

---

**Nachweis eines mononuclearen Mangan (II)-  
Zentrums in der Ribonucleotid-Reduktase aus  
*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872  
nach Überexpression des den Metallocofaktor  
codierenden *nrdF*-Gens im Originalstamm**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von Dipl. Chem. Olaf Barckhausen  
geb. am 10.07.1971 in Celle

2004

---

---

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Hartmut Follmann

Tag der Promotion: 19. Juli 2004

---

---

## Abstract

Ribonucleotide reductases are essential enzymes for proliferation of all living cells. Using a radical driven reaction mechanism, they provide the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides. They are key enzymes for DNA synthesis and due to the structure of their metallocofactor they are divided into four classes (STUBBE, 1995), of which class Ia is the best studied one. Class I RNR have a diiron center (JORDAN & REICHARD, 1998). An unusual manganese ribonucleotide reductase was described for *Corynebacterium ammoniagenes*. Its metal cofactor is encoded by the *nrdF* gene, which shows high sequence homology to *nrdF*-Genes from *Escherichia coli* (82%) and *Salmonella typhimurium* (80%; OEHLMANN, 1998). The metal center of *S. typhimurium* Class Ib RNR was characterized as a  $\mu$ -oxo-diiron complex after expression of the *nrdF*-gene in *E. coli* (JORDAN et al., 1994). In analogy to this Huque et al. (2000) and Högbom et al. (2002) postulated an equal  $\mu$ -oxo-diiron complex as metal center for *C. amoniagenes* RNR after expression of the *nrdF*-gene in *E. coli*.

In this work, homologous overexpression of the *C. ammoniagenes nrdF*-gene was established. Development of a three step purification protocol yielded a nearly homogenous R2F protein, which was studied by using UV/VIS and EPR spectroscopy. The stable free radical of the enzyme was observed in the protein cell extract by a UV/VIS signal at 408 nm for the first time. Hyperfine coupling patten of the X-band EPR spectrum identified this species as a tyrosyl radical. In Q-band EPR measurements the existance of a mononuclear manganese (II) center in the R2F protein was proven. This confirmed the characterization of the enzyme by Griepenburg et al. (1998). EPR spectroscopy at 4 K provided data of a novel signal of a spin coupled species in the protein. It could be shown with high probability that this is due to a close interaction of the tyrosyl radical and the manganese center. Feeding experiments with manganese provided hint for the essential role of manganese in radical generation *in vivo*.

The results presented in this work prove the RNR of *C. ammoniagenes* ATCC 6872 being a true manganese enzyme, if the *nrdF* gene is expressed in the original strain.

**key words:** ribonucleotide reductase, manganese, *Corynebacterium ammonaienes*, homologous overexpression

---

## Zusammenfassung

Ribonucleotid-Reduktasen (RNR) sind essentielle Enzyme für die Zellproliferation aller Lebewesen. Sie führen mit Hilfe eines radikalischen Reaktionsmechanismus die Reduktion von Ribonucleotiden zu Desoxyribonucleotiden durch. Sie sind Schlüsselenzyme für die DNA-Synthese und werden anhand ihres Metallocofaktors in vier Klassen eingeteilt (STUBBE, 1995), von denen die Klasse Ia aus *E. coli* als Prototyp am besten untersucht ist. RNR der Klasse I enthalten ein di-Eisen-Zentrum (JORDAN & REICHARDT, 1998). Eine ungewöhnliche Mangan-Ribonucleotid-Reduktase wurde für *Corynebacterium ammoniagenes* beschrieben. Der Metallocofaktor der *C. ammoniagenes*-RNR wird durch das *nrdF*-Gen codiert, welches eine hohe Sequenzhomologie zu den *nrdF*-Genen von *Escherichia coli* (82%) und *Salmonella typhimurium* (80%) aufweist (OEHLMANN, 1998). Das Metallzentrum der Klasse Ib RNR von *S. typhimurium* wurde nach Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli* als  $\mu$ -oxo-verbrückter di-Eisen-Komplex charakterisiert (JORDAN et al., 1994). Im Analogieschluß postulierten HUQUE et al. (2000) und HÖGBOM et al. (2002) auch ein  $\mu$ -oxo-Eisencluster für das Metallzentrum der *C. ammoniagenes* RNR nach Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine homologe Überexpression des *nrdF*-Gens der *C. ammoniagenes* RNR etabliert. Durch die Entwicklung eines dreistufigen Reinigungsprotokolls war es möglich, das R2F-Protein nahezu zur Homogenität zu reinigen und mit Methoden der UV/VIS- und ESR-Spektroskopie zu untersuchen. Das stabile freie Radikal des Enzyms konnte erstmals in UV/VIS-Spektren als Signal bei 408 nm schon im Zellextrakt nachgewiesen werden. Die Hyperfine-Aufspaltung des X-Band-ESR-Signals identifiziert dieses als Tyrosyl-Radikal. Mittels Q-Band-ESR wurde ein mononucleares Mangan(II)-Zentrum im R2F-Protein nachgewiesen, welches die Charakterisierung des Wildtypenzym durch Griepenburg et al. (1998) bestätigt. ESR-Spektroskopie bei 4 K lieferte Daten einer bisher in der Literatur für Ribonucleotid-Reduktasen nicht bekannten Spin-Kopplung. Diese lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine intensive Wechselwirkung des Mangan-Zentrums mit dem Tyrosyl-Radikal erklären. Fütterungsversuche mit Mangan erhöhten den Radikalgehalt der *C. ammoniagenes*-RNR im Proteinrohextrakt. Dies ist ein Hinweis für die Beteiligung des Mangans bei der Generierung des stabilen freien Radikals *in vivo*.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belegen, dass die RNR aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 ein Manganenzym ist, wenn das *nrdF*-Gen im Ausgangsstamm der Erstbeschreibung exprimiert wird.

**Schlagwörter:** Ribonucleotid-Reduktase, Mangan, *Corynebacterium ammoniagenes*, homologe Überexpression

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ribonucleotid-Reduktasen – Vier Klassen, aber ein Reaktionsmechanismus .....	1
1.2 Lebensnotwendige freie Radikale .....	5
1.3 Ribonucleotid-Reduktasen: Essentielle Enzyme des Zellzyklus .....	7
1.4 Biosynthese von Metalloproteinen .....	10
1.5 Zielsetzung .....	13
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme und Isotope .....	15
2.2 Bakterienstämme und Plasmide .....	15
2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....	16
2.4 Wachstumsmedien .....	17
2.4.1 Seed-Medium (THALER & DIEKMANN, 1979).....	17
2.4.2 Luria Bertani (LB)-Medium (MILLER, 1972).....	17
2.4.3 LBG-Medium .....	17
2.4.4 SOC-Regenerationsmedium (DOWER et al., 1988) .....	18
2.4.5 Brain-Heart-Infusion-Medium mit Sorbitol (BHIS) .....	18
2.4.6 LB-HIS Platten.....	18
2.5 Antibiotikazusatz.....	18
2.6 Messung von pH-Wert und optischer Dichte .....	19
2.7 Anzuchtverfahren.....	19
2.7.1 Anzucht von coryneformen Bakterien .....	19
2.7.1.1 Anzucht von Vorkulturen.....	19
2.7.1.2 Anzucht von <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> im 10 L-Fermenter.....	19
2.7.2 Anzucht von <i>C. ammoniagenes</i> pWCAX .....	19
2.7.2.1 Anzucht von Vorkulturen.....	19
2.7.2.2 Anzucht im 10 L-Fermenter .....	20
2.7.3 Anzucht von <i>C. ammoniagenes</i> pOCA2 .....	20
2.7.3.1 Anzucht von Vorkulturen.....	20
2.7.3.2 Anzucht im 10 L-Fermenter .....	20

---

---

2.7.4	Anzucht von <i>C. glutamicum</i> pOCA2 .....	21
2.7.5	Anzucht von <i>E. coli</i> .....	21
2.7.5.1	Anzucht von <i>E. coli</i> pOCA2 .....	21
<b>2.8</b>	<b>Zellernte .....</b>	<b>22</b>
<b>2.9</b>	<b>Zellaufschuss .....</b>	<b>22</b>
<b>2.10</b>	<b>Proteinreinigung .....</b>	<b>22</b>
2.10.1	Fällungen .....	23
2.10.1.1	Ammoniumsulfatfällung .....	23
2.10.2	Chromatographische Methoden .....	23
2.10.2.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	23
2.10.2.2	Anionenaustausch-Chromatographie an UNOsphere-Q .....	24
2.10.2.3	Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex 200 .....	25
2.10.2.4	Anionenaustausch-Chromatographie an Mono Q .....	25
2.10.2.5	Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose 4B .....	26
<b>2.11</b>	<b>Dialyse und Proteinkonzentrierung .....</b>	<b>27</b>
<b>2.12</b>	<b>Proteinbestimmungsmethoden .....</b>	<b>28</b>
2.12.1	Proteinbestimmung ganzer Zellen nach Biuret (HERBERT et al., 1971) .....	28
2.12.2	Proteinbestimmung zellfreier Extrakte nach BRADFORD (1976) .....	28
2.12.3	Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) .....	29
<b>2.13</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....</b>	<b>29</b>
2.13.1	Färben der Polyacrylamid-Gele .....	30
2.13.1.1	Silberfärbung (BLUM et al. 1987) .....	30
2.13.1.2	Coomassie-Färbung .....	32
<b>2.14</b>	<b>Western-Blot .....</b>	<b>32</b>
<b>2.15</b>	<b>Permeabilisierung von <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> nach LUO (1994) ..</b>	<b>33</b>
<b>2.16</b>	<b>Bestimmung der Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität .....</b>	<b>33</b>
2.16.1	Standard-Test für die Detektion der Mn-RRase-Aktivität .....	33
2.16.2	Biochemischer Komplementationstest .....	35
2.16.3	HPLC-Trennung des Ribonucleosid-/ 2'-Desoxyribonucleosid-Gemisches .....	36
<b>2.17</b>	<b>Toleranztest gegen Hydroxyharnstoff .....</b>	<b>37</b>
<b>2.18</b>	<b>Spektroskopische Methoden .....</b>	<b>37</b>
2.18.1	UV/VIS-Spektroskopie .....	37
2.18.2	X-Band ESR-Spektroskopie .....	38
2.18.3	Q-Band ESR-Spektroskopie .....	38

---

---

<b>2.19</b>	<b>Metallbestimmung</b> .....	<b>38</b>
2.19.1	Quantifizierung mit ICP-MS.....	38
2.19.2	ESR-Spektroskopische Quantifizierung.....	38
2.19.3	Colorimetrische Bestimmung von Eisen.....	38
<b>2.20</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>39</b>
2.20.1	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	39
2.20.2	Isolierung von Gesamt-DNA .....	39
2.20.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	39
2.20.4	DNA-Fragment-Isolierung.....	39
2.20.5	DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen.....	40
2.20.6	Inaktivierung von Restriktionsenzymen.....	40
2.20.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	40
2.20.8	Ligation .....	40
2.20.9	Methoden zum Gentransfer.....	41
2.20.9.1	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> und <i>C. ammoniagenes</i> .....	41
2.20.9.1.1	Vorbereitung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	41
2.20.9.1.2	Vorbereitung von Corynebakterien .....	42
2.20.9.1.3	Elektroporation von <i>E. coli</i> und <i>C. ammoniagenes</i> .....	42
2.20.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	42
2.20.10	Amplifikation von DNA mit PCR (Saiki et al., 1985).....	43
2.20.11	Sequenzierung .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Überproduktion des R2F-Proteins in <i>C. ammoniagenes</i></b> .....	<b>44</b>
3.1.1	Überproduktion mit dem Plasmid pWCAX.....	44
3.1.2	Herstellung des Plasmides pOCA2 .....	45
3.1.3	Funktionsüberprüfung durch heterologe Expression des <i>nrdF</i> -Gens .....	47
3.1.4	Überproduktion mit dem Plasmid pOCA2.....	49
<b>3.2</b>	<b>Reinigung der Mn-RNR zur Homogenität</b> .....	<b>50</b>
3.2.1	Reinigung an UNOsphere <sup>®</sup> -Q.....	50
3.2.2	Reinigung an Superdex <sup>™</sup> 200 nach UNOsphere <sup>®</sup> -Q .....	52
3.2.3	Reinigung an Mono Q nach Superdex 200 .....	55
3.2.4	Nachweis der Mangan-Anreicherung.....	57
<b>3.3</b>	<b>UV/VIS-spektroskopischer Nachweis des Tyrosyl-Radikals</b> .....	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>ESR-spektroskopischer Nachweis des Tyrosyl-Radikals</b> .....	<b>64</b>

---

---

3.4.1	Mikrowellen-Sättigung des Radikal-Signals.....	69
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung des neuen ESR-Kopplungssignals .....</b>	<b>70</b>
3.5.1	X-Band-Messungen.....	70
3.5.2	Q-Band-Messungen.....	75
<b>3.6</b>	<b>Spektrensimulationen zur Charakterisierung des Mangan-Zentrums.....</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>96</b>

---

---

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AdoMet	<i>S</i> -Adenosyl-methionin
Amp	Ampicillin
ATCC	American Tissue and Culture Collection
BSA	bovine serum albumin
Ci	Curie
Cm, Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol, Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanz
Fe-RNR	eisenabhängige Ribonucleotid-Reduktase
FPLC	fast protein liquid chromatography
G	Gauss
Gluc	Glucose
HK	Hauptkultur
HPLC	high performance liquid chromatography
HU	Hydroxyharnstoff
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
Km, Km <sup>r</sup>	Kanamycin, Kanamycin-Resistenz
KPP	Kaliumphosphatpuffer
Mn-RNR	manganabhängige Ribonucleotid-Reduktase
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm
PCR	polymerase chain reaction
R1	Katalytische Untereinheit der Klasse Ia-Ribonucleotid-Reduktase
R1E	Katalytische Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase
R2	Metallocofaktor der Klasse Ia-Ribonucleotid-Reduktase
R2F	Metallocofaktor der Ribonucleotid-Reduktase
RNR	Ribonucleotid-Reduktase
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

---

---

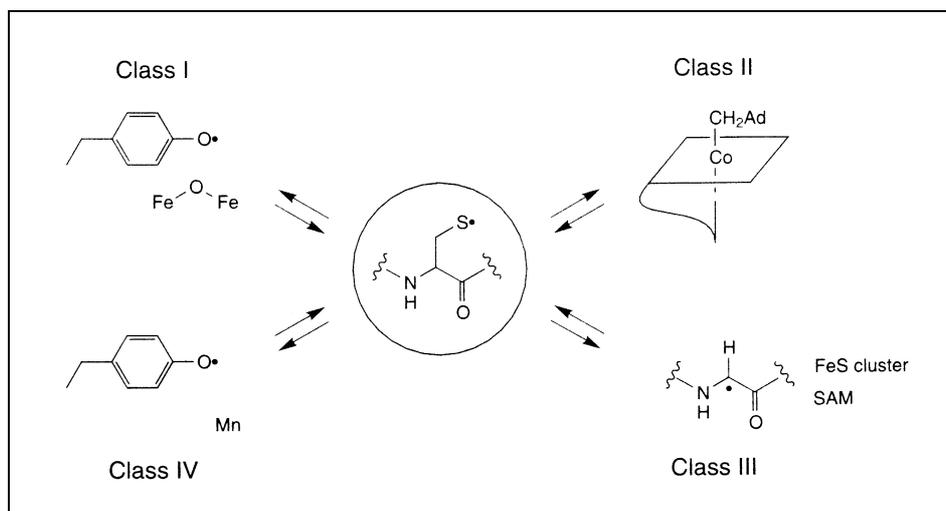
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tesla
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ÜNK	Übernacht-Kultur
upm	Umdrehungen pro Minute
VK	Vorkultur
ZFS	zero field splitting (Nullfeldaufspaltung)

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Ribonucleotid-Reduktasen – Vier Klassen, aber ein Reaktionsmechanismus

Ribonucleotid-Reduktasen (RNRs) bewältigen den letzten Schritt der Synthese der DNA-Bausteine: sie reduzieren Ribonucleotide zu 2'-Desoxyribonucleotiden. Ribonucleotid-Reduktasen werden in allen bekannten Organismen gefunden, da alle Organismen auf die *de novo*-Synthese der DNA-Vorläufermoleküle angewiesen sind (FOLLMANN, 2004). DNA-Fragmente aus dem Abbau von Biomasse, überall verfügbar in Boden und Wasser, werden nur in Ausnahmefällen wiederverwendet, so in einigen *salvage pathways* (AULING et al., 1994). Für die Ribonucleotid-Reduktion *in vivo* ist nur ein Reaktionsmechanismus bekannt, und zwar ein radikalinduzierter Zwei-Elektronen-Prozess. Entsprechend weisen alle RNRs große Ähnlichkeiten bezüglich der katalytisch aktiven Untereinheiten auf, jedoch zeigen sich Unterschiede in Natur und Generierung des für die Reaktion benötigten Radikals, woraus sich eine Einteilung in vier Klassen ergibt (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Die vier Klassen der Ribonucleotid-Reduktasen (modifiziert nach STUBBE & RIGGS-GELASCO, 1998/c); unterschiedliche Generierung und Speicherung des Radikals in der kleinen Untereinheit bewirken die Bildung des gleichen Cysteinyl-Radikals in allen RNR-Typen

Die bekannteste und am besten untersuchte Klasse ist Klasse I, deren Prototyp die aerobe RNR aus *Escherichia coli* darstellt (ÅBERG et al., 1993) und die in allen eukaryotischen Zellen sowie in einigen Prokaryoten und Viren vorkommt (THELANDER et al., 1985; INGEMARSON et al., 1989; MANN et al., 1991; FILATOV et al., 1992; DAVIES et al., 1993; HOWELL et al., 1993; SALEM et al., 1993). Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I bestehen

---

aus zwei Untereinheiten, dem katalytisch aktiven R1-Protein und der radikaltragenden, kleineren Untereinheit, dem R2-Protein. Aufgrund von Unterschieden in der allosterischen Regulation und der Beteiligung unterschiedlicher Hilfsproteine (vgl. Kap. 1.3) werden die Reduktasen der Klasse I in zwei Untergruppen unterteilt, wobei die RNRs der Klasse Ia von den *nrdAB*-Genen und die RNRs der Klasse Ib von den *nrdEF*-Genen codiert werden.

Soweit bisher biochemisch charakterisiert, ist den RNRs beider Subklassen ein Metallzentrum mit zwei  $\mu$ -oxo-verbrückten Eisenatomen und ein Tyrosyl-Radikal gemeinsam. Zur Unterscheidung der beiden Untergruppen werden die Untereinheiten der Klasse Ib-Enzyme mit R1E und R2F bezeichnet.

RNRs der Klasse II sind unter Mikroorganismen weit verbreitet, vor allem in fakultativ anaeroben Organismen wie Lactobacillen und in Cyanobakterien und Archebakterien. Als Prototyp dieser Klasse gilt die vergleichsweise gut untersuchte Ribonucleotid-Reduktase aus *Lactococcus leichmannii*. Sie ist abhängig von Adenosylcobalamin, das für die Radikalgenerierung essentiell ist.

