mit Puffer II gespült und dann mit dem Zellaufschlußpuffer äquilibriert.

Zellaufschlußpuffer

KH ₂ PO ₄	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	10	mM
pH 8,0		

Puffer I

KH ₂ PO ₄	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	20	mM
pH 8,0		

Puffer II

KH ₂ PO ₄	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	250	mM
pH 8,0		

2.16.1.3 Regeneration der Säule

Die Notwendigkeit einer Regeneration der Ni²⁺-NTA-Agarose wurde durch eine Farbänderung von grün-blau nach bräunlich-grau angezeigt. Durch das chelatierende Agens EDTA erfolgte die Elution des Nickels von der Säule. Nach einer anschließenden Wiederbeladung mit Ni²⁺-Ionen stand das Säulenmaterial erneut für mehrere Reinigungszyklen zur Verfügung. Die Regeneration erfolgte anhand des Herstellerprotokolls.

2.16.2 Affinitätschromatographie an einer Vitamin B₁₂-Agarose

Die Affinitätschromatographie erfolgte an einer Vitamin B₁₂-Agarose der Fa. Sigma, Deisenhofen. Das Chromatographiematerial wurde zwei- bis dreimal in Äquilibrierungspuffer (100 mM Glycin/KCl, pH 8,6) gewaschen und in einen Säulenkörper einer PD 10-Säule gegossen (3 ml Bettvolumen). Nachdem das Material sedimentiert war, wurde die Säule nochmals mit ca. 10 Bettvolumen Äquilibrierungspuffer gespült. Um das Chromatographiematerial vor Lichteinwirkung zu schützen, wurde die Säule von außen mit Aluminiumfolie umwickelt.

Für die Chromatographie wurde das Eluat der Affinitätschromatographie an der Ni²⁺-NTA-Agarose (s. 2.16.1) einem Pufferwechsel mit Hilfe einer PD10-Säule (s. 2.16.3) unterzogen. Nach dem Auftragen des Proteins auf die Säule erfolgte zur Bindung an das Chromatographiematerial eine 10-minütige Inkubation bei RT. Danach wurde mit 12 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit NaCl-Lösungen (100 mM bis 1 M) oder alternativ mit Vitamin B₁₂-Lösungen (0,5 bis 10 mM). Die Eluate wurden in Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen. Nach Beendigung der Chromatographie wurde zur Regeneration des Säulenmaterials gebundenes Restprotein mit 2 M NaCl entfernt. Das regenerierte Säulenmaterial wurde zur Wiederverwendung bei 4°C in 500 mM NaCl gelagert.

2.16.3 Entsalzen von Proteinlösungen

Für die Entsalzung von Proteinlösungen wurden PD10-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Gelfiltration an Sephadex G-25. Das Säulenmaterial mußte vor Benutzung mit 10 Säulenvolumen des für die Elution verwendeten Puffers äquilibriert werden. Es konnte pro Lauf ein Volumen von maximal 2,5 ml Probe aufgetragen werden, anschließend wurde mit einem Volumen von 3,5 ml eluiert.

2.16.4 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse diente zum Entsalzen und zum Pufferwechsel von Proteinlösungen. Vor dem Gebrauch wurden die Dialyseschläuche (Visking, Fa. Serva, Heidelberg) in folgenden Lösungen für jeweils 10 min gekocht:

2 % Na_2CO_3 (w/v)

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

1 mM EDTA

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Die so präparierten Dialyseschläuche wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ autoklaviert und bei 4°C gelagert. Die Dialyse wurde unter ständigem Rühren für mehrere Stunden bei 4°C gegen das 1000 bis 2000-fache Volumen bei mehrfachem Pufferwechsel durchgeführt.

2.17 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden im Bereich der linearen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinmenge bestimmt. Eine Enzymeinheit U entspricht dabei dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute. Die Volumenaktivitäten [U/ml] wurden nach folgender Formel berechnet.

$$U/ml = \frac{\Delta \text{mim} \times V}{x \cdot d \times v}$$

E = Extinktionsdifferenz

U = Enzymeinheit (1 U = 1 μmol Substrat/min)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

= Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V = Gesamtvolumen des Tests

v = Probevolumen

2.17.1 Glycerin-Dehydratase (TORAYA et al., 1977)

Die Aktivität der Glycerin- bzw. Diol-Dehydratase wurde mit der 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon (MBTH)-Methode bestimmt. MBTH reagiert mit Aldehyden wie dem in der Enzymreaktion aus Glycerin entstandenen 3-Hydroxypropionaldehyd zu einem Hydrazin-Derivat, welches spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 305 nm erfaßt werden kann (PAZ et al., 1965).

<u>Testansatz:</u>	0,28 ml	38,5 mM KP-Puffer (38,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; 55 mM KCl; pH 8,0)
	0,01 ml	Glycerin (3 M)
	0,01 ml	Coenzym B ₁₂ (0,45 mM)
Start mit:	0,01 ml	Probe
		1 min bei 37 °C inkubieren
Stop mit:	0,3 ml	K ₃ -Citrat (0,1 M; pH 3,6)
	0,5 ml	MBTH (0,1 % [w/v])
		15 min bei 37 °C inkubieren

Messung der Extinktion bei 305 nm (Extinktionskoeffizient = $13,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}$).

Sämtliche Puffer- und Substratlösungen wurden anaerob hergestellt. Für den Test wurden 1,5 ml-Küvetten eingesetzt, die mit einem Septum versehen und für 15 min mit Stickstoff begast worden waren. Nach Zugabe einer frisch hergestellten anaeroben Coenzym B₁₂-

Lösung und 5 min Vorinkubation im Dunkeln bei 37 °C erfolgte der Reaktionsstart. Für jede Probe wurden Parallelansätze gegen einen Leerwert (Reaktionszeit = 0) gemessen.

Die Reaktivierungsexperimente wurden bei 37°C in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl, 21 µM Coenzym B₁₂, 12 mM ATP/MgCl₂ und 1,2 M 1,2-Propandiol in einem Volumen von 310 µl durchgeführt. Zur Bestimmung der Reaktivierung der Dehydratase wurde 1,2-Propandiol als Substrat eingesetzt, da das Enzym während der Katalyse von 1,2-Propandiol keiner Inaktivierung unterliegt. Von DhaF und dem Komplex DhaFG wurden jeweils 40 µg/Ansatz eingesetzt. Das partiell gereinigte Protein DhaG wurde in einer Konzentration von 100 µg/Ansatz zugegeben. Für die zeitabhängige Messung wurden die Komponenten für mehrere Ansätze in ein anaerobes Hungate-Röhrchen gegeben. Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 310 µl aus dem Hungate-Röhrchen mittels einer Hamiltonspritze entnommen. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 300 µl K₃-Citrat (0,1 M), wurde die Glycerin-Dehydratase-Aktivität mit dem oben beschriebenen Test ermittelt.

2.17.2 Adenosyltransferase-Test

Zur Bestimmung einer ATP-Corrinoid Adenosyltransferase Aktivität wurde eine modifizierte Methode des *in vitro* Assays von VITOLS et al. (1966) herangezogen. Der Test wurde unter strikt anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenbox durchgeführt. Alle Geräte wurden dazu bereits 24 h vor Testbeginn in die Anaerobenbox eingeschleust. Lösungen wurden für 30 min mit N₂ begast. Der Testansatz enthielt folgende Komponenten:

<u>Testansatz:</u>	200 nmol	Tris-Puffer (pH 8.0) + 5mM DTT
	50 nmol	Vitamin B ₁₂ , Hydroxy-B ₁₂ oder Cobalamin
	400 nmol	ATP
	800 nmol	MnCl ₂
	100 µg	CoCl ₂

Der Reaktionsansatz wurde in eine Küvette, die 4 mg KBH₄ enthielt, gegeben. Die Reduktion von Cob(III)alamin zu Cob(I)alamin erfolgte innerhalb von 10 min und konnte durch eine Veränderung der Farbe des Ansatzes von rot zu grün-schwarz verfolgt werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 525 nm mit einem UV-VIS-Spektralphotometer (UV-1202, Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen. Danach erfolgte eine Bestrahlung der Probe mit einer 150 Watt Wolfram-Lampe für 5 min. Unter diesen Bedingungen wird Coenzym B₁₂ durch eine homolytische Spaltung der Co-C-Bindung zu Cob(II)alamin umgesetzt. Die Konzentration des gebildeten Coenzym B₁₂ wurde dann mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$c = \frac{E_{525}}{x \cdot d}$$

$$E_{525} = E_{525} \text{ vor Bestrahlung} - E_{525} \text{ nach Bestrahlung}$$

$$= \text{Extinktionskoeffizient bei 525 nm zwischen Coenzym B}_{12} \text{ und}$$

$$\text{Cob(II)alamin (0,0048 mM)}$$

$$c = \text{Konzentration des gebildeten Coenzym B}_{12}$$

Eine Enzymeinheit 1U entspricht dabei der Enzymmenge, die zur Regeneration von 1 nmol Coenzym B₁₂ pro Minute benötigt wird.

2.17.3 ATP-Hydrolyse

Die ATP-Hydrolyse Aktivität wurde mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie an einer Poly(Ethylenimin)-Cellulose F TLC Platte (Fa. Merck, Darmstadt) mit 2 M Ameisensäure und 0,5 M LiCl als Laufmittel untersucht. Während der Chromatographie werden ATP,

ADP und AMP getrennt. Aufgrund der 3 Phosphatgruppen zeigt ATP gegenüber ADP und AMP ein geringeres Laufverhalten auf der negativ geladenen TLC-Platte. Zur Untersuchung wurde (^{32}P)-ATP eingesetzt. Der Reaktionsansatz (25 μl) enthielt folgende Komponenten:

<u>Testansatz:</u>	38,5 mM	KP-Puffer (pH 8,0) mit 55 mM KCl
	1 μCi	(^{32}P)-ATP
	5 mM	ATP/MgCl ₂
	0 bis 15 μg	DhaF bzw. DhaFG

Zusätzlich konnten die folgenden Komponenten dem Testansatz zugefügt werden:

21 μM	Coenzym B ₁₂
1,2 M	Glycerin bzw. 1,2-Propandiol
2 μg	Glycerin-Dehydratase

Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl Ethanol abgestoppt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (15000 x g, 30 min, 4°C) entfernt. Vom Überstand wurden dann 0,5 μl auf eine TLC Platte aufgetragen und chromatographiert. Die Detektion von radioaktivem ATP, ADP bzw. AMP erfolgte mittels Autoradiographie (s. 2.11).

2.18 Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen

Die Inaktivierung der Dehydratasen durch Glycerin erfolgte durch Inkubation des Enzyms mit 50 μM Coenzym B₁₂ bei 37°C für 30 min in 2,5 ml KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl und 30 % Glycerin unter anaeroben Bedingungen. Bei der Inaktivierung durch O₂ bzw. Cyano-B₁₂ wurde das Enzym in Gegenwart von 49 μg Coenzym B₁₂ bzw. 11 μg Cyano-B₁₂ in 2,5 ml KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl für 30 min bei 37°C inkubiert. Ungebundene B₁₂-Derivate wurden mittels einer Gelfiltration abgetrennt (s. 2.16.3).

2.19 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.19.1 SDS-PAGE nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987)

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen wurden in Minigel-Elektrophorese-Kammern (Fa. Bio-Rad, München) mit 8,5 x 8,0 x 0,1 cm Glasplatten durchgeführt. Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Menge für 2 Gele):

		12,5 %ig	15 %ig
<u>Trenngel:</u>	Gelpuffer	3 ml	3 ml
	Acrylamidlösung	2,25 ml	2,7 ml
	H ₂ O _{dest.}	3,75 ml	3,3 ml
	APS-Lösung	45 µl	45 µl
	TEMED	4,5 µl	4,5 µl
<u>Sammelgel:</u>	Gelpuffer	1,13 ml	1,13 ml
	Acrylamidlösung	375 µl	375 µl
	H ₂ O _{dest.}	3 ml	3 ml
	APS-Lösung	45 µl	45 µl
	TEMED	4,5 µl	4,5 µl

Zunächst wurden Acrylamidlösung, Gelpuffer und H₂O_{dest.} gemischt. Nach der Zugabe von TEMED und APS-Lösung wurde das Gel gegossen und mit H₂O_{dest.} überschichtet, um eine ebene Fläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min) konnte das H₂O_{dest.} abgenommen und das Sammelgel gegossen werden, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt wurde. Nach 30 min war das Gel vollständig polymerisiert und konnte verwendet werden.

Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:3 mit Denaturierungspuffer gemischt. Anschließend wurden die Proben auf das mit Elektrophoresepuffer überschichtete

Gel mit Hilfe einer Hamiltonspritze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 V, bis die blaue Markerbande das Trenngel erreicht hatte, und wurde dann auf 130 V erhöht. Als Netzgerät diente ein Gene-Power-Supply GPS 200/400 der Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Markerbande das Gelende erreicht hatte.

Acrylamidlösung

Acrylamid	96	g
Bisacrylamid	3	g
H ₂ O _{dest.}	ad 200	ml

Gelpuffer

Tris	181,7	g
SDS	1,5	g
H ₂ O _{dest.}	ad 500	ml
pH 8,4		

Kathodenpuffer

Tris	12,1	g
Tricine	17,9	g
SDS	1	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
pH 8,5		

Anodenpuffer

Tris	24,2	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000	ml
pH 8,9		

Denaturierungspuffer

Tris	0,2	g
SDS	1,2	g
Serva-Blau G250	3	mg
Glycerin	3	ml
2-Mercaptoethanol	0,5	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 10	ml
pH 6,8		

APS-Lösung

Ammoniumpersulfat	0,1	g
H ₂ O _{dest.}	ad 1	ml

2.19.2 „Milde SDS-PAGE“ zur Lokalisierung Cobamid enthaltender Proteine

Die „milde SDS-PAGE“-Methode wurde entwickelt, um Proteinuntereinheiten voneinander zu trennen, ohne daß deren Cofaktoren (Cobamid oder Fe-S-Cluster) getrennt werden (LU et al., 1993). Die Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels (15 %ig) und des Laufpuffers waren wie unter 2.19.1 beschrieben. Die Proteinlösung wurde ohne Inkubation mit SDS und β -Mercaptoethanol nur mit Saccharose als Beschwerer direkt in die Taschen des Gels gefüllt. Die Proben wurden auch nicht denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei RT bei einer konstanten Spannung von 60 V über mehrere Stunden. Während des Laufs war eine durch das Cobamid hervorgerufene rote Bande sichtbar. Diese Bande wurde, bevor das Gel gefärbt wurde, markiert.

2.19.3 Native Gradienten PAGE

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen wurden in Mini-Elektrophoresekammern der Fa. Bio-Rad (München) durchgeführt (s. 2.19.1).

Für ein Gradientengel von 4 bis 20 % wurden Polyacrylamidlösungen folgender Zusammensetzung verwendet:

„Leichte“ Lösung

Acrylamid	4,0 g
Bisacrylamid	0,2 g
Gelpuffer	ad 100 ml

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

„Schwere“ Lösung

Acrylamid	20,0 g
Bisacrylamid	1,0 g
Glycerin (87 % [v/v])	8,6 ml
Gelpuffer	ad 100 ml

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Für das Trenngel von 4 bis 20 % (w/v) wurden jeweils 2 ml „Leichte“ und „Schwere“ Lösung in die Kammern eines kleinen Gradientenmischers gefüllt und unter Rühren je 3 µl TEMED und 15 µl APS-Lösung (s. 2.19.1) in die einzelnen Kammern gegeben. Nach dem Öffnen des Gradientenmischers konnte die Acrylamidlösung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Merodos GS, Fa. Merodos, Nörten-Hardenberg) zwischen die Glasplatten gegossen werden. Anschließend erfolgte die Übersichtung des Trenngels mit ca. 1 ml H₂O_{dest.}. Nach Polymerisierung des Gels für 30 min wurde das H₂O_{dest.} abgenommen. Dann wurde das Sammelgel gegossen, für das 2 ml „Leichte“ Lösung, 3 µl TEMED und 15 µl APS-Lösung verwendet wurden. Direkt im Anschluß wurde ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisierung für 30 min konnte das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden und die Pufferreservoirs mit Elektrodenpuffer gefüllt werden. Nachdem der Kamm entfernt worden war, wurde zunächst eine Vorelektrophorese (100 V, 30 min) durchgeführt. Danach konnten die mit 0,1 Volumen Beschwerungslösung versetzten Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C und 100 V für 20 bis 24 h.

Gelpuffer

Tris	250 mM
pH 8,5	

Elektrodenpuffer

Tris	0,1 M
Glycin	0,1 M
pH 8,7	

Beschwerungslösung

Saccharose	4	g
Bromphenolblau	5	mg
H ₂ O _{dest.}	ad 10	ml

Die Beschwerungslösung wurde bei -20°C gelagert.

2.20 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen**2.20.1 Coomassie-Färbung**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele kurz mit H₂O_{dest.} gespült und dann für 60 min in die Coomassie-Färbelösung gelegt. Nach Spülen mit H₂O_{dest.} wurde das Gel entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrfach gewechselt wurde. Bei guter Transparenz des Hintergrundes konnten die Gele ausgewertet werden.

<u>Coomassie-Färbelösung</u>		<u>Entfärbelösung</u>	
Coomassie-Blau G-250	0,08 % (w/v)	Methanol	33 % (v/v)
Coomassie-Blau R-250	0,08 % (w/v)	Eisessig	10 % (v/v)
Methanol	45 % (v/v)		
Eisessig	10 % (v/v)		

2.20.2 Unspezifische Proteinfärbung mit Silber (BLUM et al., 1987, modif.)

Bei elektrophoretischer Trennung geringer Proteinmengen wurde die Detektion der Proteinbanden durch eine Silberfärbung vorgenommen. Das Gel wurde dazu nach der Elektrophorese in den nachfolgend aufgeführten Lösungen auf einem Schüttler inkubiert:

Fixierer

Methanol	50	ml
Eisessig	12	ml
Formaldehyd (37%; v/v)	100	µl
H ₂ O _{dest.}	ad 100	ml

Die Methanol-Eisessiglösung wurde auf Vorrat angesetzt; nur Formaldehyd wurde unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.

Thiosulfatlösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	2	mg
H ₂ O _{dest.}	ad 100	ml

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Imprägnierlösung

AgNO ₃	200	mg
Formaldehyd (37%; v/v)	75	µl
H ₂ O _{dest.}	ad 100	ml

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃ x 10H ₂ O	6	g
Thiosulfatlösung (s.o.)	2	ml
Formaldehyd (37%; v/v)	50	µl
H ₂ O _{dest.}	ad 100	ml

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Stopplösung

EDTA	1,86	g
H ₂ O _{dest.}	ad 100	ml

Die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 titriert und konnte mehrere Wochen gelagert werden.

Alle folgenden Schritte wurden bei RT unter leichtem Schwenken auf einer Gelwippe durchgeführt:

1. mindestens 1 h (höchstens 24 h) im Fixierer inkubieren
2. 3 x 5 bis 20 min in 50 % (v/v) Ethanol waschen
3. 1 min in der Thiosulfatlösung inkubieren
4. 3 x 20 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ waschen
5. 20 min imprägnieren
6. in Entwicklerlösung inkubieren, bis die Banden sichtbar sind (5 bis 20 min)
7. einmal kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ spülen
8. 10 bis 20 min in Stopplösung inkubieren

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ geschwenkt, anschließend in 1 M Essigsäure geschwenkt und für 2 h bei 80°C in einem Geltrockner (Modell 583, Fa. Bio-Rad, München) getrocknet.

2.21 Transfer von Proteinen auf Membranen

2.21.1 Western-Blot (TOWBIN et al., 1979, modif.)

Für den spezifischen Proteinnachweis mit der Ni-NTA-Konjugatfärbung (s. 2.22.1) wurden Proteine von PAGE oder SDS-PAGE auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF-Membranen, Fa. Millipore, Eschborn) transferiert. Der Western-Blot erfolgte mit einer „Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell“ (Fa. Bio-Rad, München).

Zur Vorbereitung des Blots wurden 2 Lagen Whatman-Papier (Whatman 3 MM, Fa. Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und kurz in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde jedoch zunächst mit Methanol voräquiliert. Gleichzeitig wurde das Proteingel in Transferpuffer inkubiert, um Salz- und Detergenrückstände der Elektrophorese zu entfernen.

Anschließend wurden auf der Anodenseite der Gelhalterungskassette folgende Komponenten übereinandergeschichtet.

1. mit Transferpuffer getränkte Faserplatte
2. eine Lage Whatman-Papier
3. äquilibriertes Gel
4. äquilibrierte Membran
5. eine Lage Whatman-Papier
6. mit Transferpuffer getränkte Faserplatte

Die einzelnen Komponenten wurden luftblasenfrei und zentriert in der Kassette geschichtet und die Oberflächen des Whatman-Papiers, des Gels und der PVDF-Membran jeweils mit Transferpuffer abgesättigt. Anschließend wurde die Gel-Kassette geschlossen und in die Pufferkammer, die zuvor mit Transferpuffer gefüllt worden war, eingebaut. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei einer Spannung von 100 V bei 4°C für 1 h.

Bei der vor dem Western-Blot durchgeführten SDS-PAGE wurde ein „Prestained Marker“ (LMW, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Anhand dieser bereits gefärbten Banden konnte der Proteintransfer beurteilt werden.

Transferpuffer

Tris	25	mM
Glycin	192	mM
Methanol	20	% (v/v)

Der pH-Wert lag bei 8,3 und brauchte nicht eingestellt werden. Zu Beginn des Transfers sollte der Puffer eine Temperatur von 4°C haben.

2.21.2 Protein-„Dot-Blot“-Verfahren (HAWKES, 1986; modif.)

Alternativ zu 2.21.1 konnten Proteine mittels des „Dot-Blot“-Verfahrens auf Membranen übertragen werden. Hierfür konnten entweder Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen verwendet werden. Bei dem Verfahren werden definierte Mengen bzw. Volumina einer

Proteinlösung direkt auf die Membran getropft oder mit einer „Dot-Blot“-Kammer aufgetragen. Die Membran wurde bei RT getrocknet und dann verwendet.

2.22 Färbung von Proteinen auf Blotmembranen

2.22.1 Ni²⁺-NTA-Konjugat-Färbung

Dieses Verfahren dient dem Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen. Es beruht auf der Affinität des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Ni²⁺-NTA-Konjugats (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) zu mehreren aufeinanderfolgenden Histidinresten (His₆-Tag) eines Proteins. Ein solcher His₆-Tag kann mit Hilfe geeigneter Vektoren carboxy- oder aminoterminal an rekombinante Proteine gehängt werden. Histidin fungiert dabei als Elektronendonator an der Proteinoberfläche und bindet so an Metallionen wie z.B. Nickel (HOCHULI, 1988; YIP et al., 1989). Solche Komplexe könne durch den Umsatz geeigneter Substrate von der alkalischen Phosphatase anhand einer Farbänderung sichtbar gemacht werden. Die Inkubationen und das Waschen der Membran wurden unter Schwenken bei RT nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 1.) Blot 2 x 10 min mit TBS-Puffer waschen
- 2.) Inkubation für 1 h in Blockierungspuffer bei RT
- 3.) 3x 10 min mit TBS-Puffer waschen
- 4.) Inkubation für mindestens 1 h in TBS-Tween Puffer mit 1% Milchpulver mit Ni²⁺-NTA-Konjugat (1/1000 verdünnt)
- 5.) 3 x 10 min in TBS-Tween Puffer waschen
- 6.) Färben mit der Färbelösung
- 7.) Membran 2 x in H₂O_{dest.} waschen
- 8.) Inkubation in 3 % Trichloressigsäure
- 9.) Membran mit H₂O_{dest.} waschen

TBS-Puffer

Tris	10	mM
NaCl	150	mM
pH 7,5		

TBS-Tween-Puffer

Tris	20	mM
NaCl	500	mM
Tween 20	0,05	% (v/v)
pH 7,5		

Blockierungspuffer

Milchpulver in TBS-Puffer	5	% (w/v)
---------------------------	---	---------

Puffer A

Tris	100	mM
NaCl	100	mM
MgCl ₂	5	mM
pH 9,5		

Die Färbelösung setzte sich aus 66 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (5 % NBT in 70% Dimethylformamid) und 33 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (5 % BCIP in 100 % Dimethylformamid) in 10 ml Puffer A zusammen. Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

2.23 Molekularmassenbestimmung

2.23.1 Molekularmassenbestimmung durch SDS-PAGE

SDS lagert sich an Proteine an und zerstört fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen, so daß die Dissoziation von Proteinen in ihre Untereinheiten erreicht wird. Durch die Bindung des negativ geladenen Detergens wird die Eigenladung der Proteine weitgehend vernachlässigbar und damit eine gelelektrophoretische Auftrennung ermöglicht, die nahezu ausschließlich auf der Masse der Moleküle beruht.

Nach der SDS-PAGE (s. 2.19.1) und Färbung der Proteine (s. 2.20) konnte die Molekularmasse eines Proteins ermittelt werden, indem dessen Wanderungsgeschwindigkeit mit der von Markerproteinen verglichen wurde. Die Auftragung des Logarithmus der Molekularmassen der Markerproteine gegen den R_f-Wert (Wanderungsstrecke des Proteins

bezogen auf die Wanderungstrecke des Farbstoffmarkers) ergibt eine Eichgerade, anhand derer die Molekularmasse des jeweiligen Proteins berechnet werden konnte. Als Markerproteine wurden die Proteine des „LMW Calibration“-Kits (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) eingesetzt.

Markerproteine „LMW Calibration“-Kit

Phosphorylase b	94	kDa
Rinderserumalbumin	67	kDa
Ovalbumin	45	kDa
Carboanhydrase	30	kDa
Trypsininhibitor	20,1	kDa
Laktalbumin	14,4	kDa

Wurde anschließend ein Western-Blot (s. 2.21.1) durchgeführt, wurden als Markerproteine ein „Prestained Standard Low Range“ der Fa. Bio-Rad (München) verwendet.

„Prestained Standard Low Range“

Phosphorylase b	104	kDa
Rinderserumalbumin	81	kDa
Ovalbumin	47,7	kDa
Carboanhydrase	34,6	kDa
Trypsininhibitor	28,3	kDa
Lysozym	19,2	kDa

2.23.2 Molekularmassenbestimmung durch Gradienten-PAGE (ANDERSON et al., 1972; NISHIZAWA et al., 1988)

Die Auftrennung von Proteinen im nativen Polyacrylamid-Gradientengel (s. 2.19.3) hängt in erster Linie von der Größe der Proteine ab, da mit steigender Acrylamidkonzentration die Porengröße abnimmt und das Weiterwandern von größeren Proteinen verhindert wird. Die

Eigenladung von Proteinen ist hierbei theoretisch vernachlässigbar (MARGOLIS und KENRICK, 1967).

Nach Auftrennung durch native Gradienten-PAGE (s. 2.19.3) und Anfärbung der Proteinbanden (s. 2.20) konnte die Molekularmasse von Proteinen ermittelt werden, indem die Wanderungsstrecke mit der von Markerproteinen verglichen wurde. Als Markerproteine wurde die Proteine des „HMW Calibration“-Kits (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) eingesetzt.

Markerproteine „HMW Calibration“-Kit

Protein	Molekularmasse	RF-Wert
Thyroglobin	669 kDa	0,453
Ferritin	440 kDa	0,570
Katalase	232 kDa	0,651
Laktat-Dehydrogenase	140 kDa	0,714
Rinderserumalbumin	67kDa	0,957

2.23.3 Gelfiltration an Superdex 200 HR

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der unterschiedlichen Verweildauer von Proteinen verschiedener Größe in einem porösen Gelmaterial. Hierbei ist die Ausschlußgröße der Poren wichtig. Bei dem Material Superdex 200 HR (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) können alle Proteine, die größer als 600 kDa sind, nicht in die Poren des Gelmaterials eindringen und befinden sich im Ausschlußvolumen. Proteine (< 600 kDa) haben mit abnehmender Größe längere Verweilzeiten im Gelmaterial.

Die fertig gepackte Superdex 200 HR 16/60-Säule wurde luftblasenfrei an das Äkta-System Explorer 10 (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) angeschlossen, nachdem das gesamte System mit Puffer (38,5 mM KP-Puffer, pH 8,0; 55 mM KCl) gespült worden war. Anschließend wurde die Fließgeschwindigkeit der Pumpe in 0,1 ml/min-Schritten auf 0,5 ml/min gebracht, damit das Säulenmaterial nicht komprimiert wurde. Die Säule hatte

ein Gesamtvolumen von 121 ml. Vor jedem Lauf wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Puffer (38,5 mM KP-Puffer, pH 8,0; 55 mM KCl) äquilibriert. Die Proben wurden mit Hilfe einer Probenschlaufe (2 ml) aufgetragen. Während des Laufs wurde eine Flußrate von 1 ml/min eingestellt. Nach Durchfluß von 1,5 Säulenvolumen war der Lauf beendet. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines UV-Meßgerätes bei einer Extinktion von 280 nm. Die einzelnen Fraktionen wurden in Reagenzgläsern mit einem Fraktionssammler aufgefangen und anschließend analysiert. Die Auswertung der Gelfiltration erfolgte mit dem Computerprogramm „Unicorn“ (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg). Nach Beendigung der Gelfiltration wurde die Säule und das Schlauchsystem in Ethanol (20 %; v/v) aufbewahrt. Als Markerproteine wurden die Proteine des „LMW Calibration“-Kits (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) eingesetzt (s. 2.23.2).

2.24 Synthese von ^{14}C -markiertem Coenzym B_{12}

Zur Untersuchung von B_{12} -Bindungen von Proteinen mittels Dot-Blot-Verfahren (s. 2.21.2) sollte ^{14}C -markiertes Coenzym B_{12} synthetisiert werden, da dies nicht käuflich zu erwerben ist. Die ^{14}C -Markierung sollte dabei an der Dimethylbenzimidazol-Einheit des Coenzym B_{12} erfolgen.

2.24.1 Synthese von 5,6-Dimethyl (2- ^{14}C) benzimidazol (HÖRIG und RENZ, 1980)

Die Synthese von 5,6-Dimethyl (2- ^{14}C) benzimidazol erfolgte durch chemische Umsetzung von 1,2-Diamino-4,5-Dimethylbenzen (136 mg in 0,4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) mit Na (^{14}C) Formiat (50 μCi). Diese beiden Substanzen wurden zunächst mit 0,1 ml Ameisensäure und 1 ml HCl (2 M) versetzt und für 1,5 h bei 100°C erhitzt. Nach diesem Hitzeschritt folgte eine Inkubation über Nacht bei RT mit anschließender Fällung durch ca. 10 ml Ammoniak (2 M). Das Präzipitat wurde durch Filtration getrennt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen.

Getrocknetes 5,6-Dimethyl (2-¹⁴C) benzimidazol wurde dann in eine Fermentation mit *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* eingesetzt (s. 2.24.2).

2.24.2 Synthese von Coenzym B₁₂ durch *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* (HÖRIG und RENZ, 1980)

Die Biosynthese von Coenzym B₁₂ in *P. freudenreichii subsp. shermanii* kann in 2 Schritten vollzogen werden. Während des anaeroben Wachstums in Gegenwart von Cobaltsalzen erfolgt die Synthese der Corrin-Einheit. Die anschließende aerobe Inkubation induziert die Biosynthese von 5,6-Dimethylbenzimidazol. Das dann gebildete Cobinamid wird zu Coenzym B₁₂ umgesetzt. Unter anaeroben Bedingungen synthetisiert *P. freudenreichii subsp. shermanii* nur Coenzym B₁₂, wenn 5,6-Dimethylbenzimidazol zugeführt wird.

Die Glucosefermentation von *P. freudenreichii subsp. shermanii* erfolgte in 1-l-Serumflaschen mit dem unter 2.2.1.7 beschriebenen synthetischen Medium bei 30°C unter anaeroben Bedingungen. Am 2. und 4. Inkubationstag erfolgte die Zugabe des radioaktiv markierten 5,6-Dimethylbenzimidazols (5 bis 10 mg gelöst in Ethanol [70%; v/v]). Nach 6 bis 8 Tagen hatte sich genug Coenzym B₁₂ gebildet, und die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 x g, 10 min) geerntet. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (15000 x g, 30 min, 4°C). Nach dem Zellaufschluß mußte wegen der Lichtempfindlichkeit des Coenzym B₁₂ unter Rotlicht gearbeitet werden.

2.24.3 Nachweis und Isolierung des ¹⁴C-markierten Coenzym B₁₂ durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das gebildete radioaktiv markierte Coenzym B₁₂ (s. 2.24.2) wurde mittels einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer µBondapak C18-Säule (19 mm x 15 cm, Fa. Waters GmbH, Eschborn) gereinigt. Anhand der verschiedenen Retentionszeiten

können dabei verschiedene Substanzen getrennt werden. Die Zuordnung der Retentionszeiten erfolgt mit Hilfe von Standards, die nur eine Substanz enthalten und die ebenfalls auf die Säule aufgetragen werden. Aus den auftretenden Peakflächen kann auf die Substanzmenge geschlossen werden. Hierzu wurde für die jeweiligen Substanzen eine Eichgerade aufgenommen. Wurden die Säulen längere Zeit nicht genutzt, mußte das ganze System mit 20 % Ethanol gespült werden. Die HPLC-Anlage (Fa. Kontron, Eching) bestand aus folgenden Komponenten: 2 HPLC-Pumpen 42, Mischer M 491, Detektor 43, Multiport und einem AT-Computer mit entsprechender Software (Programm MT2). Als Laufmittel dienten die Lösungen A und B, die vor Gebrauch filtriert (Cellulosenitrat-Filter, Porengröße 0,2 µm, Fa. Sartorius, Göttingen) wurden. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml/min, ein Lauf dauerte 44 min. Dabei wurde folgender Gradient eingestellt:

Zeit (min)	Flußrate (ml/min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0	5,0	100	0
7	5,0	75	25
19	5,0	60	40
23	5,0	0	100
27	5,0	0	100
31	5,0	100	0
33	0,1	100	0

Als Eichsubstanzen wurden Hydroxy-B₁₂, Cyano-B₁₂, Methyl-B₁₂ und Coenzym B₁₂ in einer Konzentration von 0,05 mg/ml verwendet. Von diesen Lösungen wurden 50 µl injiziert. Die Detektion erfolgte am UV-Detektor bei 360 nm. Von den zu untersuchenden Proben wurde 1 ml injiziert. Pro Lauf konnten durch 4-maliges Injizieren 4 ml Probe aufgearbeitet werden.

<u>Lösung A</u>			<u>Lösung B</u>		
Na-Acetat x 3H ₂ O	8,95	g	Methanol	4	l
Tetrabutylammonium- hydroxid (TBAH)	5,88	ml	Essigsäure	0,4	ml
Lösung B	210,5	ml	TBAH	5,88	ml
H ₂ O _{dest.}	ad 4	l			

Der pH von 4,6 wurde mit Essigsäure vor
Zugabe von Lösung B eingestellt.

Das so isolierte, radioaktiv markierte Coenzym B₁₂ lag sehr verdünnt vor und wurde daher mittels einer Vakuumzentrifugation (Vakuumzentrifuge Savant AS160, Fa. Savant Instruments Inc., Holbrook, USA) eingengt. Die schon erwähnten Eichsubstanzen wiesen folgende Retentionszeiten auf:

Eichsubstanz	Retentionszeit (min)
Cyano-B ₁₂	17,76
Coenzym B ₁₂	20,35
Methyl-B ₁₂	21,79
Hydroxy-B ₁₂	22,06

2.25 Bindungsstudien von Proteinen

2.25.1 B₁₂- Bindung von Proteinen

Die im Rahmen dieser Arbeit gereinigten Proteine wurden in Bezug auf ihre Fähigkeit untersucht, Coenzym B₁₂ und dessen Analoga zu binden. Hierfür wurden die gereinigten Proteine anaerob unter Lichtausschluß mit Coenzym B₁₂ (bzw. Vitamin B₁₂) bei 37°C für 30 min inkubiert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Testansatz:</u>	38,5 mM	KP-Puffer (pH 8,0) mit 55 mM KCl
	2 mM	1,2-Propandiol
	2 mM	Coenzym B ₁₂ (Vitamin B ₁₂)
	0,2 bis 0,35 mg/ml	Protein

In einigen Ansätzen wurde auch ADP bzw. ATP (12 mM) zugegeben. Die Proben konnten im Anschluß für die „milde SDS-PAGE“ (s. 2.19.2) eingesetzt werden. Alternativ wurde radioaktiv markiertes Coenzym B₁₂ (s. 2.24) eingesetzt. In diesem Fall wurden die Proben mittels „Dot-Blot“-Verfahren auf eine Membran übertragen (s. 2.21.2). Die anschließende Analyse erfolgte mittels Autoradiographie (s.2.11).

2.25.2 ATP-Bindung von Proteinen

Für Bindungsstudien wurde das jeweilige Protein mit radioaktiv, markiertem ATP für 30 min bei 37°C inkubiert.

Der Reaktionsansatz (20 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Testansatz:</u>	30 µCi	(³² P)-ATP
	8 µg	Protein

Anschließend wurde ein Aliquot (8 µl) einer chromatographischen Trennung mit Hilfe einer Gradienten-PAGE (s. 2.19.3) unterzogen. Danach wurde das Gel getrocknet. Radioaktiv, markierte Proteine wurden mittels Autoradiographie (s. 2.11) sichtbar gemacht.

2.26 Bezugsquellen

Es wurden Chemikalien des höchsten handelsüblichen Reinheitsgrades der Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Hannover), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) verwendet. Desweiteren wurde mit Biochemikalien, Enzymen etc. folgender Firmen gearbeitet:

Amersham Pharmacia, Freiburg:

NAP-5-Säulen, PD 10-Säulen, „HMW Calibration-Kit“, „LMW-Calibration“-Kit,
Nylonmembranen

Biozym GmbH, Hess. Oldendorf:

Tfl-Polymerase

Eurogentec, Seraing, Belgien:

Agarose

Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg:

IPTG, X-Gal, Ampicillin, Acrylamid, Bisacrylamid, Mops, SDS 4x

Gibco BRL, Eggenstein:

Hefeextrakt, Random Primed Labeling Kit

Hartmann Analytic, Braunschweig:

[⁻³²P]-dATP, [⁻³²P]-ATP

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot:

Ladder-Mix, Nukleotide; Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase

Millipore, Eschborn:

Mikrodialyse-Filter

New-England Biolabs GmbH, Freiburg:

Restriktionsendonukleasen, RNA-Leiter

Oxoid, Basingstone, England:

Agar, Trypton, Hefeextrakt

Promega, Deutschland GmbH, Mannheim:

Wizard™ *Plus* Minipreps DNA Purification System, BCIP, NBT

Qiagen GmbH, Hilden:

„RNeasy™ Total RNA“-Kit, Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure-Agarose, „Qiaquick PCR Purification“-Kit, „Qiaquick Gel Extraction“-Kit, RNA/DNA Maxi Kit

Sartorius AG, Göttingen:

Sterilfilter

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Coenzym B₁₂, Cyano-B₁₂, Hydroxy-B₁₂, Methyl-B₁₂

Takara, Japan:

TakaraEx Taq-Polymerase

Whatman, Maidstone, England:

Whatman-Filterpapier 3MM

Die verwendeten Gase (N₂, H₂, N₂/CO₂ mit einem Reinheitsgrad von 99,99 %) wurden von der Firma Messer Griesheim GmbH (Kassel) bezogen.

3 Experimente und Ergebnisse

Die Glycerin-Dehydratase ist ein Schlüsselenzym des anaeroben Abbaus von Glycerin zu 1,3-Propandiol. Sie katalysiert dabei die Umsetzung von Glycerin zu -Hydroxypropionaldehyd. Diese enzymatische Reaktion zeichnet sich durch einen Coenzym B₁₂-abhängigen radikalischen Reaktionsmechanismus aus. Bisher sind Glycerin-Dehydratasen aus Enterobakterien wie z. B. *Klebsiella* und *Citrobacter* und in Clostridien näher untersucht worden (DANIEL und GOTTSCHALK, 1992; SEYFRIED et al., 1996; TOBIMATSU et al., 1996; MACIS et al., 1998). Die Glycerin-Dehydratase bevorzugt Glycerin als Substrat, kann jedoch 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden umsetzen. Allerdings unterliegt die Dehydratase während der Katalyse von Glycerin einer sogenannten „Suicide“-Inaktivierung (SEYFRIED et al., 1996).

3.1 Stand der Vorarbeiten

Die genetische Organisation des *dha*-Regulons aus *Citrobacter freundii*, das die Gene für die Schlüsselenzyme der Glycerinfermentation beinhaltet, war bereits durch Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt (DANIEL und GOTTSCHALK, 1992). Desweiteren wurden die Gene für die Schlüsselenzyme dieses Stoffwechselweges heterolog exprimiert, die korrespondierenden Genprodukte gereinigt und charakterisiert (DANIEL et al. 1995a; DANIEL et al., 1995b, SEYFRIED et al., 1996). Dazu zählt auch die Coenzym B₁₂-abhängige Glycerin-Dehydratase, die durch die drei Strukturgene *dhaB*, *dhaC* und *dhaE* kodiert wird (SEYFRIED et al., 1996). Die drei korrespondierenden Untereinheiten besitzen Molekularmassen von 60, 21 bzw. 16 kDa. Im nativen Zustand bildet die Glycerin-Dehydratase einen Komplex aus $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$ mit einer Molekularmasse von 196 kDa. Die K_m -Werte für Glycerin, 1,2-Propandiol und Coenzym B₁₂ betragen 0,5 mM, 0,1 mM bzw. 50 nM.

Die Gene der Schlüsselenzyme des reduktiven Zweigs der Glycerinfermentation aus *Clostridium pasteurianum* wurden von LUERS et al. (1997) kloniert. Die Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* wird ebenfalls durch drei Strukturgene - bezeichnet mit *dhaB*, *dhaC* und *dhaE* - kodiert. Eine Reinigung des Enzyms ist bisher nicht erfolgt. Die Glycerin-Dehydratase konnte jedoch mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm K38/pGP1-2/pLM3 heterolog produziert werden (MACIS et al., 1998).

3.2 Expression und Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*

3.2.1 Expression und Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* nach der Methode von SEYFRIED et al. (1996)

Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* wurde bereits von SEYFRIED et al. (1996) heterolog in *E. coli* produziert und gereinigt. Zur näheren Untersuchung der Inaktivierung des Enzyms durch Glycerin und einer möglichen Reaktivierung der Dehydratase sollte das Enzym nach der von SEYFRIED et al. (1996) etablierten Methode produziert und gereinigt werden. Die heterologe Expression der Gene der Glycerin-Dehydratase erfolgte mittels des T7-RNA-Polymerase/Promotorsystems. Die anschließende Reinigung der Glycerin-Dehydratase wurde in zwei Schritten mit einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und einer Affinitätschromatographie an einer Vitamin B₁₂-Agarose durchgeführt.

Zur Expression der Dehydratase-Gene wurde das Plasmid pMS2 (SEYFRIED et al., 1996), welches die Glycerin-Dehydratase-Gene kolinear zum T7-Promotor des Vektors pSK+ enthält, in den *E. coli* Stamm K38/pGP1-2 transformiert (s. 2.8.2), welcher auf dem Plasmid pGP1-2 das Gen für die T7-RNA-Polymerase trägt (TABOR und RICHARDSON, 1985). Die Expression des Polymerase-Gens steht auf diesem Plasmid unter der Kontrolle des temperatursensitiven λ -Repressors cI857, so daß eine Induktion der Expression der T7-Polymerase und damit auch der Glycerin-Dehydratase durch einen Hitzeschock beim

Übergang von 30°C auf 42°C Wachstumstemperatur erfolgt. Es wurden Vorkulturen mit einer frischen Einzelkolonie des rekombinanten *E. coli*-Stamms K38/pGP1-2/pMS2 beimpft. Zellanzucht, Induktion durch Hitzeschock und anschließende Inkubation bei 37°C erfolgten wie unter 2.3.3.4 beschrieben. Es zeigte sich, daß jeweils nach Induktion der Dehydratase-Gene eine nahezu vollständige Wachstumshemmung einsetzte. Nach Trennung der Proteine im Rohextrakt durch SDS-PAGE war eine Veränderung des Proteinmusters zu verzeichnen. Nach der Induktion traten mit fortschreitender Inkubationsdauer drei Proteinbanden hervor. Anhand der Markerproteine konnten die Molekularmassen ermittelt werden. Diese lagen im Bereich von 60, 21 bzw. 16 kDa. Die Werte stimmten mit den von SEYFRIED et al. (1996) ermittelten Molekularmassen für die jeweiligen Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase überein.

Die spezifische Glycerin-Dehydratase-Aktivität im Rohextrakt betrug 0,45 U/mg. Im Vergleich dazu betrug die spezifische Dehydratase-Aktivität bei SEYFRIED et al. (1996) 30 U/mg. Dies deutete auf eine geringere Produktion der Glycerin-Dehydratase hin. Dies könnte in den unterschiedlichen Anzuchtbedingungen seine Ursache haben. Im Gegensatz zu SEYFRIED et al. (1996) wurden die Kulturen nicht im 10 l-Maßstab in einem speziellen Fermenter angezogen, da die Anlage zu Beginn meiner Arbeiten nicht mehr vorhanden war. Die Expressionsversuche konnten daher nur im 1 l-Maßstab im Schüttelkolben durchgeführt werden.

Die Reinigung der Glycerin-Dehydratase erfolgte nach der von SEYFRIED et al. (1996) etablierten Methode. Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und die anschließende Affinitätschromatographie an einer Vitamin B₁₂-Agarose wurden wie unter 2.16.2 beschrieben durchgeführt. Nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung befand sich 30 % der Glycerin-Dehydratase-Aktivität im Pellet. Die Analyse der Eluate der Affinitätschromatographie an Vitamin B₁₂-Agarose mittels SDS-PAGE ergab, daß mit Hilfe dieser Methode im Gegensatz zu SEYFRIED et al. (1996) kein homogenes Protein erhalten wurde. Die Ursache hierfür könnte in der Verwendung unterschiedlich angezogener Zellen liegen. Auch war die Ausbeute mit 0,5 % im Vergleich zu SEYFRIED et al. (1996) mit 1,5 % geringer. Da für die nachfolgenden Inaktivierungs- und Reaktivierungsversuche

große Mengen an Dehydratase benötigt wurden, mußte eine andere Reinigungsmethode ausgearbeitet werden.

3.2.2 Heterologe Expression der Strukturgene der Glycerin-Dehydratase mit dem *lac*-Promotor des Plasmids pSK+

Aufgrund des geringen Reinigungserfolges der Glycerin-Dehydratase nach der Methode von SEYFRIED et al. (1996; s. 3.2.1) wurde eine alternative Methode erarbeitet. Hierzu wurden die Gene der Dehydratase unter Kontrolle des *lac*-Promotors des Vektors pSK+ gestellt. Ferner wurde zur Ermöglichung einer schnellen Reinigung mittels einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose ein His₆-Tag im Zuge der Klonierung an die kleine Untereinheit (DhaE) angehängt.

3.2.2.1 Klonierung der Glycerin-Dehydratase-Gene in den Vektor pSK+

Zur Klonierung in den Vektor pSK+ wurden die Gene *dhaB*, *dhaC* und *dhaE* über PCR (s. 2.12) mit den Primern „dhaBCf1“ und „dhaECf2“ (s. 2.1) sowie dem Plasmid pMS2 als Matrize amplifiziert. Am 3'-Ende des *dhaE*-Gens wurde dabei die Sequenz für einen His₆-Tag eingeführt. Die Anlagerung der Primer erfolgte für jeweils 1 min bei 60°C. Es schloß sich die Polymerisation der DNA bei 72°C für 3,5 min an, wobei 35 Zyklen durchlaufen wurden. Im Rahmen der PCR wurden am 5'-Ende des amplifizierten Fragments eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *EcoRI* und am 3'-Ende für *HindIII* eingeführt, so daß eine Klonierung der Gene über diese beiden Schnittstellen möglich war. Das gereinigte PCR-Fragment (2731 bp) wurde ebenso wie der Vektor mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und nach Reinigung ligiert (s. 2.7.1 und 2.7.3). Nach anschließender Transformation in *E. coli* JM109 erfolgte die Selektion der Transformanten mit Hilfe des X-Gal-Tests (s. 2.8.3 und 2.8.6). Positive weiße Klone wurden zur weiteren Überprüfung einer Plasmidpräparation unterzogen (s. 2.5.2.1). Durch anschließenden

Verdau der Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI konnte die Insertgröße und die Orientierung des Inserts zum *lac*-Promotor des Vektors kontrolliert werden (s. Abbildung 5). Hierbei konnten positive Klone erhalten werden. Die korrekte Insertion und Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft und bestätigt (s. 2.13). Das entsprechende Konstrukt wurde als pCS120 bezeichnet und für die Produktion und Reinigung der Glycerin-Dehydratase eingesetzt (s. Abbildung 5).

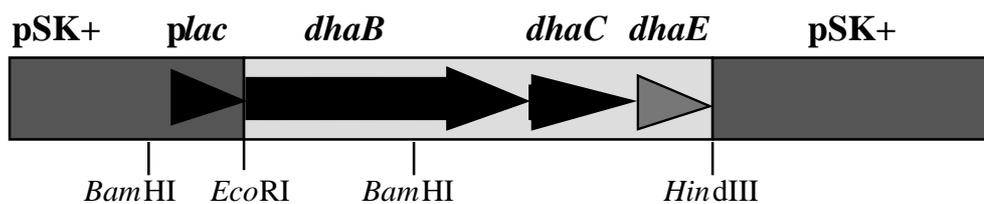


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pCS120

Das grau hinterlegte Gen trägt am 3'Ende die Sequenz für einen His₆-Tag.

3.2.2.2 Heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *C. freundii* mit Hilfe des Plasmids pCS120

Die heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene konnte direkt mit dem Plasmid pCS120 (s. 3.2.2.1) in *E. coli* JM109 erfolgen. Die Transkription der Gene, die unter Kontrolle des *lac*-Promotors stand, wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Expression erfolgte mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm JM109/pCS120 unter den beschriebenen Bedingungen (s. 2.3.3.1). Der Verlauf der Expressionsversuche wurde anhand von OD-Messungen und durch Probennahme vor und nach der Induktion mit anschließender Analyse des Proteinmusters durch SDS-PAGE (s. 2.19.1) verfolgt. Nach Induktion der Expression der Gene *dhaB*, *dhaC* und *dhaE* konnte eine Wachstumsverzögerung beobachtet werden. Ferner war bei der Analyse der Rohextrakte durch SDS-PAGE nach Induktion mit fortschreitender Inkubationsdauer das Auftreten von drei Proteinbanden zu erkennen (s. Abbildung 6). Die ermittelten Molekularmassen der drei Proteinbanden von 60, 21 bzw. 16 kDa entsprachen denen der Glycerin-Dehydratase.

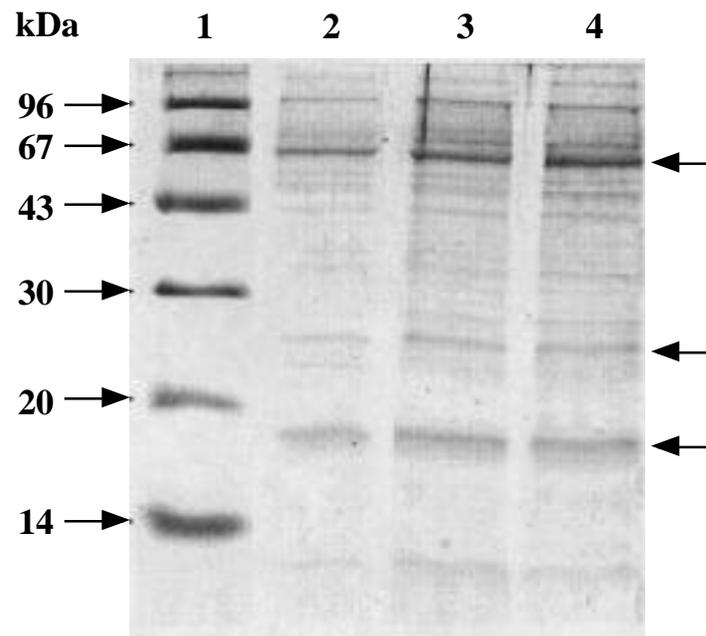


Abbildung 6: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Produktion der Glycerin-Dehydratase in *E. coli* JM109/pCS120

Zellanzucht und Induktion mit IPTG von *E. coli* JM109/pCS120 wurde wie unter 2.3.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE (s. 2.19.1) nach Färbung mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1). Die Zellpellets von *E. coli* JM109/pCS120 wurden in Denaturierungspuffer aufgenommen.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt vor Induktion

Spur 3: Rohextrakt 1 h nach Induktion

Spur 4: Rohextrakt 3 h nach Induktion

Die produzierten Proteine sind durch Pfeile markiert.

3.2.3 Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Nach Produktion der Glycerin-Dehydratase mit Hilfe des Plasmids pCS120 wurde das Enzym über den bei der Klonierung angehängten His₆-Tag durch eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt. Die Reinigung wurde zunächst wie im Herstellerprotokoll beschrieben mit Na⁺-haltigen Puffern durchgeführt (s. 2.16.1.2). Da aber die spezifische Aktivität der gereinigten Glycerin-Dehydratase in diesen Puffern

sehr gering war, wurden die vom Hersteller beschriebenen Puffer gegen K^+ -haltige ausgetauscht. Für die bisher untersuchten Coenzym B_{12} -abhängigen Dehydratasen aus Vertretern der Gattungen *Klebsiella* und *Lactobacillus* ist eine Verringerung der Enzymaktivität in Gegenwart von Na^+ -Ionen im Vergleich zu K^+ -Ionen beschrieben worden (SMILEY und SOBOLOLOV, 1962; SCHNEIDER und PAWELKIEWICZ, 1966; TORAYA und FUKUI, 1977). Dies wurde auf eine Schwächung der Bindung des Apoenzyms an das Coenzym zurückgeführt (TORAYA et al., 1971). Durch die teilweise Aufklärung der Struktur der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* wurde deutlich, daß ein K^+ -Ion im aktiven Zentrum der Diol-Dehydratase vorhanden und wahrscheinlich unmittelbar an der Wanderung der Hydroxylgruppe von C(2) zu C(1) beteiligt ist (SHIBATA et al., 1999). Der Rohextrakt aus 3.2.2.2 wurde auf eine mit Zellaufschlußpuffer (s. 2.16.1.2) äquilibrierte Ni^{2+} -NTA-Agarose (Bettvolumen 3 ml) aufgetragen. Nach einer Inkubation für 1 h bei $4^{\circ}C$ wurde die Säule mit 15 ml Zellaufschlußpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 15 ml Puffer I (s. 2.16.1.2) erfolgte die Elution des am Säulenmaterial gebundenen Proteins mit einem Puffer, der 250 mM Imidazol enthielt. Imidazol führte dabei zu einer kompetitiven Verdrängung des Histidins und damit zur Elution von Proteinen mit His_6 -Tag. Die Analyse der Reinigung anhand einer SDS-PAGE ergab, daß auf diese Weise ein homogenes Protein erhalten wurde (s. Abbildung 7; A). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte wiederum drei Proteinbanden mit den für die Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase typischen Molekularmassen.

Bei Trennung des gereinigten Proteins durch native PAGE (s. 2.19.3) trat eine Bande im Bereich von 190 kDa auf (s. Abbildung 7; B). Die Identität der Bande konnte mittels eines Westernblots (s. 2.21.1) mit gegen den im Zuge der Klonierung angehängten His_6 -Tag gerichteten Antikörpern (s. 2.22.1) nachgewiesen werden. Die Molekularmasse stimmte hervorragend mit den Ergebnissen von SEYFRIED et al. (1996) überein, die für die native Glycerin-Dehydratase eine native Molekularmasse von 196 kDa bestimmt hatten.

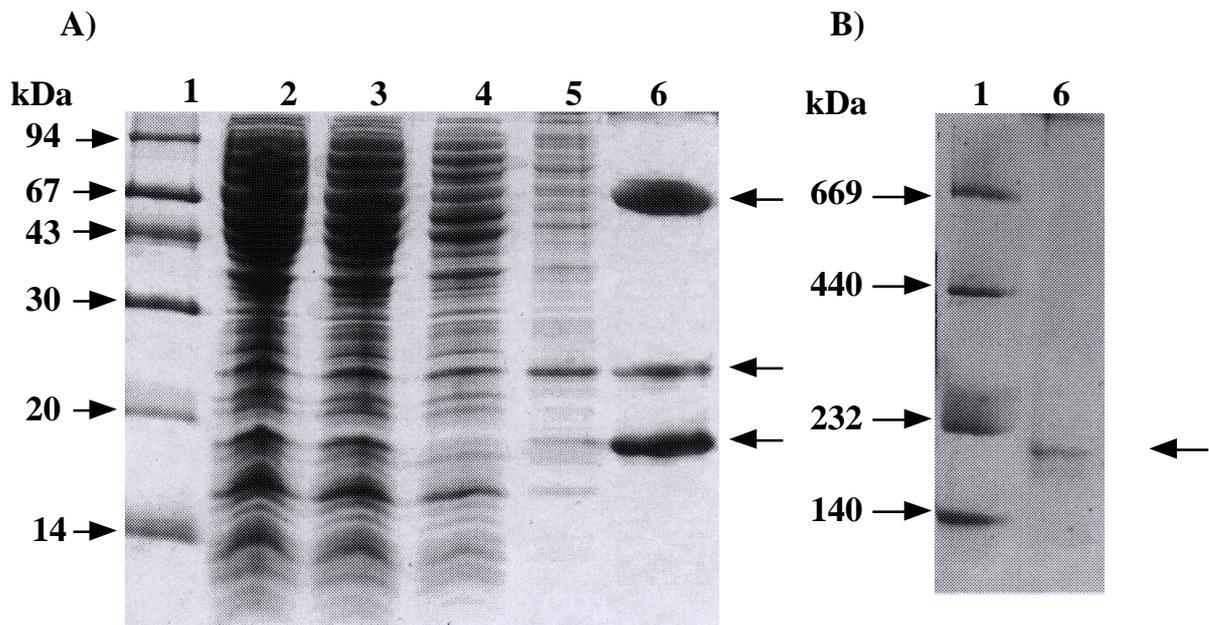


Abbildung 7: (A) SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der Glycerin-Dehydratase mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die Reinigung der Glycerin-Dehydratase wurde mittels SDS-PAGE (s. 2.19.1) und anschließender Färbung mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1) analysiert.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS120

Spur 3: Durchlauf

Spur 4: Waschschrift mit 10 mM Imidazol

Spur 5: Waschschrift mit 20 mM Imidazol

Spur 6: Eluat mit 250 mM Imidazol

(B) Native Gradienten-PAGE mit gereinigter Glycerin-Dehydratase

Die gereinigte Dehydratase wurde durch native Gradienten PAGE (s. 2.19.3) analysiert. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1).

Spur 1: Markerproteine

Spur 6: gereinigte Glycerin-Dehydratase

Die produzierten Proteine sind durch Pfeile markiert.

3.2.4 Zusammenfassung der Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*

Zur Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* war im Gegensatz zu SEYFRIED et al. (1996) nur noch ein Reinigungsschritt notwendig. Die Expression erfolgte mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm JM 109/pCS120. Die heterolog produzierte Glycerin-

Dehydratase wurde anschließend mittels einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt. Die Anreicherung ist in Tabelle 5 zusammengefaßt. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Glycerin-Dehydratase in ausreichender Menge für die folgenden Untersuchungen zur Inaktivierung und einer möglichen Reaktivierung produziert und gereinigt werden.

Tabelle 5: Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*

Anreicherungs-schritt	Protein [mg]	Aktivität [U]	spezifische Akti- vität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreich.- faktor
Rohextrakt	252,0	137,7	0.54	100	1
Affinitätschromato- graphie an Ni ²⁺ - NTA-Agarose	4,0	41,3	10,3	30	19

3.3 Expression und Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum*

Erste Versuche zur heterologen Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *Cl. pasteurianum* wurden von MACIS et al. (1998) vorgenommen. Mit Hilfe des Plasmids pLM3, bei dem die Glycerin-Dehydratase-Gene unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, konnte eine Steigerung der Glycerin-Dehydratase-Aktivität in Rohextrakten von induziertem *E. coli* K38/pGP1-2/pLM3 um das 1,9-fache gegenüber Rohextrakten von *E. coli* ECL707/pFL1 bewirkt werden (MACIS et al., 1998). Das Plasmid pFL1 trägt als Insert die Gene der Schlüsselenzyme des reduktiven Zweigs der Glycerinfermentation

(s. Einleitung). Eine Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* wurde bisher nicht beschrieben.

3.3.1 Heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *Cl. pasteurianum*

Zur heterologen Produktion der Glycerin-Dehydratase sollten wie auch bei der Dehydratase aus *C. freundii* (s. 3.2.2) die drei Strukturgene unter die Kontrolle des *lac*-Promotors des Plasmids pSK+ gestellt werden. Das Konstrukt pLM3 wurde nicht zur Expression genutzt, da mit Hilfe dieses Konstrukts keine anschließende Reinigung der Glycerin-Dehydratase mittels einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose möglich gewesen wäre.

3.3.1.1 Klonierung der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *Cl. pasteurianum* in den Vektor pSK+

Zur heterologen Expression in *E. coli* und anschließender Reinigung der Glycerin-Dehydratase wurden die drei Strukturgene *dhaB*, *dhaC* und *dhaE* mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden die Primer „dhaBCp1“ und „dhaECp2“ herangezogen (s. 2.1). Die Anlagerung an das Template pLM3 erfolgte bei 52°C für 1 min. Die anschließende Kettenverlängerung wurde bei 72°C für 3 min durchgeführt und die PCR nach 35 Zyklen beendet. Das gebildete PCR-Produkt wies eine Länge von 2688 bp auf. Im Zuge der Klonierung wurde am 3'-Ende des *dhaE*-Gens ein His₆-Tag angefügt, um eine spätere Reinigung des Genprodukts mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose zu ermöglichen. Desweiteren wurden zur Klonierung in pSK+ sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende *Bam*HI-Schnittstellen eingeführt (s. Abbildung 8). Nach Ligation des PCR-Produktes in den Vektor pSK+ über die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors und anschließender Transformation in *E. coli* JM109, erfolgte die Selektion rekomanter Klone mit Hilfe des X-Gal-Tests (s. 2.8.6). Die auf diese Weise identifizierten rekombinanten

Klone wurden zur weiteren Überprüfung einer Plasmidpräparation und einem anschließenden Restriktionsverdau mit *Hind*III unterzogen. Dadurch wurde überprüft, welche rekombinanten Klone die drei Strukturgene der Glycerin-Dehydratase kolinear zum *lac*-Promotor des Vektors besaßen. Die positiven Klone wurden zur weiteren Überprüfung sequenziert. Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde mit pCS220 bezeichnet und zur Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *Cl. pasteurianum* in *E. coli* herangezogen.

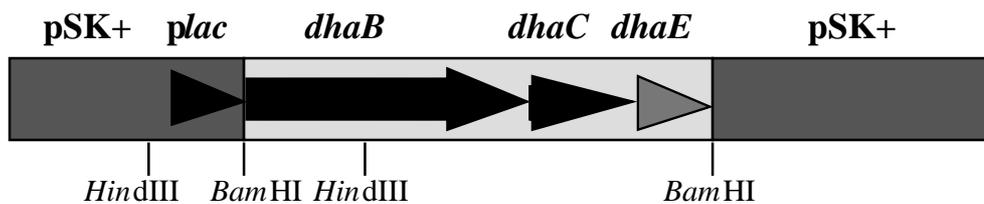


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pCS220

Das grau hinterlegte Gen besitzt am 3'-Ende eine Sequenz für einen His₆-Tag.

3.3.1.2 Heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *Cl. pasteurianum* mit Hilfe des Plasmids pCS220

Die heterologe Expression der Glycerin-Dehydratase-Gene aus *Cl. pasteurianum* erfolgte mit dem rekombinanten *E. coli* Stamm JM109/pCS220. Die Expression der drei Strukturgene der Glycerin-Dehydratase wurden durch Zugabe von IPTG zum Medium wie unter 2.3.3.1 beschrieben induziert. Nach Induktion der *dhaBCE*-Gene trat wie erwartet eine Wachstumsverzögerung ein. Die Analyse der Rohextrakte durch SDS-PAGE zeigte mit fortschreitender Inkubationsdauer nach Induktion das Auftreten der drei für die Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase typischen Proteinbanden mit den Molekularmassen von 60, 21 und 16 kDa.

3.3.2 Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* erfolgte analog zur Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose (s. 3.2.3). In Abbildung 9 ist der Verlauf der Reinigung der Glycerin-Dehydratase anhand einer SDS-PAGE dargestellt. Spur 7 zeigt die gereinigte Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum*. Diese besaß eine spezifische Aktivität von 3,6 U/mg.

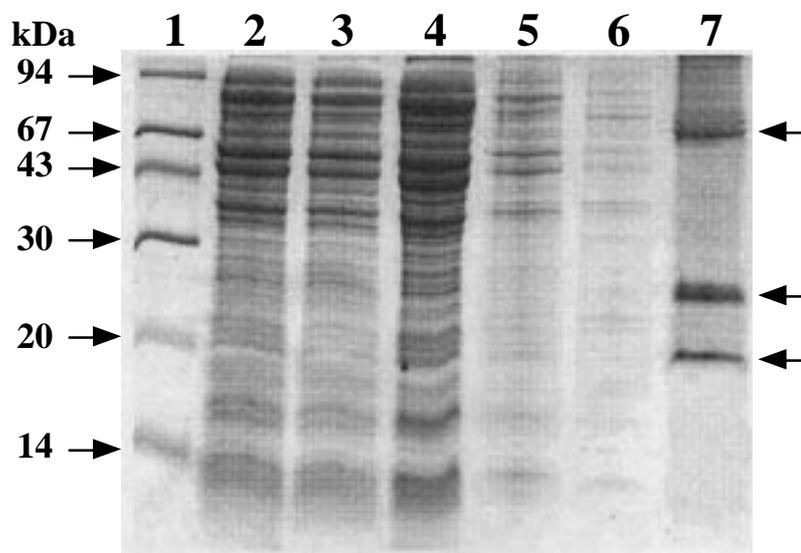


Abbildung 9: Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die Grafik stellt die Analyse der Reinigung anhand einer SDS-PAGE (s. 2.19.1) nach Färbung mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1) dar.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS220

Spur 3: Durchlauf

Spur 4: Waschschrift mit 10 mM Imidazol

Spur 5 & 6: Waschschrift mit 20 mM Imidazol

Spur 7: Eluat mit 250 mM Imidazol

Die produzierten Proteine sind durch Pfeile markiert.

In Tabelle 6 ist die Bilanz der Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* aufgeführt. Es konnte ein Anreicherungsfaktor von 13 erreicht werden. Das so gereinigte Protein wurde trotz der geringen Mengen an kontaminierendem Fremdprotein (Abbildung 9; Spur 7) zur näheren Untersuchung der Inaktivierung und einer möglichen Reaktivierung eingesetzt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum*

Anreicherungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreich.- faktor
Rohextrakt	58,8	13,9	0,27	100,0	1
Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	2,04	7,4	3,6	53	13

3.4 Inaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* durch Glycerin

Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* setzen wie auch die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* die Substrate Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden um (TORAYA et al., 1976; SEYFRIED et al., 1996). Bei den Glycerin-Dehydratase ist im Gegensatz zur Diol-Dehydratase Glycerin das bevorzugte Substrat. So beträgt die Aktivität der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* mit 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol im Vergleich zu Glycerin nur noch 30 bzw. 16 % (SEYFRIED et al., 1996).

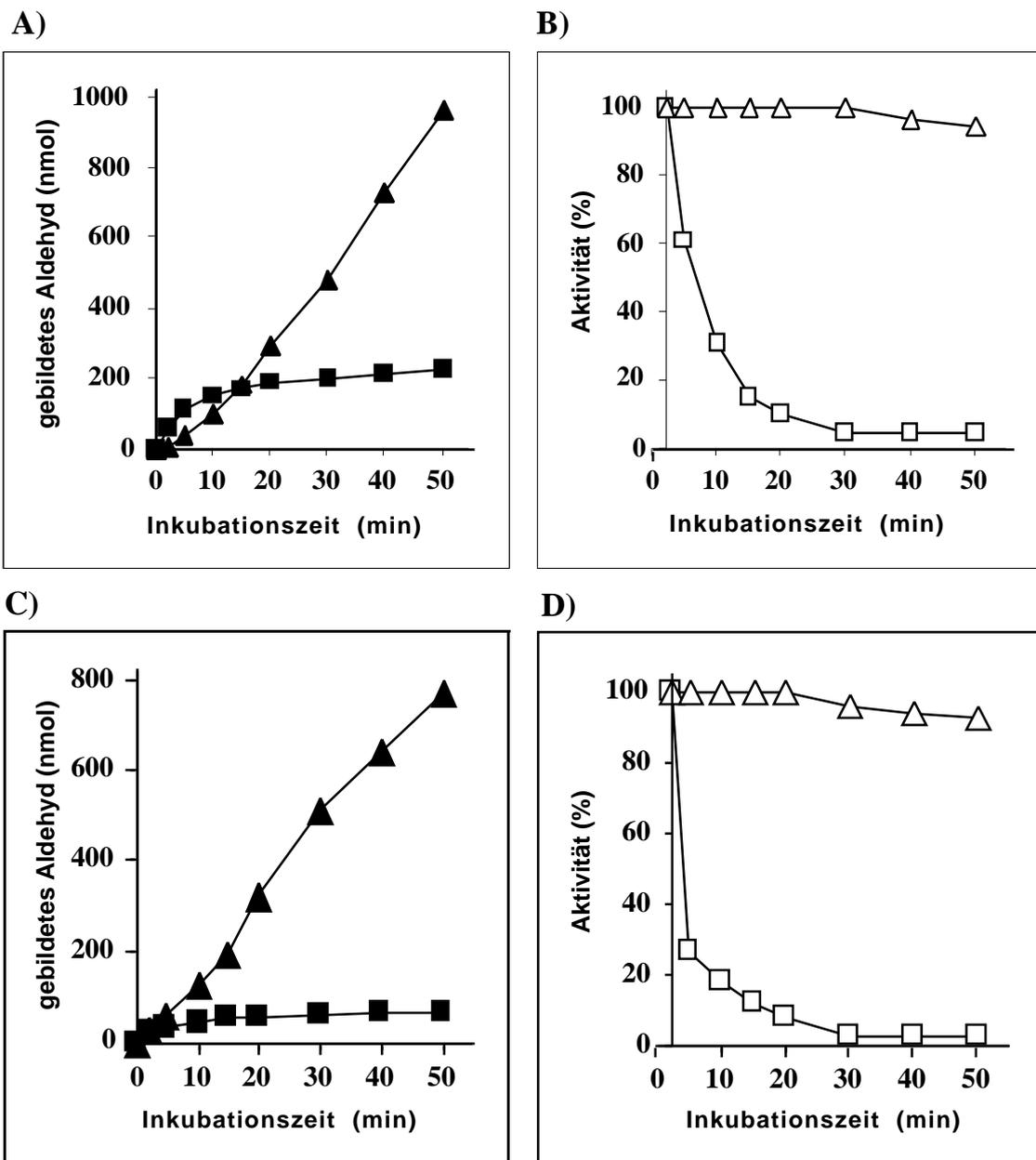
Inkubiert man die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* über einen längeren Zeitraum mit Glycerin als Substrat, so wird das Enzym im Verlauf der Katalyse irreversibel inaktiviert. Innerhalb der ersten Minute erfolgte noch kein signifikanter Aktivitätsverlust (s. Abbildung 10; A & B). Nach einer Inkubationszeit von 5 min betrug die Aktivität im Vergleich zur Anfangsaktivität nur noch 61 % und nach 30 Minuten war noch eine Restaktivität von 3 % vorhanden. Diese Aktivität blieb über 50 min stabil.

Auch die Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* wurde durch ihr Substrat Glycerin irreversibel inaktiviert (s. Abbildung 10; C & D). Bereits nach einer Inkubationsdauer von 5 min betrug die Aktivität der Glycerin-Dehydratase nur noch 27 %. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wies die Glycerin-Dehydratase nur eine Aktivität von 3 % auf, die ebenfalls über 50 min stabil blieb.

Abbildung 10: (folgende Seite)

Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* durch Glycerin

Dargestellt ist die Aldehydbildung (A; C) und die Aktivität (B; D) der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* (A; B) und *Cl. pasteurianum* (C; D) im Verlauf der Umsetzung von Glycerin (■, □) bzw. 1,2-Propandiol(▲, △). Die Aktivitätsbestimmungen wurden wie unter 2.17.1 beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der Substrate betrug 96 mM. Die Aktivität wurde relativ zur Anfangsaktivität (1 min) berechnet, die als 100 % festgesetzt wurde. Für die Versuche wurden gereinigte Glycerin-Dehydratasen mit einer spezifischen Aktivität von 0,12 U/mg (*C. freundii*) bzw. 0,64 U/mg (*Cl. pasteurianum*) für Glycerin und 0,05 U/mg (*C. freundii*) bzw. 0,67 U/mg (*Cl. pasteurianum*) für 1,2-Propandiol eingesetzt.



Kein signifikanter Aktivitätsverlust wurde dagegen bei der Inkubation der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* mit 1,2-Propandiol als Substrat verzeichnet. Der Aktivitätsverlust betrug innerhalb von 50 min weniger als 10 %. Ähnliche Ergebnisse wurden von TORAYA et al. (1976) und POZNANSKAYA et al. (1977) bei den Untersuchungen der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* und der Glycerin-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* erzielt.

Ein Vergleich der Glycerininaktivierung der Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* zeigte, daß das Enzym aus *Cl. pasteurianum* innerhalb der ersten 5 min doppelt so schnell wie das aus *C. freundii* durch Glycerin inaktiviert wurde (s. Abbildung 11).

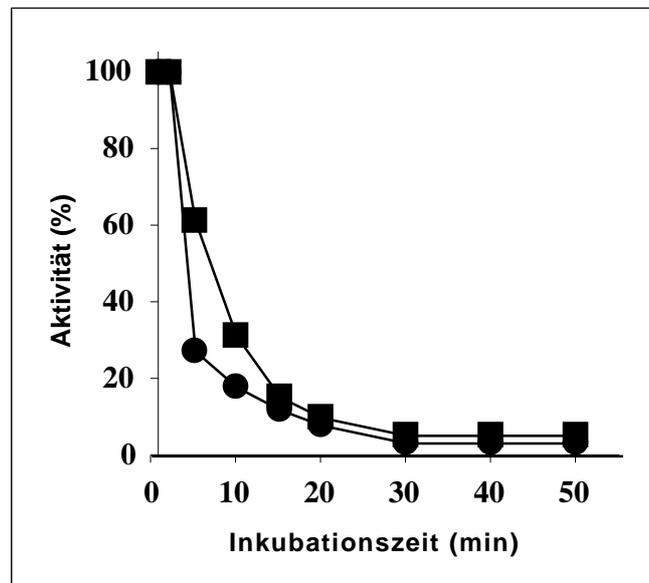


Abbildung 11: Vergleich der Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* während der Katalyse mit Glycerin

Dargestellt ist die Aktivität der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* (■) und *Cl. pasteurianum* (●) während der Katalyse von Glycerin. Es wurden jeweils 0,3 U der Enzyme eingesetzt.

3.5 Reaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum*

Sowohl die Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* als auch die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* unterliegen einer „Suicide“-Inaktivierung durch ihr natürliches Substrat Glycerin (s. 3.4). Für die Diol-Dehydratase konnte ein Komplex bestehend aus den beiden Proteinen DdrA und DdrB identifiziert werden, der das Glycerin-inaktivierte Enzym reaktiviert (TORAYA und MORI, 1999). DhaF aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum*,

dessen kodierendes Gen jeweils stromabwärts der Strukturgene der Glycerin-Dehydratase lokalisiert ist, zeigt zu DdrA aus *K. oxytoca* 60 % identische Aminosäuren (s. Abbildung 12). Bei der chromosomalen DNA aus *Cl. pasteurianum* konnte stromabwärts von *dhaF* ein mit *dhaG* bezeichnetes Gen identifiziert werden, dessen Genprodukt eine 39 %ige Aminosäureidentität zu DdrB aus *K. oxytoca* aufweist. Dagegen konnte bei *C. freundii* kein zu *ddrB* homologes Gen stromabwärts des *dhaF*-Gens identifiziert werden. Jedoch zeigte die abgeleitete Aminosäuresequenz eines anderen Gens (*dhaG*), welches stromaufwärts des für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase kodierenden Gens (*dhaT*) lokalisiert ist, eine ca. 30 %ige Identität zu DdrB aus *K. oxytoca*.

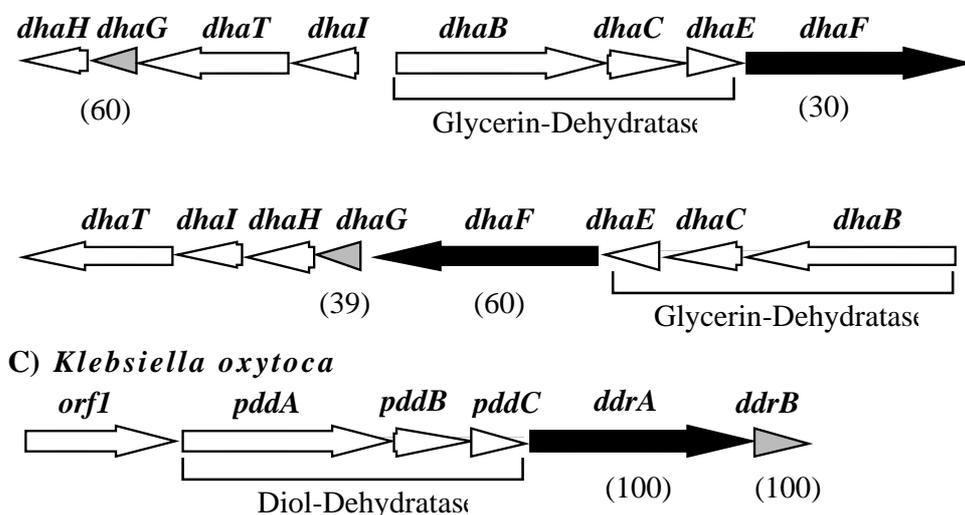


Abbildung 12: Genetische Organisation der chromosomalen DNA-Regionen, die für den reductiven Zweig der Glycerinfermentation aus *C. freundii* (A) und *Cl. pasteurianum* (B) und Teile des 1,2-Propandiol-Abbaus aus *K. oxytoca* (C) kodieren.

Pfeile und Pfeilspitzen repräsentieren die Länge, Position und Orientierung von möglichen Genen. Schwarze und graue Pfeile deuten offene Leserahmen an, die für Homologe von DdrA und DdrB aus *K. oxytoca* kodieren. Die prozentualen Aminosäureidentitäten der abgeleiteten Genprodukte im Vergleich zu DdrA und DdrB aus *K. oxytoca* sind in Klammern dargestellt.

DhaT: 1,3-Propandiol-Dehydrogenase; DhaB, DhaC, DhaE: Glycerin-Dehydratase; PddA, PddB, PddC: Diol-Dehydratase; DdrA, DdrB: Reaktivierungsfaktor.

Es erscheint daher wahrscheinlich, daß DhaF und DhaG in die Reaktivierung der Glycerin-Dehydratasen involviert sind. Um eine Rolle von DhaF und DhaG innerhalb der Glycerinverwertung nachzuweisen, wurden zunächst Transkriptionsanalysen der korrespondierenden Gene unter Glycerin-verwertenden Bedingungen durchgeführt.

3.5.1 Transkriptionsanalyse von *dhaF* und *dhaG* aus *C. freundii*

Für die Transkriptionsanalysen wurde RNA aus *C. freundii*-Zellen isoliert, die entweder anaerob auf Glucose oder Glycerin gewachsen waren (s. 2.5.1). Die RNA aus den auf Glucose gewachsenen Zellen diente dabei als Negativkontrolle, da unter diesen Bedingungen die Gene des *dha*-Regulons nicht exprimiert werden (FORAGE und FOSTER, 1979; RUCH et al., 1974) und die Enzymaktivitäten der vier Schlüsselenzyme nicht nachweisbar sind (MÜLLER, 1990). Alle Kulturen wurden in der späten logarithmischen Phase geerntet, da unter diesen Bedingungen die spezifischen Aktivitäten der Glycerin-Dehydratase und der 1,3-Propandiol-Dehydrogenase am höchsten sind.

Die isolierte RNA wurde nach der Reinigung zur Abtrennung von DNA und niedermolekularer RNA (tRNA und 5S rRNA) einer Lithiumchloridfällung unterzogen (s. 2.4.3.3). Die Übertragung der RNA auf Nylonmembranen und die Hybridisierungen erfolgten wie unter 2.9.2 und 2.10.1 beschrieben. Für die Northern-Blot-Analyse wurden Sonden gegen *dhaB*, *dhaE*, *dhaF*, *dhaG* und *dhaT* verwendet. Die Sonden gegen *dhaB*, *dhaE*, *dhaF* und *dhaG* wurden mittels PCR hergestellt (s. 2.12). Die Bedingungen der verschiedenen PCR-Reaktionen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Die *dhaT*-Sonde (1219 bp) wurde durch Restriktionsverdau des Plasmids pRD14 (s. 2.1) mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Hind*III hergestellt.

Tabelle 7: Bedingungen der PCR-Reaktionen zur Herstellung verschiedener DNA-Sonden

Die jeweiligen PCR-Reaktionen wurden nach insgesamt 35 Zyklen beendet.

Sonde gegen:	Primer	DNA-Matrize	Annealing	Ketten- verlängerung	Größe der Sonde
<i>dhaB</i>	dhaBCf1	pMS2	60°C	72°C	1729 bp
	dhaBCf2		1 min	2,5 min	
<i>dhaE</i>	dhaECf1	pMS2	60°C	72°C	493 bp
	dhaECf2		1 min	1 min	
<i>dhaF</i>	dhaFCf1	pRD1	60°C	72°C	1835 bp
	dhaFCf2		1 min	2 min	
<i>dhaG</i>	dhaGCf1	pRD1	60°C	72°C	399 bp
	dhaGCf2		1 min	1 min	

Die Northern-Blot-Analyse zeigte, daß die Gene *dhaG*, *dhaF* und *dhaT* und die Gene, die für die kleine und große Untereinheit der Glycerin-Dehydratase kodieren (*dhaB* und *dhaE*) nur in den auf Glycerin gewachsenen Zellen transkribiert wurden (s. Abbildung 13). Dagegen konnte wie erwartet kein signifikantes Hybridisierungssignal bei der RNA aus Glucose-gewachsenen Zellen detektiert werden. Im Fall der Sonden gegen *dhaB*, *dhaE* und *dhaG* trat ein Signal bei einer Länge von 4400 bp auf. Dies entspricht einem gemeinsamen Transkript aus den drei Strukturgenen der Glycerin-Dehydratase (*dhaB*, *dhaC* und *dhaE*) und *dhaF* (s. Abbildung 13). SEYFRIED et al. (1996) hatten jedoch gezeigt, daß *dhaF* nicht für eine weitere Untereinheit der Glycerin-Dehydratase kodiert. Bei den Sonden gegen *dhaG* und *dhaT* wurde ein Transkript mit einer Länge von 2400 bp identifiziert. Dieses deutet auf ein gemeinsames Transkript aus den beiden Genen zusammen mit *dhaH* und *dhaI* hin (s. Abbildung 13).

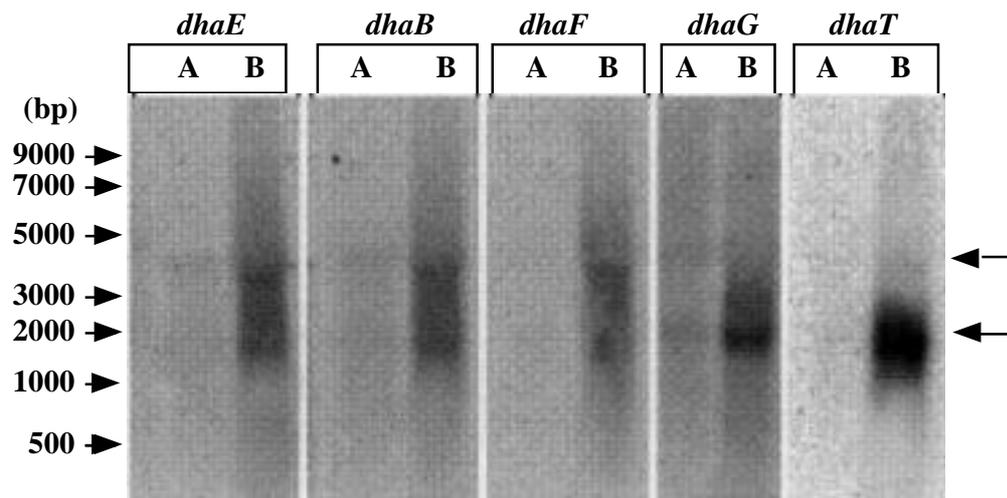


Abbildung 13: Hybridisierung der DNA-Sonden *dhaB*, *dhaE*, *dhaG*, *dhaF* und *dhaT* mit Gesamt-RNA aus Glucose (A)- oder Glycerin (B)- gewachsenen Zellen von *C. freundii*.

Für jedes Experiment wurden 15 µg der isolierten Gesamt-RNA genutzt. Pfeile weisen auf die Lage und Größe der Transkripte hin.

Wie anhand der genetischen Organisation (s. Abbildung 12) erwartet, konnte mit Hilfe der Transkriptionsanalysen gezeigt werden, daß *dhaF* und *dhaG* in verschiedenen Transkriptionseinheiten lokalisiert sind. Beide Gene werden jedoch zusammen mit den Genen für die Schlüsselenzyme des reduktiven Zweiges der Glycerinfermentation exprimiert. *DhaF* bildet dabei eine Transkriptionseinheit mit den drei Strukturgenen der Glycerin-Dehydratase. *DhaG* wird zusammen mit dem Gen für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase transkribiert.

3.5.2 Transkriptionsanalyse von *dhaF* und *dhaG* aus *Cl. pasteurianum*

Für die Transkriptionsanalysen wurde Gesamt-RNA aus auf Glucose oder Glycerin anaerob gewachsenen *Cl. pasteurianum*-Zellen isoliert (s. 2.5.1). Auch hier diente die RNA aus Glucose-gewachsenen Zellen als Negativkontrolle. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden wie unter 3.5.1 bereits beschrieben durchgeführt. Die Konstruktion der Sonden gegen *dhaB*, *dhaF*, *dhaG* und *dhaT* erfolgte wie in Tabelle 8 dargestellt durch Restriktionsverdauung verschiedener Plasmide (s. 2.7.1).

Tabelle 8: Verwendete Restriktionsenzyme und Plasmide zur Herstellung verschiedener DNA-Sonden

Sonde gegen:	Plasmid	verwendete Restriktionsenzyme	Länge der Sonde (bp)
<i>dhaB</i>	pLM3	<i>HindIII</i>	838
<i>dhaF</i>	pCS200	<i>BamHI/ HindIII</i>	1553
<i>dhaG</i>	pCS200	<i>AccI</i>	327
<i>dhaT</i>	pFL1	<i>NsiI</i>	1173

Die Analyse des Northern-Blots ergab auch bei der RNA aus *Cl. pasteurianum*, daß die Gene für den reduktiven Zweig des Stoffwechselwegs nur bei Zugabe von Glycerin als Substrat transkribiert wurden (s. Abbildung 14). Wie erwartet konnte bei der RNA aus Glucose-gewachsenen Zellen kein Signal detektiert werden. Der Northern-Blot zeigte durch das Auftreten eines Signals > 9 kb, daß die Gene der Glycerin-Dehydratase, *dhaF*, *dhaG* und das Gen für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase gemeinsam transkribiert werden. Eine Verunreinigung der RNA-Proben durch DNA kann aufgrund der durchgeführten Lithiumchloridfällung ausgeschlossen werden. Die beiden Signale zwischen 5 und 3 kb zeigten das typische Muster clostridieller rRNA und stellten somit keine spezifischen Hybridisierungssignale dar. Im Gegensatz zu *C. freundii* sind bei *Cl. pasteurianum* die beiden Gene *dhaG* und *dhaF* auf einer Transkriptionseinheit lokalisiert.