RNRs der Klasse III stellen ein anaerobes Enzymsystem dar, das in Bakterien und Archebakterien gefunden wird, die anaerob leben oder fakultativ anaerob sind. Zu den fakultativ anaeroben Bakterien gehört *E. coli*. Diese RNRs verfügen über ein sauerstoffempfindliches Glycyl-Radikal, das über einen  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Cluster und *S*-Adenosyl-methionin (SAM) erzeugt wird.

Die Reduktasen der Klasse I bilden aus den beiden Untereinheiten Homodimere, die dann gemeinsam das Holoenzym darstellen. Diese Stöchiometrie wird als  $\alpha_2\beta_2$ -Struktur bezeichnet. Einfacher gebaut sind die RNRs der Klasse II, bei denen meist nur eine  $\alpha$ -Kette für die Ribonucleotid-Reduktion genügt, seltener werden Klasse II-RNRs gefunden, die als Homodimer ( $\alpha_2$ ) vorliegen. Die Reduktasen der Klasse III wurden zunächst ebenfalls für  $\alpha_2\beta_2$ -Enzyme gehalten, neuere Studien zeigen aber, dass das  $\alpha_2$ -Dimer für die katalytische Reaktion genügt und die  $\beta_2$ -Komponente lediglich als eine das Glycyl-Radikal erzeugende Aktivase fungiert (POOLE et al., 2002).

Untersuchungen an coryneformen Bakterien haben bei *Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium glutamicum* eine strikte Abhängigkeit des Wachstums vom Mangan-Gehalt des Mediums ergeben (OKA et al., 1968). Unter Manganmangel zeigen diese Bakterien alle Zeichen einer beeinträchtigten oder fehlenden DNA-Synthese (AULING et al., 1980; JORDAN & REICHARD, 1998). Unter diesen Bedingungen zeigen die Zellen infolge einer Teilungshemmung ein ungewöhnliches Längenwachstum (unbalanciertes Wachstum) und können Nucleotide im Medium anreichern. Dies kann zur zielgerichteten Produktion von

---

---

wirtschaftlich bedeutsamen Substanzen genutzt werden. So werden mit *C. ammoniagenes* fermentativ in industriellem Maßstab (über 1000 t pro Jahr) Purin-Nukleotide wie etwa Inosin-monophosphat hergestellt (FOLLMANN, 2004), das als Geschmacksverstärker große Bedeutung besitzen. Untersuchungen belegen, dass diese Effekte tatsächlich auf einer Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion beruhen (AULING & FOLLMANN, 1994). Eine Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion durch Inaktivierung der Ribonucleotid-Reduktase kann durch verschiedenen Chemikalien wie Hydroxyharnstoff oder *p*-Methoxyphenol hervorgerufen werden (GRIEPENBURG, 1998), was zur Anreicherung von Nucleotiden trotz Anwesenheit hoher Mangan-Konzentrationen im Fermentationsmedium genutzt werden kann (ABBOUNI, 2003).

Dies unterstützt bereits bestehende Ergebnisse, denen zufolge der Metallocofaktor der RNR aus *C. ammoniagenes* anders als alle bekannten Reduktasen über ein Manganzentrum verfügt (AULING, 1983). Erste ESR-spektroskopische Untersuchungen am gereinigten Enzym bestätigten dies (WILLING, et al. 1988). In dieses Bild paßt auch die Tatsache, dass *C. ammoniagenes* nicht durch Eisenmangel im Wachstum gehemmt wird (AULING, 1983), wie es bei Zellen mit Klasse I-Reduktasen, wie beispielsweise von *E. coli*, der Fall ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die *in vivo*-Reaktivierung der Ribonucleotid-Reduktase von *C. ammoniagenes* nach Wachstum unter Mn-Mangel alleine durch Mangan erfolgte (AULING, 1980; AULING et al., 1980; AULING, 1983; AULING et al., 1994; BLASCZYK, 1994; LUO, 1994). Auf Grund dieser besonderen Eigenschaften wurde die Ribonucleotid-Reduktase von *C. ammoniagenes* als Klasse IV eingeordnet (STUBBE et al., 1995). Eine Übersicht über die Gruppe der Ribonucleotid-Reduktasen ist in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

Für die Struktur des Metallzentrums der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* wurde zunächst ein zweikerniger Metallkomplex in Form eines  $Mn_2(III)$ -Zentrums angenommen (WILLING et al., 1988/a) und später auch ein mononucleares Mn(III)-Zentrum diskutiert (BLASCZYCK et al., 1994). Fortschritte in der Enzymreinigung und in den Möglichkeiten der ESR-Spektroskopie ermöglichten in der Folge eine genauere Charakterisierung des Metallzentrums. Es wurde von zwei Gruppen unabhängig voneinander als ein einkerniges Mangan(II)-Zentrum identifiziert (GRIEPENBURG, 1998; FIESCHI et al., 1998). In folgenden Untersuchungen wurde auch die RNR aus *C. glutamicum* wegen ihres Mangan-Gehaltes analog charakterisiert (ABBOUNI, 1999).

---

**Tab. 1.1:** Die verschiedenen RNR-Typen, ihre Gene und ihre Funktion (nach OEHLMANN, 1998)

RNR-Typ	Klasse	Gene	Bezeichnung der Untereinheiten	Funktion der Genprodukte
Fe-RNR	Ia	<i>nrdA</i>	R1	Ribonucleotid-Reduktion in <i>Enterobacteriaceae</i> (CARLSON et al. 1984), in Eucaryoten (PARKER et al. 1991, CARAS et al. 1984), <i>A. thaliana</i> (PHILLIPPS et al. 1995) und deren Viren
		<i>nrdB</i>	R2	
Fe-RNR	Ib	<i>nrdE</i>	R1E	Ribonucleotid-Reduktion in <i>M. tuberculosis</i> (YANG et al. 1997)
		<i>nrdF</i>	R2F	
B <sub>12</sub> -abhängige RNR	II	<i>nrdJ</i>		aerobe und/oder anaerobe Ribonucleotid-Reduktion in verschiedenen <i>Bacteria</i> (HOGENKAMP 1984, BOOKER et al. 1993, JORDAN et al. 1997) und <i>Archea</i> (TAUER et al. 1997)
anaerobe RNR, Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> /SAM-aktiviert	III	<i>nrdD</i>		anaerobe Ribonucleotid-Reduktion in <i>Bacteria</i> und <i>Archea</i> (FONTECAVE et al. 1989, FOLLMANN 2004)
		<i>nrdG</i>		
Mn-RNR	IV	<i>nrdE</i>	R1E	Ribonucleotid-Reduktion in <i>C. ammoniagenes</i> (GRIEPENBURG 1998) und <i>C. glutamicum</i> (OEHLMANN 1998)
		<i>nrdF</i>	R2F	

Die Möglichkeiten der Reinigung des Enzyms aus dem Wildtyp-Organismus reichten jedoch aufgrund mangelnder Enzymmenge nicht aus, Zweifel an der Korrektheit der Ergebnisse völlig zu zerstreuen. Da die Mn-RNR wie die Enzyme der Klasse Ib durch die *nrdEF*-Gene codiert wird, wurde vor allem die Existenz nur eines Metallatoms als korrektes Metallzentrum bezweifelt; dagegen wurde vermutet, dass ein ursprünglich vorhandenes zweites Metallatom im Verlauf der Aufreinigung verloren gegangen war. Expression des *nrdF*-Gens in *Escherichia coli* ergab unter Standardbedingungen die Bildung eines typischen Klasse Ib-Enzyms mit einem zweikernigen,  $\mu$ -oxo-verbrückten Eisencluster als Metallzentrum (HUQUE et al., 2000), was zur Zuordnung der RNR aus *C. ammoniagenes* zur Klasse Ib führte. Nach Kristallisation des aus der Expression in *E. coli* gewonnenen Enzyms wies die

---

Röntgenstrukturanalyse ebenfalls auf die Existenz eines Eisenzentrums hin. Die Einordnung der RNR aus *C. ammoniagenes* in Klasse IV wurde auf Basis dieser Ergebnisse zurückgewiesen (Högbom et al. 2002).

## 1.2 Lebensnotwendige freie Radikale

Radikale werden heutzutage vorwiegend negativ oder sogar als gefährlich wahrgenommen, da sie mit unerwünschten Effekten wie vorzeitiger Alterung oder Beeinträchtigung der Gesundheit in Verbindung stehen. Vielen bleibt dabei verborgen, dass gerade einige der wichtigsten Teilschritte biologischer Prozesse nur unter Einbeziehung proteingebundener Radikale stattfinden (STUBBE et al., 1998). Zu eben diesen radikalischen Prozessen von essentieller Bedeutung gehört auch die Ribonucleotid-Reduktion, auf die jede lebende Zelle angewiesen ist.

Die Reduktion von Ribonucleotiden zu 2'-Desoxyribonucleotiden erfolgt in der Zelle nach einem radikalischen Mechanismus. Um diese Reaktion durchführen zu können, muß vor Beginn der Reaktion das Radikal im Protein erzeugt werden. Bei den Reduktasen der Klasse I liegt das Radikal in Form eines stabilen Tyrosyl-Radikals vor. Im Gegensatz zu freien Radikalen in der Atmosphäre oder in Lösung, deren Halbwertszeit im Bereich von Millisekunden liegt, weist das proteingebundene Tyrosyl-Radikal der Klasse I-RNR eine Halbwertszeit von vier Tagen bei Raumtemperatur auf (STUBBE, 1998/c). Für die Klasse IV-RNR aus *C. ammoniagenes* wurde eine Halbwertszeit von 1,5 h bei Raumtemperatur ermittelt (GRIEPENBURG, 1998). Die anaeroben RNR der Klasse III weisen ein Glycyl-Radikal auf, das bei Abwesenheit von Sauerstoff ebenfalls eine Halbwertszeit von mehreren Tagen zeigt. Nur bei den Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse II wird das Radikal *in situ* in der katalytischen Untereinheit als transientes Radikal erzeugt. Die außerordentliche Stabilität der proteingebundenen Radikale liegt in der effizienten Abschirmung des Radikals gegenüber äußeren Einflüssen durch die umgebende Struktur des Proteins.

Es stellt sich zunächst die Frage, warum gerade das Tyrosyl-Radikal für die Ribonucleotid-Reduktion so gut geeignet zu sein scheint. Zwei Gründe sprechen dafür: zum einen sind Tyrosyl-Radikale wirksame Oxidationsmittel und eignen sich damit für eine Vielzahl von Reaktionen. Zum anderen ist ihr Oxidationspotential abhängig vom Protonierungsgrad, der seinerseits durch die Proteinumgebung beeinflusst wird (STUBBE, 1998). Die Natur hat dadurch sozusagen die Möglichkeit eines „Feintunings“ der Reaktionsbedingungen durch Variation der Proteinumgebung des Radikals. Für die Generierung des Radikals existiert im

---

---

Fall der Fe-RNR eine recht genaue Vorstellung, auch wenn nicht alle Einzelheiten restlos verstanden sind. Das Eisenzentrum wird durch molekularen Sauerstoff von Fe<sub>2</sub>(II) über Fe<sub>2</sub>(III) zu einem Fe(III)-Fe(IV) Übergangszustand oxidiert, aus dem das Tyrosyl-Radikal und ein Fe<sub>2</sub>(III)-Zustand als aktive Form des Enzyms hervorgeht (JORDAN & REICHARD, 1998). Bisher konnte für die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* kein Verfahren für die Generierung des Tyrosyl-Radikals durch Oxidation des Metallzentrums *in vitro* entwickelt werden. Hier existiert offensichtlich ein noch nicht bekannter Mechanismus der Radikal-Generierung.

Für die Reduktion von Ribonucleotiden wird das Radikal über einen Langreichweiten-Transport aus der kleinen in die große Untereinheit übertragen und an der Substratbindungsstelle ein transientes Thiyl-Radikal generiert (JORDAN & REICHARD, 1998). Der Transport des Radikals erfolgt über eine Distanz von 35 Å und wird durch Protonenübertragung zwischen Aminosäureresten entlang des Transportweges begleitet (SJÖBERG 1997). Der Weg des Elektronentransportes konnte durch ortsspezifische Mutagenese aufgeklärt werden (MAO et al., 1992; ÅBERG et al., 1989; LARSSON et al., 1986; CLIMENT et al., 1992). Er erfolgt über eine Kette von Aminosäuren, die durch Wasserstoffbrückenbindungen so arretiert sind, dass sie ein stabiles „Rückgrat“ bilden, das auch durch Konformationsänderungen in anderen Bereichen des Enzyms nicht in seiner Anordnung beeinflusst wird. So können sich die Elektronen zu jeder Zeit ungehindert über kovalente Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen (BERATAN et al., 1992; MOSER et al., 1997; KARPIRISHIN et al., 1994; FARVER et al., 1997; MOSER et al., 1997; SKOURTIS et al., 1997; WILLIAMS et al., 1997; WINKLER et al. 1997) „frei“ zwischen Tyrosyl-Radikal und Substratbindungsstelle bewegen (NORDLUND et al., 1993; NORDLUND et al., 1990; UHLIN et al., 1994).

Abbildung 1.2 zeigt schematisch den Vorgang der Ribonucleotid-Reduktion am Beispiel der Fe-RNR aus *E. coli*, wobei die verbleibende erneute Reduktion der Cysteine 225 und 462 durch zusätzliche Reduktionssysteme erfolgt, in die spezifische Redoxine (Thioredoxin im Falle von *E. coli*) und NADPH involviert sind. Im Fall der Reduktasen des *nrdEF*-Systems (zu denen auch die RNR aus *C. ammoniagenes* zählt) wird diese Rolle wahrscheinlich vom NrdH-Protein übernommen, das thioredoxinähnliche Eigenschaften besitzt (WILLING et al. 1988b). Von der Struktur her ähnelt es eher einem Glutaredoxin (STEHR et al., 2001). Eine schematische Darstellung dieses Reduktionszyklus ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

---

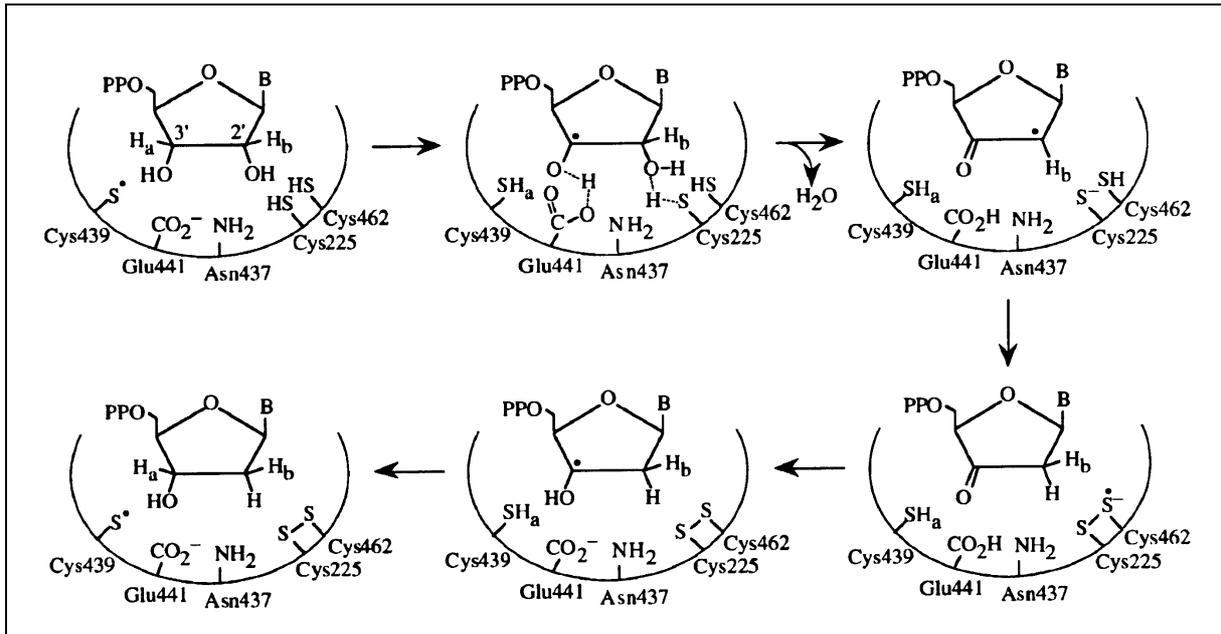


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Reduktion von Ribonucleotiden am Beispiel der Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* (JORDAN UND REICHARD, 1998)

### 1.3 Ribonucleotid-Reduktasen: Essentielle Enzyme des Zellzyklus

Die effiziente Nutzung und exzellente Kontrolle von Radikalen für die Ribonucleotid-Reduktion ist nur einer der überraschenden Aspekte der Ribonucleotid-Reduktasen, ein weiterer ist die umfangreiche allosterische Kontrolle der Ribonucleotid-Reduktasen.

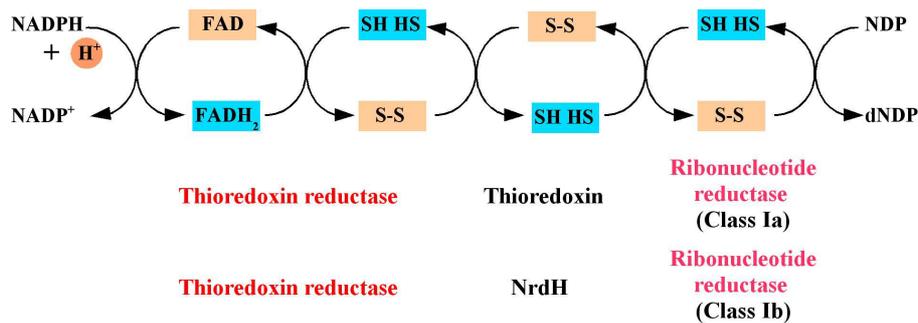
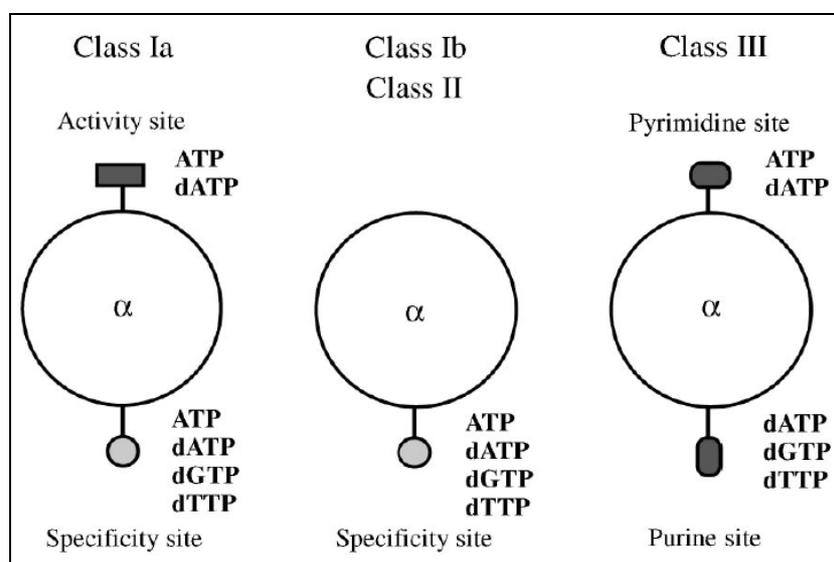


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Elektronenübertragung zur Reduktion der katalytisch wichtigen Gruppen in der Substratbindungsstelle der Ribonucleotid-Reduktasen

RNRs sind in der Zelle verantwortlich für die Aufrechterhaltung eines ausbalancierten Pools an Desoxyribonucleotiden (dNTPs) für die DNA-Synthese. Abweichungen in der Menge der für die DNA-Synthese bereitstehenden dNTPs können schwerwiegende Folgen für die Zelle haben, die zu genetischen Schäden und sogar zum Zelltod führen können (KUNZ, 1994). Um

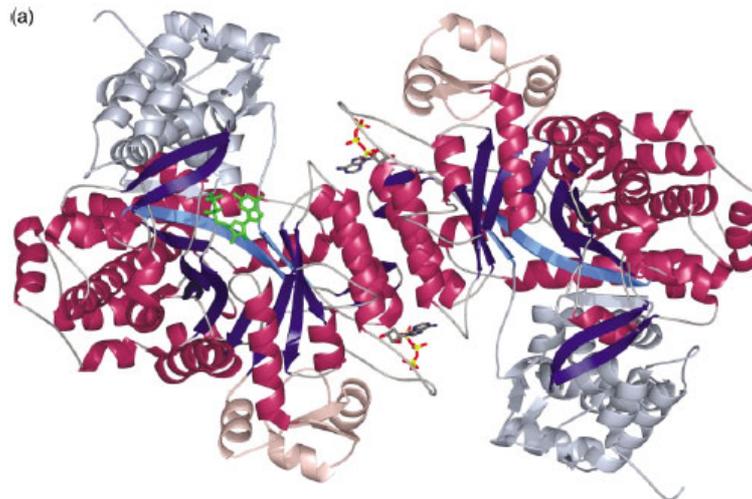
die Aufrechterhaltung eines ausgewogenen dNTP-Pools gewährleisten zu können, sind die RNRs in der Lage, die vier Nucleotide ADP, CDP, GDP und UDP gleichermaßen zu reduzieren. Die Triphosphate werden dabei auch reduziert, die höhere katalytische Aktivität tritt jedoch bei den Diphosphaten auf (WILLING et al., 1988; KUNZ UND KOHALMI, 1991). Dies allein garantiert aber noch kein ausgewogenes Verhältnis der dNTPs zueinander. Dies wird durch einen einzigartigen Mechanismus der allosterischen Kontrolle gewährleistet, durch den das Enzym abhängig von den vorliegenden Produktkonzentrationen wechselnde Substratspezifitäten aufweist. Alle Klassen der Ribonucleotid-Reduktasen verfügen über spezifitätssteuernde Produktbindungsstellen (s. Abb. 1.4).



**Abb. 1.4:** Modelle für die allosterische Regulation der Ribonucleotid-Reduktasen der verschiedenen Klassen (JORDAN & REICHARD et al. 1998)

Sichtbar wird auch ein Unterschied zwischen den Reduktasen der Klassen Ia und Ib: während die Klasse Ia-RNRs durch Bindung von ATP stimuliert und in Gegenwart von mehr als 1  $\mu\text{mol/L}$  dATP inhibiert werden (ELIASSON et al., 1996), verfügen die Klasse Ib-Enzyme über keine entsprechende Aktivitätsbindungsstelle. Bei den Klasse Ib-Enzymen wirkt sich dATP stimulierend aus. Erst Konzentrationen über 1 mmol/L wirken hemmend auf die Enzymaktivität (BROWN & REICHARD, 1969; WILLING et al., 1988/b). Das Modell (Abb. 1.5) zeigt die Bindung von Effektoren an jeweils ein Monomer der verschiedenen Klassen Ia, Ib, II und III. Die Klasse IV-Reduktase aus *C. ammoniagenes* verhält sich bezüglich der allosterischen Kontrolle wie eine Reduktase der Klasse Ib (WILLING et al., 1988/b).

Generell induziert die Bindung von dATP an die Spezifitäts-Bindungsstelle die Reduktion von CDP und UDP. Durch dGTP wird die Reduktion von ADP induziert, durch Bindung von dTTP wird vorwiegend GDP reduziert (BROWN & REICHARD, 1969; JORDAN & REICHARD, 1998). Die Übereinstimmung der Regulationsmechanismen bei allen Reduktasen ist durchaus bemerkenswert, da sich die Primärstrukturen der einzelnen Enzyme durchaus unterscheiden und dennoch vergleichbare minimale Konformationsänderungen der Substratbindungsstelle Grundlage dieser Regulation sind.



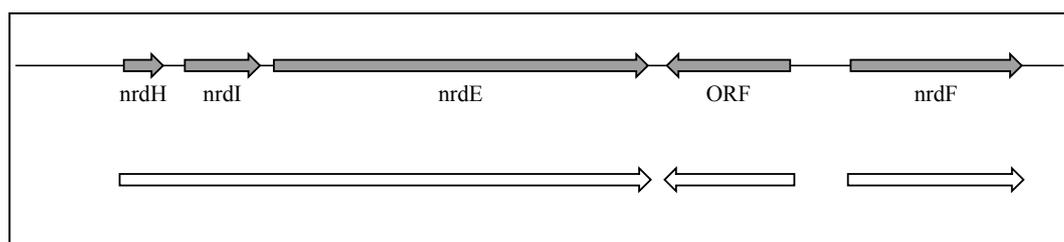
**Abb. 1.5:** Kristallstruktur des R1E-Dimers aus *Salmonella typhimurium* (UPPSTEN et al., 2003)

Aus der Kristallstruktur des R1E-Dimers von *Salmonella typhimurium* (Abbildung 1.5) geht hervor, wie der allosterische Effektor dATP und das Substrat CDP (in grün gezeichnet) in der Dimerstruktur gebunden werden. Bemerkenswert an dieser Struktur ist die Tatsache, dass die Effektorbindungsstelle, die im Falle der Klasse Ib-Enzyme auch die Gesamtaktivität steuert, erst durch die Bildung des Dimers entsteht.



**Abb. 1.6:** Modell des R2F-Dimers aus *C. ammoniagenes* nach Expression in *E. coli* (HÖGBOM et al., 2002)

Eine Besonderheit des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* ist die  $\alpha$ 0-Helix am *N*-Terminus, die sich bei der Bildung des R2F-Dimers wie eine Klammer um das zweite Monomer herumlegt (s. Abb. 1.6). Ungewöhnlich ist auch die Organisation der Ribonucleotid-Reduktase-Gene in *C. ammoniagenes*. Der überwiegende Teil der Organismen mit Reduktasen der *nrdEF*-Familie weist diese Gene in der Form *nrdH* – *nrdI* – *nrdE* – *nrdF* auf. Ihre Transkription erfolgt auf einem RNA-Strang. Nur bei einigen Organismen fehlt das *nrdH*-Gen (TORRENTS et al., 2003). Einige Vertreter der Familie der Mycobacteriaceae, u. a. *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium glutamicum*, weisen einen bedeutenden Abstand (1171 bp in *C. ammoniagenes* und sogar 3100 bp in *C. glutamicum*) zwischen *nrdHIE* und *nrdF* auf (OEHLMANN & AULING, 1999). Für den in dieser Zwischenregion befindlichen *open reading frame* weisen nur *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* Sequenzhomologien untereinander auf. Homologien zu bekannten Proteinen konnten bisher nicht gefunden werden (TORRENTS et al., 2003).



**Abb. 1.7:** Der *nrd*-Gencluster von *C. ammoniagenes* (geschlossene Pfeile) mit den vermutlichen RNA-Transkripten (offene Pfeile) nach TORRENTS et al., 2003

Besonderes Interesse verdient ebenfalls das *NrdI*-Protein, das für das Zellwachstum essentiell zu sein scheint. Seine Funktion liegt bisher völlig im Dunklen (TORRENTS et al., 2003).

## 1.4 Biosynthese von Metalloproteinen

Grundsätzlich können Metalloproteine in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Metalloproteine, bei denen der Metallocofaktor durch Koordination mit den funktionellen Gruppen der Polypeptid-Kette gebunden wird. Bei diesen Metalloproteinen gelingt in vielen Fällen ein Metalleinbau *in vitro* ohne einen katalytischen Mechanismus. Hierbei verläuft der Metalleinbau allerdings sehr langsam und teilweise ohne ausgeprägte Selektivität (MERCHANT & DREYFUSS, 1999). *In vivo* ist bei denselben Enzymen hingegen auch in Gegenwart erheblich höherer Konzentrationen anderer Ionen eine bemerkenswerte Selektivität des Metalleinbaus feststellbar. Dies lässt darauf schließen, dass dafür spezifische

---

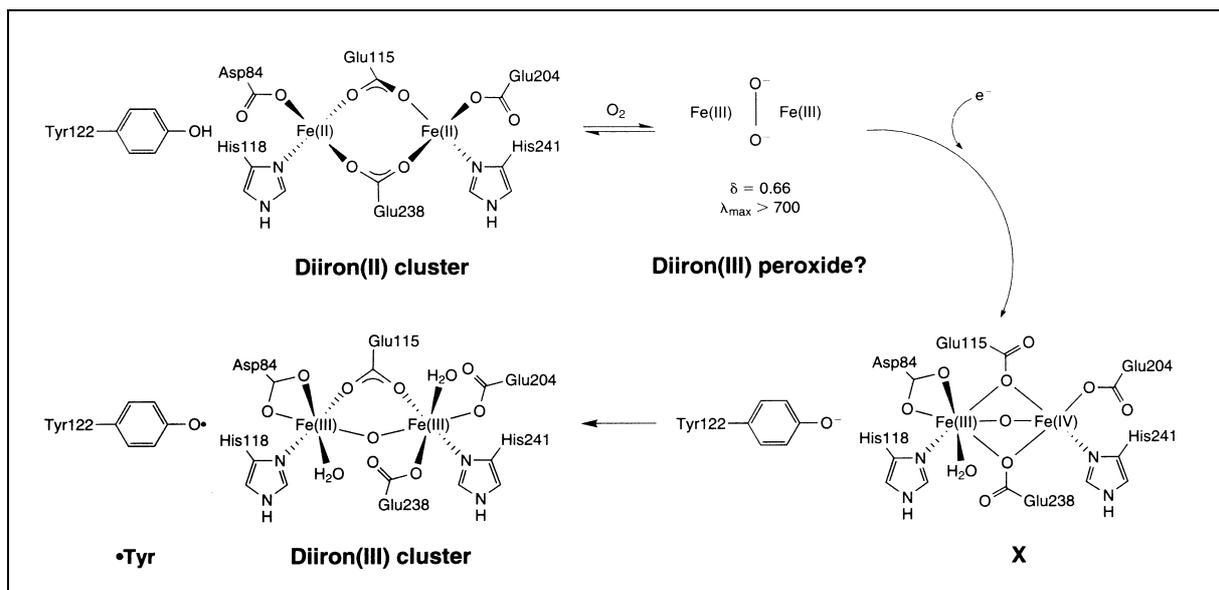
Transportmechanismen zur Verfügung stehen müssen, wie etwa die Bindung an spezifische „Metall-Chaperone“ (ZUMFT et al., 1990; CHEN et al., 1993; LEE et al., 1993; MAIER et al., 1995).

Eine weitere Gruppe von Metalloproteinen verfügt über anorganische Metallcluster, deren Synthese getrennt von der Synthese der Polypeptidkette erfolgt. Substrate für den Aufbau des Clusters müssen gezielt bereitgestellt werden. Dazu gehört auch die Mobilisierung und Reduktion gespeicherten Eisens und die Desulfurylierung von Cystein für den Aufbau eines Fe-S-Clusters (DEAN et al., 1993; FLINT, 1996; ZHENG et al., 1993). Zusätzlich kann für den Aufbau des Clusters die Aktivität eines Gerüstproteins nötig sein, wie für den Aufbau des FeMo-Cofaktors von Nitrogenasen gezeigt wurde. Dieser Cofaktor wird in einem Gerüstprotein aufgebaut und anschließend in das aktive Zentrum des Proteins transportiert (DEAN, 1993). Im Fall einer kovalenten Bindung des Cofaktors im Enzym ist eine enzymatische Verknüpfung des Clusters mit dem Apo-Protein nötig (TANIUCHI et al., 1983).

Die Metalloenzyme der dritten Gruppe haben einen organischen Cofaktor. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise die Cytochrome. Bei diesen Enzymen wird der Cofaktor generell getrennt synthetisiert und dann in der Zelle für den Einbau in verschiedene Enzyme transportiert. Hierzu sind in der Regel spezifische Transporter nötig, d. h. *carrier*-Proteine oder Cofaktor-Chaperone analog zu den Metall-Chaperonen (MERCHANT & DREYFUSS, 1999). Nicht selten wird der Cofaktor noch unmittelbar vor dem Einbau modifiziert (z. B. durch Reduktion), um die für den Einbau passenden Eigenschaften zu erhalten (NICHOLSON et al., 1989).

Die Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I gehören zur ersten Gruppe der Metalloenzyme, da bei ihnen *in vitro* Einbau von Eisen in das Enzym möglich ist. Dabei wird die  $\mu$ -oxo-Brücke durch nachfolgende Oxidation gebildet (s. Abb. 1.8).

---



**Abb. 1.8:** Schema der Radikal-Generierung in der Fe-RNR aus *E. coli* (STUBBE et al., 1998/c)

Für die RNR der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde jedoch ein zusätzliches Protein identifiziert, das aller Wahrscheinlichkeit nach als Chaperon-Protein für die Bereitstellung von Eisen für den Aufbau der Fe-RNR dient (STUBBE, 2003). Es handelt sich dabei um eine zweite Form des R2-Proteins, dem drei der konservierten Eisen-Liganden fehlen, die sonst in nahezu allen R2-Sequenzen zu finden sind (HUANG et al., 1999). Dieses Protein ist für die Generierung des Tyrosyl-Radikals notwendig (GE et al., 2001) und besitzt möglicherweise auch eine Funktion für die Faltung der radikaltragenden R2-Untereinheit (CHABES et al., 2000). Vergleichbare Systeme sind auch in anderen Organismen denkbar, wie der spezifische Metalleinbau in die RNR aus *C. ammoniagenes* andeutet. Ergebnisse früherer Arbeiten zeigten, dass in *C. ammoniagenes* unter Mangan-Mangel nicht etwa eine Fe-RNR gebildet wurde, sondern die Ribonucleotid-Reduktion gehemmt wurde und diese nur durch Zugabe von Mangan zum Fermentationsmedium wieder hergestellt werden konnte (AULING et al., 1980). Dies weist darauf hin, dass der Metalleinbau in die Ribonucleotid-Reduktase auch in *C. ammoniagenes* nicht allein auf der Spezifität der Metallbindungsstelle für bestimmte Metall-Ionen beruht, sondern aktiv gesteuert wird. Untersuchungen zufolge sind sowohl die Spezifitäten von  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  für funktionelle Gruppen der Metallbindungsstelle (MERCHANT & DREYFUSS, 1998), als auch die Ionenradien beider Spezies in etwa gleich (WEATHERBURN, 2001) und bieten daher keine Begründung für die beobachtete Selektivität. Spezifischer Mangantransport in *C. ammoniagenes* wurde bereits nachgewiesen (SCHMID & AULING 1987), Hinweise auf Transportmechanismen für Mangan liegen auch für weitere

---

Organismen vor, unter anderen *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Corynebacterium diphtheriae* (QUE & HELMANN, 2000).

Die abweichenden Ergebnisse der Charakterisierung des NrdF-Proteins aus *C. ammoniagenes* nach Präparation aus dem Wildtyp und nach heterologer Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli* (s. Kap. 1.1) und vergleichbare Beispiele legen nahe, dass Chaperon-ähnliche Systeme im Originalstamm existieren, die dem zur Expression genutzten Organismus fehlen. So wurde bei einem erheblichen Teil des Kupferproteins Azurin aus *Pseudomonas aeruginosa* bei Expression in *E. coli* Zink anstelle von Kupfer in die Metallbindungsstelle (NAR et al., 1992) eingebaut.

## 1.5 Zielsetzung

Durch WILLING (1986), BLASCZYK (1994) und GRIEPENBURG (1998) war die RNR aus *C. ammoniagenes* ATCC 6872 als Mangan-Enzym charakterisiert worden. Diese Ergebnisse wurden zunächst durch die Gruppe um B. Sjöberg zunächst bestätigt (FIESCHI et al., 1998), nach heterologer Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli* jedoch wieder angezweifelt (HUQUE et al., 2000) und schließlich zurückgewiesen (HÖGBOM et al., 2002). Die dafür vorgelegten Ergebnisse konnten jedoch nicht erklären, warum gerade der Mangel an Mangan bei *C. ammoniagenes* alle Anzeichen der gehemmten Ribonucleotid-Reduktion hervorruft und warum dieser Organismus unempfindlich gegenüber Eisenmangel ist (AULING et al., 1980). Da bereits die Expression von Genen für Metalloproteine aus anderen Organismen in *E. coli* nicht zum korrekten Ergebnis geführt hatte (KENNEDY et al., 1998), stellte sich die Frage, ob der veränderte Metalleinbau durch den anderen biologischen Hintergrund bei der heterologen Expression hervorgerufen worden sein könnte.

Die homologe Überproduktion des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* im Originalstamm stellte daher eine alternative Möglichkeit dar, eine möglichst zutreffende Aussage über die natürliche Struktur dieses Proteins treffen zu können. Aufgabenstellung dieser Arbeit war es daher, durch Etablierung einer homologen Überproduktion des R2F-Proteins in *C. ammoniagenes* und einer verbesserten Aufreinigung des Enzyms möglichst weitreichende spektroskopische Untersuchungen durchzuführen, um eine verlässliche Aussage über die Natur des Metallocofaktors der Ribonucleotid-Reduktase im originalen biologischen Hintergrund treffen zu können. Dazu sollten vorrangig Methoden der UV/VIS- und ESR-Spektroskopie herangezogen werden, wobei eine über die Vorarbeiten hinausgehende Aufreinigung des Enzyms angestrebt wurde.