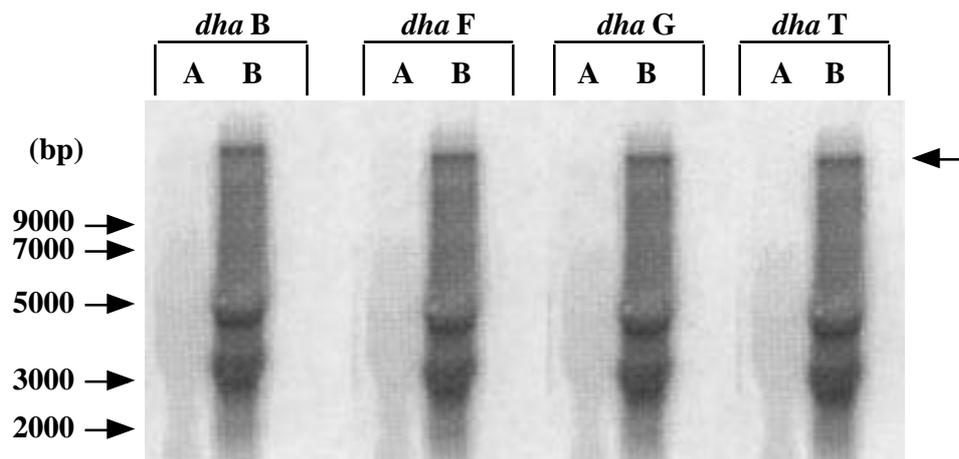


Abbildung 14: Hybridisierung der DNA-Sonden *dhaB*, *dhaE*, *dhaG*, *dhaF* und *dhaT* mit Gesamt-RNA aus Glucose (A)- oder Glycerin (B)- gewachsenen Zellen von *Cl. pasteurianum*.

Für jedes Experiment wurden 15 µg der isolierten Gesamt-RNA genutzt. Pfeile weisen auf die Lage und Größe der Transkripte hin.

3.5.3 Heterologe Expression und Reinigung von DhaF und DhaG aus *C. freundii*

Aus den Transkriptionsanalysen (s. 3.5.1) wurde ersichtlich, daß die drei Strukturgene der Glycerin-Dehydratase und *dhaF* aus *C. freundii* ein gemeinsames Transkript bilden. Dies verstärkte die Vermutung, daß DhaF in die Reaktivierung des Enzyms involviert ist. Dagegen wird *dhaG* zusammen mit dem Gen für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase transkribiert. Da letztere jedoch wie die Glycerin-Dehydratase im reduktiven Zweig der Glycerin-fermentation aktiv ist, könnte auch DhaG an einer Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase beteiligt sein. Daher sollten die beiden Proteine DhaF und DhaG heterolog produziert und in Bezug auf eine Beteiligung an der Reaktivierung untersucht werden.

3.5.3.1 Heterologe Expression von *dhaF* mit dem Expressionsvektor pKK223-3

Zur Expression von *dhaF* wurde das Gen mittels PCR wie unter 3.5.1 beschrieben amplifiziert. Das gebildete PCR-Produkt wies eine Länge von 1835 bp auf. Zur späteren schnellen Reinigung des Genprodukts wurde wie bei der Glycerin-Dehydratase (s. 3.2.2.1) während der PCR am 3'-Ende des *dhaF*-Gens die Sequenz für einen His₆-Tag angefügt. Desweiteren wurden sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende *EcoRI*-Schnittstellen eingeführt, die eine Klonierung in den Vektor pKK223-3 ermöglichten (s. Abbildung 13). Da bei diesem Vektorsystem nach der Transformation in *E. coli* JM109 die Identifizierung von Insert-tragenden Plasmiden durch den X-Gal-Test (s. 2.8.6) nicht möglich war, erfolgte die Identifizierung mittels Koloniehybridisierung mit einer Sonde gegen *dhaF* (s. 3.5.1) und anschließender Autoradiographie (s. 2.11). Die auf diese Weise identifizierten rekombinanten Klone wurden zur weiteren Überprüfung einer Plasmidpräparation und einem anschließenden Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI unterzogen. Das resultierende und durch Sequenzierung überprüfte Plasmid wurde als pCS100 bezeichnet.

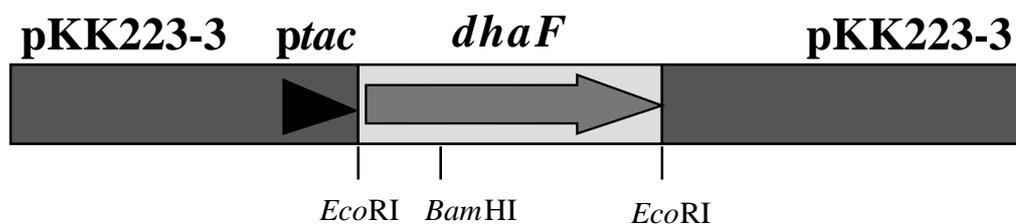


Abbildung 15: Schematische Darstellung von pCS100

Das grau hinterlegte Gen besitzt am 3'-Ende eine Sequenz für einen His₆-Tag.

Die heterologe Expression des *dhaF*-Gens aus *C. freundii* konnte direkt in *E. coli* JM109/pCS100 erfolgen. Für die Transkription, die unter Kontrolle des *tac*-Promotors steht, wird die wirtseigene RNA-Polymerase genutzt. Die Induktion der Transkription erfolgte durch Zugabe von IPTG zum Medium. Zellanzucht, Induktion mit IPTG und anschließende Inkubation bei 30°C erfolgten wie unter 2.3.3.1 beschrieben. Nach Induktion des Gens trat

eine Wachstumsverzögerung ein. Die Trennung der Rohextrakte durch SDS-PAGE zeigte eine starke heterologe Produktion von DhaF. Mit fortschreitender Inkubationsdauer nach der Induktion trat eine deutliche Bande mit einer Molekularmasse von 64 kDa auf. Diese stimmte mit der vom *dhaF*-Gen abgeleiteten Molekularmasse überein.

3.5.3.2 Heterologe Expression von *dhaG* mit dem Expressionsvektor pKK223-3

Zur heterologen Expression des *dhaG*-Gens sollte dieses ebenfalls in den Vektor pKK223-3 kloniert werden. Die Amplifizierung des *dhaG*-Gens und die Einführung eines His₆-Tags erfolgten mittels PCR mit den Primerpaaren „dhaGCf1“ und „dhaGCf2“. Im Rahmen der PCR wurde am 5'-Ende des Gens eine *EcoRI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle eingeführt. Diese ermöglichten eine Klonierung in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pKK223-3. Als DNA-Matrize für die Amplifikation diente das gereinigte Plasmid pRD1 (s. 2.1). Die PCR erfolgte wie unter 3.5.1 bereits beschrieben. Das PCR-Produkt (399 bp) wurde nach einer Reinigung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend in den entsprechend geschnittenen Vektor pKK223-3 ligiert (s. Abbildung 16). Nach Transformation des Ligationsansatzes in den *E. coli*-Stamm JM109 erfolgte die Selektion positiver rekombinanter Klone durch Koloniehybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *dhaG* (s. 3.5.1). Das dabei identifizierte Plasmid wurde durch Sequenzierung überprüft und mit pCS110 bezeichnet (s. Abbildung 16).

Die anschließende Expression des Gens erfolgte in *E. coli* JM109/pCS110 unter den bereits beschriebenen Bedingungen (s. 3.2.2). Im Gegensatz zur Expression von *dhaF* (s. 3.5.3.1) konnte bei der Analyse der Rohextrakte nach Induktion der Expression mittels SDS-PAGE auch nach Variation der Anzuchtbedingungen keine signifikante Produktion von DhaG beobachtet werden.

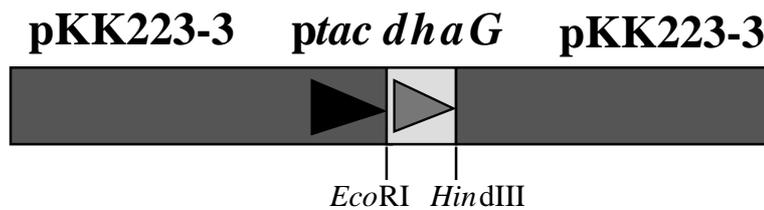


Abbildung 16: Schematische Darstellung von pCS110

Das grau hinterlegte Gen besitzt am 3'-Ende eine Sequenz für einen His₆-Tag.

3.5.3.3 Heterologe Expression des *dhaG*-Gens aus *C. freundii* mit dem Glutathion S-Transferase Genfusionssystem

Da die heterologe Expression des *dhaG*-Gens mit dem Expressionsvektor pKK223-3 sehr gering war (s. 3.5.3.2), sollte das *dhaG*-Gen mit dem Glutathion S-Transferase (GST) Genfusionssystem exprimiert und das entsprechende Genprodukt mittels einer Affinitätschromatographie an einer Glutathion Sepharose 4B gereinigt werden.

Das GST Genfusionssystem eignet sich für die Expression und Reinigung von in *E. coli* produzierten Fusionsproteinen. Der Vektor pGEX-2T ermöglicht es, Gene in Fusion mit der für den C-Terminus kodierenden Region des *gst*-Gens aus *Schistosoma japonicum* mit hoher Rate zu exprimieren (SMITH et al., 1988). Die Anreicherung der Fusionsproteine erfolgt dann mittels Affinitätschromatographie an Glutathion Sepharose 4B. Eine Abspaltung des gewünschten Proteins vom GST-Anteil wird durch eine Thrombin-Protease erreicht, deren Erkennungssequenz unmittelbar stromabwärts des *gst*-Gens lokalisiert ist.

Um eine Klonierung von *dhaG* in den Expressionsvektor pGEX-2T zu ermöglichen, wurde das Gen mittels PCR amplifiziert (s. 3.5.1). Im Zuge der PCR erfolgte die Einführung einer *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Eco*RI-Schnittstelle am 3'-Ende des *dhaG*-Gens. Hierfür wurden die Oligonukleotide „*dhaG*Cf-GST1“ und „*dhaG*Cf-GST2“ verwendet (s. 2.1). Um eine zusätzliche Reinigung durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose zu ermöglichen, wurde an das 3'-Ende die Sequenz für einen His₆-Tag eingeführt. Als DNA-Matrize für die Amplifikation diente das Plasmid pCS110 (s. 3.5.3.2).

Die Analyse des PCR-Produkts zeigte ein DNA-Fragment mit einer erwarteten Größe von 379 bp. Nach Reinigung des PCR-Produkts (s. 2.5.3.4) folgte ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI und eine Ligation in den entsprechend geschnittenen Vektor. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* JM109 transformiert. Aus den rekombinanten *E. coli*-Zellen wurden die Plasmide isoliert (s. 2.5.2.1) und zur Analyse einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Eco*RI unterzogen. Die Sequenzierung des so identifizierten rekombinanten Plasmids mit *dhaG* als Insert ergab, daß in der DNA-Sequenz des Amplifikats keine Veränderung aufgetreten war und daß sich das *dhaG*-Gen im korrekten Leserahmen zum *gst*-Gen befand. Das dabei erhaltene Plasmid wurde als pCS112 bezeichnet und ist in Abbildung 17 dargestellt.

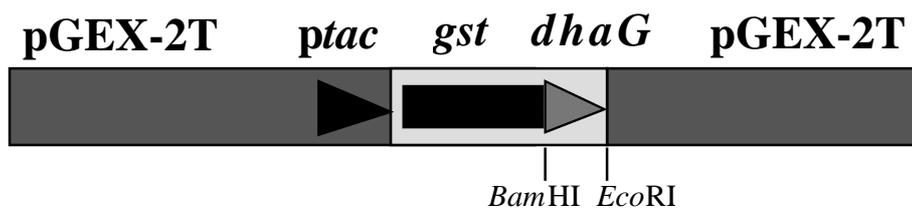


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Plasmids pCS112

Das grau hinterlegte Gen besitzt am 3'-Ende eine Sequenz für einen His₆-Tag.

Die heterologe Expression der *gst-dhaG*-Genfusion konnte direkt in dem zur Klonierung eingesetzten *E. coli*-Stamm JM109 unter den unter 2.3.3.3 beschriebenen Bedingungen erfolgen. Nach Induktion der Expression des Fusionsgens trat eine Retardierung des Wachstums ein. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, daß nach Zugabe von IPTG mit fortschreitender Inkubationsdauer eine Proteinbande mit einer Molekularmasse von 41 kDa an Intensität zunahm (s. Abbildung 18). Diese entsprach der kalkulierten Molekularmasse von GST-DhaG. Zusätzlich zu der erwarteten Proteinbande trat im Verlauf des Expressionsversuches eine Bande im Bereich von ca. 30 kDa hervor. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein vom Wirtstamm verstärkt gebildetes Protein als Folge der Akkumulation von Fremdproteinen.

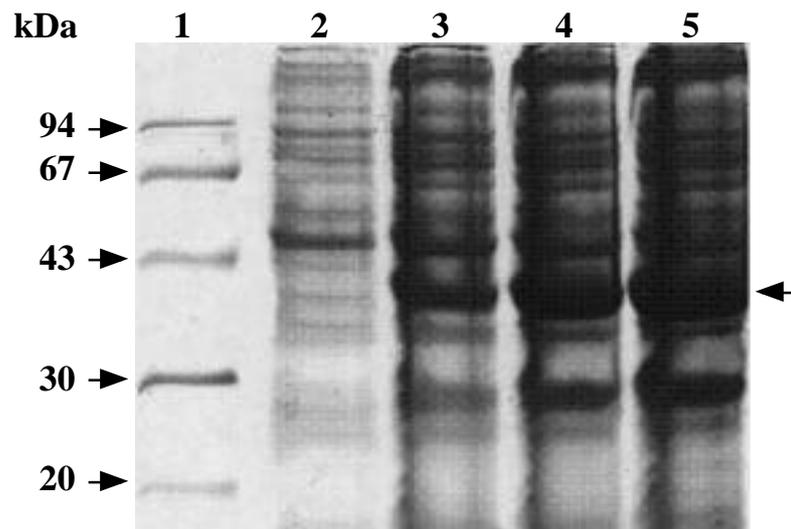


Abbildung 18: Analyse der Produktion des Fusionsproteins GST-DhaG durch SDS-PAGE

Zellanzucht und Induktion mit IPTG von *E. coli* JM109/pCS112 wurde wie unter 2.3.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE (s. 2.19.1) nach Färbung mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1). Die Zellpellets von *E. coli* JM 109/pCS112 wurden in Denaturierungspuffer aufgenommen.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Vor Induktion der Expression von *gst-dhaG*

Spur 3: 1 h nach Induktion der Expression von *gst-dhaG*

Spur 4: 2 h nach Induktion der Expression von *gst-dhaG*

Spur 5: 3 h nach Induktion der Expression von *gst-dhaG*

Das gebildete Protein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zur anschließenden Reinigung des Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie an Glutathion Sepharose 4B wurden die Zellen nach der Expression in KP-Puffer (100 mM, pH 8,0) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (s. 2.14.2). Nach Zentrifugation wurde der dabei erhaltene Überstand und das Pellet anhand einer SDS-PAGE analysiert. Dabei zeigte sich, daß sich die Hauptmenge des Fusionsproteins im Pellet befand. Dies ließ auf die Bildung unlöslicher Aggregate („inclusion bodies“) schließen. Die Bildung solcher unlöslicher Aggregate im Cytoplasma ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei heterologer Genexpression (MARSTON et al., 1984). Die Aggregate sedimentieren bereits bei niedertouriger Zentrifugation nach dem Zellaufschluß zusammen mit den Zelltrümmern und bieten prinzipiell somit ein vereinfachtes Reinigungsverfahren. Diesem Vorteil stehen allerdings in den meisten Fällen Schwierigkeiten bei der Rückfaltung

des Proteins in den nativen Zustand gegenüber (RUDOLPH und LILIE, 1996). Ferner ist fraglich, ob das rückgefaltete Protein seine biologische Aktivität wiedererlangt. Dies stellt vor allen Dingen bei Proteinen ein großes Problem dar, deren biologische Aktivität wie in diesem Fall nicht bekannt ist. Von einer Solubilisierung dieser „inclusion bodies“ durch Behandlung mit 8 M Harnstoff wurde daher abgesehen. Da die Bildung von „inclusion bodies“ eine Reinigung des Proteins erschwerte, wurde eine weitere Methode zur heterologen Expression des *dhaG*-Gens entwickelt.

3.5.3.4 Heterologe Expression des *dhaG*-Gens aus *C. freundii* mit dem pET-System

Da es bei der heterologen Produktion von Gst-DhaG zur Bildung von „inclusion bodies“ kam, die eine Reinigung des Fusionsproteins erschwerten (s. 3.5.3.3), wurde *dhaG* alternativ mit einem pET-Vektor-System exprimiert.

Das pET-System ist ein häufig verwendetes System zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*. Bei diesem System kloniert man das gewünschte Gen in pET-Vektoren und exprimiert es mit Hilfe des T7-RNA-Polymerase/Promotorsystems. Der für die Expression verwendete Stamm trägt das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Gen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, der durch IPTG induziert werden kann. Der verwendete Expressionsvektor pET19b hat eine Größe von 5717 bp. Der Vektor verfügt über den His₆-Tag, so daß das produzierte Protein über diesen N-terminal verfügt. Damit war eine schnelle Reinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose möglich.

Für die Klonierung des *dhaG*-Gens in den Vektor pET19b wurde das *dhaG*-Gen über PCR mit dem Primern „dhaGCf-pET1“ und „dhaGCf-pET2“ (s. 2.1) sowie dem Plasmid pCS110 als Matrize amplifiziert. Die Anlagerung der Primer erfolgte für jeweils 1 min bei 50°C. Es schloß sich die Polymerisation der DNA bei 72°C für 1 min an, wobei 30 Zyklen durchlaufen wurden. Zur Klonierung in den Vektor pET19b wurde im Rahmen der PCR am 5'-Ende des amplifizierten Fragments eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NdeI* und am 3'-Ende eine Erkennungssequenz für *BamHI* eingeführt. Das gereinigte 362 bp große PCR-Fragment wurde ebenso wie der Vektor mit *NdeI* und *BamHI* verdaut und nach

3.5.3.5 Heterologe Koexpression der Gene *dhaF* und *dhaG* mit dem Expressionsvektor pKK223-3

Zur heterologen Koexpression der Gene *dhaF* und *dhaG* wurden diese gemeinsam unter die Kontrolle des *tac*-Promotors des Vektors pKK223-3 gestellt. Als Ausgangsplasmid diente pCS100, in das über die *EcoRI*-Schnittstelle das *dhaF*-Gen inseriert war (s. 3.5.3.2). Dieses Insert wurde durch einen *EcoRI*-Verdau aus dem Vektor herausgeschnitten und in das entsprechend linearisierte Plasmid pCS110 ligiert, in welchem das *dhaG*-Gen über die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen im Vektor pKK223-3 vorlag (s. 3.5.3.2). Nach Ligation des *dhaF*-Gens in das Plasmid pCS110 erfolgte die Selektion rekombinanter Plasmide, die sowohl das *dhaF* und *dhaG*-Gen als Insert besaßen mittels Koloniehybridisierung mit einer Sonde gegen *dhaF* (s. 3.5.1). Zur Überprüfung der korrekten Orientierung des *dhaF*-Gens zum *tac*-Promotor des Vektors wurden die bei der Koloniehybridisierung identifizierten rekombinanten Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und sequenziert. Auf diese Weise wurden die erwünschten rekombinanten Plasmide, die beide Gene trugen, erhalten. Das für die weiteren Untersuchungen verwendete Plasmid wurde als pCS111 bezeichnet (s. Abbildung 20).

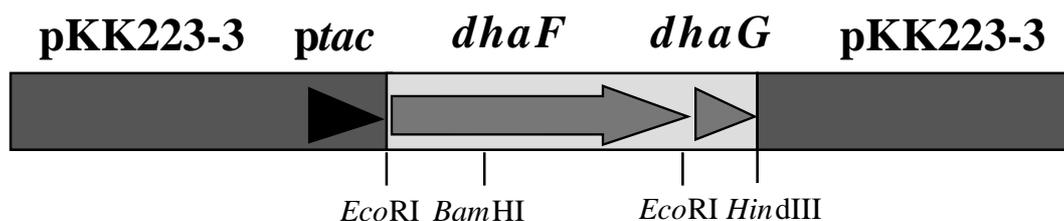


Abbildung 20 : Schematische Darstellung von pCS111

Die grau hinterlegten Gene besitzen am 3'-Ende eine Sequenz für einen His₆-Tag.

Zur heterologen Koexpression der Gene *dhaF* und *dhaG* wurde das Plasmid pCS111 in *E. coli* JM109 transformiert. Die Expressionversuche wurden anschließend wie unter 2.3.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Genexpression konnte durch Analyse der Rohextrakte durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Mit fortschreitender Inkubationsdauer nach der

Induktion traten zwei deutliche Banden mit Molekularmassen von 64 und 14 kDa auf, die mit den abgeleiteten Molekularmassen übereinstimmten.

3.5.3.6 Reinigung von DhaF, DhaG und DhaFG aus *C. freundii* mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Im weiteren wurde eine Reinigung von DhaF, DhaG und dem Komplex aus beiden Proteinen über den im Zuge der Klonierung angefügten His₆-Tag mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt.

Die aus den Expressionsversuchen erhaltenen Zellen wurden nach Induktion und 3-stündiger Inkubation geerntet, in 5 bis 30 ml KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen (s. 2.14.2). Nach der Zentrifugation wurden 5 ml des so erhaltenen Rohextrakts auf eine mit Zellaufschlußpuffer äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose (s. 2.16.1) aufgetragen. Die Reinigung erfolgte analog zur Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* (s. 3.2.3). Auch bei den Reinigungen von DhaF, DhaG und DhaFG wurden statt der vom Hersteller beschriebenen Puffer K⁺-haltige verwendet.

In Abbildung 21A ist die Reinigung des *dhaF*-Genprodukts über Affinitätschromatographie dargestellt. Es wurde ein homogenes DhaF-Protein mit einer Molekularmasse von 64 kDa erhalten (s. Abbildung 21A; Spur 8). Die Identität der Bande konnte durch Western-Blot-Analyse (s. 2.21.1) mit einem gegen den His₆-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen werden (s. Abbildung 24). Unter nativen Bedingungen bildet DhaF ein Dimer mit einer Molekularmasse von ca. 120 kDa (s. Abbildung 21; B). Diese Masse konnte auch durch Bestimmung mittels Gelfiltration bestätigt werden (s. 3.6.3).

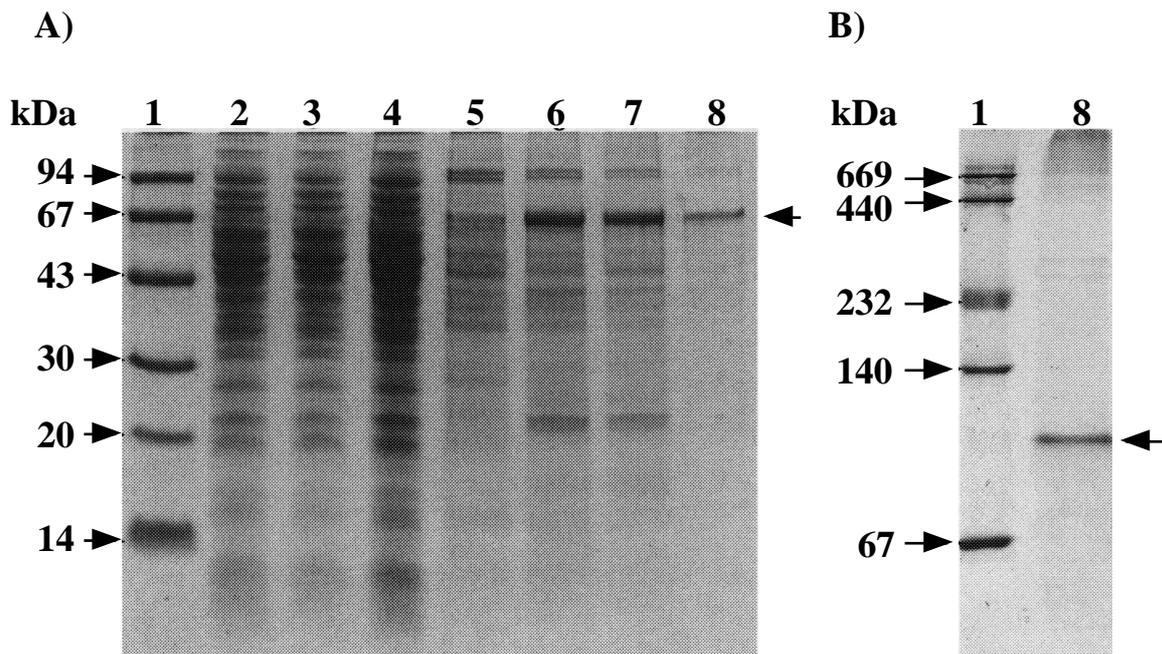


Abbildung 21: Analyse der Reinigung von DhaF mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose durch SDS-PAGE (A) und native PAGE (B)

(A) SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau wurden wie unter 2.19.1 und 2.20.1 beschrieben durchgeführt.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS100

Spur 3: Durchlauf

Spur 4 & 5: Waschschrift mit 10 mM Imidazol

Spur 6 & 7: Waschschrift mit 20 mM Imidazol

Spur 8: Eluat mit 250 mM Imidazol

(B) Gereinigtes DhaF-Protein (2 μg) wurde durch native Gradienten-PAGE (s. 2.19.3) analysiert. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1).

Spur 1: Markerproteine

Spur 8: gereinigtes DhaF

Das produzierte Protein ist durch einen Pfeil markiert.

Für die Reinigung von DhaG wurden die Rohextrakte aus den Expressionen mit den Vektoren pKK223-3 (s. 3.5.3.2) und pET19b (s. 3.5.3.4) eingesetzt. Im Gegensatz zu DhaF, konnte in beiden Fällen DhaG durch eine Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose nur partiell gereinigt werden. Das Eluat (s. Abbildung 22A; Spur 6) beinhaltete trotz der Waschschriffe mit 10 und 20 mM Imidazol (s. Abbildung 22; Spur 4 & 5) noch Fremdprotein. Ein weiterer Waschschrift mit einem Puffer, der 40 mM Imidazol enthielt,

erbrachte keine weitere Trennung von Fremdprotein. Die Identität der DhaG-Bande wurde wie bei DhaF durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen (s. Abbildung 22; B). Das partiell gereinigte Enzym wurde für die folgenden Reaktivierungsversuche eingesetzt.

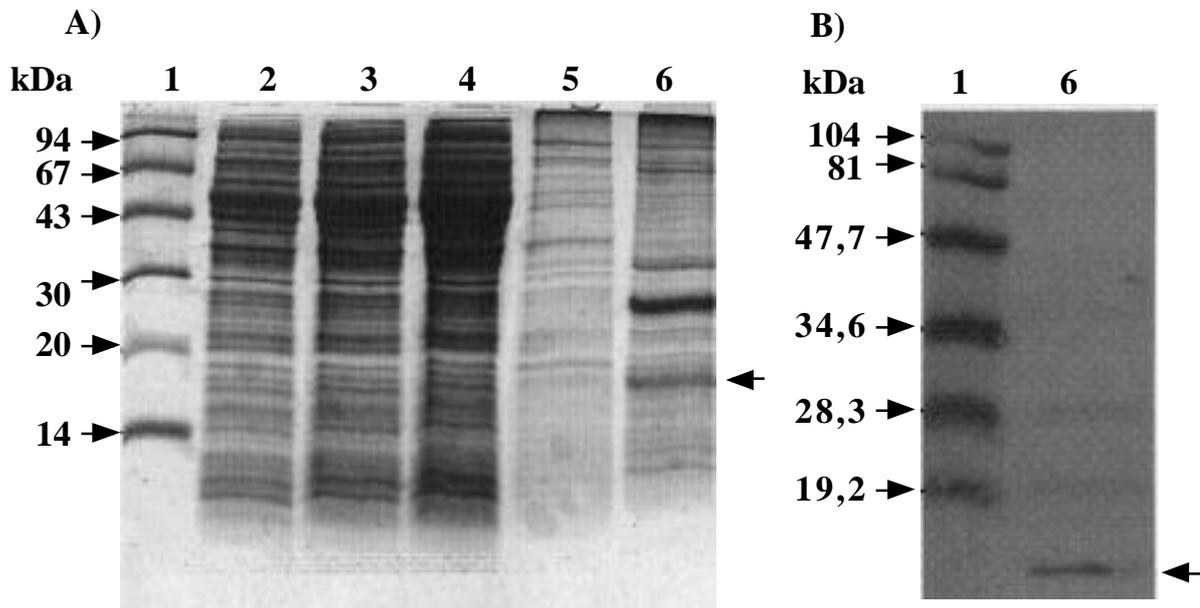


Abbildung 22: Analyse der partiellen Reinigung von DhaG mittels Affinitätschromatographie durch SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B)
 (A) SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau wurden wie unter 2.19.1 und 2.20.1 beschrieben durchgeführt.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS110

Spur 3: Durchlauf

Spur 4: Waschschrift mit 10 mM Imidazol

Spur 5: Waschschrift mit 20 mM Imidazol

Spur 6: Eluat mit 250 mM Imidazol

(B) Nachweis des N-terminalen His₆-Tags von DhaG mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Konjugatfärbung

Dargestellt ist eine Ni²⁺-NTA-Konjugat gefärbte PVDF-Membran (s. 2.22.1) nach Transfer der Proteine aus einem 15 % igen SDS-Gel (s. 2.19.1).

Spur 1: Markerproteine

Spur 6: gereinigtes DhaG

Das produzierte Protein ist durch einen Pfeil markiert.

Die beiden Gene *dhaF* und *dhaG* wurden mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm JM109/pCS111 koexprimiert (s. 3.5.3.1). Sowohl DhaF als auch DhaG besitzen einen N-terminalen His₆-Tag. Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

konnte der DhaFG-Komplex bis zur Homogenität gereinigt werden (s. Abbildung 23A; Spur 6). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte zwei Banden mit den erwarteten Molekularmassen von 64 und 14 kDa.

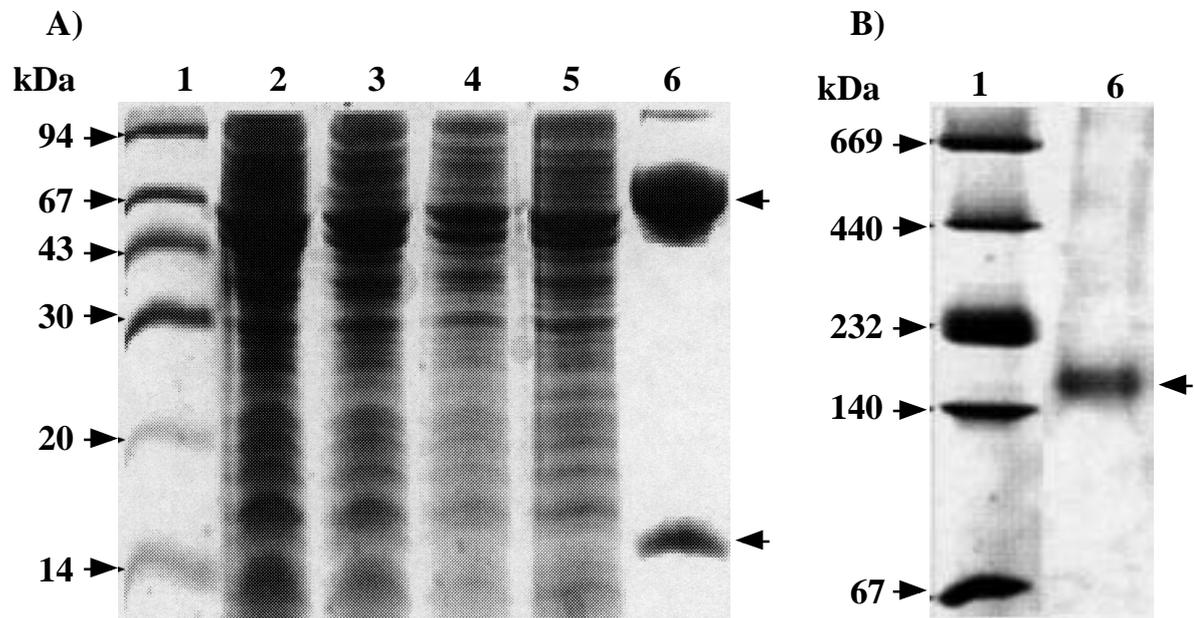


Abbildung 23: Analyse der Reinigung von DhaFG mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose durch SDS-PAGE (A) und native PAGE (B)

(A) SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau wurden wie unter 2.19.1 und 2.20.2 beschrieben durchgeführt.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS111

Spur 3: Durchlauf

Spur 4: Waschschrift mit 10 mM Imidazol

Spur 5: Waschschrift mit 20 mM Imidazol

Spur 6: Eluat mit 250 mM Imidazol

(B) Der gereinigte DhaFG-Komplex wurde durch native Gradienten-PAGE analysiert (s. 2.19.3). Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1).

Spur 1: Markerproteine

Spur 6: gereinigter DhaFG-Komplex

Die produzierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Ein identisches Resultat wurde durch Western-Blot-Analyse mit einem gegen den His₆-Tag gerichteten Antikörper erzielt (s. Abbildung 24).

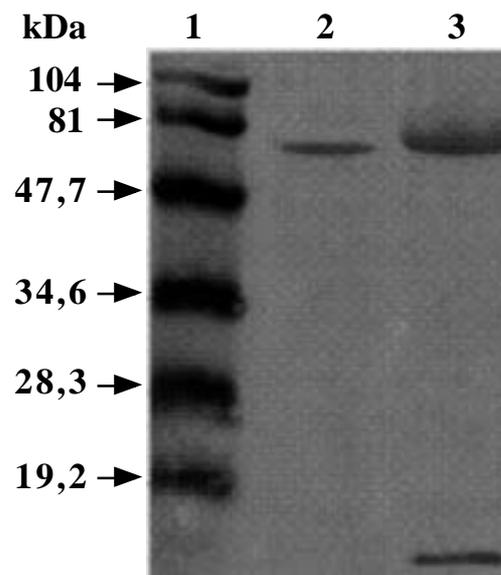


Abbildung 24: Nachweis des N-terminalen His₆-Tags der gereinigten Proteine DhaF und DhaFG mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Konjugat-Färbung

Dargestellt ist eine Ni²⁺-NTA-Konjugat gefärbte PVDF-Membran (s. 2.22.1) nach Transfer der Proteine aus einem 15 % igen SDS-Gel (s. 2.19.1).

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: gereinigtes DhaF

Spur 3: gereinigter Komplex aus DhaFG

Im nativen Zustand bilden die koexprimierten gereinigten Proteine DhaF und DhaG einen dimeren Komplex aus $\alpha_2\beta_2$ mit einer Molekularmasse von ca. 150 kDa (s. Abbildung 23; B).

Diese Masse wurde durch Gelfiltration bestätigt (s. 3.6.3).

3.5.4 Heterologe Expression und Reinigung von DhaF und DhaG aus *Cl. pasteurianum*

Die Transkriptionsanalysen bei *Cl. pasteurianum* (s. 3.5.2) hatten zu dem Ergebnis geführt, daß *dhaF* und *dhaG* zusammen mit den Genen transkribiert werden, die für die Schlüsselenzyme des reduktiven Zweigs der Glycerinfermentation kodieren. Anhand dieser Ergebnisse kann daher vermutet werden, daß DhaF und DhaG an einer möglichen Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase beteiligt sind. Daher sollten *dhaF* und *dhaG* zur

Untersuchung ihrer biologischen Funktion heterolog exprimiert und das entsprechende Genprodukt anschließend gereinigt werden.

Aus *C. freundii* konnten bereits die Gene *dhaF* und *dhaG* heterolog nach Inserierung in den Vektor pKK223-3 in *E. coli* koexprimiert (s. 3.5.3.5) und der Komplex aus beiden Proteinen durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt werden (s. 3.5.3.6). Daher sollte diese Vorgehensweise auch zur heterologen Koexpression von *dhaFG* aus *Cl. pasteurianum* und Reinigung des Komplexes aus beiden Proteinen angewendet werden.

Da das *dhaG*-Gen stromabwärts des *dhaF*-Gens lokalisiert ist, konnten die beiden Gene mit den Oligonukleotiden „dhaFCp1“ und „dhaGCp2“ zusammen amplifiziert werden. Als DNA-Matrize diente das Plasmid pFL1. Das Annealing erfolgte jeweils für 1 min bei 50°C. Die Kettenverlängerung wurde bei 72°C für 3 min durchgeführt. Nach 30 Zyklen wurde die PCR abgestoppt, und die Produkte wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert (s. 2.6.1). Mit der so durchgeführten PCR konnte ein DNA-Fragment mit einer Größe von 2243 bp hergestellt werden. Die Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pKK223-3 erfolgte durch die bei der PCR angehängten *SmaI*-Schnittstellen. Ferner wurde die Sequenz für einen His₆-Tag am 3'-Ende von *dhaG* angehängt. Nach einem Restriktionsverdau mit *SmaI* und entsprechenden Reinigungsschritten wurde das PCR-Produkt in den entsprechend linearisierten Vektor pKK223-3 ligiert (s. 2.7.3). Nach Transformation des Ligationsansatzes in den *E. coli*-Stamm JM109 erfolgte die Selektion rekombinanter Klone zunächst anhand eines Vergleichs der Plasmidgröße mit dem Ursprungplasmid pKK223-3. Die Plasmide, die ein Insert trugen, wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Dadurch konnte die Inserierung von *dhaFG* und die kolineare Orientierung zum *tac*-Promotor festgestellt werden. Positive Klone wurden zur weiteren Analyse sequenziert. Das so erhaltene rekombinante Plasmid wurde mit pCS211 bezeichnet (s. Abbildung 25).

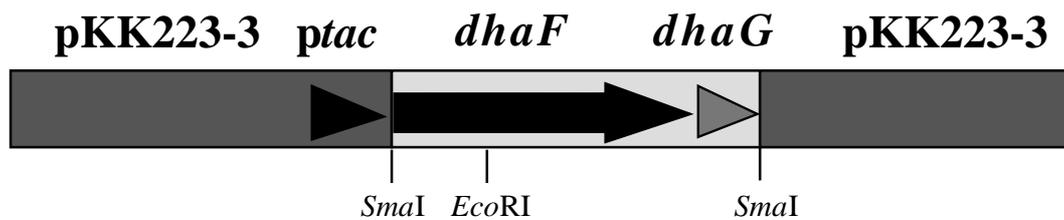


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Plasmids pCS211

Das grau hinterlegte Gen besitzt am 3'-Ende eine Sequenz für einen His₆-Tag.

Die heterologe Expression erfolgte zunächst in *E. coli* JM109 mit dem Plasmid pCS211 analog zu Expression der *dhaFG*-Gene aus *C. freundii* (s. 3.5.3.5). Die Induktion der Transkription wurde durch Zugabe von IPTG zum Medium eingeleitet. Die Analyse des Proteinmusters vor und nach der Induktion der Expression von *dhaFG* durch SDS-PAGE ergab, daß auch 3 h nach der Inkubation keine zusätzlichen Banden im erwarteten Molekularmassenbereich von 64 bzw. 14 kDa zu verzeichnen waren. Dies deutete auf eine geringe heterologe Produktion von DhaFG aus *Cl. pasteurianum* hin.

Viele Versuche, Gene aus Clostridien in *E. coli* mit hoher Rate zu exprimieren, schlugen aufgrund des ungewöhnlich hohen AT-Gehalts der clostridialen DNA im Vergleich zu der aus *E. coli* ebenfalls fehl. MAKOFF et al. (1989) konnten ein Tetanus-Toxin-Fragment des clostridialen Neurotoxins in *E. coli* erfolgreich synthetisieren, indem sie die Sequenzen für von *E. coli* selten genutzte Kodons durch häufig genutzte austauschten. Einige Gruppen konnten zeigen, daß selten genutzte Kodons einen entscheidenden Effekt auf die Translationseffizienz von rekombinanten Genen in *E. coli* haben (DEL TITO et al., 1995; GOLDMANN et al., 1995; SPANJAARD et al., 1990). Studien haben bewiesen, daß die Kodons ATA, AGA und CTA selten in *E. coli* verwendet werden. Dagegen sind diese Kodons in clostridialen Genen sehr verbreitet. ZDANOVSKY und ZDANOSKAIA (2000) amplifizierten in *E. coli* die Gene *ileX*, *argU* und *leuW*, die für tRNAs der selten genutzten Kodons ATA, AGA und CTA kodieren. Dies führte zur Verbesserung der heterologen Proteinproduktion.

Im Vergleich zu den Genen *dhaFG* aus *C. freundii* treten die Kodons ATA, AGA und CTA in den entsprechenden Genen in *Cl. pasteurianum* häufig auf. Das Kodon AGA kommt in

dhaFG aus *Cl. pasteurianum* 23 mal vor, bei *C. freundii* dagegen nur einmal. Der größte Unterschied besteht jedoch bei der Nutzung des Kodons ATA. Dieses tritt bei den Genen *dhaFG* aus *Cl. pasteurianum* 54 mal auf, bei *C. freundii* nur 2 mal. Es erschien daher sinnvoll, für die heterologe Expression der *dhaFG*-Gene aus *Cl. pasteurianum* einen *E. coli*-Stamm zu nutzen, der zusätzliche Kopien für die Gene *ileX*, *argU* und *leuW* besitzt. Daher wurde für die weiteren Expressionsversuche das Plasmid pCS211 in den *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (s. 2.1) transformiert, der die entsprechenden tRNA-Gene plasmid-kodiert und IPTG-induziert trägt. Die heterologe Expression der *dhaFG*-Gene aus *Cl. pasteurianum* erfolgte anschließend unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben. Nach Induktion der Expression der *dhaFG*-Gene durch Zugabe von IPTG konnte jedoch nach Analyse der Rohextrakte mittels SDS-PAGE auch in diesem Fall keine signifikante Produktion des DhaFG-Komplexes beobachtet werden. Trotzdem wurde eine Reinigung der *dhaFG*-Genprodukte mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose analog zu 3.5.3.6 durchgeführt. Zusätzlich wurde auch der Rohextrakt aus den Zellen der Expression mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm JM 109/pCS211 über Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt. Die anschließende Analyse der Reinigung mittels SDS-PAGE zeigte, daß DhaFG aus *Cl. pasteurianum* in beiden Fällen nur partiell gereinigt vorlag (s. Abbildung 26). Es konnte mit dem Rohextrakt der rekombinanten *E. coli*-Zellen BL21-CodonPlus(DE3)-RIL/pCS211 eine bessere Anreicherung der DhaFG-Proteine erzielt werden. Diese Anreicherung wurde zu Untersuchungen zur Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* eingesetzt (s. 3.5.6).

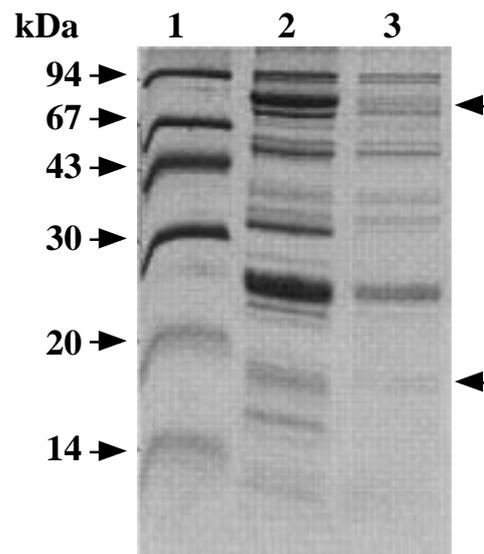


Abbildung 26: Analyse der partiellen Reinigung von DhaFG mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose durch SDS-PAGE. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie-Blau wurden wie unter 2.19.1 und 2.20.1 beschrieben durchgeführt.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Eluat aus Rohextrakt der Expression mit *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL/pCS211

Spur 3: Eluat aus Rohextrakt der Expression mit *E. coli* JM109/pCS211

3.5.5 Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*

Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* unterliegt einer schnellen „Suicide“-Inaktivierung durch ihr Substrat Glycerin (s. 3.4). Desweiteren wird das Enzym durch O_2 und Cyano- B_{12} inaktiviert (Wagner et al., 1966). In den folgenden Versuchen sollten die Proteine DhaF, DhaG und der Komplex aus beiden Proteinen auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die inaktivierte Dehydratase zu reaktivieren.

3.5.5.1 Reaktivierung von Glycerin-inaktivierter Glycerin-Dehydratase

Zur Untersuchung der Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase wurde das Enzym (1 mg; s. 3.2.3) durch die Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ Coenzym B_{12} bei 37°C für 30 min in Gegenwart von 30 % Glycerin inaktiviert (s. 2.18). Mittels einer Gelfiltration an einer PD10-Säule

(s. 2.16.3) wurde anschließend ungebundenes Coenzym B₁₂ und Glycerin abgetrennt. Das so inaktivierte Enzym wies nahezu keine detektierbare Aktivität auf (s. Abbildung 27; A) und wurde für die folgenden Reaktivierungsversuche eingesetzt.

Zur Bestimmung der Reaktivierung der inaktiven Dehydratase wurde 1,2-Propandiol als Substrat genutzt, da das Enzym während der Katalyse von 1,2-Propandiol keiner signifikanten Inaktivierung unterliegt (s. 3.4). Der Reaktivierungsansatz enthielt ATP/MgCl₂ und Coenzym B₁₂, da der Reaktivierungsfaktor der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* nur unter diesen Bedingungen aktiv war (TORAYA und MORI, 1999). Im Gegensatz dazu wurden jedoch 12 mM anstelle von 24 mM ATP/MgCl₂ eingesetzt, da die höhere Konzentration inhibierend auf die Glycerin-Dehydratase wirkte. Von DhaF und dem Komplex DhaFG wurden jeweils 40 µg/Ansatz eingesetzt. Das partiell gereinigte DhaG (s. 3.5.3.6) wurde in einer Konzentration von 100 µg/Ansatz hinzugefügt. Die Untersuchungen zur Reaktivierung der Glycerin-inaktivierten Dehydratase aus *C. freundii* zeigten, daß weder DhaF noch DhaG allein in der Lage waren, das Enzym zu reaktivieren. Auch die Zugabe beider separat gereinigter Proteine in einen Reaktivierungsansatz führte zu keiner Aktivitätssteigerung der Glycerin-Dehydratase. Erst durch die Zugabe des Komplexes aus DhaFG wurde das Enzym reaktiviert und zeigte eine deutliche Aktivitätszunahme (s. Abbildung 27; A). Die Reaktivierung der Dehydratase durch den Komplex aus DhaFG war strikt abhängig von der Anwesenheit von ATP/MgCl₂ und Coenzym B₁₂. Die Zugabe von ADP bzw. AMP (je 12 mM) und einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon (ATP-*-S*) zum Reaktionsansatz erbrachte keine Reaktivierung der inaktivierten Glycerin-Dehydratase.

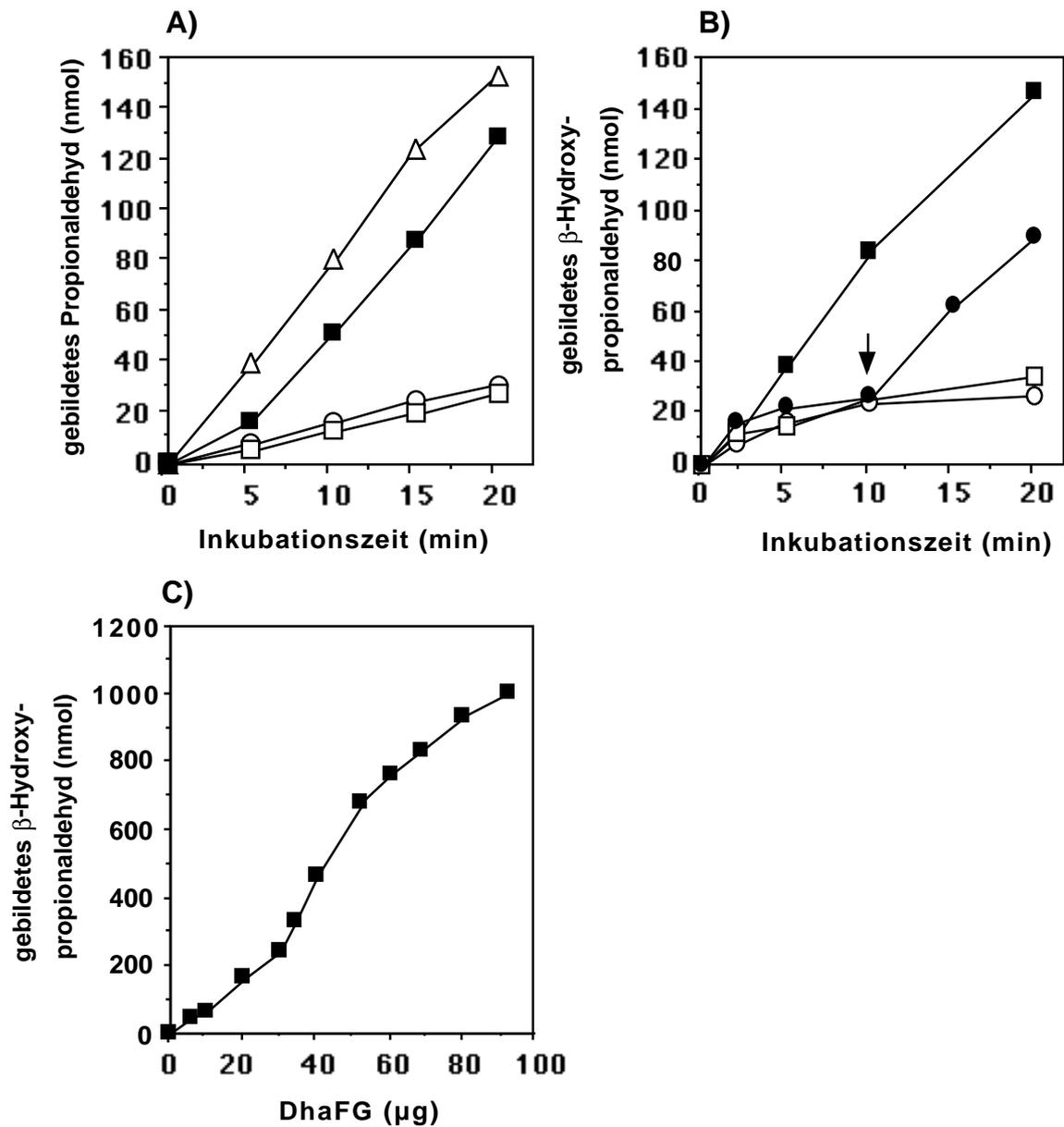


Abbildung 27: Reaktivierung der Glycerin-inaktivierten (A) Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* und die Verhinderung der Inaktivierung in Gegenwart von Glycerin (B, C) durch den Reaktivierungsfaktor DhaFG

(A) Die Glycerin-Dehydratase wurde wie unter 2.18 beschrieben inaktiviert. Die Experimente wurden bei 37°C in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl, 21 µM Coenzym B₁₂ und 1,2 M 1,2-Propandiol in einem Volumen von 310 µl durchgeführt. Die Glycerin-Dehydratase (0,24 U) wurde für die angegebenen Zeitintervalle mit 40 µg DhaFG-Komplex in An- (■) bzw. Abwesenheit von ATP/MgCl₂ (□) oder ohne DhaFG-Komplex mit ATP/MgCl₂ (○) inkubiert. Als Kontrolle diente die nicht inaktivierte Glycerin-Dehydratase (0,24 U; Δ).

(B) Die Experimente wurden bei 37°C in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl, 21 µM Coenzym B₁₂ und 1,2 M Glycerin in einem Volumen von 310 µl durchgeführt. Die nicht inaktivierte Glycerin-Dehydratase (0,24 U) wurde für die angegebenen Zeitintervalle mit 40 µg DhaFG-Komplex in An- (■) bzw. Abwesenheit von ATP/MgCl₂ (□) oder ohne DhaFG-Komplex mit ATP/MgCl₂ (○) inkubiert. Die Zugabe von DhaFG (40 µg) nach einer Inkubationsdauer von 10 min ist durch einen Pfeil angedeutet (●).

(C) Nicht inaktivierte Dehydratase (0,24 U) wurde in Gegenwart von 1,2 M Glycerin, 21 µM Coenzym B₁₂ und 12 mM ATP/MgCl₂ in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl für 4 h bei 37°C mit den angegebenen Mengen an DhaFG inkubiert. Die Bestimmung der Aldehydkonzentration erfolgte wie unter 2.17.1 beschrieben.

Wie in Abbildung 27A dargestellt, konnte durch Zugabe von DhaFG zum Reaktionsansatz die Propionaldehydbildung der Glycerin-inaktivierten Dehydratase gesteigert werden. Die Rate der Produktbildung betrug nach 10-minütiger Inkubation 7,4 nmol/min. Dies liegt im Vergleich zur nicht-inaktivierten Glycerin-Dehydratase in einem vergleichbaren Bereich (9,14 nmol/min). Der Grad der Reaktivierung des Enzyms betrug nach einer 20-minütigen Inkubation etwa 84 %. Der Komplex DhaFG ist somit der Reaktivierungsfaktor der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Glycerin-Dehydratase direkt während der Glycerinumsetzung reaktiviert werden kann bzw. die Inaktivierung des Enzyms durch die Zugabe des Reaktivierungsfaktors verhindert werden konnte (s. Abbildung 27; B). Hierzu wurde die Glycerin-Dehydratase in Gegenwart von Glycerin, Coenzym B₁₂ und ATP/MgCl₂ inkubiert. Wie erwartet erfolgte dabei innerhalb von 20 min eine fast vollständige Inaktivierung der Glycerin-Dehydratase. Wurde jedoch zu Beginn der Inkubation der DhaFG-Komplex zum Reaktionsansatz hinzugegeben, erfolgte keine Inaktivierung des Enzyms (s. Abbildung 27; B). Desweiteren konnte durch Zugabe von DhaFG zum Reaktionsansatz nach einer Inkubationsdauer von 10 min gezeigt werden, daß auch während der Katalyse inaktivierte Glycerin-Dehydratase wieder reaktiviert werden konnte (s. Abbildung 27; B). Die Reaktivierung war ebenfalls abhängig von der Anwesenheit von ATP/MgCl₂ und Coenzym B₁₂. Ferner war diese abhängig von der Menge

an zugesetztem Reaktivierungsfaktor (s. Abbildung 27; C). Der Anteil aktiver Dehydratase stieg im Bereich von 20 μg bis 70 μg Reaktivierungsfaktor linear unter den in Abbildung 27 C beschriebenen Bedingungen an.

3.5.5.2 Reaktivierung von O_2 -inaktivierter Glycerin-Dehydratase

Für das Diol-Dehydratase-Holoenzym wurde eine Inaktivierung durch O_2 in Abwesenheit des Substrats beobachtet. Diese Inaktivierung beruht auf der Reaktion der aktivierten Co-C-Bindung des enzymgebundenen Coenzym B_{12} mit Sauerstoff (WAGNER et al., 1966). Auch die Hologlycerin-Dehydratase aus *C. freundii* wurde durch O_2 in Abwesenheit von Substrat inaktiviert (s. Abbildung 28).

Die O_2 -Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch aerobe Inkubation in Gegenwart von Coenzym B_{12} bei 37°C für 30 min (s. 2.18). Ungebundenes Coenzym B_{12} wurde mittels einer Gelfiltration abgetrennt (s. 2.16.3). Die so inaktivierte Glycerin-Dehydratase wies nur noch eine sehr geringe Restaktivität auf (s. Abbildung 28). Der Reaktivierungsansatz enthielt die unter 2.17.1 beschriebenen Komponenten. Durch die Zugabe von DhaFG (40 μg /Ansatz) konnte die O_2 -inaktivierte Glycerin-Dehydratase reaktiviert werden (s. Abbildung 28). Auch diese Reaktivierung des Enzyms war strikt abhängig von der Zugabe von Coenzym B_{12} und ATP/MgCl_2 zum Reaktionsansatz. Die Zugabe von ADP bzw. AMP führte zu keiner Aktivitätssteigerung der Dehydratase. Der Grad der Reaktivierung betrug in diesem Fall im Vergleich zur nicht inaktivierten Glycerin-Dehydratase nach einer Inkubationsdauer von 20 min 54 %.

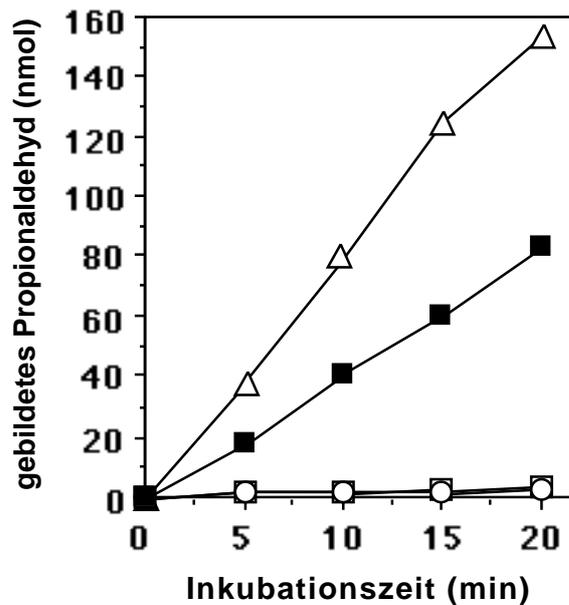


Abbildung 28: Reaktivierung der O₂-inaktivierten Glycerin-Dehydratase durch den Reaktivierungsfaktor DhaFG

Die Glycerin-Dehydratase wurde wie unter 2.18 beschrieben inaktiviert. Die Experimente wurden bei 37°C in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl, 21 µM Coenzym B₁₂ und 1,2 M 1,2-Propandiol in einem Volumen von 310 µl durchgeführt. Die Glycerin-Dehydratase (0,24 U) wurde für die angegebenen Zeitintervalle mit 40 µg DhaFG-Komplex in An- (■) bzw. Abwesenheit von ATP/MgCl₂ (□) oder ohne DhaFG-Komplex mit ATP/MgCl₂ (○) inkubiert. Als Kontrolle diente das nicht inaktivierte Enzym (0,24 U;).

3.5.5.3 Reaktivierung von Cyano-B₁₂-inaktivierter Glycerin-Dehydratase

Neben Glycerin und O₂ wird die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* durch Cyano-B₁₂ inaktiviert (SEYFRIED, 1997). Cyano-B₁₂ fehlt der für den Katalysemechanismus entscheidende 5'-Desoxyadenosylrest (WAGNER et al., 1966; TORAYA et al., 1977). Der K_i von Cyano-B₁₂ liegt dabei im Bereich des K_m für Coenzym B₁₂ (POPPE und RETEY, 1997). Der inaktive Dehydratase-Cyano-B₁₂-Komplex wird als Model für das inaktivierte Holoenzym angesehen (TORAYA, 2000a).

Die Inaktivierung der Glycerin-Dehydratase durch Cyano-B₁₂ erfolgte durch Inkubation des gereinigten Enzyms in Gegenwart von Cyano-B₁₂ bei 37°C für 30 min (s. 2.18). Ungebundenes Cyano-B₁₂ wurde mittels einer Gelfiltration abgetrennt (s. 2.16.3). Die

Reaktivierung der Cyano-B₁₂-inaktivierten Dehydratase erfolgte wie unter 2.17.1 beschrieben und war wiederum abhängig von der Zugabe des DhaFG-Komplexes, Coenzym B₁₂ und ATP/MgCl₂ (s. Abbildung 29; A). Der Grad der Reaktivierung betrug 93 % nach 20 min im Vergleich zu nicht inaktivierter Glycerin-Dehydratase.

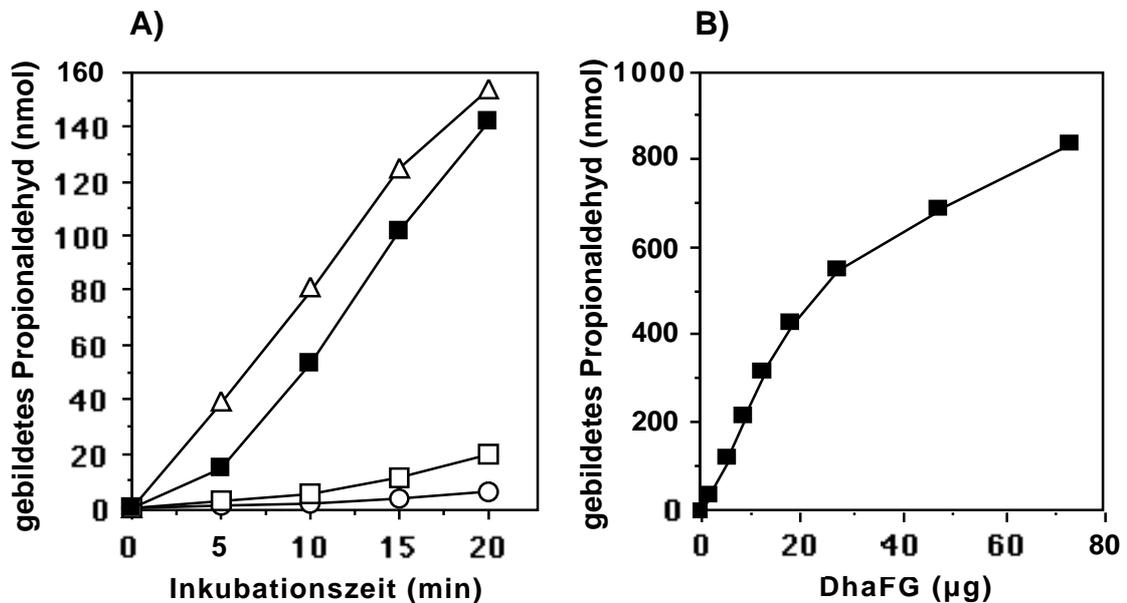


Abbildung 29: Reaktivierung der Cyano-B₁₂-inaktivierten Glycerin-Dehydratase durch den Reaktivierungsfaktor DhaFG (A) und die Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration des DhaFG-Komplexes (B)

(A) Die Glycerin-Dehydratase wurde wie bereits beschrieben inaktiviert. Die Experimente wurden bei 37°C in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl, 21 µM Coenzym B₁₂ und 1,2 M 1,2-Propandiol in einem Volumen von 310 µl durchgeführt. Die Glycerin-Dehydratase (0,24 U) wurde für die angegebenen Zeitintervalle mit 40 µg DhaFG-Komplex in An- (■) bzw. Abwesenheit von ATP/MgCl₂ (□) oder ohne DhaFG-Komplex mit ATP/MgCl₂ (○) inkubiert. Als Kontrolle diente die nicht inaktivierte Glycerin-Dehydratase (0,24 U; △).

(B) Der Cyano-B₁₂-Dehydratase Komplex (0,24 U) wurde in Gegenwart von 1,2 M 1,2-Propandiol, 21 µM Coenzym B₁₂ und 12 mM ATP/MgCl₂ in KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl für 30 min bei 37°C mit den angegebenen Mengen an DhaFG inkubiert. Die Bestimmung der Propionaldehydkonzentration erfolgte wie unter 2.17.1 beschrieben.

Durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an Reaktivierungsfaktor (0–76 µg DhaFG) konnte eine direkte Abhängigkeit zwischen der Reaktivierung der Cyano-B₁₂-inaktivierten Glycerin-Dehydratase und der Konzentration an DhaFG nachgewiesen werden (s. Abbildung 29; B). Der Anteil aktiver Dehydratase stieg im Bereich von 5 µg bis 30 µg Reaktivierungsfaktor linear unter den in Abbildung 29 B beschriebenen Bedingungen an.

3.5.5.4 Reaktivierung von Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus verschiedenen Organismen durch den Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii*

Die Fähigkeit des Reaktivierungsfaktors DhaFG aus *C. freundii* zur Reaktivierung von B₁₂-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus anderen Organismen wurde überprüft. Hierzu wurden die Diol-Dehydratasen aus *K. oxytoca* (TOBIMATSU et al., 1995), *Salmonella typhimurium* (BOBIK et al., 1997) und *Propionibacterium freudenreichii* (TORAYA, 1980), sowie die Glycerin-Dehydratasen aus *Klebsiella pneumoniae* (TOBIMATSU et al., 1996) und *Cl. pasteurianum* (MACIS et al., 1998) verwendet. Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* diente als Kontrolle.

Die hier erwähnten Organismen wurden anaerob mit Glycerin (*C. freundii*, *Cl. pasteurianum* und *K. pneumoniae*) bzw. 1,2-Propandiol (*K. oxytoca*, *S. typhimurium* und *P. freudenreichii*) als Substrat angezogen. Anschließend wurden Rohextrakte unter anaeroben Bedingungen hergestellt (s. 2.14.1) und für die Reaktivierungsversuche eingesetzt.

Die Dehydratasen wurden durch Inkubation in Gegenwart von 1,2 M Glycerin inaktiviert (s. 2.18). Alle Enzyme wiesen nach 20 min Inkubation bei 37°C unter anaeroben Bedingungen eine nahezu vollständige Inaktivierung auf. Durch die Zugabe des Reaktivierungsfaktors aus *C. freundii*, ATP/MgCl₂ und Coenzym B₁₂ am Reaktionsstart konnte die Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *K. pneumoniae* in Gegenwart von Glycerin verhindert werden. Alle anderen Dehydratasen wurden trotz Zugabe des Reaktivierungsfaktors aus *C. freundii* inaktiviert.

Zusätzlich wurde die Reaktivierung der durch Cyano-B₁₂ inaktivierten Dehydratase untersucht (s. 2.18). Neben dem Enzym aus *C. freundii* konnte nur die durch Cyano-B₁₂ inaktivierte Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* reaktiviert werden. Der Grad der Reaktivierung betrug 73 % nach 20 min Inkubation unter reaktivierenden Bedingungen. Dies lag im Bereich der Positivkontrolle (s. 3.5.5.3). Die Reaktivierung durch den DhaFG-Komplex war auch hier strikt abhängig von der Zugabe von ATP/MgCl₂ und Coenzym B₁₂. Diese Ergebnisse zeigten, daß der Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* spezifisch für Glycerin-Dehydratase ist, da die Diol-Dehydratase aus den eng verwandten Enterobakterien *K. oxytoca* und *S. typhimurium* nicht reaktiviert werden konnten. Die fehlende Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* könnte auf die große phylogenetische Distanz beider Organismen zurückzuführen sein.

3.5.6 Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum*

Nachdem die Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase durch den Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* gezeigt werden konnte, sollten Versuche zur Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* durchgeführt werden. Analog zum Enzym aus *C. freundii* wird auch die Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* während der Katalyse durch Glycerin inaktiviert (s. 3.4). Untersuchungen mit dem Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* hatten gezeigt, daß dieser die Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* nicht reaktivieren kann (s. 3.5.5.4). Im weiteren wurde versucht, eine Reaktivierung der Dehydratase mit Hilfe des partiell gereinigten DhaFG-Komplexes aus *Cl. pasteurianum* zu erzielen (s. 3.5.4). Hierzu wurde das Enzym (0,32 U) aus *Cl. pasteurianum* wie die Dehydratase aus *C. freundii* durch Glycerin inaktiviert (s. 2.18). Das inaktivierte Enzym konnte durch Zugabe von DhaFG (72 µg/Ansatz), ATP/MgCl₂ und Coenzym B₁₂ nicht signifikant reaktiviert werden. Auch bei der Inkubation der nicht inaktivierten Glycerin-Dehydratase (0,32 U) mit Glycerin konnte durch Zugabe von DhaFG (72 µg/Ansatz) die Inaktivierung nicht vermieden werden. Ein Grund hierfür könnte die geringe Anreicherung des DhaFG-Komplexes aus

Cl. pasteurianum sein. Daher war die für die Versuche eingesetzte Menge an DhaFG wesentlich niedriger als bei den entsprechenden Versuchen mit DhaFG aus *C. freundii*. Diese Versuche müßten nach Erarbeitung einer verbesserten heterologen Produktion und Reinigung des DhaFG-Komplexes aus *Cl. pasteurianum* wiederholt werden.

3.6 Untersuchungen zum Mechanismus der Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase durch DhaFG aus *C. freundii*

Anhand der vorherigen Experimente wurde deutlich, daß durch die Zugabe des Komplexes DhaFG die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* reaktiviert bzw. eine Inaktivierung verhindert werden kann. Zwei mögliche Mechanismen dafür sollten näher untersucht werden. Zum einen könnte der Reaktivierungsfaktor eine Adenosyltransferase-Aktivität besitzen, da bei der Inaktivierung der Dehydratase die Adenosyleinheit des Coenzym B₁₂ irreversibel abgespalten wird, zum anderen könnte die Reaktivierung durch einem direkten Austausch des modifizierten und inaktiven Coenzym durch enzymatisch aktives Coenzym B₁₂ vermittelt werden.

3.6.1 Adenosyltransferase-Aktivität des Reaktivierungsfaktors aus *C. freundii*

Innerhalb der Coenzym B₁₂-Synthese wird das gebildete Corrinoid adenosyliert. Die Corrinoid-Adenosylierung wird in drei Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgt die Reduktion von Co(III) zu Co(II), der dann eine weitere Reduktion von Co(II) zu Co(I) folgt. Zum Abschluß wird die 5'-Deoxyadenosyleinheit von ATP auf das reduzierte Corrinoid übertragen (BEAVEN und JOHNSON, 1955; WALKER et al., 1969). Der letzte Schritt wird von einer ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase katalysiert. Ein solches Enzym konnte in *Cl. tetanomorphum* (VITOLS et al., 1966) und *P. shermanii* (BRADY et al., 1962) teilweise gereinigt und charakterisiert werden. Die durch das *cobA*-Gen kodierte ATP-

Corrinoid-Adenosyltransferase aus *S. typhimurium* konnte dagegen heterolog produziert, gereinigt und charakterisiert werden (SUH und ESCALANTE-SEMERENA, 1995).

DhaF allein und der Komplex aus DhaFG wurden auf eine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität hin untersucht. Als Substrate wurden Vitamin B₁₂ und Hydroxy-B₁₂ eingesetzt. Der Test wurde wie unter 2.17.2 beschrieben in einer Anaerobenbox durchgeführt. Zunächst wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Coenzym B₁₂ eine Eichkurve aufgenommen, um die Linearität des Tests zu untersuchen. Von DhaF und DhaFG wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt (20 bis 80 µg/Ansatz). Jedoch konnte sowohl für DhaF als auch für DhaFG keine Adenosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

SUH und ESCALANTE-SEMERENA (1995) hatten bei der Reinigung der ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase aus *S. typhimurium* herausgefunden, daß diese ohne Zugabe von DTE nicht aktiv war. Sie schlossen daraus, daß Cysteinreste in die enzymatische Aktivität des Proteins involviert sind. Daher wurden bei einer erneuten Reinigung des Proteins DhaF und des DhaFG-Komplexes die Zellen (s. 3.5.3.5) in DTE-haltigem KP-Puffer (5 mM) aufgenommen. Die Rohextrakte wurden mit N₂ begast und anaerob aufgeschlossen (s. 2.14.1). Die Reinigung durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose erfolgte analog zu 3.5.3.6. Die Reinigung wurde jedoch unter anaeroben Bedingungen und unter Verwendung von DTE-haltigen Puffern (5 mM) durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden auf Adenosyltransferase-Aktivität getestet (s. 2.17.2). Es konnte jedoch keine solche Aktivität ermittelt werden. Auch weitere Modifikationen der Reinigungsprozedur führten zu keiner signifikanten Aktivität. Demnach besitzen DhaF und der Komplex DhaFG keine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität.

3.6.1.1 Adenosyltransferase-Aktivität von DhaH aus *C. freundii*

Für DhaF als auch für DhaFG konnte keine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden. Daher wurde untersucht, ob ein anderes Gen innerhalb des *dha*-Regulons für ein solches Enzym kodiert. Aufgrund von Sequenzvergleichen erschien

das *dhaH*-Gen möglicherweise für eine Adenosyltransferase zu kodieren. Mit dem Programm -BLAST (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) konnte eine geringe Ähnlichkeit von DhaH aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* zu EufT aus *S. typhimurium* festgestellt werden, das wahrscheinlich eine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität besitzt (KOFOID et al., 1999; SHEPPARD und ROTH, nicht publiziert).

Für eine heterologe Produktion mußte das *dhaH*-Gen in pKK223-3 subkloniert werden. Hierzu wurde es mittels PCR und den Oligonukleotiden „dhaHCf1“ und „dhaHCf2“ amplifiziert (s. 2.12). Das Plasmid pRD1 dient dabei als DNA-Matrize (s. 2.1). Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 50°C für 1 min, gefolgt von der Kettenverlängerung bei 72°C für 1 min. Die PCR wurde nach 30 Zyklen beendet. Das PCR-Produkt wies bei der anschließenden Analyse mittels einer Gelelektrophorese die erwartete Länge von 561 bp auf. Im Zuge der PCR wurde am 5'-Ende des Gens eine *EcoRI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle sowie die Sequenz für einen His₆-Tag eingeführt. Die Klonierung erfolgte über diese beiden Schnittstellen in den Vektor pKK223-3. Das so konstruierte Plasmid wurde mit pCS130 bezeichnet und für die Expression des *dhaH*-Gens eingesetzt (s. Abbildung 30).

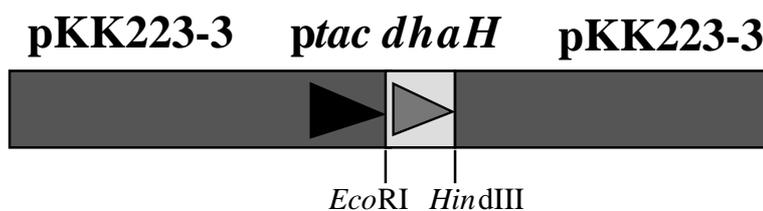


Abbildung 30: Schematische Darstellung des Vektors pCS130

Das grau hinterlegte Gen trägt am 3'-Ende die Sequenz für einen His₆-Tag.

Die Anzucht des rekombinanten *E. coli*-Stammes JM109/pCS130 und die Induktion der *dhaH*-Expression erfolgten analog zu 3.5.3.1. Nach Induktion des *dhaH*-Gens trat eine Wachstumsverzögerung ein. Die SDS-PAGE-Analyse von Rohextrakten von *E. coli* JM109/pCS130 zeigte keine signifikante Produktion von DhaH.

Die aus den Expressionsversuchen erhaltenen Zellen wurden in KP-Puffer mit 5 mM DTE aufgenommen und anaerob aufgeschlossen (s. 2.14.1). Anschließend wurden 5 ml Rohextrakt auf eine mit Zellaufschlußpuffer äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule aufgetragen (s. 2.16.1). Die Reinigung erfolgte analog zur Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* (s. 3.2.3) unter anaeroben Bedingungen. Wie auch das DhaG-Protein konnte das DhaH-Protein durch eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose nur partiell gereinigt werden (s. Abbildung 31; A). Das Eluat (Spur 7) beinhaltete trotz der Waschschrte mit 10 und 20 mM Imidazol Fremdprotein. Ein weiterer Waschschrte mit einem Puffer, der 40 mM Imidazol enthielt, erbrachte keine weitere Abtrennung des Fremdproteins. Die Identität der Bande wurde durch Detektion des N-terminalen His₆-Tags mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (s. Abbildung 31; B). Das partiell gereinigte DhaH-Protein wurde auf Adenosyltransferase-Aktivität untersucht. Die Tests wurden wie unter 2.17.2 beschrieben in einer Anaerobenbox durchgeführt. Für die Tests wurden 76 bis 300 µg Protein/Ansatz eingesetzt. Dabei konnte für DhaH keine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

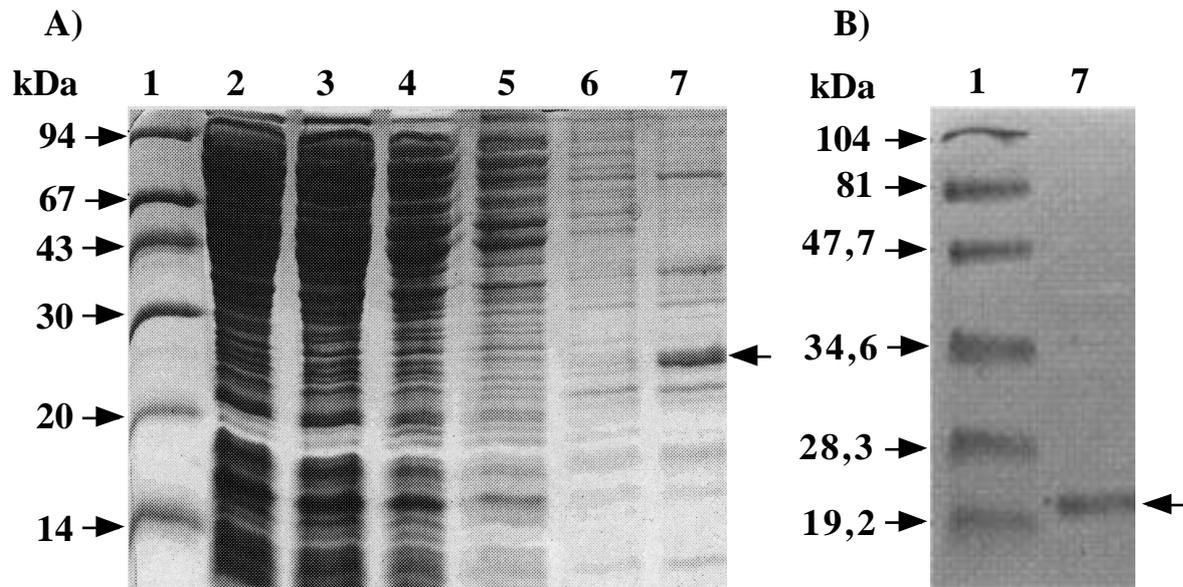


Abbildung 31: Analyse der partiellen Reinigung von DhaH mittels Affinitätschromatographie durch SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B)

(A) SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau wurden wie unter 2.19.1 und 2.20.1 beschrieben durchgeführt.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS130

Spur 3: Durchlauf

Spur 4: Waschschrift mit 10 mM Imidazol

Spur 5: Waschschrift mit 20 mM Imidazol

Spur 6: Waschschrift mit 40 mM Imidazol

Spur 7: Eluat mit 250 mM Imidazol

(B) Nachweis des N-terminalen His₆-Tags mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Konjugatfärbung

Dargestellt ist eine Ni²⁺-NTA-Konjugat gefärbte PVDF-Membran (s. 2.22) nach Transfer der Proteine aus einem 15 % igen SDS-Gel (s. 2.19.1).

Spur 1: Markerproteine

Spur 7: partiell gereinigtes DhaH

3.6.2 Austausch des modifizierten Coenzym durch den Reaktivierungsfaktor

Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* wird durch Cyano-B₁₂ inaktiviert. Durch Zugabe des Reaktivierungsfaktors bestehend aus dem Komplex DhaFG kann die so inaktivierte Glycerin-Dehydratase in Gegenwart von Coenzym B₁₂ und ATP/MgCl₂ wieder aktiviert werden (s. 3.5.5.3). Da der Reaktivierungsfaktor, wie unter 3.6.1 nachgewiesen, keine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität besitzt, wäre es denkbar, daß die Reaktivierung der Dehydratase durch einen Austausch des gebundenen Cyano-B₁₂ durch Coenzym B₁₂ hervorgerufen wird.

Um dies zu überprüfen, wurde die durch Cyano-B₁₂ inaktivierte Glycerin-Dehydratase (s. 3.5.5.3) mit dem Reaktivierungsfaktor unter reaktivierenden Bedingungen (1,2-Propanediol, Coenzym B₁₂ und 12 mM ATP/MgCl₂) für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne ATP/MgCl₂. Ungebundenes 1,2-Propanediol, ATP, Cyano-B₁₂ und Coenzym B₁₂ wurden mittels einer Gelfiltration an einer PD 10-Säule abgetrennt (s. 2.16.3). Anschließend wurde von den Reaktionsansätzen ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen. Wird die Reaktivierung der Dehydratase durch einen direkten Austausch des Cyano-B₁₂ durch Coenzym B₁₂ vermittelt, so sollte dies anhand von UV-Vis-Spektren nachzuweisen sein. Nach der Reaktivierung sollte das Enzym statt Cyano-B₁₂ Coenzym B₁₂ als Cofaktor gebunden haben. Somit sollte bei Aufnahme eines Spektrums anstelle des für Cyano-B₁₂ typischen Spektrums das für Coenzym B₁₂ nachzuweisen sein. Die Analyse des UV-Vis-Spektren ergab bei der Kontrolle das für Cyano-B₁₂ typische Spektrum mit einem Peak bei einer Wellenlänge von 360 nm (s. Abbildung 32; A). Bei dem Versuchsansatz mit ATP/MgCl₂ konnte dagegen nur das für Coenzym B₁₂ typische Spektrum detektiert werden (s. Abbildung 32; B). Daher ist zu vermuten, daß der Reaktivierungsfaktor den Austausch des gebundenen, enzymatisch inaktiven Cobalamins durch Coenzym B₁₂ katalysiert. Da Coenzym B₁₂ bei einer Inaktivierung des Holoenzym durch Glycerin und O₂ irreversibel die Adenin-Einheit verliert, kann daraus gefolgert werden, daß der Reaktivierungsfaktor

einen ATP-abhängigen Austausch des modifizierten Coenzym bzw. Cyano-B₁₂ gegen freies intaktes Coenzym B₁₂ katalysiert. Ein solcher Mechanismus wurde auch für den Reaktivierungsfaktor der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* postuliert (TORAYA und MORI, 1999). Dieser beinhaltet auch eine Komplexbildung zwischen Dehydratase und Reaktivierungsfaktor, die im weiteren untersucht wurde.

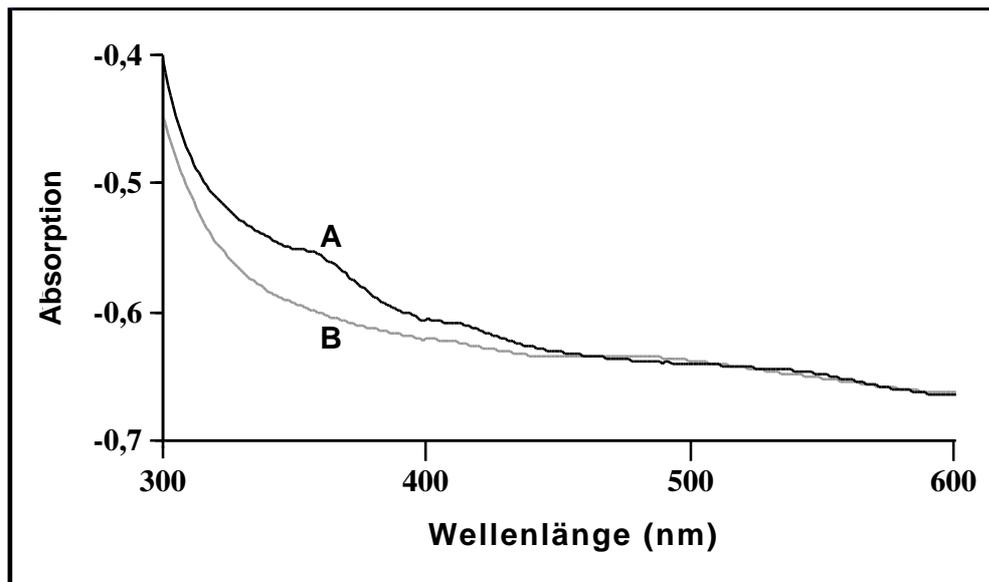


Abbildung 32: Austausch des enzymgebundenen Cyano-B₁₂ durch freies Coenzym B₁₂ durch den Reaktivierungsfaktor DhaFG

Der inaktivierte Cyano-B₁₂-Glycerin-Dehydratase-Komplex wurde in Gegenwart von 1,2 M 1,2-Propandiol, 21 µM Coenzym B₁₂ und 300 µg Reaktivierungsfaktor mit (B) oder ohne (A) 12 mM ATP/MgCl₂ in 2,5 ml KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung ungebundenen Cobalamins erfolgte durch Gelfiltration an PD 10-Säulen (s. 2.16.3). Von den Ansätzen wurden anschließend UV-Vis-Spektren aufgenommen.