---

Mit dem Stamm *C. ammoniagenes* pWCAX, hervorgegangen aus genetischen Arbeiten mit *C. ammoniagenes* ATCC 6872 (OEHLMANN, 1998) durch nachfolgende Subklonierung (W. Oehlmann, persönliche Mitteilung) stand bereits ein überproduzierender Stamm zur Verfügung. Dieser sollte zunächst verwendet und auf Tauglichkeit zur Erlangung der gesetzten Ziele überprüft werden. Nötigenfalls sollte eine erneute Klonierung des *nrdF*-Gens durchgeführt werden.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Isotope

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

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

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

### 2.2 Bakterienstämme und Plasmide

<i>E. coli</i> XL1		Stammsammlung IFMB
<i>E. coli</i> Top 10F <sup>7</sup>		Invitrogen
<i>E. coli</i> pTOPOIII_1		diese Arbeit
<i>E. coli</i> pOCA2		diese Arbeit
<i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6872		Stammsammlung IFMB
<i>C. ammoniagenes</i> pWCAX		OEHLMAN, 1998
<i>C. ammoniagenes</i> pOCA2		diese Arbeit
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032		Stammsammlung IFMB
<i>C. glutamicum</i> pOCA2		diese Arbeit
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>		Invitrogen
pTOPOIII_1	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> mit <i>nrdF</i> -PCR-Amplifikat (Primer OB1 und OB3) aus <i>C. ammoniagenes</i>	diese Arbeit
pEKEX2		EIKMANNS et al., 1991

pWCAX		OEHLMANN, 1998
pXMJ19		JACOBY et al., 1999
pOCA2	pXMJ19 mit XbaI / EcoRI-Fragment aus pTOPOIII_1	diese Arbeit

### 2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Abkürzung	Komponenten	Zusammensetzung oder Endkonzentration
TAE, 50fach konz.	Tris-Base Eisessig EDTA 0,5 M, pH 8,0	242 g/L 51,1 mL/L 100 mL/L
TBS (tris buffered saline)	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl	100 mM 150 mM
SSC (20fach)	NaCl Na <sub>3</sub> -Citrat pH 7,5 einstellen	3,0 M 0,3 M
GLB	Glycerin TAE Bromphenolblau Xylencyanolblau	50% 0,5fach 0,25% 0,25%
I-Puffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	16,0 g 3,20 g 0,12 g
85 mM Standardpuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O DTT pH 6,6 ergibt sich aus der Mischung der Phosphate	7,09 g/L 7,51 g/L 2,0 mM

---

20 mM Standardpuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,67 g/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,77 g/L
	DTT	2,0 mM
	pH 6,6 ergibt sich aus der Mischung der Phosphate	

## 2.4 Wachstumsmedien

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

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

D-Glucose Monohydrat	20,0 g/L
Pepton aus Casein	10,0 g/L
Hefe-Extrakt (Difco)	10,0 g/L
NaCl	2,5 g/L
pH	7,4 (mit 3 N NaOH einstellen)

Nach dem Autoklavieren sollte das Medium eine goldgelbe Farbe besitzen.

### 2.4.2 Luria Bertani (LB)-Medium (MILLER, 1972)

Bacto-Trypton	10,0 g/L
Hefe-Extrakt	5,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
pH	7,4 (mit 2 N NaOH einstellen)

### 2.4.3 LBG-Medium

Bacto-Trypton	10 g/L
Hefe-Extrakt	5,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Glucose	1,0 g/L
pH	7,4 (mit 2 N NaOH einstellen)

---

#### 2.4.4 SOC-Regenerationsmedium (DOWER et al., 1988)

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

#### 2.4.5 Brain-Heart-Infusion-Medium mit Sorbitol (BHIS)

Brain-Heart-Infusion (Difco)	37,0 g
Sorbitol	93,0 g

Beide Substanzen wurden in 0,5 L Wasser gelöst und anschließend getrennt autoklaviert. Danach wurden die Lösungen vereinigt und 10,0 mL/L MgSO<sub>4</sub> hinzugefügt.

#### 2.4.6 LB-HIS Platten

Trypton	5,0 g
NaCl	5,0 g
Yeast Extract	2,5 g
Brain-Heart-Infusion (Difco)	18,5 g
Agar	15,0 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 mL, pH 7,5 einstellen

Sorbitol 0,5 M (91 g / 500 mL)

Beide Lösungen werden getrennt autoklaviert und kurz vor dem Gießen der Platten gemischt.

Antibiotika : Kan 15 µg/ml oder Cm 5 µg/ml

### 2.5 Antibiotikazusatz

Wenn nicht gesondert angegeben, wurden Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen den entsprechenden Medien zugefügt: Ampicillin (Amp) 100 mg/L, Chloramphenicol (Cm) 15 mg/L, Tetracyclin (Tet) 10 mg/L (Stammlösungen jeweils in Ethanol), Kanamycin (Km) 50 mg/L (Stammlösung in Wasser, steril filtriert).

## 2.6 Messung von pH-Wert und optischer Dichte

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

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

## 2.7 Anzuchtverfahren

### 2.7.1 Anzucht von coryneformen Bakterien

#### 2.7.1.1 Anzucht von Vorkulturen

Vorkulturen der coryneformen Bakterien wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben in 100 mL Seed-Medium bei 30°C im Brutraum bei 120 rpm auf einem Rundschtüttler über Nacht inkubiert.

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

Für die Produktion von Biomasse zur Gewinnung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* wurden Zellen aus einer ÜNK in mehrere 500 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Seed-Medium mit einer OD<sub>578</sub> von 0,5 angeimpft und unter Schütteln mit 150 rpm bei 30 °C 10 – 12 h inkubiert, so dass sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befanden. Dann erfolgte das Überimpfen in einen Fermenter des Typs Biostat V (Braun, Melsungen) in 10 L Seed-Medium mit einer OD<sub>578</sub> von 0,5. Bei 30 °C, 250 rpm Rührerdrehzahl und einer Belüftungsrate von 4 L/min wurden Zellen von *C. ammoniagenes* bis zu einer OD<sub>578</sub> von 15 und Zellen von *C. glutamicum* bis zu einer OD<sub>578</sub> von 10 herangezogen, mit jeweils höchster Aktivität der Ribonucleotidreduktase.

### 2.7.2 Anzucht von *C. ammoniagenes* pWCAX

#### 2.7.2.1 Anzucht von Vorkulturen

Vorkulturen von *C. ammoniagenes* pWCAX erfolgten im 500 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium mit 50 mg/L Kanamycin auf dem Rundschtüttler bei 30 °C und 120 rpm. Die erste Vorkultur wurde am Tage für 8 h herangezogen, dann wurden je 10 mL dieser ersten Vorkultur in 10 Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium mit 50 mg/L Kanamycin

---

überimpft und über Nacht herangezogen. Diese zweite Vorkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur im 10 L Fermenter verwendet.

### 2.7.2.2 Anzucht im 10 L-Fermenter

Für die Produktion von Biomasse zur Gewinnung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* pWCAX wurde die Hauptkultur mit der zweiten ÜNK in einem Fermenter des Typs Biostat V (Braun, Melsungen) auf 10 L LB-Medium mit 50 mg/L Kanamycin mit einer  $OD_{578} \approx 1$  angeimpft. Bei 30 °C, 250 rpm Rührerdrehzahl und einer Belüftungsrate von 4 L/min wurde die Kultur bis zum Erreichen der spätexponentiellen Phase herangezogen (was in der Regel nach 5 h der Fall war) und dann 2,38 g IPTG zur Induktion der Überproduktion der RNR zugegeben. Nach weiteren 1,5 h wurden die Zellen geerntet.

## 2.7.3 **Anzucht von *C. ammoniagenes* pOCA2**

### 2.7.3.1 Anzucht von Vorkulturen

Die erste Vorkultur von *C. ammoniagenes* pOCA2 wurde im 100 mL Erlenmeyerkolben mit 20 mL LB-Medium mit 15 mg/L Chloramphenicol vom Schrägröhrchen angeimpft und auf dem Rundschüttler bei 30 °C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Je 10 mL dieser ersten Vorkultur wurden in zwei 500 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium mit 15 mg/L Chloramphenicol überimpft und für 12 h auf dem Rundschüttler inkubiert. Diese zweite Vorkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur im 10 L-Fermenter verwendet.

### 2.7.3.2 Anzucht im 10 L-Fermenter

Die Anzucht von *C. ammoniagenes* pOCA2 zur Produktion der kleinen Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase erfolgte in einem Fermenter des Typs Biostat V (Braun, Melsungen) auf 10 L LB-Medium mit 15 mg/L Chloramphenicol. Die Kultur wurde aus der zweiten Vorkultur mit einer  $OD_{578} \approx 0,1$  angeimpft. Bei 30 °C, 310 rpm Rührerdrehzahl und einer Belüftungsrate von 8 L/min wurden die Zellen bis zum Erreichen der mittelexponentiellen Phase herangezogen (in der Regel 10,5 h) und dann mit 10 mg Thiamin-HCl und 1 mg Biotin versetzt. Nach weiteren 0,5 h wurden 1,5 g IPTG und 30 mg  $MnCl_2 \times 2 H_2O$  zur Induktion der Überproduktion der RNR zugegeben. Nach weiteren 5 h wurden die Zellen geerntet.

---

#### 2.7.4 Anzucht von *C. glutamicum* pOCA2

Vorkulturen von *C. ammoniagenes* pOCA2 wurden im 100 mL Erlenmeyerkolben mit 20 mL LB-Medium mit 15 mg/L Chloramphenicol vom Schrägröhrchen angeimpft und auf dem Rundschtüttler bei 30 °C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Je 10 mL dieser ersten Vorkultur wurden in zwei 500 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium mit 15 mg/L Chloramphenicol überimpft und für 12 h auf dem Rundschtüttler inkubiert. Diese zweite Vorkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur in 500 mL Erlenmeyerkolben verwendet. Für Versuche zur Expression von *nrdF* wurde die Hauptkultur mit  $OD_{578} = 0,1$  angeimpft und nach Erreichen von  $OD_{578} = 7,0$  mit 0,6 mM IPTG induziert. Nach 5 h Inkubation auf dem Rundschtüttler wurden die Zellen geerntet.

#### 2.7.5 Anzucht von *E. coli*

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

Abweichungen sind im Text gesondert beschrieben.

##### 2.7.5.1 Anzucht von *E. coli* pOCA2

Für Versuche zur Expression von *nrdF* aus *C. ammoniagenes* in *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen von *E. coli* XL1 (nach  $CaCl_2$ -Methode, s. Kap. 2.20.9.2) frisch mit dem Plasmid pOCA2 transformiert und auf Agarplatten mit LB-Medium + 15 mg/L Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vorkulturen von *E. coli* pOCA2 wurden im 100 mL Erlenmeyerkolben mit 20 mL LB-Medium mit 15 mg/L Chloramphenicol von Agarplatte angeimpft und auf dem Rundschtüttler bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Je 10 mL dieser ersten Vorkultur wurden in zwei 500 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL mit 15 mg/L Chloramphenicol versetztem LB-Medium überimpft und für 12 h auf dem Rundschtüttler inkubiert. Diese zweite Vorkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur in 500 mL Erlenmeyerkolben verwendet. Für Versuche zur Expression von *nrdF* wurde die Hauptkultur mit  $OD_{578} = 0,1$  angeimpft und nach Erreichen von  $OD_{578} = 0,5$  mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4,5 h Inkubation auf dem Rundschtüttler wurden die Zellen geerntet.

## 2.8 Zellernte

Die Zellernte erfolgte, indem der Fermenterinhalt unter ständigem Rühren auf Eisgranulat gegeben wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Cryofuge 6-6 (Heraeus Christ GmbH, Osterode) bei 3000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde dann in 85 mM Standardpuffer resuspendiert und zum Waschen in einer Kühlzentrifuge des Typs Heraeus Cryofuge 5000 (Heraeus Christ GmbH, Osterode) bei 5000 rpm erneut sedimentiert. Zur Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

## 2.9 Zellaufschluss

Alle Arbeiten mit der sehr temperaturempfindlichen Mn-RNR wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt.

Der Zellaufschluss wurde mit frischen oder aufgetauten Zellen durchgeführt, die in 1,5 ml Standardpuffer pro 1 g Zellen suspendiert waren. So vorbereitet und im NaCl/Eiswasserbad auf 2 °C gekühlt, wurde das Material durch Schütteln in einem 50 mL-Falcon-Tube auf dem Reagenzglasschüttler homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend in einer auf 4 °C vorgekühlten French Press (French Pressure Cell Press mit 20 K Manual-Fill Cell, SLM Instruments Inc., Urbana, Il., USA) bei einem Kammerinnendruck von 1500 – 1800 psi aufgebrochen. Es wurden je zwei Passagen durchgeführt, um eine optimale Ausbeute an aktivem Protein zu erreichen. Bei der gesamten Prozedur war streng darauf zu achten, dass die Temperatur der Zellsuspension nach der French Press-Passage schnellstmöglich auf unter 4 °C abgekühlt wurde. Zwischen den Passagen wurde die French Press Zelle mit flüssigem Stickstoff gekühlt, um die Erwärmung der Zellsuspension so gering wie möglich zu halten.

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellreste durch 30-minütige Zentrifugation in der Heraeus Cryofuge 5000 (Heraeus-Christ GmbH, Osterode) bei 5000 rpm und 4 °C abgetrennt. Der zellfreie Überstand wurde als Rohextrakt für die weitere Proteinreinigung verwendet.

## 2.10 Proteinreinigung

Da die Ribonucleotid-Reduktase im Proteinrohextrakt und in teilgereinigten Fraktionen mit einer Halbwertszeit von 1,5 Stunden bei Raumtemperatur sehr empfindlich war, wurden sämtliche Schritte bei 4°C im Kühlraum oder im Eisbad durchgeführt. Zur Aufbewahrung wurden die Proteinlösungen immer in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

## 2.10.1 Fällungen

### 2.10.1.1 Ammoniumsulfatfällung

Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung in den Bereichen 0-40% und 40-60% Sättigung durchgeführt (COOPER, 1981). Dabei erfolgte die Salzzugabe über einen Zeitraum von 30 min, worauf sich eine ebenso lange Nachrührphase anschloss. Nach jedem Fällungsschritt wurde die Proteinlösung 30 Minuten bei 40000 x g und 4 °C zentrifugiert. Da sich die Ribonucleotid-Reduktase in der 40-60% Fraktion befand, wurde das Pellet dieser Fällung je nach Masse der aufgeschlossenen Zellen in 2-4 mL Standardpuffer gelöst und zweimal eine Stunde gegen Standardpuffer bei 4°C dialysiert. Alternativ wurde die Entsalzung der Proben für die Chromatographie an UNOsphere-Q an HiTrap Entsalzungssäulen (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

Zur Aufkonzentrierung der reduktasehaltigen Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie an UNOsphere-Q wurde eine analoge Ammoniumsulfatfällung im Bereich 0 - 70% durchgeführt.

## 2.10.2 Chromatographische Methoden

Alle chromatographischen Methoden wurden mit einem FPLC-System von Pharmacia LKB (Pharmacia Biotech, Freiburg) und einer BioLogic HR-Workstation (BIO-RAD Inc., Hercules, CA, USA) durchgeführt.

Das FPLC-System bestand aus dem Steuergerät (Gradient Programmer GP-250 Plus), zwei Pumpen (High Precision P-500), einem Aufgabeventil (V 7), einer UV-Zelle (Uvicord<sup>®</sup> SII), einem Leitfähigkeitsdetektor, einem Fraktionssammler (FRAC-100) und einem REC-481-Schreiber ( Kipp-Zonen).

Die BioLogic HR Workstation bestand aus einem BioLogic HR System mit UV- und Leitfähigkeitsdetektion, einem SV5-4 Select Valve zur Laufmittelwahl und einem Fraktionssammler Mod. 2128. UV-Detektion erfolgte bei 280 nm.

### 2.10.2.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurden Proteinlösungen nach Ammoniumsulfatfällung verwendet, die direkt auf die Säule gegeben wurden. Im Verlauf der Proteintrennung wurde die Ammoniumsulfatkonzentration des Laufpuffers von 1,7 M auf 0 M abgesenkt. Die unter dem Einfluss der hohen Salzkonzentration an die Säulenmatrix gebundenen Proteine wurden so nach erfolgter Rehydrierung von der Säule gewaschen.

Bei der Verwendung einer analytischen Säule mit Phenylsuperose (Pharmacia) als Säulenmatrix wurden maximal 5 mg Protein bei einer Flussrate von 0,25 mL/min in 1 mL-Fraktionen aufgefangen. Die Anwendung des Salzgradienten erfolgte über ein Elutionsvolumen von 12 mL.

Bei Verwendung einer präparativen Säule mit 20 mL Phenylsepharose (Pharmacia) als Säulenmatrix konnten 100 mg Protein aufgetragen werden. Bei einer Flussrate von 2,0 mL/min wurden 10 mL-Fraktionen gesammelt. Der Salzgradient wurde nach folgendem Schema angelegt:

20 mL	100% Puffer A
250 mL	100% Puffer A → 100% Puffer B
50 mL	100% Puffer B

Fraktionen á 10 mL von 10 – 300 mL

Puffer A: 85 mM KPP pH 6,6 + 2 mM DTT + 1,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Puffer B: 85 mM KPP pH 6,6 + 2 mM DTT

#### 2.10.2.2 Anionenaustausch-Chromatographie an UNOsphere-Q

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine Glassäule vom Typ XK 16 von Pharmacia (Pharmacia, Freiburg) verwendet, die einen Innendurchmesser von 16 mm aufwies. Die Säule wurde mit 25 mL des Anionenaustausch-Materials UNOsphere-Q von BIO-RAD (Hercules, CA, USA) befüllt, so dass die fertig gepackte Säule eine Betthöhe von 12 cm hatte.

Das Proteinmaterial der Ammoniumsulfatfällung wurde in Aliquots von 3 mL über HiTrap Säulchen entsalzt. Anschließend wurden Aliquots von 10 ml mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die UNOsphere<sup>®</sup>Q-Säule aufgetragen und zur Anreicherung der Ribonucleotid-Reduktase ein dreistufiger Salzgradient mit KCl angelegt, in dem von reinem Puffer A über 20% und 35% auf 100% Puffer B umgestellt wurde. Dabei trat die Elution der Ribonucleotid-Reduktase in der 35%-Stufe ein. Es wurden in dieser Stufe 6 mL-Fraktionen aufgefangen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert (Cooper, 1981). Hierzu wurde durch Zugabe kristallinen Ammoniumsulfats dessen Konzentration auf 70% der Sättigungsgrenze eingestellt. Es wurde 30 min nachgerührt, bei 40000 x g abzentrifugiert und das Pellet in wenig Standardpuffer aufgenommen und eingefroren.

Folgender Gradient wurde für die Reinigung angewendet:

10 mL Probenaufgabe mit 100 % Puffer A

70 mL 100% Puffer A

80 mL 85% Puffer A, 20 % Puffer B

80 mL 65% Puffer A, 35 % Puffer B

80 mL 100% Puffer B

80 mL 100% Puffer A

Flussrate 5,0 mL/min

Fraktionen á 6 mL von 10 bis 16, 90 bis 108, 126 bis 144 und 160 bis 268 mL

Puffer A: 85 mM KPP pH 6,6 + 2 mM DTT + 2 mM MgAc<sub>2</sub>

Puffer B: Puffer A + 1,0 M KCl

### 2.10.2.3 Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex 200

Für die Gelfiltrations-Chromatographie wurde eine fertig gepackte HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säule von Pharmacia verwendet, die bei einem Säuleninnendurchmesser von 16 mm und einer Gelbetthöhe von 60 cm ein Volumen von 120 mL hatte.

Das resuspendierte Proteinmaterial der Ammoniumsulfatfällung nach Reinigung durch Anionen-Austauschchromatographie wurde nach Auftauen in 1 ml Aliquots auf die Gelfiltrationssäule gegeben. Die Probenaufgabe erfolgte mit einer Flussrate von 0,75 mL/min, die Elution erfolgte bei 1,0 ml/min. Es wurden 29 Fraktionen á 2 ml von 42 bis 100 ml Elutionsvolumen aufgefangen.

Puffer: 85 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,6 + 2 mM DTT (Standardpuffer)

### 2.10.2.4 Anionenaustausch-Chromatographie an Mono Q

Die Anionenaustausch-Chromatographie an Mono Q wurde mit einer Mono Q HR 5/5-Säule von Pharmacia (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine fertig gepackte Säule mit einem Volumen von 1 mL.