3.6.3 Komplexbildung zwischen dem Reaktivierungsfaktor DhaFG und der Glycerin-Dehydratase

Die Komplexbildung zwischen dem Reaktivierungsfaktor und der Glycerin-Dehydratase wurde durch native Gelelektrophorese in An- oder Abwesenheit von ATP oder ADP überprüft (s. 2.19.3). Dazu wurde der inaktive Cyano-B₁₂-Dehydratase-Komplex (0.15 U; s. 3.5.5.3) mit 5 µg Reaktivierungsfaktor und 1,2 M 1,2-Propandiol als Substrat in Ab- bzw. Anwesenheit von 12 mM ATP oder ADP für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend unter anaeroben Bedingungen einer nativen PAGE unterzogen. Dabei enthielten das Gel und der Laufpuffer 0,1 M 1,2-Propandiol und 1 mM ATP oder ADP. Die Analyse der nativen PAGE ergab in allen Fällen, daß bei einer gemeinsamen Inkubation der Glycerin-Dehydratase mit dem Reaktivierungsfaktor es zur Bildung von Proteinaggregaten kam, die aufgrund ihrer großen Molekularmasse nicht in die Gele eingelaufen waren. Nur in den Spuren, in denen die Dehydratase bzw. der Reaktivierungsfaktor allein aufgetragen wurden, konnten mittels einer Coomassie-Blau Färbung (s. 2.20.1) Banden in Höhe der entsprechenden Proteinmasse detektiert werden. Daher wurde versucht, die Komplexbildung mittels einer Gelfiltration an einer Superdex 200-Säule nachzuweisen (s. 2.23.3). Dazu wurden 400 µg Reaktivierungsfaktor und inaktiver Cyano-B₁₂-Dehydratase-Komplex (12 U) nach Inkubation unter den oben beschriebenen Bedingungen einer Gelfiltration unterzogen. Als Laufpuffer wurde KP-Puffer (55 mM, pH 8,0) mit 38,5 mM KCl und 0,1 M 1,2-Propandiol verwendet. Enthielt der Inkubationsansatz ATP bzw. ADP wurde dem Laufpuffer entsprechend 1 mM ATP bzw. ADP zugesetzt. Wie anhand von Abbildung 33 deutlich wird, konnte mittels Gelfiltration keine eindeutige Komplexbildung zwischen dem Reaktivierungsfaktor und der Glycerin-Dehydratase nachgewiesen werden, da es zur Aggregation beider Proteine kam und diese im Ausschlußvolumen der Säule eluierten (s. Abbildung 33; C & D). Dabei hatte die Gegenwart von ADP (s. Abbildung 33; C) bzw. ATP (s. Abbildung 33; D) keinen Einfluß auf die Komplexbildung. Der 2. Peak in Abbildung 33 D wurde durch die Elution des ATPs

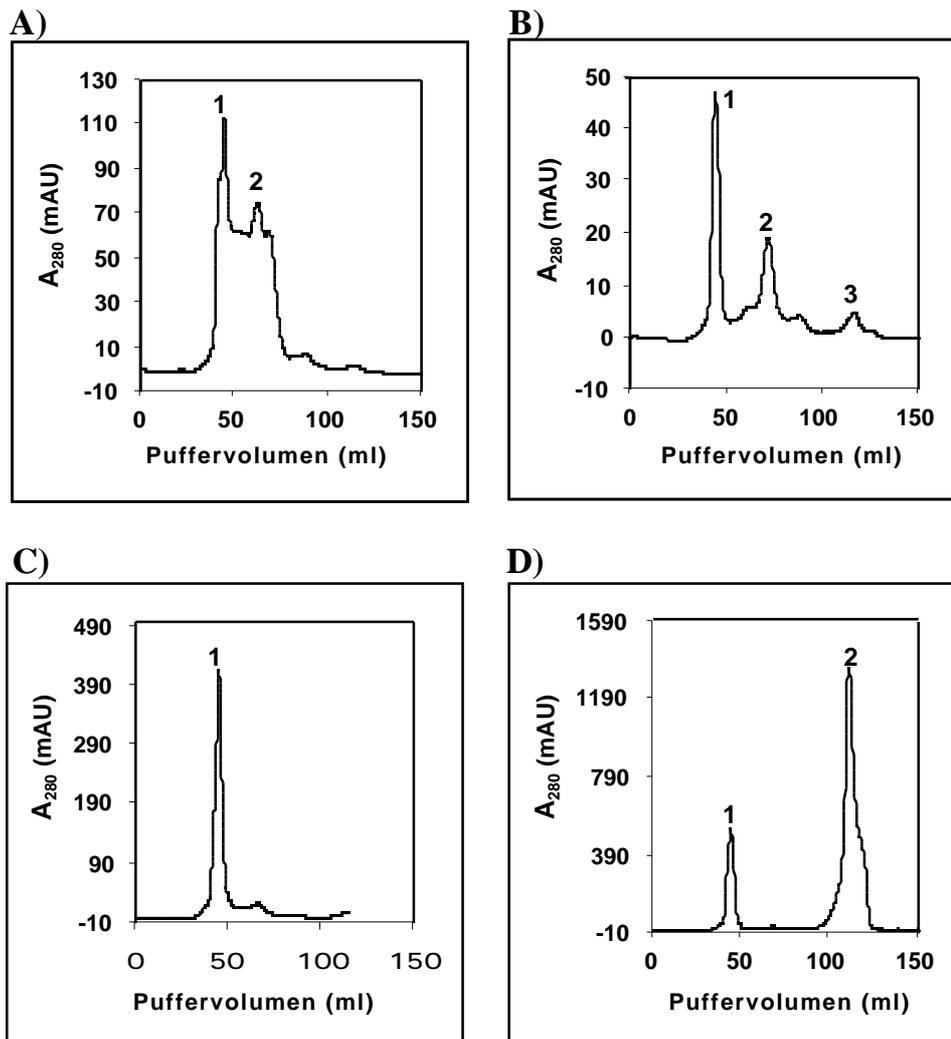
hervorgerufen. Wurde dagegen die Glycerin-Dehydratase einzeln auf die Säule aufgetragen, konnten zwei Peaks ermittelt werden (s. Abbildung 33; A). Peak 1 wird durch die Aggregation des Proteins bewirkt. Der 2. Peak stellt den nativen Komplex der Glycerin-Dehydratase dar. Ein Vergleich der Puffervolumina mit den Puffervolumina der Eichproteine ergab eine native Molekularmasse für die Dehydratase von ca. 190 kDa. Wurde der DhaFG-Komplex über die Säule getrennt, konnten drei Peaks detektiert werden (s. Abbildung 33; B). Der 1. Peak wird wiederum durch die Aggregation des Proteins hervorgerufen. Der 2. Peak stellt den dimeren Komplex des Reaktivierungsfaktor mit einer Molekularmasse von ca. 150 kDa dar. Desweiteren eluiert DhaF allein bei einem Puffervolumen von 115 ml (Peak 3). Diese Ergebnisse stimmen hervorragend mit den mittels nativer Gradienten-PAGE ermittelten Molekularmassen überein (s. 3.2.3 und 3.5.3.6).

Demnach konnte mit den hier verwendeten Methoden eine Komplexbildung zwischen der Glycerin-Dehydratase und dem Reaktivierungsfaktor nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Aggregation beider Proteine deutet jedoch auf eine Komplexbildung hin.

Abbildung 33: (folgende Seite)

Elutionsprofile der Gelfiltration an einer Superdex 200-Säule

Die Glycerin-Dehydratase (A) und der Reaktivierungsfaktor (B) wurden nach entsprechender Inkubation (s.o.) entweder einzeln oder zusammen in Gegenwart von ADP (C) oder ATP (D) auf die Säule aufgetragen.



3.6.4 Untersuchungen zu Wechselwirkungen von DhaF und DhaG untereinander und mit anderen Proteinen mittels der Zweihybrid-Analyse

Das Zweihybrid-System in *S. cerevisiae* stellt eine Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen dar. Dabei nutzt dieses System die Tatsache, daß eukaryotische Transkriptionsaktivatoren, wie z.B. GAL4, sich aus zwei funktionell verschiedenen Domänen zusammensetzen. Das GAL4-Protein, das für die Bildung der Galaktose-verwertenden Enzyme benötigt wird, bindet zunächst mittels der DNA-Bindedomäne an eine stromaufwärts vom GAL4-abhängigen Promotor gelegene

Enhancersequenz. Nach erfolgter Bindung tritt die GAL4-Aktivierungsdomäne in Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase. Zur Transkriptionsaktivierung müssen beide Domänen in definierten Abständen zueinander positioniert sein. Die Proteine, die auf ihre Interaktion hin überprüft werden sollen, werden zum einen an die GAL4-Bindedomäne, zum anderen an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert und auf ihre Interaktion überprüft (s. Abbildung 34).

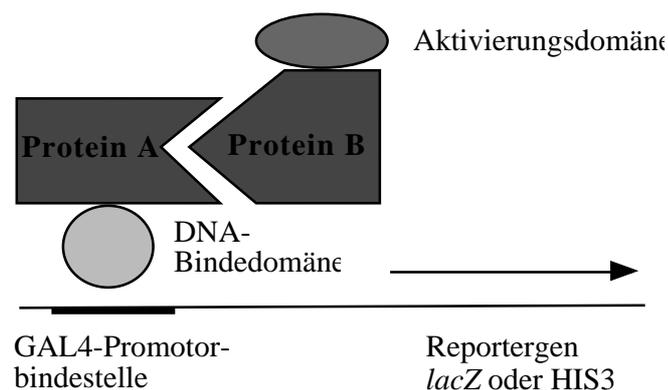


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Prinzips des Zweihybrid-Systems

Werden aufgrund der Interaktion der fusionierten Proteine Aktivierungs- und DNA-Bindedomäne so zueinander positioniert, daß die Funktion des GAL4-Transkriptionsaktivators rekonstituiert wird, kann dies durch chromosomale Reportergene wie *HIS3* und *lacZ* im *S. cerevisiae*-Stamm HF7c nachgewiesen werden. Diese Gene enthalten in ihrer Promotorregion GAL4-Bindestellen. Während die *lacZ*-Expression eine Selektion auf einen blauen Phänotyp in Gegenwart von X-Gal erlaubt, wird bei der *HIS3*-Expression auf Histidin-Prototrophie selektiert. Die so quantifizierbare Transkriptionsaktivität der Reportergene kann als Maß für die Protein-Protein-Interaktion genutzt werden.

Für die Interaktion werden die Gene der zu untersuchenden Proteine mit der jeweiligen Domäne des GAL4-Transkriptionsaktivators fusioniert. Anschließend werden die konstruierten Plasmide gleichzeitig in *S. cerevisiae* HF7c transformiert. Eine Selektion auf das Vorhandensein beider Vektoren erfolgt dabei anhand der vektorvermittelten

Aminosäure-Prototrophien für Leucin (pGAD GL-Derivat) und Tryptophan (pGBT9-Derivat). In den nächsten Schritten werden die Kotransformanten auf die Expression interagierender Hybridproteine anhand der Transkription der Reportergene (*HIS3* und *lacZ*) untersucht. Der *HIS3*-Marker stellt einen sehr schwachen Selektionsmarker dar, so daß man eine erhebliche Anzahl an falsch-positiven Klonen erhält. Daher wird in einem weiteren Schritt dem Selektionsmedium 3-Aminotriazol hinzugesetzt, ein Strukturanalogon des Histidins. Die von ihm ausgehende kompetitive Hemmung kann nur durch eine ausgeprägte Erhöhung der Histidin-Biosynthese überwunden werden, die wiederum nur durch stark interagierende Hybridproteine erzielt werden kann.

Mit Hilfe des Zweihybrid-Systems wurde die Interaktion von DhaF bzw. DhaG mit Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase untersucht. Für die Klonierung des *dhaF*- bzw. *dhaG*-Gens an die Aktivierungsdomäne (AD) bzw. Bindedomäne (BD) des *GAL4*-Transkriptionsaktivators wurde das Shuttlevektor-Paar pGAD GL/ pGBT9 gewählt (s. 2.1). Die Expression der *GAL4*-Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des starken Promotors der Alkohol-Dehydrogenase aus *S. cerevisiae*, der einer partiellen Katabolit-Repression durch Glucose unterliegt. Das Wachstum von Transformanten, die auf Interaktion der Hybridproteine hin untersucht werden sollen, erfolgt aus diesem Grund auf einem Saccharose-haltigen Medium. Ein plasmidkodiertes Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“) stellt sicher, daß die entstehenden Fusionsproteine in den Zellkern der Hefezelle transportiert werden (SILVER et al., 1984).

Die Klonierung von *dhaF* in den Vektor pBGT9 erfolgte über PCR mit Hilfe der Primer „dhaFCf1-pGBT9“ und „dhaFCf2“ unter den schon beschriebenen Bedingungen (s. 3.5.1). Das PCR-Produkt mit einer Länge von 1,833 kb wurde über die während der PCR eingeführten *EcoRI*-Schnittstellen in den Vektor pGBT9 kloniert. Zur Überprüfung der Orientierung des *dhaF*-Gens zur *GAL4*-Bindedomäne wurde das Konstrukt einem Restriktionsverdau mit *BamHI* unterzogen. Ferner wurde die Genfusion durch Sequenzierung überprüft. Das Konstrukt mit der Genfusion *GAL4*-BD-*dhaF* wurde pCS300 genannt (s. Abbildung 35).

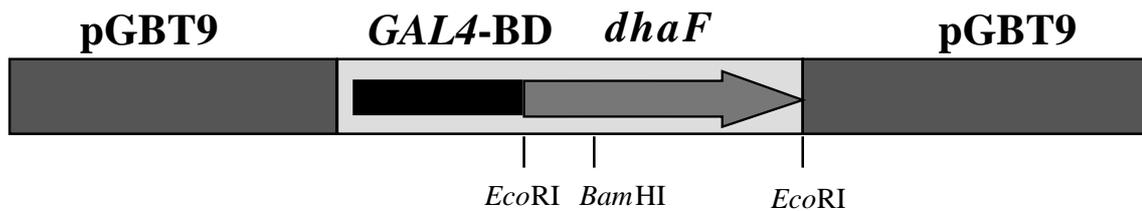


Abbildung 35: Schematische Darstellung des Plasmids pCS300

Zur Klonierung des *dhaG*-Gens in den Vektor pGAD GL wurde das Plasmid pCS110 genutzt, das über die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen des Vektors pKK223-3 das *dhaG*-Gen trägt (s. 3.5.3.2). Über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* erfolgte die Exzision des *dhaG*-Gens. Das dabei erhaltene DNA-Fragment wurde dann in den entsprechend linearisierten Vektor pMPM-K4 kloniert. Das entstandene Konstrukt wurde als pCS301 bezeichnet. Für die Klonierung des *dhaG*-Gens in den Vektor pGAD GL wurde das *dhaG*-Gen mittels eines Doppelverdaus mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem Plasmid pCS301 herausgeschnitten und in einem weiteren Schritt in den mit *EcoRI/XhoI* linearisierten Vektor pGAD-GL kloniert. Das Konstrukt pCS302 wurde durch Sequenzierung überprüft und trug das Fusionsgen aus GAL4-AD und *dhaG* (s. Abbildung 36).

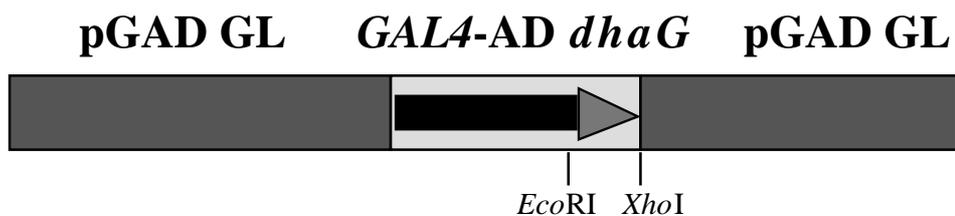


Abbildung 36: Schematische Darstellung des Plasmids pCS302

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen den Proteinen DhaF und DhaG mit den Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase mittels des Zweihybrid-Systems wurde zunächst als Positivkontrolle das Vektorpaar pCS300/pCS302 in den *S. cerevisiae*-Stamm HF7c kotransformiert (s. 2.8.4), da schon gezeigt werden konnte, daß DhaF und DhaG einen Komplex bilden (s. 3.5.3.6). Die erhaltenen Transformanten wurden auf Interaktion ihrer

Fusionsproteine untersucht. Dazu wurde ein Minimalmedium (s. 2.2.1.9) ausgewählt, dem neben Leucin und Tryptophan auch Histidin fehlte. Die erhaltenen Kotransformanten waren ohne Ausnahme in der Lage, in Abwesenheit von Histidin zu wachsen. Dies deutete auf eine Interaktion von DhaF und DhaG hin. Da es sich bei dem Histidin-Marker um einen schwachen Selektionsmarker handelt, wurde dem Medium ein Strukturanalogon des Histidins zugesetzt (3-Aminotriazol; KAMPS, 1998). Die vom 3-Aminotriazol ausgehende kompetitive Hemmung wurde durch die Kotransformanten, die pCS300 und pCS302 enthielten, ebenfalls überwunden. Die Untersuchung der Interaktion mittels des *lacZ*-Reportergens durch Filterassay (s. 2.8.7) führte ebenfalls zu einem positiven Phänotyp (Blaufärbung) der Kolonien. Als Negativkontrollen wurden die Plasmide pCS300 und pCS302 einzeln in den *S cerevisiae*-Stamm HF7c transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Leucin bzw. Tryptophan freiem Minimalmedium (s. 2.2.1.9). Anschließend wurde das Wachstum der Transformanten auf einem Histidin-freien 3-Aminotriazol enthaltenen Medium untersucht. Entgegen der Erwartungen wuchsen ca. 50 % der Transformanten, die pCS300 enthielten, auf diesem Medium. Auch der daraufhin durchgeführte β -Galactosidase-Filterassay (s. 2.8.8) führte zur Blau-Färbung der Transformanten-Kolonien. Dies deutete fälschlicher Weise auf eine Interaktion hin. Das Phänomen der Blaufärbung der Negativkontrollen ist ein bereits bei Interaktionen von Transkriptionsaktivatoren für das Zweihybrid-System beschrieben worden. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint das System nicht für die Untersuchungen der Interaktionen der Proteine DhaF und DhaG zu den Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase geeignet zu sein.

3.6.5 Coenzym B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors DhaFG

Coenzym B₁₂-abhängige Proteine können Coenzym B₁₂ auf zwei verschiedene Art und Weisen binden. Die Methionin-Synthase aus *E. coli* (DRENNAN et al., 1994), die Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii*; (MANCIA et al., 1996; MANCIA und EVANS, 1997; PADMAKUMAR et al., 1995) und die Glutamat-Mutase aus

Clostridium cochlearium (ZELDER et al., 1995) binden Coenzym B₁₂ in der sogenannten „base-off“-Form. Dabei wird der 5,6-Dimethylbenzimidazoligand des Coenzym B₁₂ durch die Imidazoleinheit eines Histidins des Proteins ersetzt. Die Sequenz Asp-x-His-x-x-Gly ist in all diesen Enzymen konserviert (DRENNAN et al., 1994). Dagegen besitzen sowohl die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* (TOBIMATSU et al., 1995) als auch die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* kein solches Bindemotiv. Sie binden Coenzym B₁₂ in der sogenannten „base-on“-Form, bei der die 5,6-Dimethylbenzimidazoleinheit des Coenzym B₁₂ am Cobalt-Atom koordiniert bleibt.

Für die Untersuchungen zur B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors wurde dieser (20 µg/Ansatz) mit 2 mM 1,2-Propandiol, 2 mM Coenzym B₁₂ bzw. Cyano-B₁₂ in 25 µl KP-Puffer (55 mM; pH 8,0) mit 38,5 mM KCl für 30 min bei 37°C unter Lichtausschluß inkubiert. Einige Ansätze enthielten außerdem 12 mM ADP bzw. ATP. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit BSA. Nach der Inkubation wurden die Proben einer milden SDS-PAGE unterzogen (s. 2.19.2). Dabei kommt es zur Trennung der einzelnen Untereinheiten, ohne daß der gebundene Cofaktor abtrennt wird (LU et al., 1993). Die Trennung der einzelnen Ansätze mittels milder SDS-PAGE (s. 2.19.2) zeigte, daß BSA Coenzym B₁₂ nicht bindet. Das im Ansatz enthaltene Coenzym B₁₂ befand sich nach der Elektrophorese vollständig in den Geltaschen. Bei den Proben, die den Reaktivierungsfaktor enthielten, befand sich das Coenzym B₁₂ bzw. Cyano-B₁₂ nach der Elektrophorese ebenfalls in den Geltaschen. Es konnte keine rote Bande in Höhe der beiden Protein DhaF und DhaG identifiziert werden. Auch die Zugabe von ATP bzw. ADP zum Reaktionsansatz führte zu keiner nachweisbaren Coenzym B₁₂- bzw. Cyano-B₁₂ Bindung durch den Reaktivierungsfaktor. Dies könnte einerseits bedeuten, daß der Komplex kein Coenzym B₁₂ bzw. Cyano-B₁₂ bindet oder aber beide Untereinheiten des Reaktivierungsfaktors für eine B₁₂-Bindung benötigt werden. Daher sollte die B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors unter nativen Bedingungen untersucht werden.

Für die weiteren Versuche wurde ¹⁴C-radioaktiv markiertes Coenzym B₁₂ hergestellt, da dieses kommerziell nicht erhältlich ist, und die Sensitivität des Nachweises der B₁₂-Bindung mittels Dot-Blot-Verfahren erhöht. Die Synthese des radioaktiv markierten

Coenzym B₁₂ erfolgte wie unter 2.14 beschrieben. Das ¹⁴C-Coenzym B₁₂ eluierte von der HPLC-Säule bei einer Retentionszeit von 20,6 min. Die Radioaktivität betrug 6,7 kBq. Durch Aufnahme eines UV-Vis-Spektrums und den Vergleich dieses Spektrums mit den Spektren verschiedener B₁₂-Derivate wurde der Nachweis erbracht, daß es sich bei dem synthetisierten, radioaktiven B₁₂ um Coenzym B₁₂ handelte. Die biologische Aktivität des radioaktiv markierten Coenzym B₁₂ wurde mit der Glycerin-Dehydratase untersucht. Diese war bei Zugabe des Präparats zum Testansatz aktiv (s. 2.17.1).

Für Untersuchungen zur Coenzym B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors wurde dieser (10 µg) unter anaeroben Bedingungen mit dem ¹⁴C-Coenzym B₁₂ (2 µl) in Gegenwart von 2 mM 1,2-Propandiol in 10 µl KP-Puffer (55 mM; pH8,0) mit 38,5 mM KCl inkubiert. Einigen Ansätzen wurde außerdem ADP (s. Abbildung 37; 5) bzw. ATP (s. Abbildung 37; 6) in einer Konzentration von 12 mM zugesetzt. Hierbei diente die Glycerin-Dehydratase (s. Abbildung 37; 3) als Positivkontrolle und BSA (s. Abbildung 37; 2) als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne Protein (s. Abbildung 37; 1) als Negativkontrolle verwendet. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min wurden 2 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes auf Nitrocellulose-Membranen gegeben (s. 2.25.1). Nach dem Trocknen der Membranen wurde ungebundenes Coenzym B₁₂ durch 2-maliges Waschen der Membran mit KP-Puffer (55 mM; pH 8,0) mit 38,5 mM KCl abgetrennt. Alternativ wurden die Membranen mit KP-Puffer gewaschen, der entweder 12 mM ATP oder 12 mM ADP enthielt. Der Nachweis von gebundenem, radioaktiv markiertem Coenzym B₁₂ erfolgte mittels Autoradiographie (s. 2.11). Die Auswertung der Autoradiographie ergab zunächst, daß bei allen Membranen das gleiche Ergebnis erzielt wurde. Die Verwendung verschiedener Waschpuffer hatte demnach keinen Einfluß auf das Ergebnis. Bei den Ansätzen, die den Reaktivierungsfaktor enthielten, konnte radioaktiv markiertes Coenzym B₁₂ nachgewiesen werden. Dies wies auf eine Bindung des Coenzym B₁₂ an den Komplex hin (s. Abbildung 37). Die Anwesenheit von ATP bzw. ADP im Reaktionsansatz hatte keinen Einfluß auf die B₁₂-Bindung. Bei der Negativkontrolle mit BSA dagegen erfolgte kein Nachweis von Radioaktivität (s. Abbildung 37; 2). Jedoch zeigte sich, daß radioaktiv markiertes Coenzym B₁₂ auch in Abwesenheit von Protein an die Membran

bindet (s. Abbildung 37; 1). Daher konnte mit dieser Methode kein eindeutiger Beweis für die Coenzym B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors erbracht werden.

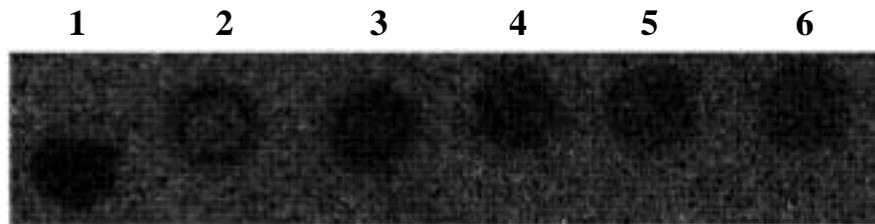


Abbildung 37: Nachweis der B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors mittels „Dot-Blot“-Verfahren mit ¹⁴C markiertem Coenzym B₁₂

Unter anaeroben Bedingungen wurde der Reaktivierungsfaktor wie bereits beschrieben mit radioaktiv markiertem Coenzym B₁₂ in Gegenwart von ATP (6), ADP (5) oder ohne (4) inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Glycerin-Dehydratase (3). BSA (2) und eine Ansatz ohne Protein (1) wurden als Negativkontrollen herangezogen.

Ein weiterer Hinweis auf eine B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors konnte durch die Bindung von DhaFG an eine Vitamin B₁₂-Agarose erbracht werden. Diese Agarose besitzt als Liganden Vitamin B₁₂. Nur B₁₂-bindende Proteine reagieren spezifisch mit diesem Material. Der mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigte Reaktivierungsfaktor (s. 3.5.3.6) wurde für eine Affinitätschromatographie an einer Vitamin B₁₂-Agarose eingesetzt. Dafür erfolgte zunächst ein Pufferwechsel in Äquilibrierungspuffer (100 mM Glycin/KCl, pH 8,6) mittels einer Gelfiltration an einer PD 10-Säule (s. 2.16.3). Insgesamt wurden ca. 500 µg gereinigter Reaktivierungsfaktor auf die Säule aufgetragen. Die Affinitätschromatographie erfolgte wie unter 2.16.2 beschrieben. Die Elution des Reaktivierungsfaktors erfolgte durch ansteigende NaCl-Konzentrationen des Puffers. Die Analyse der verschiedenen Eluate wurde mittels SDS-PAGE (s. 2.19.2) und anschließender Silberfärbung (s. 2.20.2) durchgeführt. Erst mit steigenden NaCl-Konzentrationen (100 mM bis 1M) im Puffer konnte der Reaktivierungsfaktor in den entsprechenden Eluaten nachgewiesen werden (s. Abbildung 38, Spuren 4 bis 6). Durch Elution mit Vitamin B₁₂-haltigem Puffer konnte eine spezifische Bindung des

Reaktivierungsfaktors an das Material bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach bindet der Reaktivierungsfaktor an die Vitamin-B₁₂-Agarose. Dies deutet auf eine B₁₂-Bindung durch den DhaFG-Komplex hin.

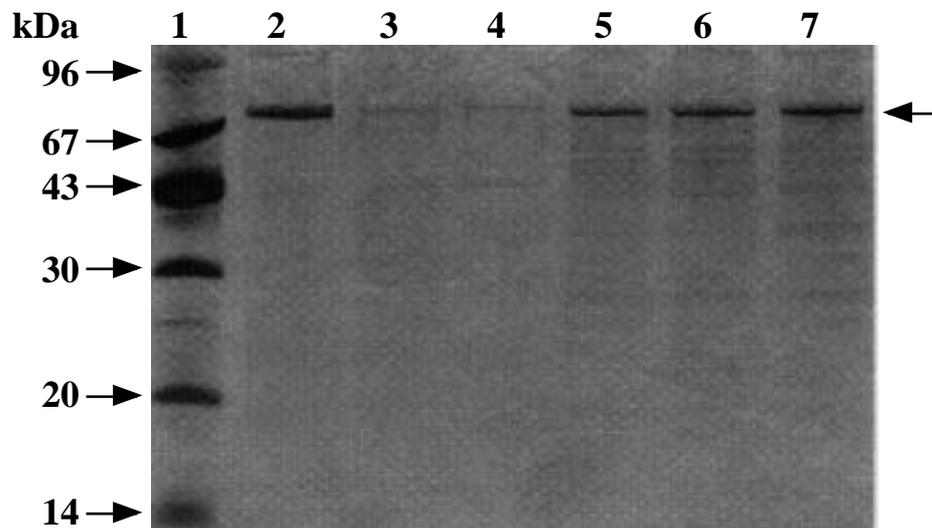


Abbildung 38: Analyse der Bindung des Reaktivierungsfaktors an eine Vitamin B₁₂-Agarose durch SDS-PAGE

SDS-PAGE und Silberfärbung wurden wie unter 2.19.1 und 2.20.2 beschrieben durchgeführt.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Durchlauf

Spur 3: Waschen mit Äquilibrationpuffer

Spur 4: Elution mit 100 mM NaCl

Spur 5: Elution mit 500 mM NaCl

Spur 6: Elution mit 1 M NaCl

3.6.6 ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse von DhaF und DhaFG

Die Versuche zur Reaktivierung der Hologlycerin-Dehydratase und die Aktivierung des Cyano-B₁₂-Dehydratase-Komplexes hatten gezeigt, daß beide Prozesse strikt abhängig von der Zugabe von ATP waren (s. 3.5.5.1 und 3.5.5.3). ADP, AMP und das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon ATP- γ -S konnten ATP nicht ersetzen. Dies deutete darauf hin, daß die ATP-Hydrolyse essentiell für die von DhaFG katalysierte Reaktivierungsreaktion ist. Um eine ATP-Hydrolyse-Aktivität nachzuweisen, wurde der

Komplex DhaFG (15 µg) bzw. DhaF (15 µg) allein mit [32 P]ATP wie unter 2.17.3 beschrieben inkubiert. Einige Ansätze enthielten zusätzlich Coenzym B₁₂, Glycerin-Dehydratase (2 µg) und 1,2-Propandiol bzw. Glycerin. Nach einer Inkubation bei 37°C wurde zu bestimmten Zeitpunkten die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Ethanol abgestoppt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand (0,5 µl) auf eine TLC-Platte aufgetragen. Die Trennung von ATP, ADP und AMP erfolgte durch Dünnschichtchromatographie mit 2 M Ameisensäure und 0,5 M LiCl als Laufmittel (s. 2.17.3). Durch die negative Ladung der TLC-Platte zeigt ATP gegenüber ADP und AMP ein geringeres Laufverhalten. Durch eine anschließende Autoradiographie konnten die verschiedenen Adeninnukleotide sichtbar gemacht und quantifiziert werden (s. 2.11). Die Analyse der Produkte der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie zeigte die Bildung von ADP und damit die Hydrolyse von ATP durch DhaFG. Zum Reaktionsstart (Abbildung ; Spur 2) konnte nur ATP nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationsdauer von 90 min kam es im Gegensatz zur Negativkontrolle (Abbildung 39; Spur 1) zur Bildung von ADP (Abbildung 39; Spur 3).

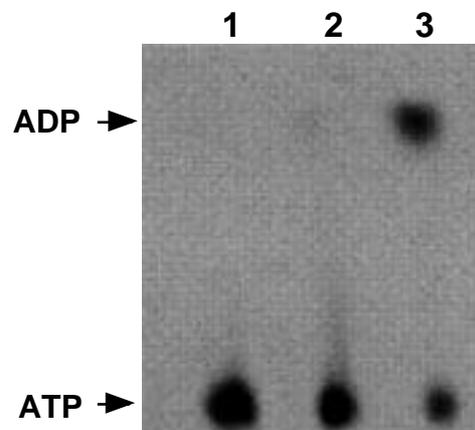


Abbildung 39: Analyse der Produkte der ATP-Hydrolyse durch den Reaktivierungsfaktor mittels Dünnschichtchromatographie

Spur 1: BSA nach einer 90 minütigen Inkubation

Spur 2: DhaFG am Reaktionsstart

Spur 3: DhaFG nach einer 90 minütigen Inkubation

Tabelle 9: ATP-Hydrolyse-Aktivität von DhaF und dem Komplex DhaFG unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Protein	Reaktionsbedingungen				Bildung von
	Glycerin-Dehydratase	Anaerob	Substrat	Coenzym B ₁₂	ADP (%)
DhaFG	+	+	Glycerin	+	31
DhaFG	+	+	1,2-Propandiol	+	27
DhaFG	+	+	Glycerin	-	33
DhaFG	+	+	kein	+	27
kein	+	+	Glycerin	+	0
DhaFG	-	+	kein	-	25
DhaFG	+	-	Glycerin	+	28
DhaFG	-	-	kein	-	25
DhaG	+	+	Glycerin	+	0
DhaG	-	+	Glycerin	+	0
DhaF	-	-	kein	-	25
DhaF	-	+	kein	-	27
DhaF	+	+	Glycerin	+	28

Die ADP-Bildung wurde unter verschiedenen Bedingungen nach einer Inkubation von 90 min quantifiziert (s. Tabelle 9). Die Anwesenheit der Glycerin-Dehydratase, Coenzym B₁₂, Glycerin, 1,2-Propandiol oder Kombinationen dieser Komponenten hatten unter den beschriebenen Konditionen keinen Einfluß auf die ATP-Hydrolyse durch den Reaktivierungsfaktor. In allen Fällen wurden innerhalb von 90 min ca. 30 % der initialen ATP-Menge in ADP überführt. Die Menge des gebildeten ADP war unter reaktivierenden und nicht-reaktivierenden Bedingungen identisch. Dies deutete darauf hin, daß die ATP-Hydrolyse nicht direkt mit der Reaktivierungsreaktion gekoppelt ist. Desweiteren stimmte die ATP-Hydrolyse-Rate des Reaktivierungsfaktor mit der des DhaF-Proteins allein überein.

Somit scheint DhaF die ATPase des Reaktivierungsfaktors zu sein. DhaG allein zeigte keine ATP-Hydrolyse-Aktivität.

Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, daß DhaF allein in der Lage ist, ATP zu binden (s. Abbildung 40). Hierzu wurde DhaF (8 µg) mit 30 µCi [32 P]ATP wie unter 2.25.2 beschrieben für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit BSA (8 µg). Ein Aliquot der Ansätze (8 µl) wurde anschließend durch native PAGE getrennt (s. 2.19.3). Nach Trocknen des Gels wurden die radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie (s. 2.11) sichtbar gemacht. In Abbildung 40 ist zu erkennen, daß DhaF im Gegensatz zur Negativkontrolle radioaktiv markiert wurde und somit eine ATP-Bindung vorlag.

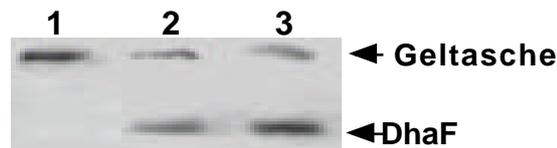


Abbildung 40: ATP-Bindung von DhaF

BSA und DhaF wurden wie unter 2.25.2 beschrieben mit [32 P]ATP für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels nativer Gradienten-PAGE (s. 2.19.3) getrennt. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte durch Autoradiographie (s. 2.11).

Spur 1: BSA

Spur 2 & 3: DhaF

4 Diskussion

Seit der Entdeckung eines lichtsensitiven Corrinoidfaktors durch BARKER et al. (1958), der an der Umsetzung von Glutamat zu 3-Methylaspartat durch die Glutamat-Mutase beteiligt ist, wurden weitere Coenzym B₁₂-abhängige Enzyme entdeckt und näher untersucht. Diese kann man in 3 Klassen einteilen. Die erste Klasse von Enzymen katalysiert eine Neuordnung des Kohlenstoffgerüsts. Dazu gehören die Glutamat-Mutase (SWITZER, 1982), 2-Methylenglutarat-Mutase (BUCKEL und GOLDING, 1996), Methylmalonyl-CoA-Mutase (RETEY, 1982) und die Isobutyryl-CoA-Mutase (MOORE et al., 1995). Enzyme der zweiten Klasse katalysieren die Eliminierung von Heteroatomen. Hierzu zählen die Ethanolamin-Ammoniak-Lyase (BABIOR, 1982), die Ribonukleotid-Reduktase, die Diol- und die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glycerin-Dehydratasen (TORAYA, 1994). Die Coenzym B₁₂-abhängige Aminomutase (BAKER und STADTMAN, 1982) katalysiert die intramolekulare Wanderung von Aminogruppen und repräsentiert die dritte Gruppe. Obwohl die Reaktionen sehr unterschiedlich erscheinen, folgen sie jedoch bis auf die Reaktion der Ribonukleotid-Reduktase einem Schema. Bei den Coenzym B₁₂-abhängigen Reaktionen wandert ein Wasserstoffatom im Austausch gegen eine Gruppe X von einem Kohlenstoffatom des Substrats zu einem anderen (ABELES und DOLPHIN, 1976; BABIOR, 1975).

4.1 Inaktivierung von B₁₂-abhängigen Proteinen

Glycerin- und Diol-Dehydratasen katalysieren die Coenzym B₁₂-abhängige Umsetzung von Glycerin zu α -Hydroxypropionaldehyd. Sie unterliegen jedoch einer auf dem radikalischen Mechanismus basierenden „Suicide“- Inaktivierung durch dieses Substrat (TORAYA et al., 1976; BACOVCHIN et al., 1977; POZNANSKAYA et al., 1977; SEYFRIED et al., 1996). Ein vereinfachter Reaktionsmechanismus von Glycerin- und Diol- Dehydratasen, der auch

für einige andere Coenzym B₁₂-abhängige Enzyme gilt, ist in Abbildung 41 dargestellt (ABELES und DOLPHIN, 1976; ABELES, 1979; TORAYA, 1994; BABIOR, 1975; BABIOR, 1988; BUCKEL und GOLDING, 1996).

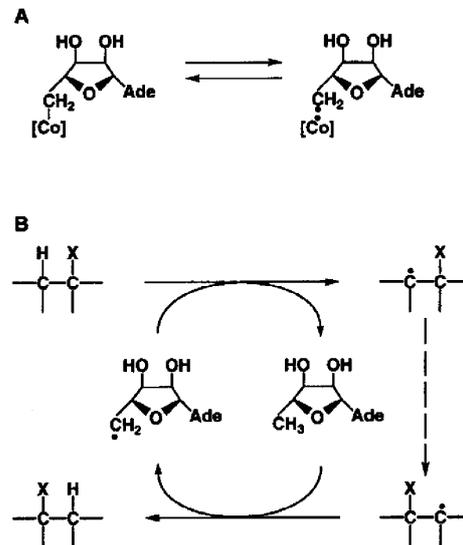


Abbildung 41: Vereinfachter Mechanismus für Coenzym B₁₂-abhängige Diol- und Glycerin-Dehydratasen.

(A) Homolytische Spaltung der Co-C Bindung des enzymgebundenen Coenzym B₁₂. (B) Adenosyl-Radikal-katalysierte enzymatische Umlagerung.

[Co]; Cobalamin; Ade; 9-Adeninyll; X, wandernde Gruppe

Die Interaktion zwischen Apoenzym und Coenzym bewirkt eine Aktivierung der Co-C-Bindung des Coenzym B₁₂. Dies führt zur Homolyse der Co-C-Bindung und Bildung von Cob(II)alamin und einem Adenosyl-Radikal. Letzteres spielt eine entscheidende Rolle bei der Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Substrat. In Abwesenheit des Substrats liegt nur ein kleiner Teil des Coenzym in der dissoziierten Form vor. Die Zugabe von Substrat zum Komplex verschiebt das Gleichgewicht stark in Richtung der dissoziierten Form. Das Adenosyl-Radikal abstrahiert ein Wasserstoffatom vom Substrat. Daraus resultieren ein vom Substrat hergeleitetes Radikal und 5'-Desoxyadenosin. Das Substrat-Radikal rearrangiert dann zu einem Produkt-Radikal durch einen Hydroxylgruppentransfer

von C2 zu C1. Das Produkt-Radikal überträgt ein Wasserstoffatom auf 5'-Desoxyadenosin. Das Resultat ist die Bildung des Endprodukts und die Regeneration von Coenzym B₁₂. Die Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* durch ihr natürliches Substrat Glycerin wurde im Laufe dieser Arbeit näher untersucht (s. 3.4). Beide Enzyme wurden während der Reaktion mit Glycerin innerhalb von wenigen Minuten fast vollständig inaktiviert. Ein Vergleich der Glycerininaktivierung der Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* zeigte, daß das Enzym aus *Cl. pasteurianum* deutlich schneller inaktiviert wurde. Bei den Untersuchungen von SEYFRIED et al. (1996) zur Inaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* betrug die Aktivität nach einer Inkubationsdauer von 2,5 min in Gegenwart von Glycerin noch 59 % im Vergleich zur Anfangsaktivität. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen hervorragend überein. Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* wies nach einer Inkubation von 5 min noch 61 % der Anfangsaktivität auf (s. 3.4). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von TORAYA et al. (1976) und POZNANZKAYA et al. (1977) bei entsprechenden Untersuchungen der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* und der Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* erzielt. Die Diol- und Glycerin-Dehydratasen weisen jedoch unterschiedliche Raten für die Inaktivierung auf. Die Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* besitzt nach einer Inkubation von 5 min in Gegenwart von Glycerin noch eine Aktivität von 58 %, dagegen ist die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* fast vollständig inaktiv (POZNANSKAYA et al., 1977; BACHOVCHIN et al., 1977; TORAYA et al., 1976). Keine signifikante Inaktivierung tritt mit 1,2-Propandiol auf. Dies gilt auch für die Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum*. Der Aktivitätsverlust betrug nach 50 min Inkubation weniger als 10 % (s. 3.4).

Die auf dem Mechanismus basierende Inaktivierung der Dehydratasen durch Glycerin wird durch eine irreversible Spaltung der Co-C-Bindung des Coenzym B₁₂ hervorgerufen (s. Abbildung 42). Dabei kommt es zur Bildung von 5'-Desoxyadenosin und einer unbekanntem Cobalaminspezies, die ein Spektrum ähnlich wie das von Alkylcobalamin zeigt (BACHOVCHIN et al., 1977). Diese unbekanntem Cobalaminspezies wird sehr langsam in

Hydroxy-B₁₂ umgewandelt, bindet mit hoher Affinität an die Dehydratase und inaktiviert diese irreversibel.

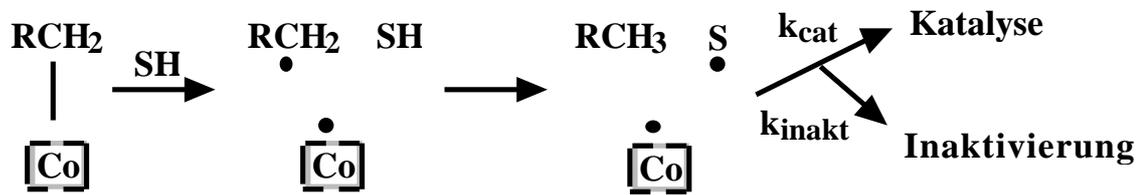


Abbildung 42: Verzweigung zwischen Katalyse und „Suicide“-Inaktivierung, hervorgerufen durch die irreversible Spaltung der Co-C-Bindung
RCH₂, Adenosyl; [Co], Cobalamin, SH, Substrat.

Die zwei Hydroxylgruppen von Glycerin, die an das prochirale C2-Atom binden, sind enantiotop Substituenten. Dies hat zur Folge, daß 2 chemisch verschiedene diastereomere Kombinationen eines Enzym-Glycerin-Komplexes entstehen können, die mit EG_S und EG_R bezeichnet werden (s. Abbildung 43). EG_S repräsentiert Glycerin, das mit der (pro-S)-Hydroxymethylgruppe an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden ist, das in die Abstraktion eines Wasserstoffatoms („A“) involviert ist. EG_R zeigt den dazu korrespondierenden Enzym-Glycerin-Komplex, bei dem Glycerin mit der (pro-R)-Hydroxymethylgruppe gebunden ist. Durch Versuche mit deuteriertem Glycerin konnte gezeigt werden, daß die Produktbildung über die „S“-bindende Konformation verläuft, die Inaktivierung dagegen durch die „R“-bindende verursacht wird (BACHOVCHIN et al., 1977).

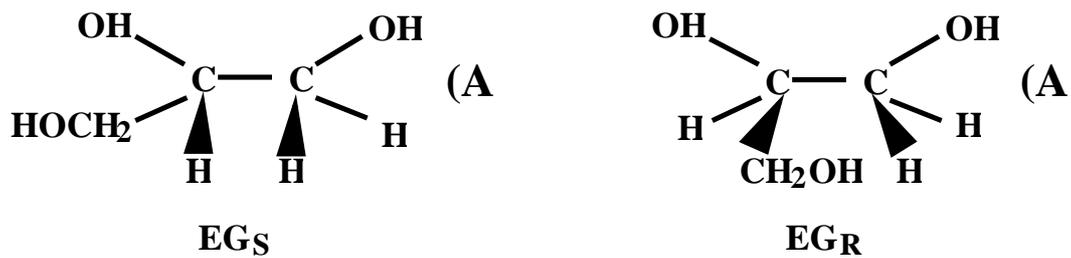


Abbildung 43: Zwei chemisch verschiedene diastereomere Enzym-Glycerin-Komplexen

A, aktives Zentrum der Dehydratase, das in die Abstraktion eines Wasserstoffatoms involviert ist.

Ferner werden die Dehydratasen durch verschiedene Coenzym B₁₂-Analoga inaktiviert (TORAYA und ABELES, 1980; TORAYA und ISHIDA, 1991; TORAYA et al., 1977; ICHIKAWA und TORAYA, 1988; TORAYA et al., 1994). Die Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* wurden durch eine 30 minütige Inkubation mit Cyano-B₁₂ vollständig inaktiviert (s. 3.5.5.3). Eine Inaktivierung der Diol-Dehydratase durch dieses Analogon wurde ebenfalls beschrieben. Der K_i-Wert für Cyano-B₁₂ liegt dabei im gleichen Bereich wie der K_m-Wert für Coenzym B₁₂ (POPPE und RETEY, 1997). Die Inaktivierung durch B₁₂-Analoga ist bei den Imidazolyl- und Pyridyl-Trimethylen-Analoga sehr stark, da die Enzymreaktion innerhalb von 2 bzw. 8 min vollständig zum Stillstand kommt. Während der Inkubation von Imidazolyl- und Pyridyl-Analoga mit dem Apoenzym in Anwesenheit von Substrat kommt es zur Bildung einer Cbl(II)-ähnlichen Spezies, wobei das EPR-Signal für das organische Radikal schnell verschwindet (TORAYA und ISHIDA, 1991; TORAYA et al., 1994; YAMANISHI et al., 1998 a). AdoCbi-PMe, ein inaktives Coenzym, das statt der DBI-Einheit eine CH₃-Gruppe besitzt, inaktiviert die Dehydratase irreversibel in Gegenwart von Substrat (ISHIDA und TORAYA, 1993). Es wird zu Cob(II)inamidmethylphosphat umgesetzt. Dabei ist kein Signal für das organische Radikal detektierbar (ISHIDA und TORAYA, 1993; YAMANISHI et al., 1998a). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß durch das Verschwinden des organischen Radikals die Inaktivierung der

Dehydratase durch Coenzym B₁₂-Analoga bewirkt wird. Da die Inaktivierung nur in Anwesenheit von Substrat erfolgt, wird dafür ein zur Glycerin-Inaktivierung vergleichbarer Mechanismus angenommen (s. Abbildung 44; TORAYA und ISHIDA, 1991; ISHIDA und TORAYA, 1993; YAMANASHI et al., 1998b). Ein Radikal-Intermediat wird durch unerwünschte Nebenreaktionen aus dem aktiven Zentrum des Enzyms entfernt. Dadurch wird die Regeneration des Coenzym B₁₂ unmöglich. Dies führt zur Inaktivierung, da das modifizierte Coenzym B₁₂ mit hoher Affinität an die Dehydratase bindet und auch gegen freies Coenzym B₁₂ nicht austauschbar ist.