Die zum Pool B vereinigten Fraktionen der Gelfiltration an Superdex 200 (vier Fraktionen á 2 mL) wurden 2 h gegen 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 2 mM DTT dialysiert und über eine 8 mL Probenschleife mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Mono Q-Säule gegeben. Im Bereich des KCl-Gradienten von 10 bis 30 mL wurden 30 Fraktionen á 0,67 mL aufgefangen.

Folgender Gradient wurde angelegt:

10 mL 100 % Puffer A

20 mL 70 % Puffer A → 100 % Puffer B

5 mL Puffer B

10 mL Puffer A

Flussrate: 1,0 mL/min

Fraktionen á 0,67 mL von 10 bis 30 mL

Puffer A: 50 mM Tris-HCl mit pH 7,5 + 2 mM DTT

Puffer B: A + 1,0 M KCl

#### 2.10.2.5 Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose 4B

Durch die stereochemisch kontrollierte Reaktion zwischen den immobilisierten Liganden der Säulenmatrix (mit N<sup>6</sup>-(6-Aminoethyl)adenosin-2',5'-bisphosphat als gruppenspezifischem Liganden) und der Nucleotid-Bindungsstelle des R1E-Proteins kommt es zur Bindungsknüpfung. Aufgrund der leichten Dissoziierbarkeit des Mn-RNR-Holoenzym lässt sich das R2F-Protein im Pufferstrom vom R1E-Protein trennen. Durch Reaktion mit dem allosterischen Effektor dATP, dessen Affinität zum gruppenspezifischen Liganden sehr hoch ist, kommt es durch eine einfache Konkurrenzreaktion zum spezifischen Ablösen des R1E-Proteins von der Säulenmatrix.

Für die Affinitätschromatographie wurde Zellextrakt aus *C. ammoniagenes* nach Streptomycin- und Ammoniumsulfatfällung durch Dialyse auf 20 mM Phosphatpuffer umgepuffert. Es wurden 200 mg Gesamtprotein auf die Säule gegeben. Die Aufgabe erfolgte mit einer Flussrate von 0,17 mL/min und der Fluss wurde für 30 min gestoppt, nachdem das Protein vollständig auf die Säule geladen war. Anschließend wurde das R2F-Protein enthaltende unspezifische Eluat von der Säule gewaschen, bis kein Protein mehr detektiert werden konnte. Danach wurde die Säule mit einem Säulenvolumen 20 mM KP-Puffer mit 0,05 M NaCl gewaschen und wieder mit 20 mM Standardpuffer solange nachgespült, bis kein Protein mehr detektiert werden konnte, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu lösen. Für die spezifische Elution des R1E-Proteins wurde 20 mM KP-Puffer mit 1 mM dATP verwendet, von dem ein Säulenvolumen auf die Säule gegeben wurde. Nach einem erneuten Elutionsstopp für 30 min wurde das R1E-Protein mit 20 mM KP-Puffer von der Säule gewaschen. Damit ergab sich folgender Gradient für diese Chromatographie:

5 mL Probenaufgabe

30 min Elutionsstopp

20 mL Puffer A

20 mL Puffer B2

20 mL Puffer A  
10 mL Puffer B3  
30 min Elutionsstop  
60 mL Puffer A

Puffer A: 20 mM KPP, pH 6,6 + 2 mM DTT

Puffer B2: A + 50 mM NaCl

Puffer B3: A + 1 mM dATP

Das spezifische Eluat wurde aufgefangen und nach Aufkonzentrieren mit Centricon-Einheiten (Millipore, Bedford, MA, USA) für die biochemische Komplementation im Enzymassay verwendet.

Nach jedem Lauf wurde die Affinitätssäule regeneriert, indem jeweils mindestens 10 Säulenvolumina der Lösungen A und B mit einer Flussrate von maximal 0,2 mL/min über das Affinitätsmaterial gegeben und die Säule anschließend zur Lagerung mit 20% Ethanol äquilibriert.

Puffer A: 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M NaCl

Puffer B: 0,1 M NaAc pH 4,5; 0,5 M NaCl

## **2.11 Dialyse und Proteinkonzentrierung**

Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche (Visking 20/32, Ø 16 mm) der Firma Serva (Heidelberg) verwendet. In diesen wurden die Proteinlösungen in der Regel 2 x 1 h gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

Nach der Affinitätschromatographie wurde die aufgefangene Proteinlösung in Ultrafiltrationseinheiten für die Zentrifuge (CentriCon) der Firma Millipore (Bedford, MA, USA) mit einem Ausschlussgewicht von 30 kDa auf 10% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Durch waschen mit 85 mM Standardpuffer konnten die Proben gleichzeitig auch umgepuffert werden.

Die Proben der Gelfiltration und der Anionenaustausch-Chromatographie an Mono Q wurden in Ultrafiltrationseinheiten (Minicon) von Millipore mit einer Ausschlussgröße von 1000 kDa aufkonzentriert. Diese Einheiten ermöglichen eine besonders schnelle und schonende Aufkonzentrierung der Proben, da dieses Verfahren rein auf Schwerkraft beruht und damit

---

---

schädliche Scherkräfte wie bei Zentrifugationsmethoden oder in einer Amicon-Zelle auftreten. Diese Methode eignet sich jedoch nur für Volumina von wenigen mL und ermöglicht keinen Pufferwechsel.

Für die Aufkonzentrierung der Proben nach Ionenaustausch-Chromatographie an UNOsphere-Q wurde eine Ammoniumsulfatfällung im Bereich 0 bis 70% durchgeführt. Das Material konnte dann ohne weitere Vorbereitung für die Gelfiltration verwendet werden.

## 2.12 Proteinbestimmungsmethoden

Für alle Proteinbestimmungen wurde für den entsprechenden Messbereich eine Eichkurve unter Verwendung einer BSA-Standardreihe ermittelt, aus der mittels linearer Regression die gemessenen Proteinwerte ermittelt wurden.

### 2.12.1 Proteinbestimmung ganzer Zellen nach Biuret (HERBERT et al., 1971)

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

Mit dieser Methode konnten Proben mit einer Proteinkonzentration von 0,25 – 3 mg/mL bestimmt werden.

### 2.12.2 Proteinbestimmung zellfreier Extrakte nach BRADFORD (1976)

Zur Bestimmung löslicher Proteine nach Bradford musste folgendes Reagenz hergestellt werden:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) in 50 mL Ethanol lösen

100 mL 85%ige Phosphorsäure zugeben

auf ein Endvolumen von 1 L mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Lösung einen Tag stehen lassen und dann filtrieren

Für die eigentliche Bestimmung wurden 0,1 mL Proteinlösung mit 5 mL Bradford-Reagenz gemischt, 2 min bei RT inkubiert und dann die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die

---

verwendeten Proben sollten eine Proteinkonzentration im Bereich von 0,1 bis 1,0 mg/L haben.

### 2.12.3 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951)

Für die Bestimmung nach Lowry et al. wurden drei Stammlösungen benötigt:

Lösung I: 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 100 mL 0,5 M NaOH

Lösung II: 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  in 100 mL 1% (w/v)  $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Folin-Reagenz (Merck)

10 Teile Lösung I werden mit 1 Teil Lösung II gemischt und davon 0,2 mL zu einem gleichen Volumen der Proteinprobe gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 0,6 mL eines Gemisches aus 1 Teil Folin-Reagenz und 10 Teilen Wasser hinzugefügt und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 540 nm in einem Spektralphotometer Ultrospec III (Pharmacia, Freiburg) bestimmt.

Die zu bestimmenden Proben sollten eine Proteinkonzentration zwischen 50 und 300  $\mu\text{g/mL}$  aufweisen.

## 2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein Minigel-System (Biometra GmbH, Göttingen) mit einer Größe von 80 x 80 x 1 mm (B x H x T) verwendet.

Für ein Trenngel mit 16% Acrylamidgehalt und ein 5%iges Sammelgel wurden folgende Stammlösungen zusammengegeben:

Trenngel:

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	6,0 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 mit 0,4% SDS	3,8 mL
$\text{H}_2\text{O}$	5,1 mL
20% Ammoniumpersulfat	30 $\mu\text{L}$
TEMED	20 $\mu\text{L}$

Mittels Pasteurpipette wurde die Lösung in der Kammer mit Isopropanol überschichtet.

Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde das Isopropanol abgossen und die Lösung für das Sammelgel vorbereitet.

Sammelgel:

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	0,70 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 mit 0,4% SDS	1,25 mL

---

H <sub>2</sub> O	3,00 mL
20% Ammoniumpersulfat	20 µL
TEMED	10 µL

Das Sammelgel wurde genauso hergestellt wie für das Trenngel beschrieben. Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen und der Probenkamm eingesetzt.

Der Elektrophoresepuffer wurde vor jedem Lauf frisch angesetzt und bestand aus folgenden Komponenten:

Laufpuffer:

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

Die Proben von 20 µL Volumen sollten für das Minigel-System eine Proteinkonzentration von 10 mg/L nicht überschreiten. Zu den Proteinproben wurden jeweils 0,5 Volumina eines Probenpuffers gegeben. Dieser Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

1 M Tris-HCl, pH 6,8	3,20 mL
20% SDS	1,00 mL
Glycerin	1,00 mL
β-Mercaptoethanol	20 µL
0,2% Bromphenolblau	50 µL

Die Proben wurden anschließend 5 min gekocht und im Eisbad abgekühlt. Nach Zentrifugation (5 min bei 13000 rpm) wurden jeweils 20 µL der Proben (15 µL Kalibrierstandard) in die Proben tasche gegeben. Zum Größenvergleich wurde ein Proteinstandard von BIO-RAD verwendet.

Zu Beginn der elektrophoretischen Trennung mit dem Minigel wurde eine konstante Stromstärke von 15 mA/Gel eingestellt. Nach Erreichen der Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA/Gel heraufgesetzt. Der Gellauf wurde beendet, wenn die blaue Lauffront des Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.13.1 Färben der Polyacrylamid-Gele

#### 2.13.1.1 Silberfärbung (BLUM et al. 1987)

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

Lösung 1:

---

---

125 mL Methanol  
30 mL Essigsäure  
125  $\mu$ L Formaldehyd 37%  
95 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 2:

125 mL Ethanol  
125 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 3:

75 mL Ethanol  
175 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 4:

50 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (0,2 g/L)  
250 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 5:

500 mg AgNO<sub>3</sub> (2 g/L)  
188  $\mu$ L Formalin 37%  
250 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 6:

15 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 g/L)  
125  $\mu$ L Formalin 37%  
1 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (4,0 g/L)  
250 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 7:

25 mL MeOH  
30 mL HAc  
195 mL H<sub>2</sub>O

Nach dem Gellauf wurde das Gel mindestens eine Stunde in Lösung 1 fixiert, dann 40 min in Lösung 2 und schließlich 20 min in Lösung 3 gewaschen. Hierauf erfolgte eine Inkubation in Lösung 4 für 1 min. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 sec in Wasser geschwenkt. Zum Imprägnieren wurde 20 min in Lösung 5 geschüttelt. Nach Waschen (2 mal 20 sec in Wasser) wurde die Färbung in Lösung 6 so lange entwickelt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren, bevor mit Lösung 7 die Reaktion gestoppt wurde. Vor dem Trocknen des Gels wurde noch 2 mal für 5 min mit Wasser gewaschen.

---

### 2.13.1.2 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Lösung aus 19% Ethanol, 6% Essigsäure und 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) fixiert und gefärbt. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung mit einem Gemisch aus 19% Ethanol und 6% Essigsäure wieder entfernt.

## 2.14 Western-Blot

Der Western-Blot wurde in einer semi-dry Fast-Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel sofort nach dem Elektrophoreselauf in die Blotting-Apparatur gelegt, so dass folgender Aufbau entstand (von der Anode zur Kathode): 3 Lagen Blotting-Papier → Blotting-Membran → SDS-Gel → 3 Lagen Blotting-Papier. Beim Aufeinanderschichten wurde jede Lage sorgfältig mit Transferpuffer getränkt und beim Aufeinanderlegen darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten verbleiben. Als Transferpuffer diente der oben beschriebene Elektrophorese-Puffer unter Zusatz von 20% Methanol. Als Blotting-Membran wurde eine Nitrocellulose-Membran verwendet (Protran von Schleicher & Schuell, Dassel). Der Blot erfolgte bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Membranfläche für 1,5 h.

Für die *N*-terminale Aminosäure-Sequenzierung wurde als Blottingmembran Immobilon P von Millipore (Bedford, MA, USA), eine PVDF-Membran, verwendet. Vor der Verwendung im beschriebenen Blotting-Aufbau wurde die Membran mit reinem Methanol benetzt, da sonst keine Benetzung durch den Transfer-Puffer stattfand. Der Aufbau erfolgte desweiteren wie beschrieben.

Eine Immunfärbung der nachzuweisenden Proteine erfolgte in folgenden Schritten:

- Blockieren der Membran mit TBT-Puffer + 5% Milchpulver (1 h bei 37 °C)
  - Inkubation mit Antiserum, 1:1000 verdünnt in TBT-Puffer + 5% Milchpulver (1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C)
  - Waschen 2 x 30 min in TBT-Puffer bei RT
  - Inkubation mit Antikörper Ziege anti Kaninchen IgG (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) 1:2000 in TBT-Puffer + 5% Milchpulver (1 h bei 37 °C)
  - Waschen 2 x 30 min in TBT-Puffer bei RT
  - Inkubation in Phosphatasepuffer für 5 min
  - Schütteln in 10 mL Färbelösung (35 µL Bromo-chloro-indolyl-phosphat (5% in DMF), 45 µL Nitrosotetrazoliumchlorid Blau (5% in 70% DMF) in Phosphatasepuffer) bis zur ausreichenden Färbung der Proteinbande bei RT
-

- Stoppen der Farbreaktion durch Waschen mit Wasser

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

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

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

## 2.16 Bestimmung der Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität

### 2.16.1 Standard-Test für die Detektion der Mn-RRase-Aktivität

Die gesamte nachfolgende Aktivitätsbestimmung erfolgte aus Sicherheitsgründen in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen Typ „safe lock“. Der Standardradionuklid-Assay (LUO 1994, BLASCYK 1994) zur Bestimmung der Mn-RRase-Aktivität teilgereinigter Proteinfractionen fand in 85 mM Standardpuffer statt und setzte sich wie folgt zusammen:

a) mit CDP als Substrat:

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

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

b) mit GDP als Substrat:

DTT	6 mM
-----	------

---

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

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

Der Test wurde aus bei -20°C gelagerten Stammlösungen jeweils wie folgt frisch zusammenpipettiert:

a) mit CDP als Substrat:

120 mM DTT	5 μL
20 mM MgCl <sub>2</sub>	5 μL
1 mM dATP	5 μL
1 mM CDP	2,5 μL
0,025 μCi/μL [5- <sup>3</sup> H]-CDP	2,5 μL

b) mit GDP als Substrat:

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

Bei sehr geringen Enzymkonzentrationen im Standard-Reduktasetest, wie z. B. bei permeabilisierten Zellen oder unterhalb 100 μg im zellfreien Rohextrakt oder regelöstem Ammoniumsulfat-Präzipitat wurde die Substratkonzentration auf 25 μM oder 12,5 μM erniedrigt bzw. ganz auf „kaltes“ Substrat verzichtet, um noch messbare Umsätze zu erhalten. Die praktische Ausführung ist im nachfolgenden Schema dargestellt.

---

Durchführung des [<sup>3</sup>H]-Radionuklidassays zur Prüfung der Mn-RRase-Aktivität

- Zugabe von 20 µL Testmix zu 80 µL Enzymlösung (resp. Zellsuspension) auf dem Eisbad, gut mischen
  - Inkubation bei 30 °C für 20 min
  - Abbruch der Enzymreaktion durch Kochen für 3 min
  - Zugabe von 10 µL Pronase (25 µg/µL Standardpuffer) auf dem Eisbad, gut mischen
- Inkubation für 90 min bei 37 °C
- Abbruch der Enzymreaktion durch Kochen für 3 min
  - Zugabe von 10 µL 1,5 M Tris-HCl pH 9,9 und 4 µL alkalischer Phosphatase auf dem Eisbad, gut mischen
  - Inkubation für 90 min bei 37 °C
  - Abbruch der Enzymreaktion durch Kochen für 3 min
  - 10 minütige Zentrifugation bei  $g > 12000$
  - Vorsichtige Entnahme von 105 µL für die Edukt/Produkt-Trennung auf der HPLC mit anschließender Fraktionierung
  - Zugabe von Szintillationscocktail zu den vier HPLC-Fractionen
  - Detektion der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler (Wallac 1410 LSC, Pharmacia LKB, Freiburg)

Die Zugabe von Pronase diene der Zerstörung jeglicher Proteinaktivität, die das Ergebnis des Enzymassays durch unspezifische Nebenreaktionen bspw. durch *N*-Glycosidasen hätte verfälschen können. Die Inkubation mit alkalischer Phosphatase diene der vollständigen Dephosphorylierung des Produktes, um das Produkt sicher in einer Fraktion auffangen zu können.

### 2.16.2 Biochemischer Komplementationstest

Beim chemischen Komplementationstest wurden zunächst nur die R1E-Proteinlösung (ca. 36 µg Protein absolut und die R2F-Proteinlösung rekombiniert (in 80 µL) und gut durchmischt. Je nach Reinigungsgrad wurden folgende Mengen R2F-Protein im 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 0 °C (Eisbad) vorgelegt:

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

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

### 2.16.3 HPLC-Trennung des Ribonucleosid-/ 2'-Desoxyribonucleosid-Gemisches

Die Trennung des Ribonucleosid-/ 2'-Desoxyribonucleosid-Gemisches, entstanden im Verlauf der Ribonucleotid-Reduktion im RRase-Test, wurde mit Hilfe einer Knauer-HPLC-Anlage durchgeführt. Die einzelnen Komponenten dieser Anlage waren:

WellChrom Solvent Organizer K-1500 (Knauer, Berlin)

Wellchrom 4 channel Degasser K-5004 (Knauer, Berlin)

WellChrom HPLC-Pump K-1001 (Knauer, Berlin)

Autosampler BasicMarathon K-3800 (Knauer, Berlin)

Jetstream Peltier Column Thermostat 04570

Detektoren:

Knauer Spektralphotometer Typ. 87.00 (Knauer, Berlin)

WellChrom DAD K-2700

Fraktionssammler Frac 100 (Pharmacia, Freiburg)

Für die Trennung der Komponenten wurde eine 300 x 4 mm Kationenaustauschersäule EUROKAT-H (Knauer, Berlin) mit einer 30 x 4 mm Vorsäule mit demselben Trennmateriale verwendet. Die Säule wurde auf 37 °C temperiert, das Chromatogramm wurde bei 254 nm aufgenommen.

EUROKAT-H ist ein sulfoniertes, quervernetztes Styrol/Divinylbenzol-Copolymer, auf dem in Verbindung mit dem verwendeten 0,1 M Boratpuffer (pH 8,2) eine Trennung nach dem Prinzip der Anionenausschluss-Chromatographie erfolgt, der eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Matrix überlagert ist. So wurden mit Borat komplexierte Ribonucleotide (Reste von Substrat, die nicht durch die alkalische Phosphatase gespalten wurden) und Ribonucleoside (dephosphoryliertes Substrat) als Anionen ohne Retention durch die Säule gespült, während neutrale Deoxyribonucleoside (dephosphoryliertes Produkt) und auch Nucleobasen (Purine und Pyrimidine als Folge von Nebenreaktionen) auf der Säule eine Retention erfuhren.

Die Trennung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Puffer: 0,1 M Borat / NH<sub>3</sub>, pH 8,2

Flussrate: 0,5 mL/min

Laufzeit: 30 min

Fraktionierung:

1. Cytidin, CDP	1,5 – 7,5 min
2. d-Cytidin	7,5 – 13,5 min
3. Cytosin	13,5 – 19,5 min
4. Nachlauf	19,5 – 25,5 min

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

## 2.17 Toleranztest gegen Hydroxyharnstoff

Zum Test von Transformanten auf Toleranz gegenüber Hydroxyharnstoff wurden Agarplatten mit LB-Medium hergestellt, das folgende Zusätze enthielt: 15 µg/mL Chloramphenicol, 1 mM IPTG und Hydroxyharnstoff in einer Konzentrationsreihe mit den Konzentrationen 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 10 mM und 15 mM. Auf diesen Platten wurde der zu testende transformierte Stamm zusammen mit dem Vergleichsstamm *C. ammoniagenes* pXMJ19 ausgestrichen. Parallel dazu wurden beide Stämme zum Vergleich auf einer Agarplatte mit LB-Medium + 15 µM Chloramphenicol ausgestrichen. Registriert wurde gleiches oder vermindertes Wachstum bezogen auf die Platte ohne Zusatz von IPTG und HU sowie fehlendes Wachstum.

## 2.18 Spektroskopische Methoden

### 2.18.1 UV/VIS-Spektroskopie

Alle UV/VIS-Spektren wurden an einem Kontron UVICON 970 Spektralphotometer (Kontron Instruments, Neufahrn) aufgenommen. Es wurde im Bereich 300 – 600 nm mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min und einer Auflösung von 0,5 nm gemessen. Zur Qualitätsverbesserung wurden alle Spektren dreimal gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Zur Erzeugung von Differenzspektren wurden nach Messung eines UV/VIS-Spektrums einige Kristalle HU in die Messküvette gegeben und die Proteinlösung mit einer Pipette vorsichtig bis zur vollständigen Auflösung des HU durchmischt. Danach wurde unter identischen Bedingungen erneut ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen. Durch Subtraktion beider Spektren wurde das Differenzspektrum erzeugt.

### 2.18.2 X-Band ESR-Spektroskopie

Hochkonzentrierte Fraktionen (Fraktion 4-12 nach UNOsphereQ, Fraktion 15-17 nach Superdex 200 und Fraktion 12 nach Mono Q) wurden in ESR-Quarzglasröhrchen mit einem Aussendurchmesser von 5 mm gefüllt. Die Proben wurden entweder in Minicon-Zellen (Millipore, Bedford, MA, USA) oder durch Ammoniumsulfatfällung im Bereich 0 – 70% aufkonzentriert. Die Messungen wurden in folgenden Spektrometern aufgenommen:

- a) Bruker EMX EPR Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten)
- b) Bruker ElexSys E500 EPR-Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten)

### 2.18.3 Q-Band ESR-Spektroskopie

CW-Q-Band ESR-Spektren wurden mit hochkonzentrierten Fraktionen nach Gelfiltration an Superdex 200 mit einem Bruker ESP300 EPR-Spektrometer (Bruker, Rheinstetten) in 3 mm Quarzröhrchen

Gepulste Q-Band ESR-Spektren wurden ebenfalls mit hochkonzentrierten Fraktionen nach Gelfiltration an Superdex 200 mit einem Bruker ElexSys E580 ESR Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten) aufgenommen.

## 2.19 Metallbestimmung

### 2.19.1 Quantifizierung mit ICP-MS

Material nach Ammonium-Sulfatfällung wurde zunächst über HiTrap-Säulchen entsalzt. Die gepoolten Fraktionen der 35%-Stufe der Chromatographie an UNOsphere<sup>®</sup>-Q wurden zunächst durch Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert und dann über HiTrap-Säulen entsalzt. Gepoolte, Reduktase-haltige Fraktionen der Chromatographie an Superdex<sup>™</sup>200 wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt.

### 2.19.2 ESR-Spektroskopische Quantifizierung

Der Mangengehalt der Fraktion 12 der Chromatographie an Mono Q wurde durch Doppelintegration der Signale des Mangans nach HU-Behandlung und eines Kupferstandards und Vergleich der Integrationsdaten bestimmt.

### 2.19.3 Colorimetrische Bestimmung von Eisen

Für die Bestimmung des Eisengehaltes einer Probe wurden 100 µL der Probe auf 1000 µL aufgefüllt und dann nacheinander mit 20 µL Lösung 1, 40 µL Lösung 2, 20 µL Lösung 3 und

40 µL Lösung 4 versetzt. Nach 15 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Für die Kalibrierreihe wurden durch Verdünnung eines Fe-Eichstandards (Merck, Darmstadt) Proben im Bereich von 0,1 bis 10 mg/L angesetzt und analog bestimmt.

Lösung 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6,2% (v/v)

Lösung 2 160 g Ammoniumacetat in 200 mL Eisessig und 200 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 3 20 g Hydroxylammoniumchlorid in 100 mL H<sub>2</sub>O

Lösung 4 0,5 g Phenantroliniumchlorid in 100 mL H<sub>2</sub>O

## 2.20 Molekularbiologische Methoden

### 2.20.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Präparation von Plasmid- oder genomischer DNA wurde nach MANIATIS et al. (1982) durchgeführt. Dazu wurde die Extinktion einer Probe bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt.  $E_{260} = 1$  entspricht dabei etwa 50 µg/L doppelsträngiger DNA. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  gibt den Grad der Verunreinigung durch Proteine an. Reine Präparationen sollten einen Quotienten von 1,8 – 2,0 aufweisen.

### 2.20.2 Isolierung von Gesamt-DNA

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

### 2.20.3 Isolierung von Plasmid-DNA

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

### 2.20.4 DNA-Fragment-Isolierung

Für die Aufarbeitung von PCR- oder Restriktionsansätzen zur Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente wurde der QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Fragment-Isolierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

---

### 2.20.5 DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen

Zur analytischen oder präparativen Spaltung von DNA wurden entsprechend den Angaben des Herstellers pro  $\mu\text{g}$  DNA 1 bis 3 Einheiten Restriktionsenzym gegeben und bei der erforderlichen Temperatur (meist  $37^\circ\text{C}$ ) 1 bis 2 Stunden inkubiert. Optimale Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe von 10fach konzentriertem Reaktionspuffer geschaffen. Bei der Restriktion mit mehr als einem Enzym wurde der günstigste Reaktionspuffer ausgewählt oder die Verdaue nacheinander ausgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Zugabe des 5fach konzentrierten GLB-Puffers.

### 2.20.6 Inaktivierung von Restriktionsenzymen

Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte für 15 min bei  $65^\circ\text{C}$ .

### 2.20.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen nach MANIATIS et al. (1982) mit 0,8%-igen Agarose-Gelen durchgeführt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer suspendiert, bis zur vollständigen Auflösung aufgeköcht, auf ca.  $50^\circ\text{C}$  abgekühlt und dann in die Gelvorrichtung gegossen. Angelegte Spannung und Dauer der Elektrophorese richteten sich nach Größe und Art des verwendeten Gelsystems. Als Standard zum Größenvergleich der aufgetrennten DNA-Fragmente diente die „1 kb DNA-Ladder“ von BIO-RAD (BIO-RAD Inc., Hercules, CA, USA) oder mit Hind III verdaute DNA des Phagen  $\lambda$  (Boehringer, Mannheim). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und mit einer Geldokumentationsanlage AlphImager 2200 der Firma Alpha Innotech (San Leonardo, CA, USA) festgehalten.

### 2.20.8 Ligation

Die zu ligierenden DNA-Fragmente stammten entweder aus präparativen Agarose-Gelen oder direkt aus einem inaktivierten Restriktionsansatz. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit 3'- oder 5'-überlappenden Enden wurde  $1\ \mu\text{g}$  DNA mit 1 U T4-Ligase (Gibco BRL, Eggenstein oder Boehringer, Mannheim) in Ligasepuffer 14 – 20 h bei  $16^\circ\text{C}$  oder 3 h bei RT inkubiert. Dabei wurde das zu klonierende Fragment in 5-fachem Überschuss zum Zielvektor

---

eingesetzt. Bei Ligationsansätzen von DNA-Fragmenten mit glatten Enden betrug das Verhältnis von Fragment zu Vektor 10:1. Die Ligationsansätze wurden direkt transformiert.

## 2.20.9 Methoden zum Gentransfer

### 2.20.9.1 Elektrotransformation von *E. coli* und *C. ammoniagenes*

Zur Elektrotransformation (Elektroporation) werden vorbehandelte Zellen mit Plasmid-DNA gemischt und durch eine definierte Kondensatorentladung einem elektrischen Puls mit einer Feldstärke von 12,5 – 19,5 kV/cm ausgesetzt, wodurch es zu einer Aufnahme der Plasmid-DNA kommt (DOWER et al., 1988). Die Entladungszeiten sind von der Feldstärke abhängig und liegen in einem Bereich von 2 bis 5 msec. Wesentliche Voraussetzung für die hohe Effizienz dieser Transfermethode sind eine logarithmische Wachstumsphase der verwendeten Zellen, sowie die Konzentrierung und Entionisierung der Zellsuspension während der Vorbehandlung. Dadurch wird die Entstehung eines homogenen elektrischen Feldes zwischen den Elektroden der Elektroporationsküvetten gewährleistet.

Die Elektroporationen wurden in einem Electro Cell Manipulator ECM<sup>®</sup> der Firma BTX Inc. (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Elektroporationsküvetten wurden ebenfalls von BTX oder von EUROGENTECH (Liège, Belgien) bezogen.

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

#### 2.20.9.1.1 Vorbereitung von *E. coli*-Zellen

- Vorkultur von *E. coli* in 10 mL LBG-Medium animpfen und über Nacht bei 37 °C inkubieren
  - Vorkultur 1:100 in LBG-Medium überimpfen und unter Schütteln mit 150 rpm bei 37 °C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 – 0,7 anziehen
  - Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen und alle weiteren Schritte bei 4 °C durchführen
  - 250 mL der Kultur 15 min in einer Sorvall Kühlzentrifuge bei 6000 rpm sedimentieren und den Überstand vollständig mit einer Pipette abziehen
  - Zentrifugenbecher zweimal mit bidestilliertem Wasser ausspülen ohne das Pellet zu lösen
  - das Pellet in 5 mL H<sub>2</sub>O bidest. resuspendieren und in 250 mL H<sub>2</sub>O bidest. waschen
  - die Zellen 25 min bei 5000 rpm sedimentieren
-

- 
- den Überstand abgießen und die Zellen im Rücklauf resuspendieren
  - Suspension aufteilen und jeweils 25 mL 15% Glycerin zugeben
  - Zellen 15 min bei 5000 rpm zentrifugieren und den Überstand vollständig abziehen
  - Pellet in 1 mL 15% Glycerin aufnehmen und in kleinen Portionen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  einfrieren

#### 2.20.9.1.2 Vorbereitung von *Corynebacterien*

- Vorkultur in 10 mL LBG-Medium animpfen und über Nacht bei  $30^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubieren
- 0,2 – 0,8 mL der Vorkultur in 100 mL Elektroporationsmedium geben, in 1000 mL Erlenmeyerkolben überimpfen und über Nacht auf dem Rundschüttler mit 200 rpm bei  $30^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,5 heranziehen
- alle weiteren Schritte bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchführen
- mindestens  $10^9$  Zellen in PE-Röhrchen überführen und 10 min bei 6000 rpm in einer Kühlzentrifuge sedimentieren und den Überstand vollständig abziehen
- das Pellet im gleichen Volumen 15% Glycerin waschen und erneut sedimentieren
- das Pellet in 1 mL 15% Glycerin resuspendieren und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- Zellen zweimal mit 1 mL 15% Glycerin waschen und durch kurzes Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge 5417 sedimentieren
- Zellen in 60  $\mu\text{L}$  15% Glycerin aufnehmen und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  lagern

#### 2.20.9.1.3 Elektroporation von *E. coli* und *C. ammoniagenes*

- portionierte Zellen auf Eis auftauen, Küvetten und DNA auf Eis stellen
- DNA zu den Zellen geben, gut mischen und Ansatz 1 min auf Eis stellen
- Suspension in die Elektroporationsküvette geben, in die Apparatur stellen und den elektrischen Puls auslösen (entsprechend einer Felstärke von 12,5 kV/cm)
- sofort 1 mL SOC-Medium zugeben und gut mischen
- Zellen von *E. coli* 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ , Zellen von *C. ammoniagenes* 3 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  regenerieren und anschließend auf Selektionsmedium ausplattieren

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

Transformationen mit Plasmid-DNA wurden nach MANIATIS et al. (1982) durchgeführt. Alternativ dazu wurde nach einem vereinfachten Transformationsprotokoll gearbeitet, bei dem 5 mL LB-Medium mit 0,2 mL ÜNK des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in einer

---

---

Labofuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode) abzentrifugiert (10 min bei 5000 rpm), in 0,2 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und mindestens 15 min auf Eis stehen gelassen. Mit diesen kompetenten Zellen wurde entsprechend der CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>-Methode weitergearbeitet.

#### 2.20.10 Amplifikation von DNA mit PCR (Saiki et al., 1985)

Alle PCR-Versuche wurden mit einem Thermocycler „GeneAmp PCR System 9600“ der Firma PE Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) durchgeführt. Zusammen mit ca. 100 ng Template-DNA und 400 ng je Primer (bezogen von MWG Biotech, Ebersfelde) wurden Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Im Standard-Protokoll einer spezifischen Reaktion wurde die DNA zuerst bei 94 °C für 2 min denaturiert, dann folgten 30 Zyklen, denen sich nach dem Denaturieren der DNA bei 94 °C für 30 sec die Primerbindung bei einer Temperatur anschloss, die 5 °C unter dem niedrigsten T<sub>m</sub>-Wert lag und 1 min gehalten wurde. Die Elongation wurde bei 72 °C durchgeführt, wobei für die Dauer dieses Schrittes je Kilobase des zu amplifizierenden DNA-Bereiches 1 min gerechnet wurde.

#### 2.20.11 Sequenzierung

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

Zur Sequenzierung dienten folgende Primer:

OCA2\_1 5'-CCA ACA TTG CCT TCA TGG AAT CC-3'

OCA2\_2 5'-GTG CAC GGC TAC TAC ATT GG-3'

OCA2\_3 5'-GGC TAC GAA GGT CTC TTC CC-3'

OCA2\_4 5'-GGG AAG AGA CCT TCG TAG CC-3'

OCA2\_5 5'-CCA ATG TAG TAG CCG TGC AC-3'

OCA2\_6 5'-GGA TTC CAT GAA GGC AAT GTT GG-3'

Für die Klonierung und die Sequenzierung dienten folgende Primer:

OB1 5'-TTT TTC TAG AGC AGG GTA GGT TGA TTT CAT GTC GAA TG-3'

OB3 5'-AAA AGA ATT CTT AGA AGT CCC AGT CAT CGT C-3'

---

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Überproduktion des R2F-Proteins in *C. ammoniagenes*

Die aus dem Wildtyp-Stamm *C. ammoniagenes* ATCC 6872 vorliegenden Ergebnisse (GRIEPENBURG et al., 1998) reichten für eine genaue Charakterisierung des organischen Radikals und des Metallzentrums des R2F-Proteins nicht aus. Die dafür notwendigen größeren Proteinmengen konnten nur auf dem Wege einer Überproduktion des Proteins gewonnen werden. Eine homologe Überexpression in *C. ammoniagenes* schien daher das geeignete Mittel zu sein, neue und von den bisherigen Strategien unabhängige Ergebnisse zu erhalten.

#### 3.1.1 Überproduktion mit dem Plasmid pWCAX

Für erste Arbeiten zur Charakterisierung des R2F-Proteins stand im Labor mit *C. ammoniagenes* pWCAX bereits ein überproduzierender Stamm zur Verfügung.

Bei dem Plasmid pWCAX handelte es sich um ein Konstrukt aus dem *E. coli* / *C. glutamicum*-Shuttlevektor pEKEX2 (EIKMANN et al., 1991) und dem *nrdF*-Gen, das in den Vektor inseriert war. Hierbei war das *nrdF*-Gen inclusive der vermutlichen geneigenen Promotorsequenzen (OEHLMANN, 1998) oberhalb des Startcodons kloniert (W. Oehlmann, persönliche Mitteilung), wodurch die Expression des Gens in *C. ammoniagenes* sichergestellt werden sollte. Unklar war jedoch, ob der induzierbare *tac*-Promotor des Expressionsvektors noch einen zusätzlichen Einfluss auf die Expression hatte.

Zunächst wurde versucht, die Stärke der Expression durch Feststellung der Toleranz von *C. ammoniagenes* pWCAX gegenüber Hydroxyharnstoff (HU) zu quantifizieren. Hydroxyharnstoff ist ein Radikalfänger, der zuverlässig in der Lage ist, die enzymatische Aktivität der Ribonucleotid-Reduktase zu hemmen (GRIEPENBURG et al., 1998). Bereits 1 mM HU hemmt das Wachstum von Einzelkolonien des Wildtyps nahezu vollständig, so dass eine höhere Toleranz gegenüber HU für eine erhöhte Expression der Ribonucleotid-Reduktase steht. Wachstumstests auf Agarplatten ergaben eine Resistenz von *C. ammoniagenes* pWCAX bis zu 5 mM HU, damit war die Expression des *nrdF*-Gens im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor fünf erhöht.

Die Funktionalität des *tac*-Promotors im Plasmid pWCAX wurde durch vergleichende Wachstumstests mit und ohne Induktion durch IPTG untersucht. Da der *tac*-Promotor durch Glucose zuverlässig gehemmt wird, wurde auch dies in die Untersuchung mit einbezogen.

---

---

Es wurden Versuche mit LB-Medium (LB) durchgeführt, dem wechselnd 5 g/L Glucose, 100 µg/L Mangan und 1,0 mmol/L IPTG zugesetzt wurden. Als Kontrolle wurde LB-Medium ohne Zusätze verwendet. Es ergab sich kein sichtbarer Unterschied in der Stärke der Expression, so dass ein Einfluss des *tac*-Promotors auf die Genexpression ausgeschlossen werden konnte.

Damit war erwiesen, dass die Genexpression bei diesem Plasmid allein dem eigenen Promotor und damit auch der zellinternen Regulation unterlag, wodurch die geringe Expressionsrate dieses Stammes erklärt wurde. Entsprechend war zu erwarten, dass durch Ausschluss der zellinternen Regulation (durch Verwendung eines anderen Promotors) eine verbesserte Überproduktion des NrdF-Proteins erreichbar wäre. Mit Proteinmaterial aus dieser Expression konnten die Ergebnisse von GRIEPENBURG (1998) bestätigt werden (vgl. Abbildungen 3.14 und 3.29).