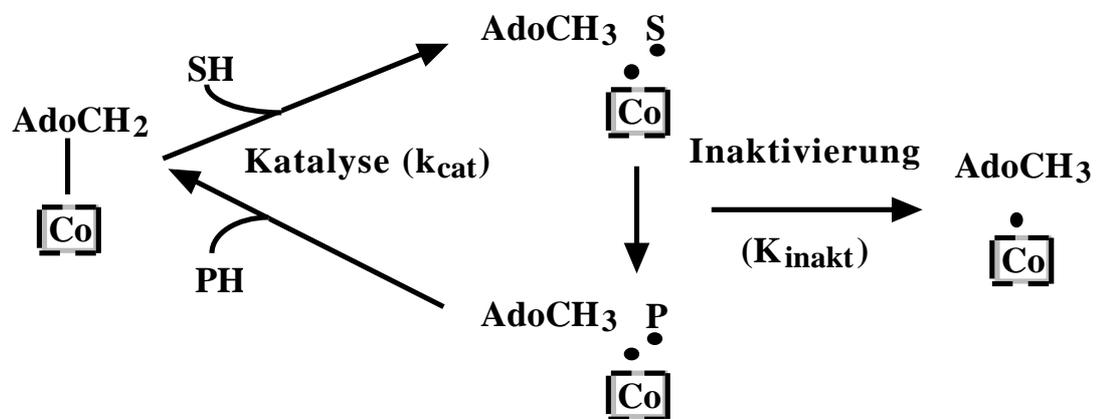
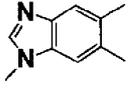
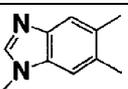
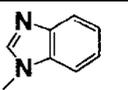
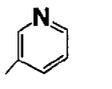


Abbildung 44: Mechanismus der Inaktivierung der Dehydratase durch Coenzym B₁₂-Analoga
 RCH_3 , 5'-Desoxyadeosin; $[\text{Co}]$, Cobalamin; SH, Substrat; PH, Produkt.

Versuche mit Coenzym B₁₂-Analoga hatten auch gezeigt, daß die Nukleotid-Einheit einen Einfluß auf die Inaktivierung der Dehydratase hat. Wie aus den $k_{\text{cat}}/k_{\text{inakt}}$ -Werten in Tabelle 10 zu entnehmen ist, verursachen AdoCbiP-Impr und AdoCbiP-PyPr eine stärkere Inaktivierung als ihr DBIyl-Gegenspieler oder das Coenzym B₁₂ selbst (TORAYA und ISHIDA, 1991; ISHIDA und TORAYA, 1993; TORAYA et al., 1994). Daher können diese beiden Analoga als „Suicide“-Coenzyme bezeichnet werden (TORAYA, 2000a). Im Fall der Inaktivierung mit AdoCbiP-Me war der $k_{\text{cat}}/k_{\text{inakt}}$ -Wert nahezu null und die Inaktivierung daher sehr ausgeprägt (ISHIDA und TORAYA, 1993). Dies ist daher ein sehr extremer Fall

der „Suicide“-Inaktivierung. Ein solches Analogon des Coenzym B₁₂ wird auch als „Pseudocoenzym“ bezeichnet (TORAYA, 2000a).

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen dem $k_{\text{cat}}/k_{\text{inakt}}$ -Wert und dem Umfang der Base von verschiedenen Coenzym B₁₂-Analoga (TORAYA, 1998)

Analogon	$k_{\text{cat}}/k_{\text{inakt}} \times 10^{-4}$	Base	
		Struktur	Umfang
Coenzym B ₁₂	144		sehr groß
AdoCbiP-DBIPr	70		sehr groß
AdoCbiP-BIPr	12		groß
AdoCbiP-PyPr	1,4		mittel
AdoCbiP-ImPr	0,33		klein
AdoCbiP-Me	0	keine	kein

Die Base der Nukleotid-Einheit hat demnach einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilisierung des hochaktiven Radikalintermediats und ist wichtig für die katalytische Reaktion (TORAYA und ISHIDA, 1991; ISHIDA und TORAYA, 1993; TORAYA et al., 1994). Daher ist Cbl^{II} nicht nur ein Zuschauer der Reaktion, sondern wirkt als Stabilisator für organische Radikal-Intermediate. Die Röntgenstruktur der Diol-Dehydratase zeigt, daß der Corrinring des Cyano-B₁₂ durch die Bindung zum Enzym abgeflacht und die Co-N Bindung verlängert ist (SHIBATA et al., 1999). Dies ist auch bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MANCIA et al., 1996) und der Glutamat-Mutase (REITZER et al., 1999) der Fall, jedoch nicht bei der Methionin-Synthase (LUDWIG et al., 1996). Daher ist es möglich,

daß die Homolyse der Co-C Bindung durch die Verlängerung der Co-N Bindung gegenüber der Heterolyse bevorzugt wird. Durch eine große Base wie DBI wird aufgrund von sterischen Behinderungen zwischen dem abgeflachten Corrinring und der Base die Co-N Bindung länger (SHIBATA et al., 1999). Die Rolle der DBI-Einheit liegt somit in der Verhinderung einer Inaktivierung der Dehydratasen (TORAYA, 1998), da die radikalischen Intermediate durch eine räumliche Isolierung vor löslichen Molekülen geschützt werden (SHIBATA et al., 1999). Die Diol-Dehydratase besteht aus einer dimeren Form eines Heterotrimeren ($\alpha_2\beta_2$). Jedes Heterotrimer ist in der Lage ein Molekül Coenzym B₁₂ zu binden. Das Coenzym ist jeweils zwischen der α - und β -Untereinheit lokalisiert. Der obere Ligand (Co) ist in Richtung der β -Untereinheit orientiert. Die β -Untereinheit spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Kontakt mit dem unteren Liganden des Cobalamins. Die β -Untereinheit enthält eine $(\alpha/\beta)_8$ „Barrel“-Struktur im zentralen Teil. Diese Struktur, der sogenannte „Triose-Phosphat-Isomerase (TIM)-Barrel“, wurde ebenfalls in der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MANCIA et al., 1996) und der Glutamat-Mutase (REITZER et al., 1999) gefunden. Das Cobalamin-Molekül ist in der Region lokalisiert, die vom C-terminalen Ende der β -Stränge des „TIM-Barrel“ gebildet wird. Die DBI-Einheit des Coenzym verschließt durch ihren großen Umfang den Zugang zum „TIM-Barrel“, wodurch die im „Barrel“ lokalisierte Co-C-Bindung des Coenzym B₁₂ und damit die radikalischen Intermediate vor äußeren Einflüssen geschützt sind. Das Substrat 1,2-Propandiol und das K⁺-Ion, ein essentieller Cofaktor, sind ebenfalls tief im „Barrel“ verborgen (LEE und ABELES, 1963; TORAYA et al., 1974).

Neben der Glycerinaktivierung führt eine aerobe Inkubation des Diol-Holoenzym in Abwesenheit von Substrat zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzym (LEE und ABELES, 1993; WAGNER et al., 1966). Durch eine Inkubation der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* mit Coenzym B₁₂ unter aeroben Bedingungen wurde diese innerhalb von 30 min fast vollständig inaktiviert (s. 3.5.5.2). Der Verlust der Aktivität verläuft dabei parallel zu einer Änderung des Spektrums von Coenzym B₁₂. Das resultierende Spektrum zeigt einen Peak bei 360 nm und ist dem von Hydroxy-B₁₂ sehr ähnlich (WAGNER et al.,

1966). Die Bildung von Hydroxy-B₁₂ erfolgt durch eine irreversible Spaltung der aktivierten Co-C-Bindung des Coenzym, die durch die Reaktion mit O₂ verursacht wird. Hydroxy-B₁₂ ist ein starker Inhibitor von Glycerin- und Diol-Dehydratase. Der K_i-Wert für die Bindung von Hydroxy-B₁₂ (8,6 bzw. 680 nM) ist kleiner als der K_m-Wert für die Bindung von Coenzym B₁₂ (12,6 bzw. 750 nM) (POPPE und RETEY, 1997). Bei beiden Enzymen schützen die Substrate und deren Analoga die aktive Dehydratase vor O₂-Inaktivierung (POZNANSKAYA et al., 1977; TORAYA und FUKUI, 1972). Wenn Glycerin, 1,2-Propandiol und Ethylenglycol als Substrate für die Glycerin-Dehydratase genutzt wurden, waren die Inaktivierungskonstanten geringer als die für das Holoenzym ohne Substrat (POZNANSKAYA et al., 1977).

Ein zu den Glycerin- und Diol-Dehydratase ähnliches Verhalten bezüglich der O₂-Inaktivierung zeigt auch die Coenzym B₁₂-abhängige Ethanolamin-Ammoniak-Lyase (SCHRAUZER und STADLBAUER, 1975). Das Enzym katalysiert die Deaminierung von verschiedenen Aminoalkoholen zu Oxoverbindungen und Ammoniak. So setzt das Protein Ethanolamin zu Acetaldehyd und Ammoniak um (BABIOR, 1970). Desweiteren ist Vitamin B₁₂ ein Inhibitor des Enzyms (SCARLETT und TURNER, 1976). Mit Ethanolamin als Substrat ist der Reaktionsverlauf der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase linear, wird jedoch 2-Aminopropanol als Substrat eingesetzt, unterliegt das Enzym einer Inaktivierung (BABIOR et al., 1974). Nach ca. 2 min Reaktionszeit waren 50 % des Coenzym B₁₂ zu Hydroxy-B₁₂ umgewandelt und dementsprechend betrug die Enzymaktivität ebenfalls nur noch 50 %. Die Lyase wies nach einer 10-minütigen Inkubation eine vollständige Inaktivierung auf. Die Inaktivierung des Enzyms bei Verwertung von Glycolaldehyd als Substrat zeigte, daß die Reaktion der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase der der Dehydratase gleicht, da die Inaktivierung durch dieses Substrat in beiden Fällen durch die Bindung eines modifizierten Coenzym hervorgerufen wurde (ABEND et al., 2000).

Auch die Coenzym B₁₂-abhängigen Enzyme der Klasse 1 und 3 werden während der Katalyse inaktiviert. Die Glutamat-Mutase katalysiert die reversible Coenzym B₁₂-abhängige Umlagerung von (S)-Glutamat zu (2S, 3S)-3-Methylaspartat (BARKER et al., 1958), den ersten Schritt der Glutamatfermentation von Acetat und Butyrat durch z. B.

Cl. cochlearium, *Cl. tetanomorphum* und *Cl. tetani* (BUCKEL und BARKER, 1974). Wird die Glutamat-Mutase über Nacht mit Coenzym B₁₂ und Substrat inkubiert, führt dies zur Bildung von inaktivem Enzym. Die Inaktivierung wird durch die Bindung von Pseudovitamin B₁₂, einem Cob(II)alamin, hervorgerufen. Auch die 2-Methylglutarat-Mutase wird bei einer längeren Inkubation mit Substrat und Coenzym B₁₂ inaktiviert (ZELDER und BUCKEL, 1993). Die Mutase ist ein Schlüsselenzym bei der Fermentation von Nicotinat zu Ammoniak, Propionat, Acetat und CO₂ durch *Cl. barkeri* (KUNG et al., 1970; KUNG und TSAI, 1971). Das Enzym katalysiert die reversible, Coenzym B₁₂-abhängige Umlagerung von 2-Methylglutarat zu (R)-3-Methylitaconat mit einer Inversion der Konfiguration (HARTRAMPF und BUCKEL, 1986).

Bei der Reduktion von Ribonukleotiden durch die Reduktase aus *L. leichmanii* ist Coenzym B₁₂ an einem Wasserstofftransfer beteiligt. Der Mechanismus der Reaktion ähnelt dem der Diol-Dehydratase und verschiedener Mutasen (HOGENKAMP et al., 1968; HOGENKAMP, 1968). Die Reaktion der Ribonukleotid-Reduktase unterscheidet sich von den anderen Reaktionen dadurch, daß das Wasserstoffatom von einer Thiolgruppe stammt (HAMILTON et al., 1971). Die Funktion des Coenzym B₁₂ ist die Bildung eines Thiyl-Radikals (STUBBE, 1990). Die Inaktivierung der Ribonukleotid-Reduktase ist ebenfalls mit der Umwandlung von Coenzym B₁₂ zu Cob(II)alamin in Gegenwart von Substrat verbunden (HAMILTON et al., 1971; YAMADA et al., 1971).

Coenzym B₁₂-abhängige Enzyme werden demnach durch viele Faktoren inaktiviert. In allen Fällen kommt es durch die Bildung eines am Enzym gebundenen, inaktiven Coenzym zur Inaktivierung der Proteine.

4.2 Regeneration von inaktivierten B₁₂-abhängigen Enzymen durch einen Reaktivierungsfaktor

Coenzym B₁₂-abhängige Enzyme werden durch Nebenreaktionen eines radikalischen Zwischenprodukts inaktiviert (s. 4.1). Damit ist es neben der Aufklärung des Reaktionsmechanismus wichtig, Untersuchungen zur Reaktivierung dieser Enzyme durchzuführen. BAKER et al. (1973) zeigten, daß die Coenzym B₁₂-abhängige -Lysin-Mutase während der Katalyse inaktiviert wird. Diese Inaktivierung wird durch die irreversible Spaltung der Co-C-Bindung des Coenzym B₁₂ hervorgerufen. Die Inaktivierung konnte durch die Zugabe eines Sulfhydryl-Proteins und ATP verhindert werden. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die Inaktivierung verhindert oder das inaktivierte Protein reaktiviert wurde. Im letzteren Fall wäre das Sulfhydryl-Protein ein Reaktivierungsfaktor für die -Lysin-Mutase. Die Diol- und Glycerin-Dehydratase unterliegen, wie bereits erwähnt, während der Umsetzung von Glycerin und anderen Substraten einer Inaktivierung. Die physiologischen Rollen dieser beiden Enzyme sind unterschiedlich. Die Diol-Dehydratase katalysiert die Dehydratisierung von 1,2-Propandiol, bei dessen anaeroben Abbau (TORAYA, 1994). Die Glycerin-Dehydratase katalysiert den ersten Schritt des reduktiven Zweiges der Glycerinfermentation (FORAGE und FOSTER, 1982). In einigen Bakterien wird die Glycerin-Dehydratase durch die isofunktionelle Diol-Dehydratase ersetzt (TORAYA et al., 1980; FORAGE und FOSTER, 1982). Die Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratase durch ihr Substrat Glycerin erscheint unverständlich, da Glycerin ein natürliches Wachstumssubstrat für die Bakterien ist. Diese Diskrepanz konnte durch die Entdeckung eines Reaktivierungsfaktors für die Diol-Dehydratase teilweise geklärt werden (TORAYA und MORI, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Reaktivierungsfaktor der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* identifiziert, isoliert und charakterisiert (s. 3.5). Der Reaktivierungsfaktor wird durch die beiden Gene *dhaF* und *dhaG* kodiert. Gene, die für Proteine kodieren, die homolog zu DhaF und DhaG aus *C. freundii* sind, befinden sich auch

bei *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* und *Cl. pasteurianum* in der Nähe der Strukturgene der Dehydratasen (s. Abbildung 45). Jedoch ist die genetische Organisation unterschiedlich. Bei *K. oxytoca*, *S. typhimurium* und *Cl. pasteurianum* sind beide Gene für den Reaktivierungsfaktor stromabwärts der Strukturgene lokalisiert. Bei *C. freundii* befindet sich dagegen nur das *dhaF*-Gen stromabwärts der Strukturgene und bildet mit diesen ein gemeinsames Operon. Das *dhaG*-Gen zeigt eine entgegengesetzte Orientierung und ist stromabwärts des kodierenden Gens für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase lokalisiert. Northern-Blot-Analysen zeigten, daß diese beiden Gene ebenfalls zusammen transkribiert werden (s. 3.5.1). Die genetische Organisation von *K. pneumoniae* ist zu der aus *C. freundii* identisch. Die Produktion des Reaktivierungsfaktors und damit die Aktivität der Glycerin-Dehydratase ist in diesen beiden Organismen mit der Bildung der 1,3-Propandiol-Dehydrogenase verbunden, die das cytotoxische Produkt der Glycerin-Dehydratase-Reaktion α -Hydroxypropionaldehyd zu 1,3-Propandiol umsetzt und damit entgiftet (s. Abbildung 2; TALARICO et al., 1988). Daher könnte die Kopplung beider Enzymaktivitäten zur Verhinderung einer Akkumulation des toxischen α -Hydroxypropionaldehyds in der Zelle dienen.

Die rekombinanten Proteine DhaF und DhaG aus *C. freundii* bilden einen dimeren Komplex mit einer apparenten Molekularmasse von ca. 150 kDA (s. 3.5.3.6). Dies wurde auch für den Faktor aus *K. oxytoca* gezeigt (TORAYA und MORI, 1999). Beide Enzyme sind nicht nur in der Lage, Glycerin-inaktivierte Dehydratasen zu reaktivieren, sondern reaktivieren auch das durch O_2 inaktivierte Holoenzym (s. 3.5.5.2. u. 3.5.5.2). Ferner können die Reaktivierungsfaktoren den inaktiven Enzym-Cyano- B_{12} -Komplex aktivieren (s. 3.5.5.3). Diese Reaktionen sind alle strikt abhängig von der Zugabe von freiem Coenzym B_{12} und $ATP/MgCl_2$ (s. 3.5.5). Nach 20 minütiger Inkubation betrug der Reaktivierungsgrad von Glycerin- bzw. O_2 -inaktivierter Dehydratase aus *C. freundii* 84 bzw. 54 % und der Aktivierungsgrad des Enzym-Cyano- B_{12} -Komplexes 95 %. Ähnliche Werte wurden von MORI und TORAYA (1999) für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* erzielt. Für die Reaktivierung der Dehydratasen werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert: 1.) Die

Regeneration des Coenzym B₁₂ durch Adenosylierung des gebundenen modifizierten Coenzym durch eine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase. 2.) Der direkte Austausch des inaktiven gebundenen Coenzym durch freies biologisch aktives Coenzym B₁₂. Beide Möglichkeiten wurden im Verlauf dieser Arbeit untersucht.

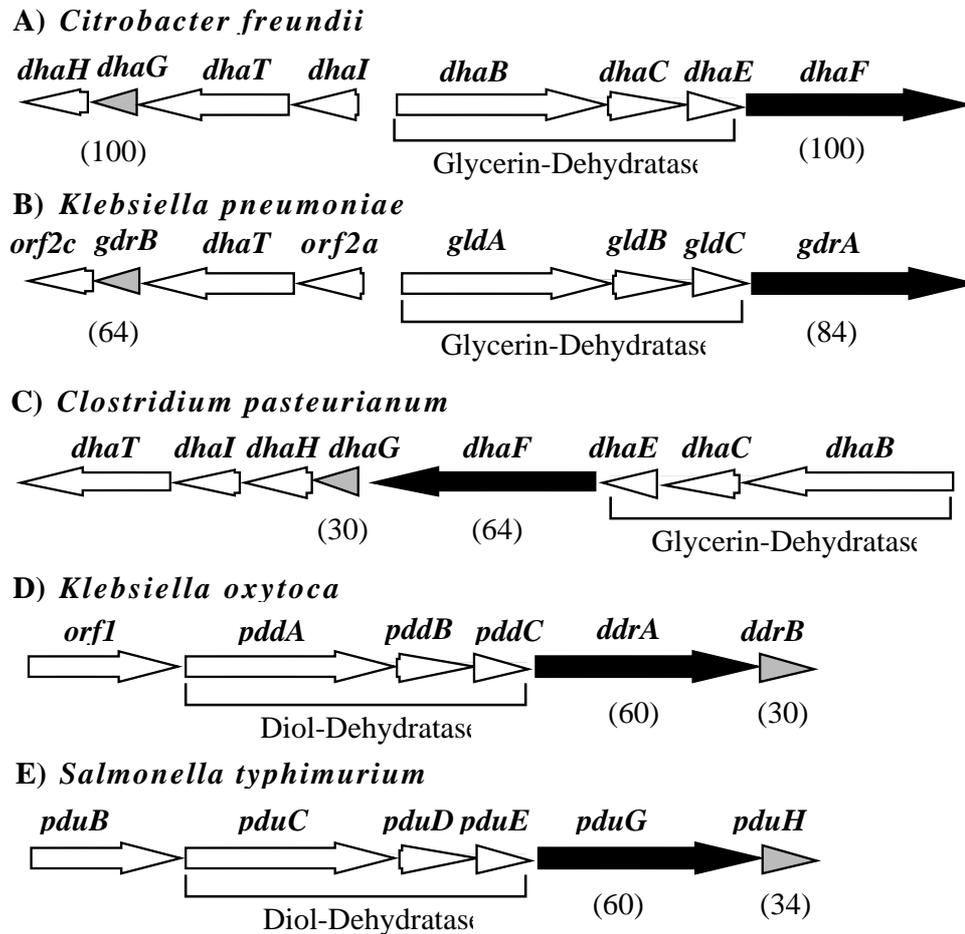


Abbildung 45: Genetische Organisation der chromosomalen DNA-Region, die für den reduktiven Zweig der Glycerinfermentation aus *C. freundii* (A), *K. pneumoniae* (B) und *Cl. pasteurianum* (C) und für Teile des 1,2-Propandiol-Abbaus aus *K. oxytoca* (D) und *S. typhimurium* (E) kodieren.

Pfeile und Pfeilspitzen repräsentieren die Länge, Position und Orientierung der Gene. Schwarze und graue Pfeile deuten offenen Leserahmen an, die für Homologe von DhaF bzw. DhaG aus *C. freundii* kodieren. Die prozentualen Aminosäureidentitäten der abgeleiteten Genprodukte im Vergleich zu DhaF und DhaG aus *C. freundii* sind in Klammern dargestellt.

4.2.1 Reaktivierung der Dehydratasen durch Adenosylierung des gebundenen modifizierten Coenzym

In *S. typhimurium* wird Coenzym B₁₂ nur unter strikt anaeroben Bedingungen synthetisiert (JETER et al., 1984). Cyano-B₁₂ und Hydroxy-B₁₂ können von *S. typhimurium* dagegen sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen aufgenommen werden (JETER, 1990). Die Umsetzung von Cyano-B₁₂ zu Coenzym B₁₂ erfolgt zunächst zu Hydroxy-B₁₂. Dieses wird zu Cob(II)alamin reduziert und dann weiter zu Cob(I)alamin. Zum Schluß erfolgt die Adenosylierung zu Coenzym B₁₂ (FRIEDMANN, 1975; HUENNEKENS et al., 1982). Das *cobA*-Gen kodiert für die dazu notwendige ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase (SUH und ESCALANTE-SEMERENA, 1993). Die Aktivität von CobA ist am höchsten bei einem pH in beiden Fällen von 8,0 und bei 37°C. Für die Reaktion werden divalente Kationen benötigt, wobei mit Mn²⁺-Ionen die höchste Aktivität erzielt wurde. Neben ATP dienen auch CTP, UTP und GTP als Donornukleotide. Interessanterweise ist GTP, das strukturell zu ATP am ähnlichsten ist, der schlechteste Donor. Die K_m-Werte für Cobalamin und ATP betragen 5,2 und 2,8 µM. Neben Cobalamin nutzt CobA auch Cobinamid als Substrat. Das Enzym ist sowohl in die Cobalamin-Aufnahme durch Adenosylierung von Cob(I)alamin als auch in die Neusynthese durch Adenosylierung eines Intermediates involviert (ESCALANTE-SEMERENA et al., 1990).

Neben dem CobA Enzym ist noch eine weitere Adenosyltransferase in *S. typhimurium* bekannt. Das Bakterium kann Ethanolamin als C-, N- und Energiequelle nutzen. Im *eut*-Operon sind die Gene für die Proteine organisiert, die in den Coenzym B₁₂-abhängigen Abbau von Ethanolamin involviert sind. SHEPPARD und ROTH (2001) postulieren, daß das *eutT*-Genprodukt eine Adenosyltransferase-Aktivität besitzt und Cyano-B₁₂ zu Coenzym B₁₂ umsetzt. EutT weist zu CobA keinerlei Homologie auf (KOFOID et al., 1999).

S. typhimurium ist in der Lage, anaerob auf 1,2-Propandiol zu wachsen. Die Gene für diesen Stoffwechselweg sind innerhalb des *pdu*-Operons organisiert. Dieses beinhaltet u. a. die Gene für die Coenzym B₁₂-abhängige Diol-Dehydratase. JOHNSON et al. (2001) zeigten

kürzlich, daß das *pduO*-Gen innerhalb dieses Operons für eine Adenosyltransferase kodiert. Die partiell gereinigte Präparation von heterolog produziertem PduO-Protein wies eine höhere Adenosyltransferase-Aktivität als das gereinigte CobA-Protein auf. Die Aktivität von PduO betrug 312 mU/mg, die von CobA dagegen nur 53 mU/mg (SUH und ESCALANTE- SEMERENA, 1995). Die Funktion von PduO ist die Umsetzung von inaktiven Cobalaminen zu Coenzym B₁₂. Genetische Tests zeigten, daß die Funktion des *pduO*-Gens teilweise durch das *cobA*-Gen ersetzt werden konnte. Ein optimales Wachstum von *S. typhimurium* auf 1,2-Propandiol war jedoch von einem funktionellen *pduO*-Gen abhängig. Ferner zeigten Wachstumsversuche, daß *cobA/pduO*-Doppelmutanten nicht in der Lage waren, auf Mineralmedium mit 1,2-Propandiol als C-Quelle und Cyano-B₁₂ zu wachsen. Erst durch Zugabe von Coenzym B₁₂ erfolgte Wachstum dieser Doppelmutanten. Da die drei hier beschriebenen Adenosyltransferasen keinerlei Homologie zueinander aufweisen, kann man sie in drei verschiedene Familien einteilen: PduO-Typ, CobA-Typ und EutT-Typ. Der EutT-Typ ist zusammen mit den Genen der Coenzym B₁₂-abhängigen Ethanolamin-Ammoniak-Lyase organisiert. Die Hauptfunktion der Adenosyltransferasen des CobA-Typs scheint in der Neusynthese von Coenzym B₁₂ zu liegen. Ein Sequenzvergleich von PduO auf Aminosäureebene mit anderen Genprodukten ergab Identitäten zu DhaH (41 %) und DhaI (37 %) aus *C. freundii* sowie zu Orf2c (43 %) und Orf2a (35 %) aus *K. pneumoniae*. Desweiteren weist PduO 22 % Identität zu AF1290 aus *Archaeoglobus fulgidus* auf, dessen analoges Gen benachbart zu potentiellen Genen für eine Coenzym B₁₂-abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase ist. Das in Abbildung 46 dargestellte Alignment zeigt, daß PduO N-terminal Ähnlichkeiten zu DhaH und C-terminal zu DhaI aus *C. freundii* aufweist.

Aufgrund der Sequenzübereinstimmungen konnte vermutet werden, daß ein Komplex aus DhaH und DhaI aus *C. freundii* Adenosyltransferase-Aktivität besitzt. Das heterolog produzierte DhaH-Protein allein sowie der DhaFG-Komplex wiesen aber keine solche Aktivität auf (s. 3.6.1). Die Gene für die Adenosyltransferasen des PduO-Typs sind mit denen für Glycerin- und Diol-Dehydratasen benachbart. Ihre Aufgabe ist es demnach, das

durch den Reaktivierungsfaktor von der Dehydratase gelöste modifizierte Coenzym in enzymatisch aktives Coenzym B₁₂ umzusetzen.

1					50
DhaI_Cf	-----	-----	-----	-----	-----
PduO_St	-MAIYTRTGD	AGTTSLEFTGQ	RVSKTHPRVE	AYGTLDELNA	ALSLCACAAA
DhaH_Cf	MYRIYTRTGD	NGTTALFGGS	RIDKDDIRVE	AYGTVDELIS	QLGVCYASTR
	51				100
DhaI_Cf	-----	-----	-----	-----	-----
PduO_St	DENHRTLLLEA	IQQQLFWFSA	ELASDSEQPS	PKQRYISSEE	ISALGSRYS
DhaH_Cf	QAELRQELHA	MQKMLFVLGA	ELASDQKGLT	RLKQRIGEED	IQALEQLIDR
	101				150
DhaI_Cf	-----	-----	-----	-----	-----
PduO_St	GDGPRRTAAQ	LYFTTRCEAA	SRLHFARTLA	RRAERRIVEL	ATEVNVVQVL
DhaH_Cf	NMAQSGPLKE	FVIPGKNLAS	AQLHVARTLT	RRLERILIAM	GRTLTLRDEA
	151				200
DhaI_Cf	-----	-----	-----	-----	--MNKSQQIA
PduO_St	MRYINRLSDC	LYALARAEEDS	DAHQANIIRE	VSKRYLAACQ	PPHSEKETTPV
DhaH_Cf	RRYINRLSDA	LFSMARIEET	TPDVCA----	-----	-----
	201				250
DhaI_Cf	TITLAAAKKM	AQAVEAKALE	INVPVVFVSV	DHGGNTLLMQ	RMDDAFVTS
PduO_St	ALSFHDLHQL	TRAAVERAQQ	LQVPVVVSIV	DAHGTETVTW	RMPDALLVSS
DhaH_Cf	-----	-----	-----	-----	-----
	251				300
DhaI_Cf	DISLNKAYTA	CCLRQGTHEI	TDAVQPGASL	YGLQLTNQQR	IVIFGGGLP
PduO_St	ELAPKAWTA	VAMKTATHEL	SDVVQPGAAL	YGLSHLQK	VVTFGGGGYA
DhaH_Cf	-----	-----	-----	-----	-----
	301				338
DhaI_Cf	VILNGKVI	GVSSGGTVEQ	DRLLAETALD	CFSEL---	
PduO_St	LWRDGILIGG	LGISGGVVEQ	DMDIAQTAIA	AINVGTHQ	
DhaH_Cf	-----	-----	-----	-----	

Abbildung 46: Alignment von Aminosäuresequenzen von PduO aus *S. typhimurium* und DhaH und DhaI aus *C. freundii*

Referenzen: PduO aus *S. typhimurium*, JOHNSON et al, 2001; DhaH und DhaI aus *C. freundii*, DANIEL et al., 1995a)

Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Eine Reaktivierung der inaktivierten Dehydratase wird nicht nur durch das Fehlen der Adenosyltransferase-Aktivität des DhaFG-Komplexes sondern auch durch die folgenden Ergebnisse unwahrscheinlich. Die Reaktivierungsreaktionen der Diol- und Glycerin-

Dehydratase sind strikt abhängig von der Anwesenheit von freiem Coenzym B₁₂, jedoch nicht von der Zugabe von reduzierenden Agenzien (HONDA et al., 1980), die für eine Adenosylierung des Cobalamins zwingend notwendig wären (VITOLS et al., 1966). Durch Zugabe von CTP und GTP anstelle von ATP konnte die Diol-Dehydratase teilweise reaktiviert werden. Würde die Reaktivierung durch eine ATP-Corrinoid-Adosyltransferase katalysiert werden, würde bei der Reaktion mit CTP Cytidylcobalamin entstehen, daß die Diol- und Glycerin-Dehydratase inaktiviert (ZAGALAK und PAWELKIEWICZ, 1964; TORAYA et al., 1977).

Die durch den DhaFG-Komplex katalysierte Reaktivierung wird demnach nicht durch eine Adenosylierung des gebundenen modifizierten Coenzym bewirkt. Ein direkter Austausch des modifizierten Coenzym durch enzymatisch aktives Coenzym B₁₂ erscheint daher wahrscheinlich.

4.2.2 Reaktivierung der Dehydratasen durch den direkten Austausch des gebundenen modifizierten Coenzym durch freies Coenzym B₁₂

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren nach der Reaktivierungsreaktion der durch Cyano-B₁₂ inaktivierten Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* zeigte, daß Cyano-B₁₂ durch Coenzym B₁₂ im Zuge der Reaktivierung ausgetauscht wurde (s. 3.6.2). Dies konnte auch für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* gezeigt und durch Versuche mit radioaktiv-markiertem Cyano-B₁₂ bestätigt werden (TORAYA und MORI, 1999, MORI und TORAYA, 1999).

Ein weiterer Hinweis für eine Austauschreaktion wurde durch Untersuchungen zur Spezifität des Reaktivierungsfaktors aus *C. freundii* gefunden (s. 3.5.5.4). Der DhaFG-Komplex ist im Gegensatz zum Reaktivierungsfaktor aus *K. oxytoca* spezifisch für Glycerin-Dehydratasen. DhaFG reaktiviert neben dem Enzym aus *C. freundii* nur die Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae*. Die Diol-Dehydratasen aus *K. oxytoca* und *S. typhimurium* wurden dagegen nicht reaktiviert. Die Konstruktion von

Hybridreaktivierungsfaktoren aus den Enzymen aus *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* zeigte, daß die große Untereinheit der Faktoren für die Spezifität verantwortlich ist (TOBIMATSU et al., 2000). Die Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit der Reaktivierungsfaktoren zeigt eine geringe Ähnlichkeit zu der -Untereinheit der Dehydratasen. Es wird vermutet, daß die kleine Untereinheit direkt in den Prozeß der Reaktivierung involviert ist, indem sie die -Untereinheit der Dehydratasen bei der Bindung von Cobalamin ersetzt (TOBIMATSU et al., 2000). Eine solche Komplexbildung und die damit verbundene Spezifität des Reaktivierungsfaktors wären bei einer Adenosylierung des modifizierten Coenzym nicht notwendig. Die Reaktivierung der Dehydratasen wird demnach durch einen Austausch des am Enzym gebundenen, inaktiven Coenzym gegen freies Coenzym B₁₂ hervorgerufen.

4.3 Bindung von Coenzym B₁₂ durch Enzyme

Röntgenstrukturanalysen der Cobalamin-bindenden Fragmente der Methionin-Synthase aus *E. coli* (DRENNAN et al., 1994), Methylmalonyl-CoA Mutase aus *P. shermanii* (MANCIA et al., 1996) und der Glutamat-Mutase aus *Cl. cochlearium* (REITZER et al., 1999) zeigten, daß bei einer Bindung von Coenzym B₁₂ der DBI-Ligand vom Cobalt-Atom durch eine Imidazol-Gruppe eines Histidin-Restes ersetzt wird. Diese Art der Coenzym B₁₂-Bindung wird als „Base-off“ bezeichnet. Das Cobalaminbindemotiv Asp-x-His-x-x-Gly ist in allen Klasse 1 Enzymen konserviert, die eine Neuordnung von Kohlenstoffgerüsten katalysieren (MARSH et al., 1989; JANSEN et al., 1989; MARSH und HOLLOWAY, 1992; BEATRIX et al., 1994, CHEN et al., 1997). Die Sequenz konnte auch in der Methionin-Synthase (BANERJEE et al., 1989) und der L- -Lysin-5,6-Aminomutase (CHANG und FREY, 1998) nachgewiesen werden. Dagegen besitzen Enzyme der Klasse 2, die Eliminierungen von Heteroatomen katalysieren, kein solches Motiv. Weder bei der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* (TOBIMATSU et al., 1998), den Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* (SEYFRIED et al., 1996), *Cl. pasteurianum* (MACIS et al., 1998) und *K. pneumoniae* (TOBIMATSU et al., 1996), der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase aus *S. typhimurium*

(FAUST et al.; 1990) noch der Ribonukleotid-Reduktase aus *L. leichmanii* (BOOKER et al., 1993) konnte das B₁₂-Bindemotiv identifiziert werden. Diese Enzyme binden Coenzym B₁₂ in der „Base-on“ Form. Hierbei liegt die DBI-Nukleotid-Einheit des Coenzym B₁₂ mit dem Cobalt-Atom im Corrin-Ring koordiniert vor. Ein Hinweis für eine solche Art der B₁₂-Bindung konnte für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* durch EPR-Studien mit ¹⁵N-markiertem Coenzym B₁₂ oder dessen Analoga erbracht werden (YAMANISHI et al., 1998a u. b; ABEND et al., 1998). Vor kurzem konnte dies auch durch EPR-Studien für die Ribonukleotid-Reduktase aus *L. leichmanii* gezeigt werden (LAWRENCE et al., 1999). Durch die Kristallisation der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* im Komplex mit 1,2-Propandiol und Cyano-B₁₂ wurde erstmals die Struktur eines „Base-on“-Enzyms und seine B₁₂-Bindung beschrieben (SHIBATA et al., 1999, TORAYA, 2000b).

Die Interaktionen des Cobalamins mit den Seitenketten der Aminosäurereste der α - und β -Untereinheiten sind sehr komplex (s. Abbildung 47). Durch Seitenketten einer ganzen Gruppe von Aminosäuren wird ein Raum für das Cobalamin gebildet, der weitgehend von hydrophoben Gruppen umgeben ist. 5 Aminogruppen der 6 peripheren Seitenketten des Corrinrings bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureresten der α - und β -Untereinheit aus. Zu diesen Aminosäureresten zählen Thr 172, Glu 205, Thr 222, Asp 234 und Met 373 der α -Untereinheit und Asp 112, Asn 150 und Gln 156 der β -Untereinheit. Studien mit Coenzym B₁₂-Analoga hatten Hinweise erbracht, daß die Phosphatgruppe der Nukleotid-Einheit entscheidend für die B₁₂-Bindung ist. AdoCbl(3-Me), ein Cobalamin in dem DBI in der N-3 Position methyliert ist und daher nicht zum Cobalt koordiniert ist, zeigt nur eine sehr geringe Affinität zum Apoenzym und inaktiviert dieses (ISHIDA et al., 1993). Dagegen ist ein Coenzym B₁₂-Analogon, in dem die Ribose-Einheit der Nukleotid-Einheit durch eine Trimethylethylen-Gruppe ersetzt wurde, ein gutes Coenzym für die Diol-Dehydratase und bindet an das Apoenzym ($K_m = 0,80 \mu\text{M}$) mit der gleichen Affinität wie Coenzym B₁₂ ($K_m = 0,82 \mu\text{M}$) (TORAYA und ISHIDA, 1991). AdoCbi-PMe besitzt keine Nukleotid-Einheit. Durch die starke Bindung des Analogons konnte bewiesen werden, daß die Phosphatgruppe essentiell für die Coenzym B₁₂-Bindung

Die Elektronendichte für die CN-Gruppe, den π -Liganden des Cyano-B₁₂, konnte im Rahmen der Strukturanalyse nicht aufgeklärt werden und wurde daher bei der Verfeinerung der Struktur nicht aufgenommen (s. Abbildung 47). TORAYA (1985) postulierte eine Bindungsstelle für die Adenosylgruppe des Coenzym B₁₂. Kompetitive Bindungsstudien zeigten, daß der Platz der Bindestelle für die Adenosylgruppe sehr eng ist. Die Bindung von 5'-Desoxyadenosin wurde gegenüber Adenosin favorisiert. Desweiteren ist die Bindungsstelle spezifisch für Adenosinnukleoside. Adenin und Adenin-enthaltende Nukleoside mit veränderten Zuckereinheiten konnten an das Enzym binden, 5'-Desoxyuridin dagegen nicht. Diese hohe spezifische Aktivität für Adenosinnukleoside stimmt hervorragend mit der Aktivität von entsprechenden Analoga des Coenzym B₁₂ überein: *ara-AdoCbl* weist mit der Diol-Dehydratase 61 % Aktivität im Vergleich zu Coenzym B₁₂ auf (TORAYA et al., 1977), während Uridylcobalamin als Coenzym in mehreren Coenzym B₁₂-abhängigen Reaktionen inaktiv ist (SANDO et al., 1975; BABIOR, 1969).

Das K⁺-Ion ist ebenfalls an der B₁₂-Bindung beteiligt. Es wird vorgeschlagen, daß durch die Bindung von K⁺ die Struktur des „TIM-Barrels“ verändert wird. In Abwesenheit von K⁺ wird die Enzym-Coenzym B₁₂-Bindung geschwächt, und es kommt zur Dissoziation des Komplexes. Ein Hinweis auf die Notwendigkeit von K⁺-Ionen für die Aktivität der Glycerin-Dehydratase konnte bei der Reinigung des Enzyms erbracht werden. Wurden bei der Reinigung der Dehydratase anstatt der im Herstellerprotokoll beschriebenen Na⁺-haltigen Puffer K⁺-haltige verwendet, konnte diese mit hoher Aktivität eluiert werden. Bei der Verwendung der Na⁺-haltigen Puffer war die Dehydratase inaktiv.

An der B₁₂-Bindung sind neben dem K⁺-Ion Aminosäuren der α - und β -Untereinheit der Diol-Dehydratase beteiligt. Die β -Untereinheit hat dagegen keinen Anteil an der Coenzym B₁₂-Bindung. Zu den an der B₁₂-Bindung beteiligten Aminosäuren gehören Thr 172, Glu 205, Thr 222, Asp 234 und Met 373 der α -Untereinheit sowie Asp 112, Lys 135, Thr 137, Asn 150, Pro 155, Gln 156 und Ser 200 der β -Untereinheit. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der α - und β -Untereinheiten der Glycerin-

Dehydratasen aus *C. freundii*, *Cl. pasteurianum* und *K. pneumoniae* mit den Sequenzen der 1,2-Propandiol-Dehydratasen aus *K. oxytoca* und *S. typhimurium* zeigt, daß diese Aminosäuren in allen Dehydratasen hoch konserviert sind (s. Abbildung 48). Nur die Aminosäure Serin an Position 200 der -Untereinheit aus der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca*, die mit der Phosphatgruppe des Coenzym interagiert, ist durch ein Alanin ersetzt.

Abbildung 48: (folgende Seiten)

Alignment der Aminosäuresequenzen von DhaB (A) und DhaC (B) aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum*, GldA (A) und GldB (B) aus *K. pneumoniae*, PddA (A) und PddB (B) aus *K. oxytoca* und PduC (A) und PduD (B) aus *S. typhimurium*

Referenzen: Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*, SEYFRIED et al. (1996); Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum*, MACIS et al. (1998); Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae*, TOBIMATSU et al. (1996); Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca*, TOBIMATSU et al. (1995); Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium*, BOBIK et al. (1997).

Aminosäuren, die an der Coenzym B₁₂-Bindung beteiligt sind, sind dunkelgrau, identische Aminosäuren grau hinterlegt.

A)

	1				50							
PddA_Ko	-MR	SKRF	EAL	AKRPVNQ	DGF	VKEWIEEGFI	AMESPN	NDPKP	SIKIVN	GAVT		
PduC_St	-MR	SKRF	EAL	AKRPVNQ	DGF	VKEWIEEGFI	AMESPN	NDPKP	SIKIVN	GAVT		
DhaB_Cf	MRR	SKRF	EVL	AQRPVN	QDGL	IGEWPEEGLI	AMESPY	DPAS	SVKVEN	GRIV		
GldA_Kp	MKR	SKRF	AVL	AQRPVN	QDGL	IGEWPEEGLI	AMDSPF	DFVS	SVKVDN	GLIV		
DhaB_Clp	-MK	SKRF	QVL	SERPVN	KDGF	IGEWPEEGLI	AMSPND	PKP	SIKIKE	GKVI		
	51				100							
PddA_Ko	ELD	GK	PVSD	DLIDH	FIARY	GINLNRA	EEV	MAMDSV	KLAN	MLCD	PNV	KRS
PduC_St	ELD	GK	PVSE	DLIDH	FIARY	GINLNRA	EEV	MAMDSV	KLAN	MLCD	PNV	KRS
DhaB_Cf	ELD	GK	SRAE	DMIDR	FIADY	AINVPEA	ERA	MQLDALE	IAR	MLVD	IHVS	SRE
GldA_Kp	ELD	GK	RRDQ	DMIDR	FIADY	AINVERTE	QA	MRLEAVE	IAR	MLVD	IHVS	SRE
DhaB_Clp	ELD	GK	NRED	DMIDR	FIANY	GINLNRA	EDV	IKMDSV	KLAK	MLVD	INVD	KR
	101				150							
PddA_Ko	EIVPL	TTAM	T	PAKIV	EVVSH	MNVVEM	MMAM	QKMRAR	TPS	QQA	HVTN	VKD
PduC_St	EIVPL	TTAM	T	PAKIV	EVVSH	MNVVEM	MMAM	QKMRAR	TPS	QQA	HVTN	VKD
DhaB_Cf	EIIAI	TTAI	T	PAKRLE	VMAQ	MNVVEM	MMAL	QKMRAR	TPS	NQCH	VTNL	KD
GldA_Kp	EIIAI	TTAI	T	PAKAVE	VMAQ	MNVVEM	MMAL	QKMRAR	TPS	NQCH	VTNL	KD
DhaB_Clp	TIVEL	TTAM	T	PAKIV	EVVGN	MNVVEM	MMAL	QKMRAR	KTPS	NQCH	VTNL	KD
	151				200							
PddA_Ko	NPVQ	IAADAA	EGAW	RGF	DEQ	ETTIV	AVARYA	PFNAI	ALLVG	SQVGR	PGVLT	
PduC_St	NPVQ	IAADAA	EGAW	RGF	DEQ	ETTIV	AVARYA	PFNAI	ALLVG	SQVGR	PGVLT	
DhaB_Cf	NPVQ	IAADAA	EAGIR	GFSE	Q	ETTIV	GIARYA	PFNAL	ALLVG	SQC	GAP	GVLT
GldA_Kp	NPVQ	IAADAA	EAGIR	GFSE	Q	ETTIV	GIARYA	PFNAL	ALLVG	SQC	GRP	GVLT
DhaB_Clp	NPVQ	IAADAA	EAAIR	GFDE	Q	ETTIV	GIVRYA	PFNAL	ALLVG	AQVGR	GGVLT	
	201				250							
PddA_Ko	QCSL	EEATEL	KLGM	LGH	TCY	AETI	SVYGTE	PVFTD	GDDTP	WSKG	FLASSY	
PduC_St	QCSL	EEATEL	KLGM	LGH	TCY	AETI	SVYGTE	PVFTD	GDDTP	WSKG	FLASSY	
DhaB_Cf	QCSV	EEATEL	ELGMR	GLT	TSY	AETV	SVYGTE	SVFTD	GDDTP	WSKA	FLASAY	
GldA_Kp	QCSV	EEATEL	ELGMR	GLT	TSY	AETV	SVYGTE	AVFTD	GDDTP	WSKA	FLASAY	
DhaB_Clp	QCAI	EEATEL	ELGMR	GLT	TSY	AETV	SVYGTE	NVFTD	GDDTP	WSKA	FLASAY	
	251				300							
PddA_Ko	ASRGL	KMRFT	SGSG	SEV	QMG	YAEGK	SMLYL	EARCI	YITKA	AGVQ	GLQNGS	
PduC_St	ASRGL	KMRFT	SGSG	SEV	QMG	YAEGK	SMLYL	EARCI	YITKA	AGVQ	GLQNGS	
DhaB_Cf	ASRGL	KMRYT	SGTG	SEAL	MG	YSESK	SMLYL	ESRCI	FITKG	AGVQ	GLQNGA	
GldA_Kp	ASRGL	KMRYT	SGTG	SEAL	MG	YSESK	SMLYL	ESRCI	FITKG	AGVQ	GLQNGA	
DhaB_Clp	ASRGL	KMRFT	SGSG	SEAL	MG	YAEGK	SMLYL	EARCI	YITKA	AGVQ	GLQNGS	
	301				350							
PddA_Ko	VSC	IGVPS	AV	PSGIR	AVLAE	NLICSS	LDLE	CASSND	QTF	HSDM	RRTAR	L
PduC_St	VSS	IGVPS	AV	PSGIR	AVLAE	NLICSS	LDLE	CASSND	QTF	HSDM	RRTAR	L
DhaB_Cf	VSC	IGMTG	AV	PSGIR	AVLAE	NLIAS	MLDLE	VASAND	QTF	HSDI	RRTAR	T
GldA_Kp	VSC	IGMTG	AV	PSGIR	AVLAE	NLIAS	MLDLE	VASAND	QTF	HSDI	RRTAR	T
DhaB_Clp	VSC	IGMTG	AL	PSGIR	AVLGE	NLIT	TMLDIE	VASAND	QTF	HSDI	RRTAR	M

	351				400
PddA_Ko	LMQFLPGTDF	ISSGYSAVPN	YDNMFAGSNE	DAEDFDDYNV	IQRDLKVDGG
PduC_St	LMQFLPGTDF	ISSGYSAVPN	YDNMFAGSNE	DAEDFDDYNV	IQRDLKVDGG
DhaB_Cf	LMQMLPGTDF	IFSGYSAVPN	YDNMFAGSNF	DAEDFDDYNI	LQRDLMVDGG
GldA_Kp	LMQMLPGTDF	IFSGYSAVPN	YDNMFAGSNF	DAEDFDDYNI	LQRDLMVDGG
DhaB_Clp	LMQMLPGTDF	IFSGYSSVNP	YDNMFAGSNF	DAEDFDDYNV	IQRDLMVDGG
	401				450
PddA_Ko	LRPVREEDVI	AIRNKAARAL	QAVFAGMGLP	PITDEEVEEA	TYAHGSKDMP
PduC_St	LRPVREEDVI	AIRNKAARAL	QAVFAGMGLP	PITDEEVEEA	TYAHGSKDMP
DhaB_Cf	LRPVTEETI	AIRNKAARAI	QAVFRELGLP	LISDEEVDAA	TYAHGSKDMP
GldA_Kp	LRPVTEAETI	AIRQKAARAI	QAVFRELGLP	PIADEEVEEA	TYAHGSNEMP
DhaB_Clp	LRPVSEEEVI	TIRNKAARAI	QAVFEGLKLP	AITDEEVEAV	TYSHGSKDVP
	451				500
PddA_Ko	ERNIVEDIKF	AQEIIINKNRN	GLEVVKALAQ	GGFTDVAQDM	LN IQAKLITG
PduC_St	ERNIVEDIKF	AQEIIINKNRN	GLEVVKALAQ	GGFTDVAQDM	LN IQAKLITG
DhaB_Cf	ARNVVEDLAA	VEEMMKRNIT	GLDIVGALSS	SGFEDIA SNI	LNMLRQRVTG
GldA_Kp	PRNVVEDLSA	VEEMMKRNIT	GLDIVGALSR	SGFEDIA SNI	LNMLRQRVTG
DhaB_Clp	ERNVVEDLKA	AEMINRGIT	GIDVVKALSK	HGFDDIA ENI	LNMLKQRISG
	501				550
PddA_Ko	DYLHTSAIIV	GDGQVLSAVN	DVNDYAGPAT	GYRLQGERWE	EIKNIPGALD
PduC_St	DYLHTSAIIV	GDGQVLSAVN	DVNDYAGPAT	GYRLQGERWE	EIKNIPGALD
DhaB_Cf	DYLQTSAILD	RQFDVVS AVN	DINDYQGP GT	GYRISAERWA	EIKNIAGVVQ
GldA_Kp	DYLQTSAILD	RQFEVVS AVN	DINDYQGP GT	GYRISAERWA	EIKNIPGVVQ
DhaB_Clp	DYLQTSAILD	KNFNVVS AVN	DCNDYMGP GT	GYRLSKERWD	EIKNIPNAMK
	551				
PddA_Ko	PNEID				
PduC_St	PNEID				
DhaB_Cf	PGSIE				
GldA_Kp	PDTIE				
DhaB_Clp	PEDIK				

B)

	1				50
PddB_Ko	MEINEKLLRQ	I IEDVLSEMK	GSDKPVSFNA	PAASAAPQAT	PPAGDGFLTE
PduD_St	MEINEKLLRQ	I IEDVLRDMK	GSDKPVSFNA	PAASTAPQTA	APAGDGFLTE
DhaC_Cf	-----	-----	-----	---MECTTER	KPVFTLQVSE
GldB_Kp	-----	-----	-----	-----	-----
DhaC_Clp	-----	-----	-----	-----	----MELKE
	51				100
PddB_Ko	VGEARQGTQQ	DEVIIAVGPA	FGLAQTVNIV	GIPHKSILRE	VIAGIEEEGI
PduD_St	VGEARQGTQQ	DEVIIAVGPA	FGLAQTVNIV	GLPHKSILRE	VIAGIEEEGI
DhaC_Cf	GEAAKADERV	DEVVIGVGPA	FDKYQHKT LI	DMPHKA ILKE	LVAGIEEEGL
GldB_Kp	-----	-----	-----	-MPHGA ILKE	LIAGVEEEGL
DhaC_Clp	KDIALSGNQS	NEVVIGIAPA	FGKYQHSIV	GVP HDK ILRE	LIAGIEEEGL

	101					150
PddB_Ko	KARVIRCFKS	SDVAFVAVEG	NRLSGSGISI	GIQSKGTTVI	HQQGLPPLSN	
PduD_St	KARVIRCFKS	SDVAFVAVEG	NRLSGSGISI	GIQSKGTTVI	HQQGLPPLSN	
DhaC_Cf	HARVVRILRT	SDVSEFMAWDA	ANLSGSGIGI	GIQSKGTTVI	HQRDLLPLSN	
Gldb_Kp	HARVVRILRT	SDVSEFMAWDA	ANLSGSGIGI	GIQSKGTTVI	HQRDLLPLSN	
DhaC_Clp	KSRVVR IIRT	SDVSEFIAHDA	AVLSGSGIGI	GIQSKGTTVI	HQKDLLPLNN	
	151					200
PddB_Ko	LELFPQAPLL	TLETYRQIGK	NAARYAKRES	PQPVP TLNDQ	MARPKYQAKS	
PduD_St	LELFPQAPLL	TLETYRQIGK	NAARYAKRES	PQPVP TLNDQ	MARPKYQAKS	
DhaC_Cf	LELFSQAPLL	TLETYRQIGK	NAARYARKES	PSPVP VVNDQ	MVRPKFMAKA	
Gldb_Kp	LELFSQAPLL	TLETYRQIGK	NAARYARKES	PSPVP VVNDQ	MVRPKFMAKA	
DhaC_Clp	LELFPQAPLL	DL DIFRLIGK	NAAKYAKGES	PNPVP TRNDQ	MVRPKFQAKA	
	201					227
PddB_Ko	AILHIKETKY	VVTGKNPQEL	RVAL---			
PduD_St	AILHIKETKY	VVTGKNPQEL	RVAL---			
DhaC_Cf	ALFHIKETKH	VVQDRAPVTL	HIALVRE			
Gldb_Kp	ALFHIKETKH	VVQDAEPVTL	HIDLVRE			
DhaC_Clp	ALLHIKETKH	VVQNAKPIEL	EIIS---			

Untersuchungen zeigten, daß der Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* an Vitamin B₁₂-Agarose bindet und somit ein Hinweis auf eine direkte B₁₂-Bindung des DhaFG-Komplexes vorlag (s. 3.6.5). Ein Alignment der Aminosäuresequenz von DhaF und DhaG mit den Sequenzen der - und -Untereinheiten der Dehydratasen erbrachte keine signifikante Übereinstimmung (Daten nicht gezeigt). Auch die an der B₁₂-Bindung beteiligten konservierten Aminosäuren der Dehydratasen konnten in der Aminosäuresequenz von DhaF und DhaG nicht detektiert werden. Dies war auch bei einem Alignment der - und -Untereinheit der Ethanol-Ammoniak-Lyase aus *S. typhimurium* (FAUST et al., 1990) mit den - und -Untereinheiten der Dehydratasen der Fall. EPR-Studien mit ¹⁵N-markiertem Coenzym B₁₂ bewiesen jedoch, daß die Lyase Cobalamin in der „Base-on“-Form bindet (ABEND et al., 1999). Eine Bindung von Coenzym B₁₂ durch den Reaktivierungsfaktor in der „base-on“-Form ist damit nicht ausgeschlossen. Für die schon beschriebenen Cobalamin-abhängigen Enzyme der Klasse I, die Coenzym B₁₂ „base-off“ binden, wurde das konservierte Bindemotiv Asp-x-His-x-x-Gly beschrieben (MARSH et al., 1989; JANSEN et al., 1989; MARSH und HOLLOWAY, 1992; BEATRIX et al., 1994). Das Bindemotiv gilt jedoch nicht für alle Enzyme dieser Klasse. Die Corrinoid-enthaltende 23 kDa-Untereinheit MtrA des N⁵-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym M-Methyl-

transferase Komplexes aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* weist die Sequenz nicht auf. ESR-Studien zeigten jedoch, daß das Corrinoïd in der „base-off“-Form an MtrA bindet. Ferner ist die prosthetische Gruppe mit einem Histidinrest des Apoenzyms koordiniert (HARMS und THAUER, 1996). Das Corrinoïd/Eisen-Schwefelprotein aus *Cl. thermoaceticum* (LU et al., 1993) und aus *Methanosarcina thermophila* (MAUPINFURLOW und FERRY, 1996), die an Methyltransferreaktionen beteiligt sind, zeigen ebenfalls keine Sequenzübereinstimmungen mit anderen Corrinoïdproteinen. Diese Proteine binden das Corrinoïd zwar in der „base-on“-Form, jedoch wurde die untere axiale Koordinationsposition des Co(II) nicht von einem Histidinrest eingenommen (RAGSDALE et al., 1987; WIRT et al., 1993).

Die Aminosäuresequenzen von DhaF aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* zeigen eine zum Bindemotiv ähnliche Sequenz (Gly-x-His-x-x-Gly und Ser-x-His-x-x-Gly). Dies könnte auf eine „base-off“-Bindung hinweisen. DdrA aus *K. oxytoca* weist dagegen kein solches Motif auf. Die Sequenz der Ribonukleotid-Triphosphat-Reduktase aus *L. leichmanii* besitzt ebenfalls eine zum Bindemotiv ähnliche Sequenz (Glu-x-His-x-x-Gly). Das Enzym bindet Coenzym B₁₂ jedoch in der „base-on“-Form (LAWRENCE et al., 1999). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Bindemotivs und der Substitution des DBI-Restes durch einen Aminosäurerest des Apoenzyms besteht daher offenbar nicht. Da der Reaktivierungsfaktor Coenzym B₁₂ im Gegensatz zu den hier erwähnten Enzymen nicht als Cofaktor benötigt, könnte die B₁₂-Bindung auch in anderer Form erfolgen. B₁₂-Transporter binden ebenfalls Cobalamin und benötigen dies nicht als Cofaktor. Drei lösliche Proteine sind an der Aufnahme und dem Transport von Cobalamin im Menschen beteiligt: Haptocorrin (HC), Intrinsic Faktor (IF) und Transcobalamin (TC). Gemeinsam sorgen die drei Proteine dafür, daß die in der Nahrung enthaltenen geringen Mengen an Cobalamin zu den zwei intrazellulären B₁₂-abhängigen Enzymen Methionin-Synthase im Cytosol und Methylmalonyl-CoA-Mutase in den Mitochondrien gelangen. Die drei Proteine können jeweils ein Molekül Vitamin B₁₂ binden. Die apparenten Bindungskonstanten für Vitamin B₁₂ betragen 0,01 (IF), 0,3 (HC) und 5 (TC) x 10¹² l/mol (GUETH et al., 1994). Die Spezifität der Cobalamin-Bindung der drei Proteine variiert. IF weist die höchste Spezifität

auf, HC dagegen die niedrigste. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von IF von der Anwesenheit der Nukleotid-Einheit und des Corrin-Rings abhängig ist (KOUNANS et al., 1994). IF bindet Cyano-B₁₂, Hydroxy-B₁₂ und Coenzym B₁₂ mit vergleichbaren Bindungskonstanten (GUETH et al., 1994). Der obere Ligand (z.B die Cyano-, Hydroxy- und Adenosyl-Gruppe) hat jedoch keinen Einfluß auf die Bindung, da dieser zur Oberfläche des Proteins orientiert ist. Die Daten von LIEN et al. (1973) weisen darauf hin, daß die DBI-Einheit von Cyano-B₁₂ möglicherweise ähnlich wie bei der Glutamat-Mutase durch einen Histidin-Rest des Proteins ersetzt wird. Die „base-off“-Corrinoide Cobinamid, *p*-cresolyl Cobamid, 2-Amino-Vitamin B₁₂ und Carboxy-Cyanoamino Cobamid konnten dagegen nur in hohen Konzentrationen mit Vitamin B₁₂ um die Corrinoid-Bindungsstelle des IF und TC konkurrieren (STUPPERICH und NEXO, 1991). Pseudovitamin B₁₂ mit einer schwachen Co-N Koordination bindet 10³ mal schwächer als Vitamin B₁₂. Die Bindung von B₁₂ an IF und TC ist daher wahrscheinlich abhängig von einer korrekten Koordination des Cobalts zu den N-heterozyklischen Basen. Aus sterischen Gründen ist die Co-N-Bindung nicht direkt für das Protein verfügbar. Es wird daher vermutet, daß die Distanz zwischen den heterozyklischen Basen und dem Corrin-Ring in die Erkennung des B₁₂ involviert ist (STUPPERICH und NEXO, 1991).

Auch in Bakterien wurde ein B₁₂-Transportsystem identifiziert. Freies Cobalamin wird z. B. in *S. typhimurium* und *E. coli* aktiv aufgenommen (BRADBEER, 1991; ROTH et al., 1996). Der Import durch die beiden Membranen ist ein ATP-verbrauchender Prozeß mit einem spezifischen Transporter in der äußeren Membran, bestehend aus dem B₁₂-bindenden BtuB-Protein und dem transperiplasmatischen, energiekoppelnden TonB-Protein (CADIEUX und KADNER, 1999). Bindet B₁₂ an das BtuB-Protein, wird es durch einen energieabhängigen Prozeß ins Periplasma transportiert. Das TonB-Protein nutzt dabei die protonenmotorische Kraft, um die für den Transport benötigten strukturellen Änderungen hervorzurufen. Das BtuB/TonB-System konzentriert B₁₂ im Periplasma und erleichtert so den Transport über die innere Membran. Allerdings liegt wahrscheinlich auch im Periplasma ein mit BtuF bezeichnetes B₁₂-Bindeprotein vor (VAN BIBBER et al., 1999). Der Transport über die innere Membran ist an eine ATP-Hydrolyse gekoppelt und wird

durch einen ABC-Transporter, bestehend aus den membranintegralen Proteinen BtuC und BtuD, bewirkt (BRADBEER, 1991; ROTH et al., 1996). Obwohl der Transportmechanismus gut aufgeklärt wurde, ist über die Art der B₁₂-Bindung durch BtuB und BtuF bisher nichts bekannt.

DhaF und DhaG zeigen keine signifikante Ähnlichkeit zu den genannten B₁₂-Transportern. Daher ist es unwahrscheinlich, daß der Reaktivierungsfaktor Coenzym B₁₂ in einer zu den Transportern ähnlichen Art und Weise bindet.

4.4 Der Reaktivierungsfaktor der Dehydratasen- ein Chaperon?

Die Reaktivierung der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* (TORAYA und MORI, 1999) und der Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* (HONDA et al., 1980) und *C. freundii* war strikt abhängig von der Zugabe von ATP zum Reaktionsansatz (s. 3.5.5). ADP, AMP und nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga konnten ATP nicht ersetzen (s. 3.5.5.1). Der Reaktivierungsfaktor zeigt eine geringe aber deutliche ATPase-Aktivität. Für *C. freundii* konnte gezeigt werden, daß die große Untereinheit DhaF diese Aktivität besitzt und ATP bindet (s. 3.6.6). Die ATP-Hydrolyse ist notwendig für die Reaktivierung des inaktivierten Holoenzym. Sowohl für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* (MORI und TORAYA, 1999) als auch für die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* konnte aber keine direkte Verbindung zwischen der ATP-Hydrolyse und der Reaktivierungsreaktion beobachtet werden. Unter reaktivierenden und nicht-reaktivierenden Bedingungen war die Rate der ATP-Hydrolyse annähernd gleich (s. 3.6.6). Daher ist es wahrscheinlich, daß die ATP-Hydrolyse und die Reaktivierung nicht miteinander gekoppelt sind. Dieses Phänomen ist auch von anderen Enzymen bekannt. Die ATP-hydrolysierende Aktivität der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase ist bei der Aktivierung eines inaktiven Komplexes zwischen der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase und Ribulosebisphosphat essentiell. Allerdings sind auch hier die beiden Reaktionen nicht direkt miteinander

gekoppelt (ROBINSON und PORTIS, 1989). Ähnliches liegt bei der Faltung von Polypeptiden durch Chaperone vor (BUKAU und HORWICH, 1998).

MORI und TORAYA (1999) konnten nachweisen, daß ATP und dessen Hydrolyse eine wichtige Funktion bei der Komplexbildung des Reaktivierungsfaktors mit der Diol-Dehydratase einnimmt. Die ADP-Form des Reaktivierungsfaktors bildet einen engen Komplex mit dem Apoenzym, wodurch die Bindung des modifizierten Coenzym an die Dehydratase gelöst wird. Bei der ATP-Form dagegen konnte keine Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen beobachtet werden. Es ist daher möglich, daß die ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung des Reaktivierungsfaktors von einer „low-affinity“ zu einer „high-affinity“-Form für die Dehydratase induziert. Der Komplex zwischen der ADP-Form des Reaktivierungsfaktors und der Dehydratase ist jedoch auch bei Zugabe von Coenzym B₁₂ inaktiv. Erst die Zugabe von ATP und die daraus resultierende Dissoziation des Komplexes führt zu aktiver Diol-Dehydratase. Somit besitzt ATP zwei Funktionen bei der Reaktivierung der Dehydratasen. Zum einen geht durch die ATP-Hydrolyse der Reaktivierungsfaktor in eine „high-affinity“-Form für die Dehydratase über, zum anderen bewirkt es die Dissoziation des Komplexes. Eine durch ATP-Hydrolyse hervorgerufene Konformationsänderung mit einer resultierenden Veränderung der Affinität zum Substrat ist vom Chaperon DnaK bereits bekannt (RÜDIGER et al., 1997). DnaK ist das zentrale Protein der Chaperon-Maschinerie aus *E. coli*. Die Funktionsweise der Chaperone aus *E. coli*, die maßgeblich am Erhalt der nativen Konformation von Proteinen in der Zelle beteiligt sind (GEORGIOPOLOUS und WELCH, 1993), ist schon seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Der Chaperon-Zyklus wird in *E. coli* durch die Bindung eines denaturierten oder teilweise ungefalteten Peptids an DnaJ initiiert (s. Abbildung 49). Dieser Komplex wird von DnaK erkannt, wodurch es wie oben beschrieben durch ATP-Hydrolyse und Konformationsänderung von DnaK zur Ausbildung eines ternären Komplexes aus je zwei Molekülen DnaK und DnaJ mit dem Substrat kommt. Alternativ kann das Peptid abhängig von seiner Sekundärstruktur auch zunächst an DnaK und dann an DnaJ binden. Der ternäre Komplex, in dem das gebundene Substrat vor Aggregation geschützt ist, wird durch den Nukleotidaustauschfaktor GrpE aufgelöst. Dabei

kommt es wahrscheinlich zunächst zur Dissoziation von DnaJ. Anschließend wird durch die Assoziation von ATP an DnaK der GrpE-DnaK-Komplex gelöst. Das ATP-gebundene DnaK setzt aufgrund seiner niedrigen Affinität zum Substrat dieses frei und kann neues Substrat binden (HARTL, 1996; RÜDIGER et al., 1997). Das aus dem Chaperon-Zyklus freigesetzte Peptid liegt noch nicht in der nativen Konformation vor. Ist eine spontane Faltung nicht möglich, kann es entweder den Zyklus nochmals durchlaufen oder an die Chaperonine GroEL und GroES weitergeleitet werden. Bei einer irreversiblen Schädigung wird das Peptid von Proteasen abgebaut. Im Gegensatz zu Chaperonen falten Chaperonine Proteine aktiv. Die Chaperone halten ein Protein im faltungskompetenten Zustand und verhindern durch Abschirmung der hydrophoben Reste die Aggregation des Substrats. In vielen Fällen reicht dies aus, damit sich ein Protein spontan in seine korrekte Tertiärstruktur falten kann (BUKAU et al., 1996; HARTL, 1996; RÜDIGER et al., 1997).

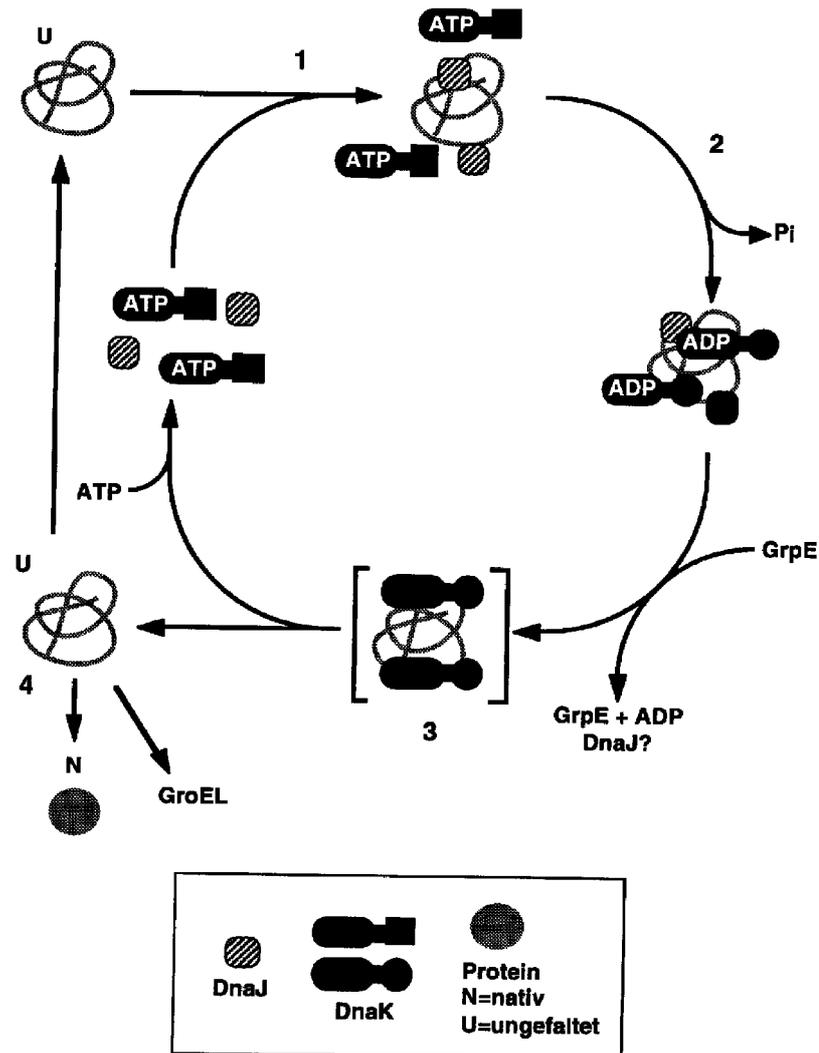


Abbildung 49: Der Chaperon-Zyklus in *E. coli* (HARTL, 1996; modif.)

(1) Bindung des ungefalteten Substrats an DnaJ oder DnaK; (2) ATP-Hydrolyse, Konformationsänderung von DnaK sowie Ausbildung des ternären Komplexes; (3) Durch GrpE induzierter Nukleotidaustausch und Substratfreigabe; (4) Substrat-Faltung (spontan), Weiterleitung an die Chaperonine oder nochmaliges Durchlaufen des Chaperon-Zyklus.

Das Chaperon DnaK ist aus drei Domänen aufgebaut. Die N-terminale Domäne besitzt ATPase-Funktion. Im Anschluß daran ist die Peptid-Bindedomäne und der C-terminale Bereich mit unbekannter Funktion lokalisiert (RÜDIGER et al., 1997). Die Peptid-Bindedomäne von DnaK kann in Abhängigkeit von gebundenem Nukleotid zwei verschiedene Konformationen einnehmen, die unterschiedliche Affinitäten zum Substrat

aufweisen (BUCHBERGER et al., 1995; KAMATH-LOEB et al., 1995). DnaK liegt in der Zelle überwiegend in der ATP-Form vor (THEYSSSEN et al., 1997; McCARTY et al., 1995). In dieser Konformation ist die Peptid-Bindedomäne für das Substrat frei zugänglich. Die ATP-Form von DnaK weist eine geringe Affinität zum Peptid auf. Hierdurch wird eine hohe Austauschrate potentieller Substrate ermöglicht. Wird ein Peptid als Substrat erkannt, kommt es zur ATP-Hydrolyse. Als Folge davon verschließt DnaK die Peptid-Bindedomäne mit einem flexiblen "Dach" und das Substrat wird auf diese Weise fest gebunden (s. Abbildung 50; BUCHBERGER et al., 1995; RÜDIGER et al., 1997; GETHING, 1996).

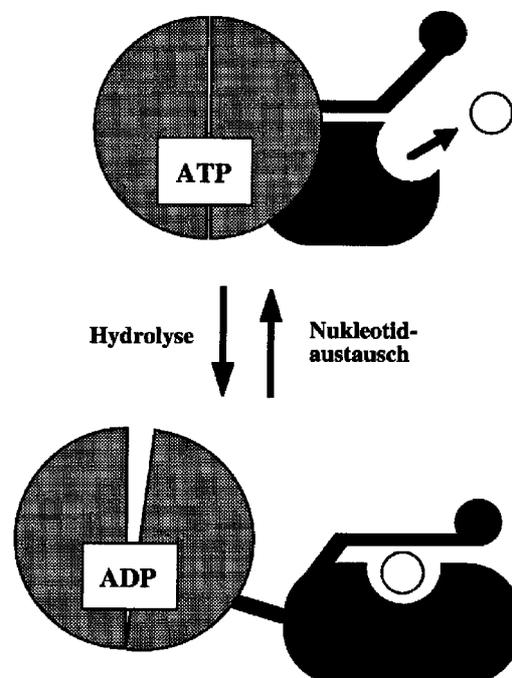


Abbildung 50: Nukleotid-induzierte Konformationsänderung und Substrat-Freigabe von DnaK (Rüdiger et al., 1997)

grau, ATPase-Domäne; schwarz, Nukleotid-Bindedomäne; weißer Kreis, Substrat.

Die Rate der ATP-Hydrolyse des Reaktivierungsfaktors aus *K. oxytoca* liegt im selben Bereich wie die Rate der „Suicide“-Inaktivierung der Diol-Dehydratase während der Dehydratisierung von Glycerin (BACHOVCHIN et al., 1977; MORI und TORAYA, 1999).

Im Vergleich zu anderen ATPasen ist die Rate der ATP-Hydrolyse des Reaktivierungsfaktors sehr gering. Chaperone weisen jedoch eine ähnlich geringe Hydrolyse-Rate auf (BUKAU und HORWICH, 1998). Teile der Aminosäuresequenz der großen Untereinheit des Reaktivierungsfaktors zeigen hohe Ähnlichkeiten zu DnaK und anderen Mitgliedern der Hsp70 Familie der Chaperone (MORI et al., 1997; BARDWELL and CRAIG, 1984). Auch bei DhaF aus *C. freundii* konnte eine signifikante Ähnlichkeit zu Hsp70-Chaperonen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die homologen Regionen schließen die Aminosäurereste ein, die für die ATP-Bindung wichtig sind (FLAHERTY et al., 1990; BORK et al., 1992). Daher kann der Reaktivierungsfaktor der Diol- und Glycerin-Dehydratasen als ein neuer Typ von Chaperonen angesehen werden, der in die Reaktivierung von inaktivierten Enzymen involviert ist.

Mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse kann der in Abbildung 51 abgebildete Mechanismus für die Reaktivierung der Dehydratasen durch den Reaktivierungsfaktor postuliert werden. Dieser Mechanismus ähnelt sehr stark dem vorgestellten Chaperon-Zyklus aus *E. coli*. Während der Dehydratisierung von Glycerin wird sowohl die Glycerin- als auch die Diol-Dehydratase inaktiviert. Die Inaktivierung wird durch die irreversible Spaltung der Co-C-Bindung des Coenzym B₁₂ hervorgerufen. Das so modifizierte Coenzym bindet an die Dehydratase und inaktiviert diese. Der Reaktivierungsfaktor bindet nun in seiner ADP-Form an das inaktivierte Enzym, wodurch die Bindung des modifizierten Coenzym zur Dehydratase geschwächt und dieser abgespalten wird. Durch die Bindung von ATP an den Reaktivierungsfaktor und der daraus resultierenden Konformationsänderung dissoziiert der Komplex aus Reaktivierungsfaktor und Dehydratase. Die Dehydratase kann nun erneut enzymatisch aktives Coenzym B₁₂ binden und die Dehydratisierung von Glycerin katalysieren. Durch eine ATP-Hydrolyse entsteht ein aktiver ADP-Reaktivierungsfaktor-Komplex. Das abgespaltene modifizierte Coenzym wird im weiteren durch eine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase-Aktivität des DhaHI-Komplexes in enzymatisch aktives Coenzym B₁₂ überführt. Eventuell ist der DhaFG-Komplex an einem Transport des modifizierten Coenzym und aktivem Coenzym B₁₂ beteiligt.

die Kristallisation der Enzyme mit einem inaktiven B₁₂-Analogon, das über eine Adenosyleinheit verfügt, die Bindung des Adenosyl-Restes zur Dehydratase aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck könnte man AdoCbi-Me einsetzen, welches an die Dehydratase mit hoher Affinität bindet jedoch katalytisch nicht aktiv ist.

Im Gegensatz zum DhaFG-Komplex aus *C. freundii* konnte der partiell gereinigte Komplex aus *Cl. pasteurianum* die inaktivierte Dehydratase nicht reaktivieren (s. 3.5.6). Die Versuche zur Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* sollten nach Erarbeitung eines verbesserten Protokolls für die heterologe Produktion und Reinigung des DhaFG-Komplexes wiederholt werden. Eine Charakterisierung des Reaktivierungsfaktors könnte dann ebenfalls erfolgen. Neben der Untersuchung der Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* sollten Versuche zur Spezifität des DhaFG-Komplexes dabei im Vordergrund stehen.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung der Reaktivierungsfaktoren der Diol- und Glycerin-Dehydratase wurde die Diskrepanz zwischen Wachstum von *K. oxytoca* und *C. freundii* auf Glycerin einerseits und der Inaktivierung der Dehydratase bei der Umsetzung dieses Substrats andererseits beseitigt. Der Mechanismus der Reaktivierung und die Wirkungsweise der Reaktivierungsfaktoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Reaktivierungsfaktor bindet in seiner ADP-Form mit hoher Affinität an den inaktiven Enzym-Cyano-B₁₂-Komplex. Dagegen konnte nur eine schwache Komplexbildung beobachtet werden, wenn die Dehydratase durch das Coenzym B₁₂-Analogon AdoPeCbl inaktiviert wurde (MORI und TORAYA, 1999). Das Analogon besitzt einen Adeninring als oberen axialen Liganden. Die Affinität des Reaktivierungsfaktors zur Dehydratase scheint daher größer zu Enzym-gebundenen Analoga ohne Adeninrest zu sein. Diese Unterschiede in der Affinität sind bisher nicht untersucht worden. Desweiteren ist die Abspaltung des modifizierten Coenzym von der Dehydratase im Rahmen der Komplexbildung zwischen Enzym und Reaktivierungsfaktor nicht aufgeklärt. Eine Kristallisation des Komplexes aus Dehydratase und Reaktivierungsfaktor könnte darüber Aufschluß geben. Dabei ließe sich auch überprüfen, inwieweit die kleine Untereinheit des Reaktivierungsfaktors an der Dissoziation des modifizierten Coenzym beteiligt ist. Die Charakterisierung des

Reaktivierungsfaktors aus *C. freundii* hatte gezeigt, daß dieser B₁₂ binden kann (s. 3.6.5). Durch die Kristallisation des Reaktivierungsfaktors in Gegenwart von B₁₂ könnte die B₁₂-Bindestelle am DhaFG-Komplex identifiziert werden. Ferner könnten Unterschiede in der B₁₂-Bindung zwischen der ADP- und ATP-Form des Reaktivierungsfaktors sichtbar gemacht werden. Für diese Untersuchungen könnte auch das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte, radioaktiv-markierte Coenzym B₁₂ herangezogen werden.

Durch die Klonierung und Expression der Gene *dhaH* und *dhaI* aus *C. freundii* und die anschließende Reinigung der korrespondierenden Genprodukte könnte untersucht werden, ob der Komplex aus DhaH und DhaI eine ATP-Corrinoid-Adenosyltransferase Aktivität besitzt. Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene hatten gezeigt, daß DhaH und DhaI hohe Ähnlichkeit zur Adenosyltransferase aus *S. typhimurium* aufwiesen (JOHNSON et al, 2001). Durch Zugabe einer Adenosyltransferase zum Reaktivierungsansatz unter reduzierenden Bedingungen könnte untersucht werden, ob dadurch die Reaktivierungsreaktion unabhängig von der Zugabe von enzymatisch-aktivem Coenzym B₁₂ ist. Hiermit könnte der Beweis erbracht werden, daß die Adenosyltransferase und der DhaFG-Komplex gemeinsam die Reaktivierung der Glycerin-Dehydratase bewirken.

1,3-Propandiol ist, wie schon in der Einleitung erwähnt, von großem wirtschaftlichem Interesse. Zur Zeit wird 1,3-Propandiol industriell durch einen kostenintensiven, petrochemischen Prozeß nach dem Shell-Verfahren hergestellt. Daher untersucht die Fa. Genencor (USA) die Möglichkeit, 1,3-Propandiol durch ein biotechnologisches Verfahren herzustellen. Dabei wurde ein rekombinanter *E. coli*-Stamm entwickelt, der die Gene für die Diol-Dehydratase, den Reaktivierungsfaktor und die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase aus *K. oxytoca* besitzt. Desweiteren enthält dieser Stamm die Gene aus *Saccharomyces cerevisiae*, die für die Dihydroxyaceton-3-Phosphat-Dehydrogenase und die Glycerin-3-Phosphat-Phosphatase zur Umsetzung von Glucose zu Glycerin kodieren (CHOTARI et al., 2000). Im Gegensatz zu Glycerin sind Glucose bzw. Glucose-haltige Zuckerabfälle ein kostengünstigeres Substrat und zudem in großen Mengen verfügbar. Mit Hilfe dieses rekombinanten Stammes konnte im Vergleich zu 1,3-Propandiol-produzierenden Wildtypen (70 g/l in 40 h) eine sehr viel höhere 1,3-Propandiol-Produktion

erzielt werden (200 g/l in 40 h). Wachstumsstudien haben bewiesen, daß Coenzym B₁₂ limitierend für das Wachstum auf Glycerin und 1,2-Propandiol ist. Durch die Überproduktion von PduO wurde die Generationszeit von *S. typhimurium* auf 1,2-Propandiol von 8,4 auf 5,8 h gesenkt (JOHNSON et al., 2001). Diese Beobachtung und die Identifizierung der Adenosyltransferase ist entscheidend für die Entwicklung von biotechnologisch-relevanten rekombinanten Bakterienstämmen zur Produktion von 1,3-Propandiol. Desweiteren wird die zur 1,3-Propandiol-Produktion genutzte Diol-Dehydratase während der Umsetzung von Glycerin inaktiviert. Da Glycerin-Dehydratasen im Vergleich zu Diol-Dehydratasen weniger schnell durch Glycerin inaktiviert werden, wäre ein industrieller Einsatz dieser Enzyme sinnvoll. Durch die Überproduktion der Adenosyltransferase und des im Rahmen dieser Arbeit isolierten Reaktivierungsfaktors der Glycerin-Dehydratase könnte eine Steigerung der Effizienz der 1,3-Propandiol-Produktion erreicht sowie der Verbrauch und damit die Kosten für B₁₂ gesenkt werden.

5 Zusammenfassung

1. Die Strukturgene der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* wurden nach Klonierung in den Vektor pSK+ heterolog in *E. coli* exprimiert. Die anschließende Reinigung der produzierten Proteine erfolgte mittels des bei der Klonierung angehängten His₆-Tags durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose. Die Ausbeute betrug im Fall des Enzyms aus *C. freundii* 30 %, die spezifische Aktivität lag bei 10,3 U/mg. Bei der Reinigung der Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* wurde eine Ausbeute von 53 % erreicht. Das Enzym wies eine spezifische Aktivität von 3,6 U/mg auf.
2. Die gereinigten Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* wurden in Gegenwart des Substrats Glycerin im Verlauf der Katalyse inaktiviert. Dabei war die Rate der Inaktivierung der Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* gegenüber dem Enzym aus *C. freundii* 2-fach erhöht. Kein signifikanter Aktivitätsverlust wurde dagegen bei der 50 minütigen Inkubation der Glycerin-Dehydratasen mit 1,2-Propandiol als Substrat verzeichnet.
3. Northern-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA, die aus auf Glucose oder Glycerin gewachsenen *C. freundii*- und *Cl. pasteurianum*-Zellen isoliert worden war, zeigten, daß die Gene des *dha*-Regulons nur in Gegenwart von Glycerin exprimiert werden. Ferner bilden bei *C. freundii* die Strukturgene der Glycerin-Dehydratase und das *dhaF*-Gen ein gemeinsames Operon. Das *dhaG*-Gen wird zusammen mit dem Gen für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase transkribiert. Im Gegensatz zu *C. freundii* sind bei *Cl. pasteurianum* die beiden Gene *dhaG* und *dhaF* zusammen mit den Strukturgenen für die Glycerin-Dehydratase in einer Transkriptionseinheit organisiert.

4. Die Gene *dhaF* und *dhaG* aus *C. freundii* konnten nach Klonierung in den Expressionsvektor pKK223-3 heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Durch das Anhängen der Sequenz für einen His₆-Tag wurde die anschließende Reinigung der Proteine mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt. Dabei konnte DhaF im Gegensatz zu DhaG bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Die Identität der Banden wurde durch Western-Blot-Analysen mit einem gegen den His₆-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen. DhaF besitzt eine Molekularmasse von 64 kDa und bildet im nativen Zustand einen dimeren Komplex mit einer Molekularmasse von 120 kDa. DhaG weist eine Molekularmasse von 14 kDa auf.

5. Die heterologe Koexpression der Gene *dhaG* und *dhaF* aus *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* erfolgte ebenfalls nach Klonierung in den Expressionsvektor pKK223-3. Die Reinigung der Komplexe wurde analog zur Reinigung der Proteine DhaF und DhaG mit einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt. Dabei konnte im Gegensatz zum DhaFG-Komplex aus *C. freundii* der Komplex aus *Cl. pasteurianum* nur partiell gereinigt werden. SDS- und Western-Blot-Analysen zeigten, daß sich die DhaFG-Komplexe wie erwartet aus zwei Untereinheiten mit Molekularmassen von 64 und 14 kDa zusammensetzten. Die nativen Molekularmassen der DhaFG-Komplexe betragen jeweils 150 kDa. Dies entspricht einer Zusammensetzung von 2 2.