### 3.1.2 Herstellung des Plasmides pOCA2

Um die Beschränkungen der Expression mit *C. ammoniagenes* pWCAX zu umgehen, wurde das *nrdF*-Gen erneut in einen Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde der *E. coli* / *C. glutamicum*-Shuttlevektor pXMJ19 (JACOBY et al., 1999) verwendet. In diesem Fall wurde das Gen mit nur 24 Basenpaaren oberhalb des Startcodons kloniert. Auf diese Weise sollte das Gen ohne eigenen Promotor, jedoch mit der vermutlichen Ribosom-Bindestelle (OEHLMANN et al., 1998) kloniert werden, so dass die Expression nun dem *tac*-Promotor des Expressionsvektors unterlag (s. Abb. 3.2).

Abbildung 3-1 zeigt die Sequenz des *nrdF*-Gens, das nach PCR-Amplifikation in den Shuttlevektor pXMJ19 kloniert wurde. Grau unterlegt sind die Sequenzen der verwendeten PCR-Primer OB 1 (*upstream*) und OB 3 (*downstream*), die die für die Klonierung notwendigen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme enthielten. Durch OB 1 wurde eine XbaI-Schnittstelle und durch OB 3 eine EcoRI-Schnittstelle an die Gensequenz angehängt. Fett gedruckt ist die Sequenz der vermutlichen Ribosom-Bindungsstelle, unterstrichen das Start-Codon des Gens. Über die PCR-Amplifikation wurde das Start-Codon von GTG auf ATG geändert, um eine Ablesung der Sequenz auch in *E. coli* zu erleichtern.

---

```

1  TTTTCTAGA GCAGGGTAGG TTGATTTTCAT GTCGAATGAA TATGACGAGT ACATCGCTAA
61 CCACACAGAT CCGGTAAAAG CGATTAAGTGA GAACGTCATT CCCGACGAGA AAGACTTGGA
121 AGTTTGGGAC CGTCTGACTG GTAACCTTCTG GTTGCCAGAA AAGATTCCAG TATCCAATGA
181 CATTTCAGAGC TGGAACAAGA TGACTCCGCA AGAACAGCTA GCGACCATGC GTGTGTTTAC
241 CGGCTTGACA CTCTTGAGCA CCATCCAGGG CACGGTGGGC GCAATTTCTT TGCTGCCCAG
301 TGTGAAACC ATGCATGAGG AAGGCGTGTA CACCAACATT GCCTTCATGG AATCCGTACA
361 CGCGAAGTCT TATTCCAATA TCTTTATGAC CTTGGCATCG ACTCCGCAGA TTAATGAAGC
421 ATTCCGCTGG TCTGAAGAAA ACGAAAACCT TCAGCGTAAG GCAAAGATCA TCATGTCTTA
481 CTACAACGGT GATGACCCAC TGAAGAAGAA GGTAGCTTCC ACGCTTTTGG AATCCTTCTT
541 GTTCTACTCC GGTTTCTACC TGCCGATGTA CCTGTCCTCG CGCGCGAAGC TACTAATAC
601 CGCTGATATT ATTCGCCTCA TTATTCGTGA TGAATCCGTG CACGGCTACT ACATTGGCTA
661 CAAGTACCAG CAGGGTGTGA AGAAGCTTTC TGAGGCTGAG CAGGAAGAAT ACAAGGCATA
721 CACCTTCGAC CTTATGTACG ATCTGTACGA AAACGAGATT GAGTACACCG AGGATATCTA
781 CGATGACTTG GGCTGGACCG AAGACGTTAA GCGTTTCCCTG CGCTACAACG CTAATAAGGC
841 GCTAAACAAC TTGGGCTACG AAGGTCTCTT CCCAACTGAT GAGACCAAGG TATCGCCAGC
901 GATCTTGTCT TCGCTGAGCC CGAACGCTGA CGAAAACCAC GACTTCTTCT CTGGTTCTGG
961 TTCTTCCTAC GTTATTGGTA AGGCCGAAGA CACCACTGAC GATGACTGGG ACTTCTAAGA
1021 ATTCTTTT

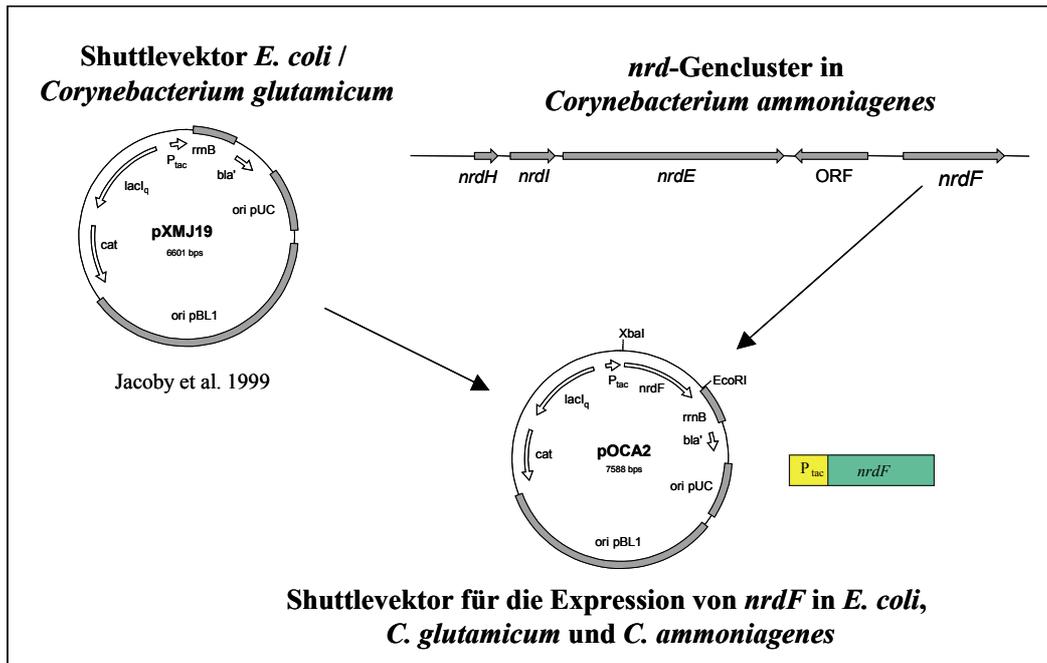
```

**Abb. 3.1:** Sequenz des *nrdf*-Gens; die Sequenzen der Klonierungsprimer sind grau unterlegt, die vermutliche Ribosombindestelle ist fett gedruckt, das Start-Codon ist unterstrichen

Das PCR-Produkt wurde für die weitere Bearbeitung in den Plasmid-Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO der Firma Invitrogen kloniert, um durch Sequenzierung fehlerfreie Amplifikate identifizieren und diese dann für die weiteren Arbeiten verwenden zu können.

Mit Hilfe der Klonierungsprimer OB 1 und OB3 sowie der Sequenzierungsprimer OCA2\_1 bis OCA2\_6 wurde das Gen vollständig sequenziert und Fehlerfreiheit durch Vergleich mit der von Fieschi et al. (GenBank Nr. CAA70766.1) veröffentlichten Sequenz festgestellt.

Nach jeweiligem Verdau mit den Restriktionsenzymen XbaI und EcoRI konnten die erhaltenen Fragmente des Vektorplasmids pXMJ19 und des *nrdf*-Gens zum Plasmid pOCA2 ligiert werden.

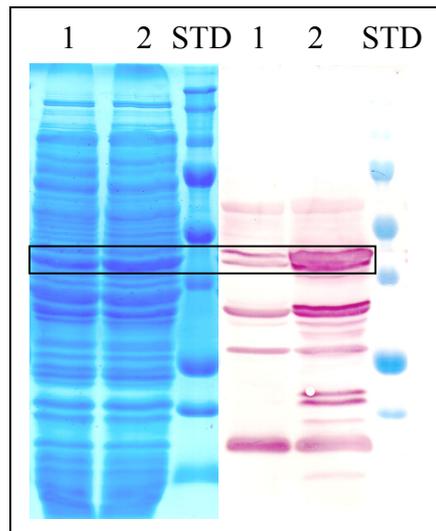


**Abb. 3.2:** Klonierungsstrategie für die Expression des *nrdF*-Gens in *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum* und *E. coli*

### 3.1.3 Funktionsüberprüfung durch heterologe Expression des *nrdF*-Gens

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Plasmids pOCA2 sollte die Expression in *E. coli* und sicherheitshalber auch in *C. glutamicum* überprüft werden, da über die Funktion des *tac*-Promotors in *C. ammoniagenes* keine Ergebnisse vorlagen.

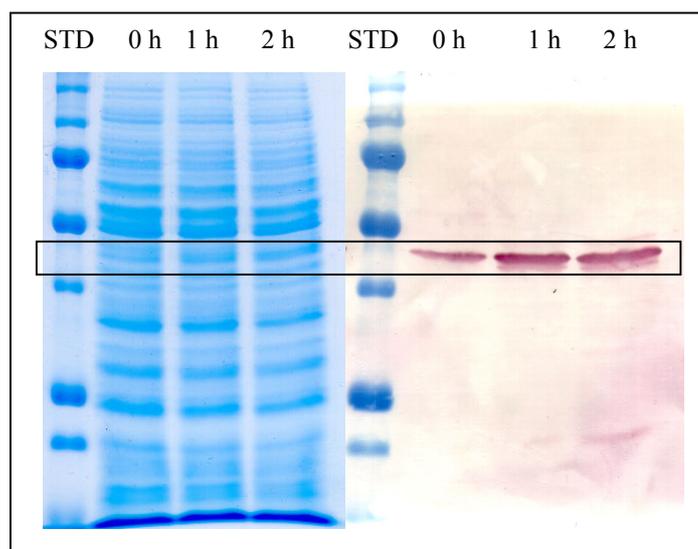
Zum Vergleich der homologen Expression mit der heterologen in *E. coli* sollte das Plasmid pOCA2 auch zur Expression des CA2-Proteins in *E. coli* genutzt werden. Dazu wurden Zellen von *E. coli* XL1 frisch mit dem Plasmid pOCA2 transformiert und dann entsprechend Kap. 2.7.4 herangezogen. Nach Ernte der Zellen wurden diese mit der French Press aufgeschlossen und der Zellüberstand wurde analysiert (s. Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Expression von *nrdF* in *E. coli*; **1** vor Induktion, **2** 3,5 Stunden nach Induktion

Im SDS-Polyacrylamid-Gel wurde die deutliche Verstärkung einer Proteinbande nach Induktion mit IPTG sichtbar. Der Western-Blot zeigte, dass es sich bei dem produzierten Protein tatsächlich um das R2F-Protein handelte. Die Expression von *nrdF* war damit auch in *E. coli* erfolgreich.

Analog zu *C. ammoniagenes* wurde auch der Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 mittels Elektroporation mit dem Plasmid pOCA2 transformiert und gem. Kap. 2.7.4 angezogen. Eine Analyse mit SDS-PAGE zeigte den Erfolg der Expression.



**Abb. 3.3:** Gel und Blot der Expression von *nrdF* in *C. glutamicum* pOCA2; **STD:** BIO-RAD-Standard mit 100, 75, 50, 37, 25 und 20 kD;

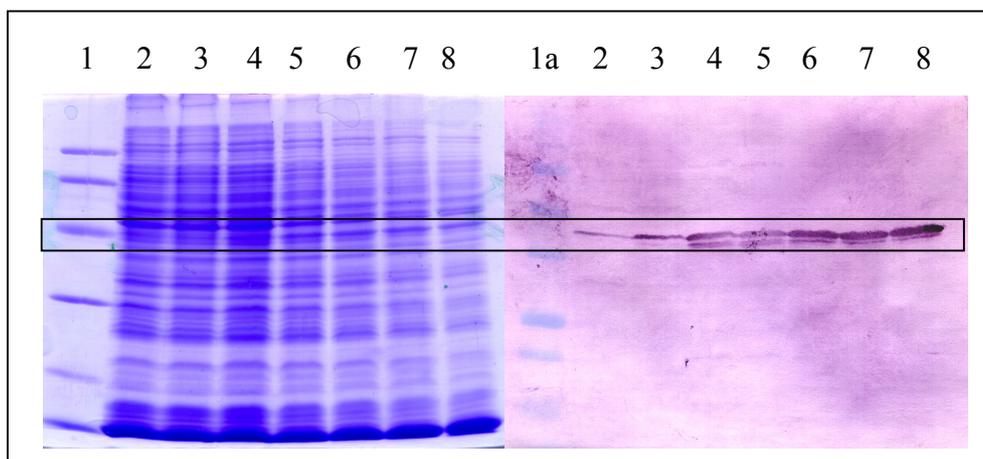
Der Test auf Toleranz gegenüber Hydroxyharnstoff ergab eine zehnfach höhere Toleranz im Vergleich zu dem Kontrollstamm *C. ammoniagenes* pXMJ19. Da die R1E- und R2F-Proteine von *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* sich gegenseitig komplementieren können (OEHLMANN 1998, ABBOUNI 1999), war diese erhöhte Toleranz gegenüber HU auf die Expression des *nrdF*-Gens aus *C. ammoniagenes* durch das Plasmid pOCA2 zurückzuführen. Es war damit erwiesen, dass auch in *C. glutamicum* erfolgreich aktives R2F-Protein überproduziert werden konnte.

### 3.1.4 Überproduktion mit dem Plasmid pOCA2

Mit dem so hergestellten Plasmid pOCA2 wurde der Stamm *C. ammoniagenes* ATCC 6872 mittels Elektroporation transformiert.

Um den Erfolg der Expression zu untersuchen, wurden während der Zellanzucht zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG, sowie in Abständen von 1 Stunde Proben genommen und mittels Western-Blot untersucht.

Im Western-Blot war die Anreicherung des R2F-Proteins innerhalb von fünf Stunden nach Induktion mit IPTG sichtbar (s. Abb. 3.5). Deutlich zu erkennen ist die zum Zeitpunkt der Induktion bereits vorhandene, nicht plasmidgebundene Grundexpression der Zelle.



**Abb. 3.5:** Gel und Blot der Expression von *nrdF* in *C. ammoniagenes* pOCA2; **1** Standard mit 94, 67, 43, 30, 20,1 und 14,4 kD; **1a** BIO-RAD-Standard mit 100, 75, 50, 37, 25 und 20 kD; Probennahme vor Induktion (**2**), zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG (**3**) und 1 h (**4**), 2 h (**5**), 3 h (**6**), 4 h (**7**) und 5 h (**8**) nach Induktion

Es war jedoch zu klären, ob das exprimierte Protein auch aktiv war. Dazu wurde wieder die erhöhte Toleranz gegenüber Hydroxyharnstoff durch die Überproduktion als Maß genutzt.

---

Zum Test der Toleranz gegen Hydroxyharnstoff wurden zum Vergleich der rekombinante Stamm *C. ammoniagenes* pOCA2 und als Kontrolle der Stamm *C. ammoniagenes* pXMJ19, der nur den Expressionsvektor ohne Insert enthielt, auf Agarplatten mit steigender HU-Konzentration ausgestrichen (s. Kap. 2.17). Eine achtfach höhere Toleranz des Stammes *C. ammoniagenes* pOCA2 gegenüber dem Kontrollstamm bewies die gelungene Überproduktion funktionsfähigen R2F-Proteins.

Die optimale Stärke der Expression wurde durch Induktion mit 0,6 M IPTG und einer Induktionszeit von 4,5 bis 5 h erreicht. Der Anteil an NrdF am Gesamtprotein im Rohextrakt betrug dann ca. 5% (nicht gezeigt). Die Ausbeute an radikalhaltigem Protein konnte durch Zugabe von  $\text{MnCl}_2$  zum Fermentationsmedium deutlich gesteigert werden, wie sich durch eine Verstärkung des Radikal-Signals im UV/VIS-Spektrum (s. Kap. 3.3) zeigte. Für die Fermentation im 10 L-Maßstab wurde  $\text{MnCl}_2$  zu einer Endkonzentration von 185  $\mu\text{M}$  zugegeben. Versuche mit geringeren Mn-Konzentrationen im Fermentationsmedium führten zu einem verringerten Radikal-Signal (vgl. Kap. 3.3) im Protein-Rohextrakt nach Ammoniumsulfat-Fällung.

## 3.2 Reinigung der Mn-RNR zur Homogenität

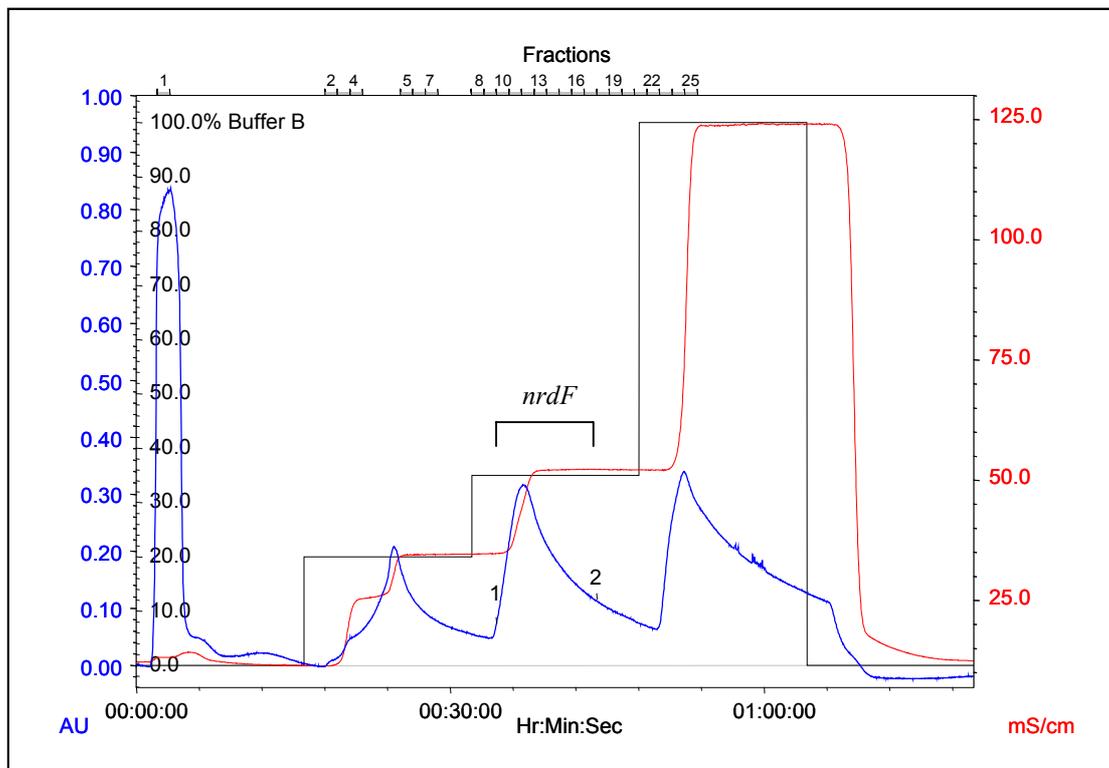
Das bisherige Reinigungsprotokoll von GRIEPENBURG reichte auch nach Etablierung der gesteigerten Überproduktion des NrdF-Proteins nicht aus, um Probenmaterial mit ausreichend hoher Spinkonzentration für eine weitergehende Charakterisierung der Radikalspezies zu gewinnen. Da bei der Reinigung die Zerstörung des stabilen organischen Radikals des R2F-Proteins die größte Gefahr darstellte, war es das vorrangige Ziel, die für die Chromatographieschritte benötigte Zeit so kurz wie möglich und die Zahl der Vorgänge des Auftauens und Einfrierens so klein wie möglich zu halten. Dies sollte vor allem durch Einsatz von Materialien für die präparative Anionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie erreicht werden.

### 3.2.1 Reinigung an UNOsphere®-Q

Schon in vorhergehenden Arbeiten mit der RNR aus *Bacillus subtilis* (STALLMANN, 1995) hatte sich das UNO-Q-Material (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) als hervorragendes Material für die Ionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von Ribonucleotid-Reduktasen herausgestellt. Dieses Material ist ein Anionenaustauscher auf Polymerbasis, das bei guter Trennleistung optimalen Erhalt der Enzymaktivität ermöglicht.

---

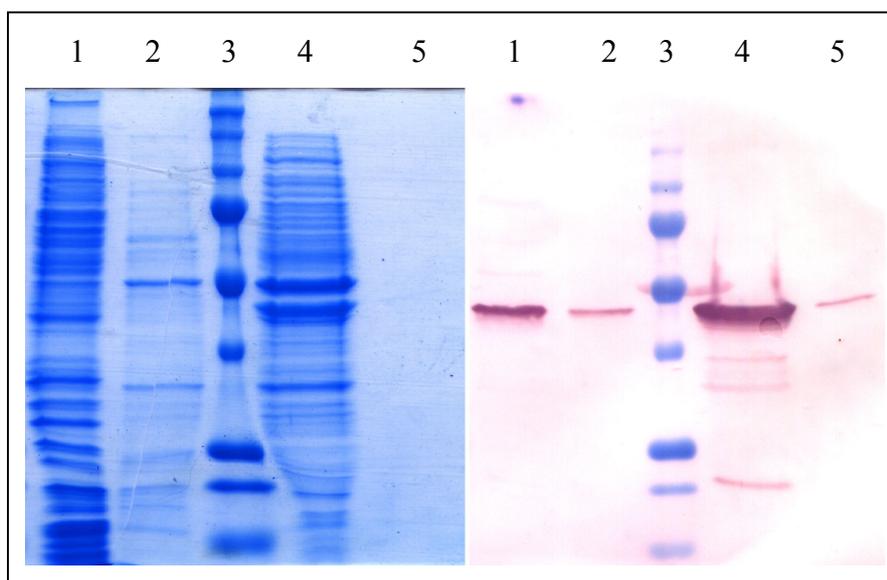
Mit Einführung des UNOsphere<sup>®</sup>Q-Materials konnte der Nutzen dieser Chromatographiemethode noch gesteigert werden, da mit diesem präparativen Material die Gesamtzeit der Chromatographie erheblich gesenkt und dadurch der Verlust an Enzymaktivität während der Reinigung weiter reduziert werden konnte. Es zeigte eine etwas geringere chromatographische Trennleistung als UNO-Q, wies aber eine sehr viel höhere Proteinbindungskapazität auf und konnte mit hohen Durchflussraten betrieben werden, so dass die Zeit für die Aufarbeitung von ca. 300 mg Protein-Rohextrakt von 8 h auf 2 h gesenkt werden konnte.



**Abb. 3.6:** Chromatogramm eines Laufes an UNOsphere<sup>®</sup>Q; der Bereich der Fraktionen 10 bis 17 wurde mit **1** und **2** markiert; (—) UV-Absorption bei 280 nm, (—) Leitfähigkeit, (—) theoretischer Gradient mit 0, 20, 35, 100 und 0 % Puffer B

Die Ionenaustausch-Chromatographie hängt stark von der Zusammensetzung der Elutionspuffer ab, und schon kleine Schwankungen in der Ionenstärke beeinflussen die Elution des Zielenzym. Deshalb wurde für den ersten Reinigungsschritt ein Stufengradient entwickelt, der eine reproduzierbare Elution des Zielenzym sicherstellte, damit auf die zeitraubende Detektion der RNR in den Fraktionen jedes einzelnen Laufes verzichtet werden konnte. Die RNR wurde zuverlässig in den Fraktionen 10 – 17 eluiert (s. Abb. 3.6). Ein

erhöhter Durchbruch an R2F-Protein wurde dabei im Interesse einer schnelleren Reinigung toleriert.



**Abb. 3.7:** Analyse der Elutionsstufen der Anionenaustausch-Chromatographie; 1 Durchbruch; 2 15%-Stufe; 3 Bio-Rad-Standard; 4 35%-Stufe; 5 100%-Stufe

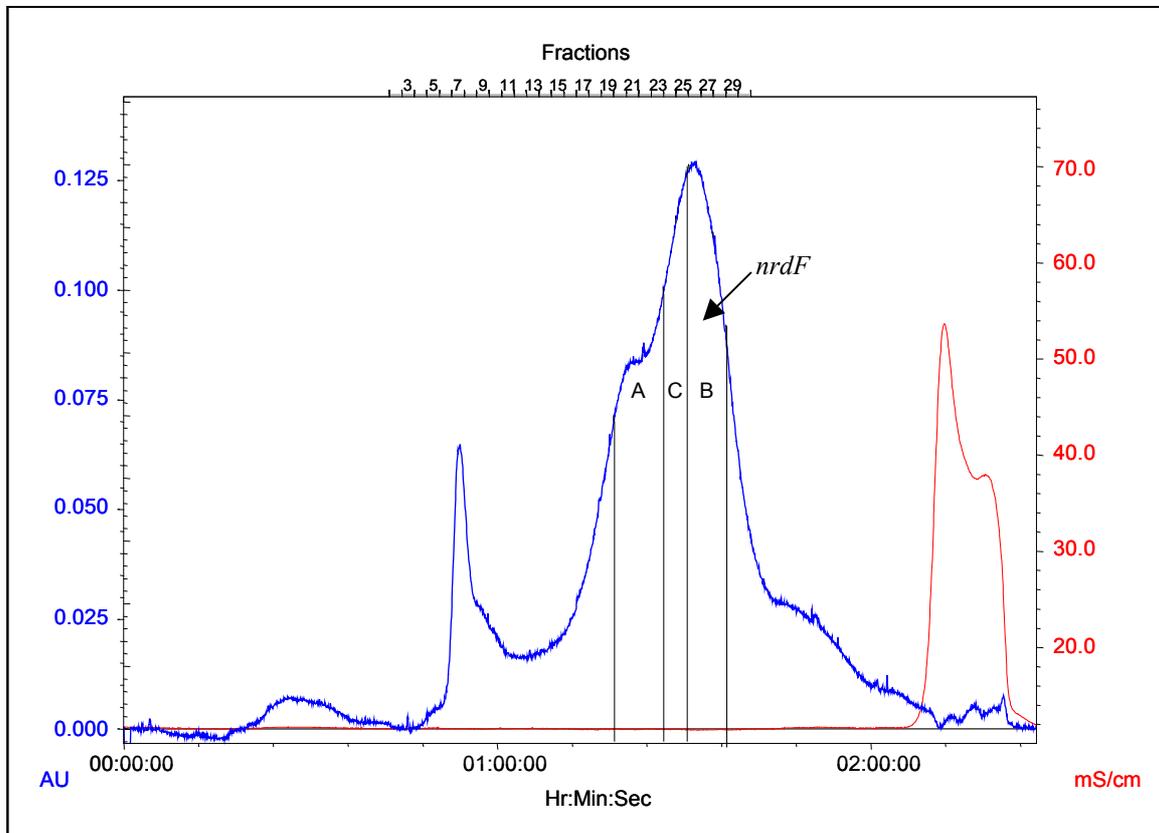
### 3.2.2 Reinigung an Superdex™ 200 nach UNOsphere®-Q

Für die zweite Reinigungsstufe erwies sich nach Vorarbeiten (nicht gezeigt) die Gelfiltration an Superdex 200 prep grade (Pharmacia, Freiburg) als optimale Methode für eine schonende Aufreinigung in kurzer Zeit. Dabei wurden leicht unterschiedliche Ergebnisse erhalten, je nach dem welches lasmid zur Expression verwendet wurde.

Mit Proben aus der Expression des *nrdF*-Gens in *C. ammoniagenes* pWCAX eluierte die RNR nach 76 mL (nicht gezeigt). Da das R2F-Protein in den Fraktionen 19 bis 21 mit Western-Blot und Aktivitätstest nachgewiesen werden konnte, wurden diese in einem Pool zusammengefasst und für die weitere spektroskopische Bearbeitung (s. Abb. 3.14 und 3.34) verwendet.

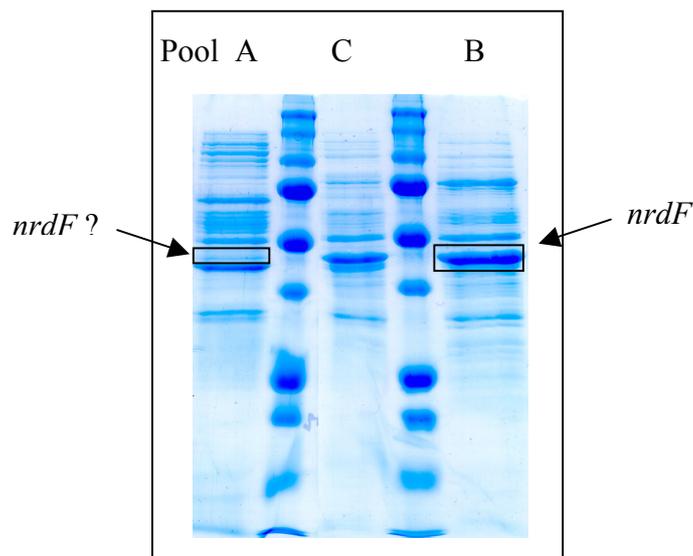
Nach Expression mit dem Plasmid pOCA2 änderte sich das Bild allerdings. Die noch nach der Reinigung an UNOsphere Q großen Mengen Reduktase, die im Western-Blot nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 3.7), fanden sich nicht in den Fraktionen 19 –21 (Elutionsbereich 76-82 mL) wieder, sondern hier konnten nur Restmengen nachgewiesen werden. Statt dessen zeigte der Western-Blot die erheblich größere Proteinmenge in den Fraktionen 24-28 (Elutionsbereich 86-94 mL, s. Abbildung 3.8). In der Proteinreinigung nach Expression mit pOCA2 wurden daher die Fraktionen 19-21 in Pool A und die Fraktionen 25-

27 in Pool B zusammengefasst (s. Abb. 3.8). Das Elutionsvolumen des Pools A entsprach einer Proteingröße von ca. 81 kDa, während für Pool B eine Proteingröße von ca. 37 kDa ermittelt werden konnte.



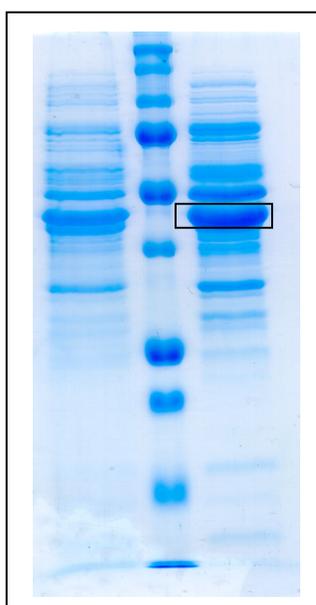
**Abb. 3.8:** Chromatogramm der Chromatographie an Superdex™ 200; (—) UV-Absorption bei 280 nm, (—) Leitfähigkeit

Die Analyse der Proteinfraktionen im SDS-Gel zeigte für Pool B eine starke Proteinbande, die in Pool A nur schwach vorhanden war (s. Abb. 3.9).



**Abb. 3.9:** SDS-PAGE der Reinigung an Superdex 200

Zur weiteren Absicherung sollte über eine *N*-terminale Aminosäure-Sequenzierung überprüft werden, ob die in Pool B sichtbare kräftige Bande tatsächlich das R2F-Protein der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* war. Dazu wurde eine Probe des Pool B nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf PVDF-Membran geblottet und die entsprechend einem parallel dazu angefärbten Blot sichtbare Bande ausgeschnitten und einer *N*-terminalen Sequenzierung unterzogen (s. Abbildung 3.10).



**Abb. 3.10:** SDS-PAGE für die *N*-terminale Aminosäuresequenzierung; Das gezeigte Gel ist dem für das Blotting verwendeten analog und wurde nach Coomassie gefärbt

Es ergab sich eine vollständige Übereinstimmung mit der Sequenz des *N*-Terminus des R2F-Proteins der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* (s. Abb. 3.11). Das Fehlen der Position 1 in der ermittelten Sequenz war dabei technisch bedingt.

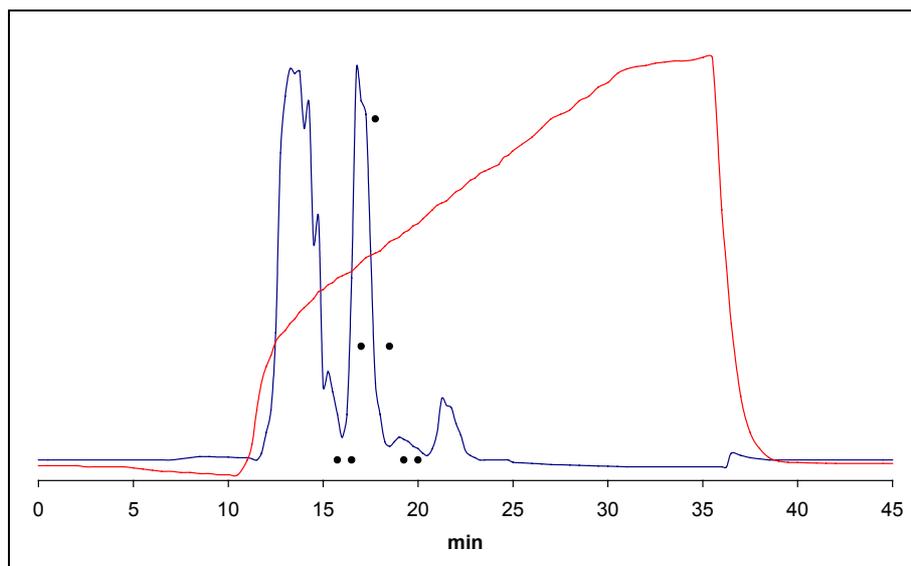
Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	M	S	N	E	Y	D	E	Y	I	A	N	H	T
2	-	S	N	E	Y	D	E	Y	I	A	N	H	T

1: Sequenz des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* (OEHLMANN 1998)  
 2: ermittelte Sequenz der Proteinbande aus Pool B

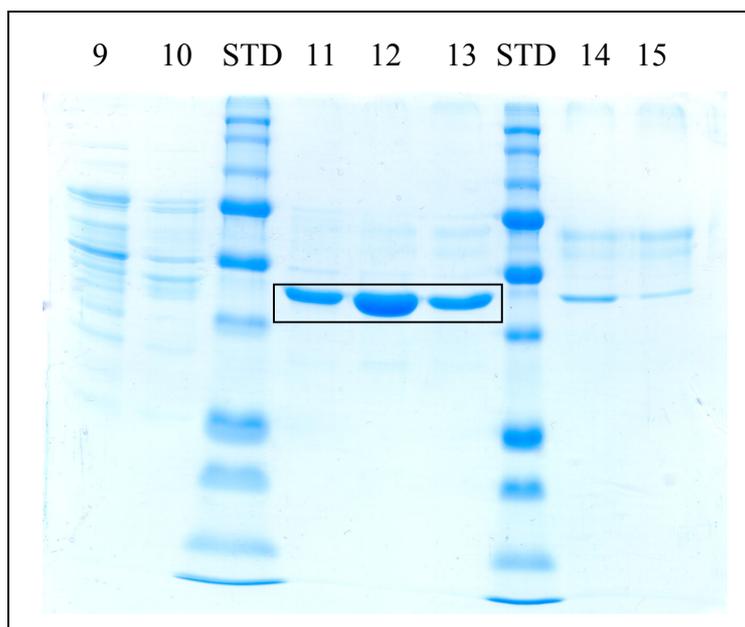
**Abb. 3.11:** Vergleich der N-terminalen Sequenzen des NrdF-Proteins aus *C. ammoniagenes*

### 3.2.3 Reinigung an Mono Q nach Superdex 200

Da die Reinigung an Mono Q für das R2F-Protein bereits erfolgreich Anwendung gefunden hatte (GRIEPENBURG, 1998; FIESCHI et al., 1998; HUQUE et al., 2000) wurde diese Methode als abschließender Reinigungsschritt erprobt. Bei der Wahl der Bedingungen wurde das Protokoll von Griepenburg genutzt. Allerdings wurde auf den Zusatz von Glycerin verzichtet, denn in aktuellen Berichten wurde der Zusatz von bereits 20 % Glycerin als ausreichend für erfolgreiche Versuche zum Austausch des Metallzentrums der RNR aus *E. coli* beschrieben (PIERCE et al., 2003). Es bestand daher die Befürchtung, dass bereits der Zusatz von 10% Glycerin (wie von GRIEPENBURG (1998) beschrieben) zum Verlust proteingebundenen Metalls führen könnte. Es wurden je Lauf 8 mL des Pool B der Reinigung an Superdex 200 (s. Abb. 3.8) auf die Säule gegeben, die Elution erfolgte hauptsächlich in den Fraktionen 11, 12 und 13, d. h. in einem Gesamtvolumen von 2 mL, so dass alleine hierdurch eine erhebliche Aufkonzentrierung der RNR erfolgte. Im SDS-Polyacrylamid-Gel waren nach Coomassie-Färbung nur noch wenige sehr schwache Banden anderer Proteine zu erkennen (s. Abbildung 3.13), so dass nun von einer Reinheit >98% ausgegangen werden konnte. Fraktion 12 enthielt die größte Menge an Reduktase, hier konnte eine Anreicherung der Radikalkonzentration um Faktor 6,5 gegenüber dem vorhergehenden Reinigungsschritt festgestellt werden.



**Abb. 3.12:** Chromatogramm der Reinigung an Mono Q HR 5/5; (—) UV-Absorption bei 280 nm, (—) Leitfähigkeit, (●) Aktivität in den Fraktionen 9 – 15



**Abb. 3.13:** SDS-Gel der Reinigung an Mono Q HR 5/5, Fraktionen 9 – 15

Die in den Fraktionen 11 – 13 sichtbaren Banden konnten mittels Western-Blot als das R2F-Protein identifiziert werden.

Das Proteinmaterial der Fraktion 12 wurde um den Faktor 2,5 aufkonzentriert und für die ESR-spektroskopischen Untersuchungen verwendet (vgl. Kap. 3.4 und 3.5).

### 3.2.4 Nachweis der Mangan-Anreicherung

Durch Quantifizierung der Eisen- und Mangan-Gehalte der Proben wurde eine Anreicherung von Mangan im Verlauf der Proteinreinigung nachgewiesen. Vor allem eine Trennung von Eisen und Mangan in unterschiedliche Fraktionen im Verlauf der Gelfiltration wurde erkennbar. Im Pool B, in dem die Hauptmenge der RNR nachgewiesen werden konnte (s. Kapitel 3.2.2), fand sich eine hohe Mangananreicherung, während Eisen in den Fraktionen des Pool A angereichert wurde. In Fraktion 12 nach Mono Q betrug das Verhältnis von Mangan zu Eisen fast 30:1 (s. Abb. 3.14).