6. Der DhaFG-Proteinkomplex aus *C. freundii* war in der Lage, Glycerin-inaktivierte Glycerin-Dehydratase aus demselben Organismus zu reaktivieren und die Inaktivierung des Enzyms in Gegenwart von Glycerin zu verhindern. Desweiteren konnte durch den Reaktivierungsfaktor O₂-inaktivierte Glycerin-Dehydratase reaktiviert werden. Eine Aktivierung des inaktiven Cyano-B₁₂-Dehydratase-Komplexes wurde ebenfalls beobachtet. Die Reaktivierung von Glycerin- und

O₂-inaktivierter Dehydratase sowie die Aktivierung des inaktiven Cyano-B₁₂-Dehydratase-Komplexes war dabei strikt abhängig von der Anwesenheit von ATP/MgCl₂ und freiem Coenzym B₁₂. Demgegenüber war der partiell gereinigte DhaFG-Komplex aus *Cl. pasteurianum* nicht in der Lage, die inaktivierte Glycerin-Dehydratase aus demselben Organismus zu reaktivieren.

7. Untersuchungen zur Substratspezifität des DhaFG-Komplexes aus *C. freundii* zeigten, daß das Protein ebenfalls die Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* reaktivieren kann. Der Grad der Reaktivierung lag dabei im gleichen Rahmen wie der des Enzyms aus *C. freundii*. Eine Reaktivierung der inaktivierten Glycerin-Dehydratase aus *Cl. pasteurianum* und der Diol-Dehydratasen aus *K. oxytoca* und *S. typhimurium* konnte nicht beobachtet werden.
8. Die Untersuchungen der durch den DhaFG-Komplex aus *C. freundii* katalysierten Reaktivierungsreaktion bewies, daß diese nicht auf eine Umwandlung von enzymatisch-inaktivem Cobalamin in aktives Coenzym B₁₂ durch eine Adenosyltransferaseaktivität zurückzuführen ist. Eine solche Aktivität konnte für den DhaFG-Komplex und das partiell gereinigte DhaH-Protein nicht detektiert werden. Spektroskopische Analysen zeigten, daß die Reaktivierung der Dehydratase durch den DhaFG-Komplex auf einem ATP-abhängigen Austausch von am Enzym gebundenen inaktiven Cobalamin gegen freies Coenzym B₁₂ beruht. Hinweise auf eine dafür notwendige Komplexbildung zwischen Glycerin-Dehydratase und dem Reaktivierungsfaktor konnten ebenfalls erbracht werden. Ferner deuten die Fähigkeit des DhaFG-Komplexes zur spezifischen Interaktion mit Vitamin B₁₂-Agarose und Dot-Blot-Analysen mit radioaktiv markiertem B₁₂ auf eine direkte B₁₂-Bindung des Reaktivierungsfaktors hin.

9. Der Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* besitzt eine geringe aber konstante ATP-Hydrolyse-Aktivität. Die Rate der ATP-Hydrolyse ist sowohl unter reaktivierenden als auch nicht-reaktivierenden Bedingungen gleich. Das DhaF-Protein allein hydrolysiert ATP mit der gleichen Rate wie der DhaFG-Komplex. Desweiteren ist DhaF in der Lage, ATP zu binden. Somit ist die DhaF-Untereinheit die ATPase des DhaFG-Komplexes.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ABBAD-ANDALOUSSI, S., DÜRR, C., RAVAL, G., PETITDEMANGE, H. (1996). Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* **142**: 1149-1158.

ABELES, R. H. (1979). Current status of the mechanism of action of B₁₂-coenzyme: In: Zagalak, B. und Friedrich, W. (Hrsg.) *Vitamin B₁₂*, 373-388. Walter de Gruyter, Berlin.

ABELES, R. H., BROWNSTEIN, A. M., RANGLES, C. H. (1960). β -Hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*: *Biochim. Biophys. Acta* **41**: 530-531.

ABELES, R. H., DOLPHIN, D. (1976). The vitamin B₁₂ coenzyme. *Acc. Chem. Research* **9**: 114-120.

ABEND, A., BANDARIAN, V., NITSCHKE, R., STUPPERICH, E., RETEY, J., REED, G. H. (1999). Ethanolamine Ammonia-Lyase has a base on binding mode for coenzyme B₁₂. *Arch. Biochem. Biophys.* **370**: 138-141.

ABEND, A., BANDARIAN, V., REED, G. H., FREY, P. A. (2000). Identification of cis-ethanesemidione as the organic radical derived from glycolaldehyd in the suicide inactivation of dioldehydrase and of ethanolamine ammonia-lyase. *Biochemistry* **39**: 6250 – 6257.

ABEND, A., NITSCHKE, R., BANDARIAN, V., STUPPERICH, E., RETEY, J. (1998). Diol dehydratase binds coenzyme B₁₂ in the ‚base-on‘ mode: ESR investigation on cob(II)alamin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 625-627.

ALWINE, J. C., KEMP, D. J., STARK, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazo-benzyloxymethylpaper and hybridization with DNA-probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5350-5354.

ANDERSSON, L. O., BORG, H., MIKAELSSON, M. (1972). Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gel of graded porosity. *FEBS Lett.* **20**:199-202.

- AVERHOFF, B. (1988). Optimierung der Succinat- und Trimethylenglycol-Produktion durch Variation von Wachstumsparametern und Zugabe externer H-Donatoren. Dissertation, Universität Göttingen.
- BABIOR, B. M. (1969). The mechanism of action of ethanolamine deaminase. I. Inhibition by coenzyme B₁₂ analogues. *J. Biol. Chem.* **244**: 2917-2926.
- BABIOR, B. M. (1970). The mechanism of action of ethanolamine ammonia-lyase, a B₁₂-dependent enzyme. VII. The mechanism of hydrogen transfer. *J. Biol. Chem.* **245**: 6125-6133.
- BABIOR, B. M. (1975). Mechanism of cobalamin-dependent rearrangements. *Acc. Chem. Res.* **8**: 376-383.
- BABIOR, B. M. (1982). Ethanolamine ammonia-lyase. In: Dolphin, D. (Hrsg.), B₁₂ Vol. 2, 263-287. Wiley, New York.
- BABIOR, B. M. (1988). The mechanism of adenosylcobalamin-dependent rearrangements. *BioFactors* **1**: 21-26.
- BABIOR, B. M., CARTY, T. J., ABELES, R. H. (1974). The mechanism of action of ethanolamine ammonia-lyase, a B₁₂-dependent enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**: 1689-1695.
- BACHOVCHIN, W. W., EAGAR, R. G., MOORE, K. W., RICHARDS, J. H. (1977). Mechanism of action of adenosylcobalamin: Glycerol and other substrate analogues as substrates and inactivators for propandiol dehydratase - kinetics, stereospecificity, and mechanism. *Biochemistry* **16**: 1082-1092.
- BADIA, J., ROS, J., AGUILAR, J. (1985). Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **161**: 435-437.
- BAKER, J. J., STADTMAN, T. C. (1982). Amino mutase. In: Dolphin, D. (Hrsg.), B₁₂, Vol. 2, 203-232. Wiley, New York.
- BAKER, J. J., VAN DER DRIFT, V., STADTMAN, T. C. (1973). Purification and properties of -lysine mutase, a pyridoxal phosphate and B₁₂ coenzyme dependent enzyme. *Biochemistry* **12**: 1054-1063.

- BANERJEE, R. V., JOHNSTON, N. L., SOBESKI, J. K., DATTA, P., MATTHEWS, R. G. (1989). Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli* metH gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **264**: 13888-13895.
- BARBIRATO, F., ASTRUC, S., SOUCAILLE, P., CAMARASA, C., SALMON, J. M., BORIES, A. (1997). Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. *Microbiology* **143**: 2423-2432.
- BARDWELL, J. C., CRAIG, E. A. (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 848-852.
- BARKER, H. A., SMYTH, R. D., WEISSBACH, H., MUNCH-PETERSEN, A., TOOHEY, J. I., LADD, J. N., VOLCANI, B. E., WILSON, R. M. (1960). Assay, purification, and properties of the adenosylcobalamide coenzyme. *J. Biol. Chem.* **235**: 181-190.
- BARKER, H. A., WEISSBACH, H., SMYTH, R. D. (1958). A coenzyme containing pseudovitamin B₁₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 1093-1097.
- BARTEL, P. L., CHIEN, C.-T., STERNGLANZ, R., FIELDS, S. (1993). Using the two hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Hartley, D. A. (Hrsg.) *Cellular interactions in Development: A Practical Approach.*, 153-179. Oxford University Press, Oxford.
- BEATRIX, B., ZELDER, O., LINDER, D., BUCKEL, W. (1994). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the coenzyme B₁₂-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri* in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **221**: 101-109.
- BEAVEN, G. H., JONSON, E. A. (1955). The reduction of vitamin B₁₂, *Nature* **176**: 1264-1265.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining method for plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Elektrophoresis* **8**: 93-99.
- BOBIK, T. A., XU, Y., JETER, R. M., OTTO, K. E., ROTH, J. R. (1997). Propanediol utilization genes (*pdu*) of *Salmonella typhimurium*: three genes for the propanediol dehydratase. *J. Bacteriol.* **179**: 6633-6639.

- BOENIGK, R., BOWIEN, S., GOTTSCHALK, G. (1993). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 453-457.
- BOOKER, S., STUBBE, J. (1993). Cloning, sequencing and expression of the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8352-8359.
- BORK, P., SANDER, C., VALENCIA, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7290-7294.
- BRADBEER, C. (1991). Cobalamin transport in *Escherichia coli*. *Biofactors* **3**: 11-19.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BRADY, R. O., CASTANERA, E. G., BARKER, H. A. (1962). The enzymatic synthesis of cobamide coenzymes. *J. Biol. Chem.* **237**: 2325-2332.
- BREZNAK, J. A., COSTILOW, R. N. (1994). Physicochemical factors in growth. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (Hrsg.) *Methods for general and molecular bacteriology*, 137-154. American Society for Microbiology, Washington D. C., USA.
- BUCHBERGER, A., THEYSSEN, H., SCHRÖDER, H., MCCARTY, J. S., VIRGALLITA, G., MILKEREIT, P., REINSTEIN, J., BUKAU, B. (1995). Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J. Biol. Chem.* **270**: 16903-16919.
- BUCKEL, W., BARKER, H. A. (1974). Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* **117**: 1248-1260.
- BUCKEL, W., GOLDING, B. T. (1996). Glutamate and 2-methyleneglutarate mutase: From microbial curiosities to paradigms for coenzyme B₁₂-dependent enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **25**: 329-337.

- BUKAU, B., HESTERKAMP, T., LUIRINK, J. (1996). Growing up in a dangerous environment: a network of targeting and folding pathways for nascent polypeptides in the cytosol. *TICN* **6**: 480-485.
- BUKAU, B., HORWICH, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- BULUWELA, L., FORSTER, A., BOEHM, T., RABBITTS, T. H. (1989). A rapid procedure for colony screening using nylon filters. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 23-24.
- CADIEUX, N., KADNER, R. J. (1999). Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10673-10678.
- CHANG, C. H., FREY, P. A. (1998). GenBank AF104259.
- CHASSY, B. M., MERCENIER, A., FLICKINGER, J. (1988). Transformation of bacteria by electroporation. *Biotech.* **6**: 303-309.
- CHEN, H.-P., MARSH, E. N. G. (1997). How enzymes control the reactivity of adenosylcobalamin: Effect on coenzyme binding and catalysis of mutations in the conserved histidine-aspartate pair of glutamate mutase. *Biochemistry* **36**: 7884-7889.
- CHOTANI, G., DODGE, T., HSU, A., KUMAR, M., LADUCA, R., TRIMBUR, D., WEYLER, W., SAFORD, K. (2000). The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**: 434-455.
- DABROCK, B., BAHL, H., GOTTSCHALK, G. (1992): Parameters effecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1233-1239.
- DANIEL, R. (1994). Glycerinvergärung durch *Citrobacter freundii*: Sequenzierung und Charakterisierung des *dha* Regulons. Dissertation, Universität Göttingen.
- DANIEL, R., BOBIK, T.A., GOTTSCHALK, G. (1998). Biochemistry of coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiol. Reviews* **22**: 553-566.

- DANIEL, R., BOENIGK, R., GOTTSCHALK, G. (1995 a). Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **177**: 2151-2156.
- DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1992). Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii* *dha* regulon. FEMS Microbiol. Lett. **100**: 281-286.
- DANIEL, R., STUERTZ, K., GOTTSCHALK, G. (1995 b). Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. J. Bacteriol. **177**: 4392-4401.
- DEL TITO, B. J., WARD, Jr. J. M., HODGSON, J., GERSHATER, C. J., EDWARDS, L. A., WYSOCKI, L. A., WATSON, F. A., SATHE, G., KANE, J. F. (1995). Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **177**: 7086-7091.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. **12**: 387-395.
- DOWER, W. J., MILLER, J. F., RAGSDALE C. W. (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145.
- DRENNAN, C. L., HUANG, S., DRUMMOND, J. T., MATTHEWES, R. G., LUDWIG, M. L. (1994). How a protein binds B₁₂: a 3.0 Å X-ray structure of B₁₂-binding domains of methionine synthase. Science **266**: 1669-1674.
- ESCALANTE-SEMERENA, J. C., SUH, S.-J. and ROTH, J. R. (1990). CobA function is required for both de novo cobalamin biosynthesis and assimilation of exogenous corrinoids in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **172**: 273-280.
- FAUST, L. P., CONNOR, J. A., ROOF, D. M., HOCH, J. A., BABIOR, B. M. (1990). Cloning, sequencing and expression of the genes encoding the adenosylcobalamin-dependent ethanolamine ammonia-lyase of *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. **265**: 12462-12466.
- FEILROTTER, H. E., HANNON, G. J., RUDEL, C. J., BEACH, D. (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. Nucl. Acids Res. **22**: 1502-1503.

- FLAHERTY, K. M., DELUCA-FAHERTY, C., MCKAY, D. B. (1990). Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock-cognate protein. *Nature* **346**: 623-628.
- FORAGE, R. G., FOSTER, M.A. (1979). Resolution of the coenzyme B₁₂-dependent dehydratases of *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. *Biochim. Biophys. Acta* **569**: 249-259.
- FORAGE, R. G., LIN, E. C. C. (1982). dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J. Bacteriol.* **151**: 591-599.
- FRIEDMANN, H. C. (1975). Biosynthesis of corrinoids. In: B. M. Babor (Hrsg.), Cobalamin, 75-103. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- GEORGOPOULOS, C., WELCH, W. J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**: 601-634.
- GETHING, M.-J. (1996). Molecular chaperones: clasping the price. *Curr. Biol.* **6**: 1573-1576.
- GIETZ, D., ST. JEAN, A. WOODS, R. A. and SCHIESTL, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of yeast cells. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 1425-1425.
- GOLDMANN, E., ROSENBERG, A. H., ZUBAY, G., STUDIER, F. W. (1995). Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5'-end of a message in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **245**: 467-473.
- HAMILTON, J. A., YAMADA, R., BLAKLEY, R. L., HOGENKAMP, H. P. C., LOONEY, F. D., WINFIELD, M. E. (1971). Cobamides and ribonucleotide reduction. VII. Cob(II)alamin as a sensitive probe for the active center of ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **10**: 347-355.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- HARMS, U., THAUER, K. (1996). The corrinoid-containing 23-kDa subunit MtrA of the energy-conserving N⁵-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyl-transferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biochem.* **241**: 149-154.

- HARTL, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-580.
- HARTRAMPF, G., BUCKEL, W. (1986). On the steric course of the adenosylcobalamin-dependent 2-methyleneglutarate mutase reaction in *Clostridium barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **156**: 301-304.
- HATMANIS, M. G. N., STADTMAN, T. C. (1986). Diol metabolism and diol dehydratase in *Clostridium glycolicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**: 144-152.
- HAWKES, R. (1986). The dot immunobinding assay. *Methods Enzymol.* **135**: 102-117.
- HEINDRICKX, M., DE VOSS, P., VACANNEYT, M., DE LEY, J. (1991). The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and 1213 t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 385. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 637-642.
- HILL, J., DONALD, K. A., GRIFFITH, D. E. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucl. Acids Res.* **19**: 5791-5791.
- HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DOBELI, H., GENTZ, R., STÜBER., D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio Technology* **6**: 1321-1325.
- HOGENKAMP, H. P. (1968). Enzymatic reactions involving corrinoids. *Annu. Rev. Biochem.* **37**: 225-245.
- HOGENKAMP, H. P., GHAMBEER, R. K., BROWNSON, C., BLAKLEY, R. L., VITOLS, E. (1968). Cobamides and ribonucleotide reduction. VI. Enzyme-catalyzed hydrogen exchange between water and deoxyadenosylcobalamin. *J. Biol. Chem.* **243**: 799-808.
- HOLMES, D. S., QUICKLEY, M. (1981). A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- HONDA, S., TORAYA, T., FUKUI, S. (1980). In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B₁₂-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. *J. Bacteriol.* **143**: 1458-1465.
- HÖRIG, J. A., RENZ, P. (1980). Biosynthesis of Vitamin B₁₂. *Eur. J. Biochem.* **105**: 587-592.

- HUENNEKENS, F. M., VIKTOLS, K. S., FUJII, K., JACOBSEN, D. W. (1982). Biosynthesis of the cobalamin coenzymes, In: D. Dolophin (Hrsg.), B₁₂, 145-167. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- HUNGATE, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, J. R., RIBBONS, D. W. (Hrsg.) Meth. Microbiol. **3b**:117-132. Academic Press, New York, USA.
- ICHIKAWA, M., TORAYA, T. (1988). Roles of the β -D-ribofuranose ring and the functional groups of the D-ribose moiety of adenosylcobalamin in the diol dehydratase reaction. Biochim. Biophys. Acta **952**: 191-200.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**: 23-28.
- ISHIDA, A., TORAYA, T. (1993). Adenosylcobinamide methyl phosphate as a pseudocoenzyme for diol dehydrase. Biochemistry **32**: 1535-1540.
- ITO, H., FUKADA, Y., MURATA, K., KIMURA, A. (1993). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**: 163-168.
- JANSEN, R., KALOUSEK, F., FENTON, W. A., ROSENBERG, L. E., LEDLEY, F. D. (1989). Cloning of full-length methylmalonyl-CoA mutase from cDNA library using the polymerase chain reaction. Genomics **4**: 198-205.
- JETER, R. M. (1990). Cobalamin-dependent 1,2-propanediol utilization by *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. **136**: 887-896.
- JETER, R. M., OLIVERA, B. M., ROTH, J. R. (1984). *Salmonella typhimurium* synthesizes cobalamin (vitamin B₁₂) de novo under anaerobic growth conditions. J. Bacteriol. **159**: 206-213.
- JOHNSON, C. L. V., PECHONICK, E., PARK, S. D., HAVEMANN, G. D., LEAL, N. A., BOBIK, T. A. (2001). Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the *Salmonella pduO* gene, an ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase gene. J. Bacteriol. **183**: 1577-1584.

- KAMATH-LOEB, A. S., LU, C. Z., SU, W.-C., LONETTO, M. A., GROSS, C. A. (1995). Analysis of three DnaK mutant proteins suggests that progression through the ATPase cycle requires conformational changes. *J. Biol. Chem.* **270**: 30051-30059.
- KAMPS, A. (1998). Untersuchungen zur Wechselwirkung der beiden Regulatorproteine NifA und NifL aus *Klebsiella pneumoniae* mittels des *Two Hybrid Systems*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- KELL, D. B., PECK, M. W., RODGER, G., MORRIS, J. G. (1981). On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**: 81-88.
- KOFOID, E., RAPPLEYE, C., STOJILJKOVIC, I., ROTH, J. (1999). The 17-gene ethanolamine (*eut*) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologous of carboxysome shell proteins. *J. Bacteriol.* **181**: 5317-5329.
- KUNG, H. F., CEDERBAUM, S., TSAI, L., STADTMAN, T. C. (1970). Nicotinic acid metabolism V. A cobamide coenzyme-dependent conversion of α -methylene-glutaric acid to dimethylmaleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **65**: 978-984.
- KUNG, H. F., TSAI, L. (1971). Nicotinic acid metabolism VII: Mechanism of action of clostridial α -methylene-glutarate mutase (B_{12} -dependent) and methylitaconate isomerase. *J. Biol. Chem.* **246**: 6436-6443.
- LAWRENCE, C. C., GERFEN, G. J., SAMANO, V., NITSCHKE, R., ROBINS, M. J., RETEY, J., STUBBE, J. (1999). Binding of Cob(II) alamin to the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Latobacillus leichmanii*. Identification of dimethylbenzimidazole as the axial ligand. *J. Biol. Chem.* **274**: 7039-7042.
- LEE, H. A., ABELES, R. H. (1963). An intramolecular oxidation-reduction requiring a cobinamide coenzyme. *J. Biol. Chem.* **238**: 2367-2350.
- LIEN, E. L., ELLENBOGEN, L., LAW, P. Y., WOOD, J. M. (1974). Studies on the mechanism of cobalamin binding to hog intrinsic factor. *J. Biol. Chem.* **249**: 890-894.
- LU, W.-P., SCHIAU, I., CUNNINGHAM, J. R., RAGSDALE, S. W. (1993). Sequence and expression of the gene encoding the corrinoid/iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* and reconstitution of the recombinant protein to full activity. *J. Bio. Chem.* **268**: 5605-5614.

- LUDWIG, M. L., DRENNAN, C. L., MATTHEWS, R. G. (1996). The reactivity of B₁₂ cofactors: the proteins make a difference. *Structure* **4**: 505-512.
- LUERS, F., SEYFRIED, M., DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1997). Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett.* **154**: 337-345.
- MACIS, L., DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1998). Properties and sequence of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 21-28.
- MAKOFF, A. J., OXER, M. D., ROMANOS, M. A., FAIRWEATHER, N. F., BALLANTINE, S. (1989). Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: high level expression by removing rare codons. *Nucleic Acids Res.* **17**: 10191-10202.
- MANCIA, F., EVANS, P. R. (1997). Conformational changes on substrate binding to methylmalonyl CoA mutase and new insights into the free radical mechanism. *Structure* **6**: 711-720.
- MANCIA, F., KEEP, N. H., NAKAGAWA, A., LEADLAY, P. F., McSWEENEY, S., RASMUSSEN, B., BÖSECKE, P., DIAT, O., EVANS, P. R. (1996). How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure* **4**: 339-350.
- MANDEL, M., HIGA, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- MARCK, C. (1988). „DNA-Strider“: a „C“ program for fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family computers. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1829-1836.
- MARSH, E. N. G., HOLLOWAY, D. E. (1992). Cloning and sequencing of glutamate mutase component S from *Clostridium tetanomorphum*: homologies with other cobalamin-dependent enzymes. *FEBS Lett.* **310**: 167-170.
- MARSH, E. N., MCKNIE, N., DAVIS, N. K., LEADLAY, P. F. (1989). Cloning and structural characterization of the genes coding for adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem. J.* **260**: 345-352.

- MARSTON, F. A. O., LOWE, P. A., DOEL, M. T., SCHOEMAKER, J. M., WHITE, S., ANGAL, S. (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **Vol.2**: 800-804.
- MAUPIN-FURLOW, J., FERRY, J. G. (1996). Characterization of the *cdhD* and *cdhE* genes encoding subunits of the corrinoid/iron-sulfur enzyme of the Co dehydrogenase complex from *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **178**: 340-346.
- MCCARTY, J. S., BUCHBERGER, A., REINSTEIN, J., BUKAU, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **249**: 126-137.
- MEYER, M. P. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46.
- MOORE, B. S., EISENBERG, R., WEBER, C., BRIDGES, A., NANZ, D., ROBINSON, J. A. (1995). On the stereospecificity of the coenzyme B₁₂-dependent isobutyryl-CoA mutase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 11285-11291.
- MORI, K., TOBIMATSU, T., HARA, T., TORAYA, T. (1997). Characterization, Sequencing, and Expression of the genes encoding a reactivating factor for glycerol-inactivated adenosyl-dependent diol dehydratase. *J. Biol. Chem.* **272**: 32034-32041.
- MORI, K., TORAYA, T. (1999). Mechanism of reactivation of Coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase by a molecular chaperone-like reactivating factor. *Biochemistry* **38** :13170-13178.
- MÜLLER, B. (1990). Isolierung und Charakterisierung von konstitutiv Glycerin-vergärenden Mutanten von *Citrobacter freundii*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- NISHIZAWA, H., KITA, N., OKIMURA, S., TAKAO, E., ABE, Y. (1988). Determination of molecular weight of native proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* **9**: 803-806.
- PADMAKUMAR, R., TAOKA, S., PADMAKUMAR, R., BANERJEE, R. (1995). Coenzyme B₁₂ is coordinated by histidine and not dimethylbenzimidazole on methylmalonyl-CoA mutase. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 7033-7034.

- PAZ, M. A., BLUMENFELD, O. O., ROJKIND, M., HENSON, E., FURFINE, C., GALLOP, P. M. (1965). Determination of carbonyl compounds with N-methyl benzothiazolone hydrazone. *Arch. Biochem. Biophys.* **109**: 548-559.
- PEARSON, W. R., LIPMANN, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 2444-2448.
- PFENNIG, N., LIPPERT, K. D. (1966). Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* **55**: 245-256.
- POPPE, L., RETEY (1997). Kinetic investigations with inhibitors that mimic the posthomolysis intermediate in the reactions of coenzyme-B₁₂-dependent glycerol dehydratase and diol dehydratase. *Eur. J. Biochem.* **245**: 398-401.
- POZNANSKAYA, A. A., TANIZAWA, K., SODA, K., TORAYA, T., FUKUI, S. (1979). Coenzyme B₁₂-dependent diol dehydrase: purification, subunit heterogeneity, and reversible association. *Arch. Biochem. Biophys.* **194**: 379-386.
- POZNANSKAYA, A. A., YAKUSHEVA, M. I., YAKOVLEV, V. A. (1977). Study of the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol-dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta* **484**: 236-243.
- RAGSDALE, S. W., LINDAHL, P. A., MÜNCK, E. (1987). Mössbauer, EPR and optical studies of the corrinoid/iron-sulfur protein involved in the synthesis of acetyl coenzyme A by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Biol. Chem.* **22**: 14289-14297.
- REITZER, R., GRUBER, K., JOG, G., WAGNER, U. G., BOTHE, H., BUCKEL, W., KRATKY, C. (1999). Glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*: the structure of a coenzyme B₁₂-dependent enzyme provides new mechanistic insights. *Structure* **7**: 891-902.
- RETEY, J. (1982). Methylmalonyl-CoA mutase. In: Dolphin, D. (Hrsg.) B₁₂ Vol. 2, 357-379. Wiley, New York.
- RIGGS, M. G., MCLACHLAN, A. (1986). A simplified screening procedure for large numbers of plasmid minipreparations. *Bio Techniques* **4**: 310-311.

- ROBINSON, S. P., PORTIS, A. R. (1989). Adenosin triphosphate hydrolysis by purified rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**: 93-99.
- ROTH, J. R., LAWRENCE, J. G., BOBIK, T. A. (1996). Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 137-181.
- RUCH, F. E., LENGELER, J., LIN, E. C. C. (1974). Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **119**: 50-56.
- RÜDIGER, S. L., GERMEROOTH, L., SCHNEIDER-MERGENER, J., BUKAU, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**: 1501-1507.
- RUDOLPH, R., LILIE, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**: 49-56.
- RUSSEL, M., MODEL, P. (1984). Replacement of the *fip* gene of *Escherichia coli* by an inactive gene cloned on a plasmid. *J. Bacteriol.* **159**: 1034-1039.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2. Aufl.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- SANDO, G. N., BLAKLEY, R. L., HOGENKAMP, H. P. C., HOFFMANN, P. J. (1975). Studies on the mechanism of adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reduction by the use of analogs of the coenzyme. *J. Biol. Chem.* **250**: 8744-8779.
- SCARLETT, F. A., TURNER, J. M. (1976). Microbial metabolism of amino alcohols. Ethanolamine catabolism mediated by coenzyme B₁₂-dependent ethanolamine ammonia-lyase in *Escherichia coli* und *Klebsiella aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* **95**: 173-176.
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- SCHIESTL, R. H., GIETZ, R. D. (1989). High efficiency transformation for intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Gen.* **16**: 339-346.

- SCHNEIDER Z., PAWELKIEWICZ J. (1966). The properties of glycerol dehydratase isolated from *Aerobacter aerogenes*, and the properties of the apoenzyme subunits. *Acta Biochim. Polen.* **8**: 311-328.
- SCHNEIDER, Z., LARSEN, E. G., JACOBSON, B. E., PAWELKIEWICZ, J. (1970). Purification and properties of glycerol dehydrase. *J. Biol. Chem.* **245**: 3388-3396.
- SCHRAUZER, G. N., STADLBAUER, E. A. (1975). Ethanolamine ammonia-lyase: Inactivation of the holoenzyme by N₂O and the mechanism of action of coenzyme B₁₂. *Bioinorg. Chem.* **4**: 185-196.
- SCHÜTZ, H., RADLER, F. (1984). Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *System. App. Microbiol.* **5**: 169-178.
- SEYFRIED, M. (1997). Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Coenzym B₁₂-abhängigen Glycerin-Dehydratase aus *Citrobacter freundii*. Doktorarbeit, Universität Göttingen.
- SEYFRIED, M., DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1996). Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *J. Bacteriol.* **178**: 5793-5796.
- SHEPPARD, D. E., ROTH, J. R. (nicht publiziert). Vitamin B₁₂ adenosylation functions in the *eut* operon of *Salmonella typhimurium*. Zur Publikation eingereicht.
- SHIBATA, N., MASUDA, J., TOBOMATSU, T., TORAYA, T., SUTO, K., MORIMOTO, Y., YASUOKA, N. (1999). A new mode of B₁₂ binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: X-ray structure of diol dehydratase. *Structure* **7**: 997-1008.
- SILVER, P. A., KEEGAN, L. P., PTASHNE, M. (1984). Amino terminus of the yeast *GAL4* gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5951-5955.
- SMILEY, K. L., SOBOLOV, M. (1962). A cobamide-requiring glycerol dehydratase from an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**: 538-543.

- SMITH, D. B., RUBIRA, M. R., SIMPSON, R. J., DAVERN, K. M., TIU, W. U., BOARD, P. G., MITCHELL, G. L. (1988). Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli*: *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**: 249-256.
- SPANJAARD, R., A., CHEN, K., WALKER, J. R., VAN DUIN, J. (1990). Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA (Arg). *Nucleic Acids Res.* **18**: 5031-5036.
- SPRENGER, G. A., HAMMER, B. A., JOHNSON, E. A., LIN, E. C. C. (1989). Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing genes of the *dha* regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1255-1262.
- STUBBE, J. (1990). Ribonucleotide reductase: amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* **265**: 5329-5332.
- STUDIER, F. W., MOFFAT, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- STUPPERICH, E., NEXO, E. (1991). Effect of the cobal-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B₁₂ binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *Eur. J. Biochem.* **199**: 299 – 303.
- SUH, S. J., ESCALANTE-SEMERENA, J. C. (1993). Cloning, sequencing and overexpression of *cobA* which encodes ATP-corrinoid adenosyltransferase in *Salmonella typhimurium*. *Gene* **129**: 93-97.
- SUH, S.-J., ESCALANTE-SEMERENA, J. C. (1995). Purification and initial characterization of the ATP:corrinoid adenosyltransferase encoded by the *cobA* gene of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**: 921-925.
- SWITZER, R. L. (1982). Glutamate mutase. In: Dolphin, D. (Hrsg.), B₁₂ Vol. 2, 289-305. Wiley, New York.
- TABOR, S. RICHARDSON, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.

- TALARICO, T. L., AXELSON, L. T., NOVOTNY, J., FIUZAT, M., DOBROGOSZ, W. J. (1990). Utilization of glycerol as hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 943-948.
- TALARICO, T. L., CASAS, I. A., CHUNG, T. C., DOBROGOSZ, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1854-1858.
- THEYSSSEN, H., SCHUSTER, H.-P., PACKSCHIES, L., BUKAU, B., REINSTEIN, J. (1997). The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* **263**: 657-670.
- TOBIMATSU, T., AZUMA, M., HAYASHI, S., NISHIMOTO, K., TORAYA, T. (1998). Molecular cloning, sequencing and characterization of the genes for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase of *Klebsiella pneumoniae*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1774-1777.
- TOBIMATSU, T., AZUMA, M., MATSUBARA, H., TAKATORI, H., NIIDA, T., NISHIMOTO, K., SATOH, H., HAYASHI, R., TORAYA, T. (1996). Cloning, sequencing, and high level expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydrase of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 22352-22357.
- TOBIMATSU, T., HARA, T., SAKAGUCHI, M., KISHIMOTO, Y., WADA, Y., ISODA, M., SAKAI, T., TORAYA, T. (1995). Molecular cloning, sequencing, and expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent diol dehydrase of *Klebsiella oxytoca*. *J. Biol. Chem.* **270**: 7142-7148.
- TOBIMATSU, T., KAJIURA, H., TORAYA, T. (2000). Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Arch. Microbiol.* **174**: 81-88.
- TOBIMATSU, T., KAJIURA, H., YUNOKI, M., AZUMA, M., TORAYA, T. (1999). Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J. Bacteriol.* **181**: 4110-4113.
- TOBIMATSU, T., SAKAI, T., HASHIDA, Y., MIZOGUCHI, N., MIYOSHI, S., TORAYA, T. (1997). Heterologous expression, purification, and properties of diol dehydratase, an adenosylcobalamin-dependent enzyme of *Klebsiella oxytoca*. *Arch. Biophys. Biochem.* **347**: 132-140.

TORAYA, T. (1985). The binding site for the adenosyl group of coenzyme B₁₂ in diol dehydratase. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**: 470-477.

TORAYA, T. (1994). Diol dehydrase and glycerol dehydrase, coenzyme-dependent isoenzymes. In: Sigel, H. und Sigel A. (Hrsg.) *Metal ions in biological systems* Vol. 30, 217-254. Dekker, New York, USA.

TORAYA, T. (1998). Recent structure-function studies of B₁₂ coenzymes in diol dehydrase. In: Kräutler, B., Arigoni, D. und Golding, B. T. (Hrsg.) *Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins*, 303-320. Wiley-VCH, Weinheim.

TORAYA, T. (2000a). Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 106-127.

TORAYA, T. (2000b). The structure and the mechanism of action of coenzym B₁₂-dependent diol dehydratases. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **10**: 87-106.

TORAYA, T., ABELES, R. H. (1980). Inactivation of diol dehydrase in the presence of a coenzyme-B₁₂ analog. *Arch. Biochem. Biophys.* **203**: 174-180.

TORAYA, T., FUKUI, S. (1972). Coenzyme B₁₂-dependent propanediol dehydratase system; Ternary complex between apoenzym, coenzyme, and substrate analog. *Biochim. Biophys. Acta* **284**: 536-548.

TORAYA, T., FUKUI, S. (1977). Immunochemical evidence for the difference between coenzyme-B₁₂-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Eur. J. Biochem.* **76**: 285-289.

TORAYA, T., FUKUI, S. (1980). Immobilized derivatives of vitamin B₁₂ coenzymes and ist analogs. *Methods Enymol.* **67**: 5766.

TORAYA, T., HONDA, S., FUKUI, S. (1979). Fermentation of 1,2-propanediol and 1,2-ethanediol by some genera of *Enterobacteriaceae*, involving coenzyme B₁₂-dependent diol-dehydratase. *J. Bacteriol.* **139**: 39-47.

TORAYA, T., ISHIDA, A. (1991). Roles of the D-ribose and 5,6-dimethylbenzimidazole moieties of the nucleotide loop of adenosylcobalamin in manifestation of coenzymic function in the diol dehydrase reaction. *J. Biol. Chem.* **266**: 5430-5437.

- TORAYA, T., KUNO, S., FUKUI, S. (1980). Distribution of coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. *J. Bacteriol.* **141**: 1439-1442.
- TORAYA, T., MIOSHI, S., MORI, M., WADA, K. (1994). The synthesis of a pyridyl analog of adenosylcobalamin and its cozymic function in the diol dehydratase reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**: 169-174.
- TORAYA, T., MORI, K. (1999). A reactivating factor for coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase. *J. Biol. Chem.* **274**: 3372-3377.
- TORAYA, T., SHIRAKASHI, T., KOSUGA, T., FUKUI, S. (1976). Substrate specificity of coenzyme B₁₂-dependent diol dehydrase: Glycerol as both a good substrate and a potent inactivator. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69**: 475-480.
- TORAYA, T., SUGIMOTO, Y., TAMAO, Y., SHIMIZU, S., FUKUI, S. (1971). Propanediol dehydratase system. Role of monovalent cations in binding of vitamin B₁₂ coenzyme or its analogs to apoenzyme. *Biochemistry* **11**: 2599-2606.
- TORAYA, T., UESAKA, M., FUKUI, S. (1974). Coenzyme B₁₂-dependent diol dehydrase system. Dissociation of the enzyme into two different protein components and some properties of the components. *Biochemistry* **13**: 3895-3899.
- TORAYA, T., USHIO, K., FUKUI, S., HOGENKAMP, H. P. C. (1977). Studies on the mechanism of the adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. *J. Biol. Chem.* **252**: 963-970.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J. (1978). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- VAN AELST, L., BARR, M., MARCUS, S., POLVERRINO, A., WIGLER, M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6213-6217.
- VAN BIBBER, M., BRADBEER, C., CLARK, N., ROTH, J. R. (1999). A new class of cobalamin transport mutants (*btuF*) provides genetic evidence for periplasmic binding protein in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**: 5539-5541.

VIEIRA, J., MESSING, J. (1982). The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with universal primers. *Gene* **19**: 259-268.

VITOLS, E., WALKER, G. A., HUENNEKENS, F. M. (1966). Enzymatic conversion of vitamin B₁₂ to a cobamide coenzyme, -(5,6-dimethylbenzimidazolyl)deoxyadenosylcobamide (adenosyl-B₁₂). *J. Biol Chem.* **241**: 1455-1461.

WAGNER, O. W., LEE, H. A., FREY, P. A., ABELES, R. H. (1966). Studies on the mechanism of action of cobamide coenzymes: chemical properties of the enzyme-coenzyme complex. *J. Biol. Chem.* **241**: 1751-1762.

WAHL, G. M., LEWIS, K. A., RUIZ, J. C., ROTHENBERG, B., ZHAO, J., EVANS, G. A. (1987). Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping and gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 2160-2164.

WALKER, G. A., MURPHY, S., HUENNEKENS, F. M. (1969). Enzymatic conversion of vitamin B_{12a} to adenosyl-B₁₂: evidence for the existence of two separate reducing systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**: 95-102.

WIRT, M. D., KUMAR, M., RAGSDALE, S. W., CHANCE, M. R. (1993). X-ray absorption spectroscopy of the corrinoid/iron-sulfur protein involved in acetyl coenzyme A synthesis by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 2146-2150.

YAMADA, R., TAMAO, Y., BLAKLEY, R. L. (1971). Degradation of 5'-deoxyadenosylcobalamin by ribonucleoside triphosphate reductase and binding of degradation product to the active center. *Biochemistry* **10**: 3959-3968.

YAMANISHI, M., YAMADA, S., ISHIDA, A., YAMAUCHI, J. and TORAYA, T. (1998). EPR spectroscopic evidence for the mechanism-based inactivation of adenosylcobalamin-dependent diol-dehydratase by coenzyme analogs. *J. Biochem.* **124**: 598-601.

YAMANISHI, M., YAMADA, S., MUGURUMA, H., MURAKAMI, Y., TOBIMATSU, T., ISHIDA, A., YAMAUCHI, A., TORAYA, T. (1998). Evidence for axial coordination of 5,6-dimethylbenzimidazole to the cobalt atom of adenosylcobalamin bound to diol dehydratase. *Biochemistry* **37**: 4799-4803.

YANNISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

YIP, T.-T., NAKAGAWA, Y., PORTATH, J. (1989). Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **183**: 159-171.

ZAGALAK, B., PAWELKIEWICZ, J. (1964). Synthesis and properties of some analogs of the corrin coenzymes. *Acta Biochim. Pol.* **11**: 49-59.

ZDANOVSKY, A. G., ZDANOVSKAIA, M. V. (2000). Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3166-3176.

ZELDER, O., BEATRIX, B., KROLL, F., BUCKEL, W. (1995). Coordination of a histidine residue of the protein-component S to the cobalt atom in coenzyme B₁₂-dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*. *FEBS Lett.* **369**: 252-254.

ZELDER, O., BUCKEL, W. (1993). On the role of two different cobalt(II)species in coenzyme B₁₂-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 85-90.

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung eines selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens sowie sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung. Weiterhin danke ich ihm für die Teilnahme an mehreren nationalen und internationalen Tagungen und der Exkursion nach Eilat.

Herrn Dr. Rolf Daniel danke ich für die Betreuung während der Promotion, die Freiräume bei der Entwicklung neuer Ideen und diverse Tips in anregenden Diskussionen sowie die gewissenhafte, kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit. Weiterhin danke ich ihm dafür, daß er neben meinem Chef auch ein Freund war, der mich immer unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gebührt an dieser Stelle den ehemaligen und jetzigen Labormitgliedern Tanja L., Luciana, Falk, Maike, Elke, Alan, Ute, Anke, Susanne, Rolf, Anja, Caro, Frank, Baris, Claudia, Jessica und Tanja W. für die außerordentlich nette Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und den Sinn für Humor, der über so manche Durststrecke hinweggeholfen hat.

Den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Labors 206/210 Claudi, Hans-Jörg, Jensi, Vera, Uwe, Sabine, Bata und Frank danke ich für das gewährte Asyl und die netten Gespräche zwischen den Experimenten und auch außerhalb des Labors. Vor allen Vera gebührt Dank für den tollen unvergeßlichen Amerikaurlaub und Claudi dafür, daß sie mich wieder ins „wahre Leben“ zurückgeholt hat.

Ein ganz dickes Dankeschön geht auch an Susanne, die mich stets tatkräftig und mit viel Enthusiasmus bei den Klonierungen und Proteinreinigungen unterstützt hat. Du wirst in mancher Hinsicht immer ein Vorbild für mich sein.

Sven möchte ich für die Unterhaltung und die Essensrationen bei meinen Nachtschichten ganz herzlich danken. Dadurch wurden diese wesentlich erträglicher.

Viel Mühe haben sich auch Katja und Anja beim Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit gemacht. Vielen Dank Euch beiden!

An Herrn Helwig, Frau Hick und Frau Große sowie die Werkstattbesetzung geht ein großes Dankeschön für die zuvorkommende Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei anstehenden Reparaturen.

Allen bisher nicht genannten Mitgliedern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, sei an dieser Stelle gedankt.

In Katja und Anja habe ich neben netten Kolleginnen auch tolle Freundinnen gefunden, deren Freundschaft mir sehr am Herzen liegt.

Meinen Eltern möchte ich für das entgegengebrachte Verständnis, die unendliche Geduld und die Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit danken, ohne die dieses Studium nicht möglich gewesen wäre.

Kai danke ich von ganzem Herzen, daß er immer ein geduldiger Zuhörer war und mit mir „Freud und Leid“ geteilt hat.

Lebenslauf

01. Juni 1972	geboren in Göttingen
1978 - 1982	Besuch der Grundschule in Lengern
1982 - 1984	Besuch der Orientierungsstufe in Bovenden
1984 - 1991	Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums in Göttingen
Juni 1991	Abitur
Oktober 1991	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen für das Studienfach Biologie
Oktober 1993	Diplomvorprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
September 1995 – Oktober 1995	sechswöchiges Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ian. A. Wilson am Scripps Research Institut in San Diego, Kalifornien,USA
Februar 1996	Diplomprüfung in Mikrobiologie (Hauptfach), Immunologie und Organische Chemie
März 1996 – Juni 1997	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gottschalk und Dr. U. Deppenmeier mit dem Titel: „Erzeugung und Charakterisierung Disaccharid-oxidierender Mutanten von <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H“
Juni 1997 – August 1997	achtwöchiges Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ian. A. Wilson am Scripps Research Institut in San Diego, Kalifornien,USA
September 1997	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation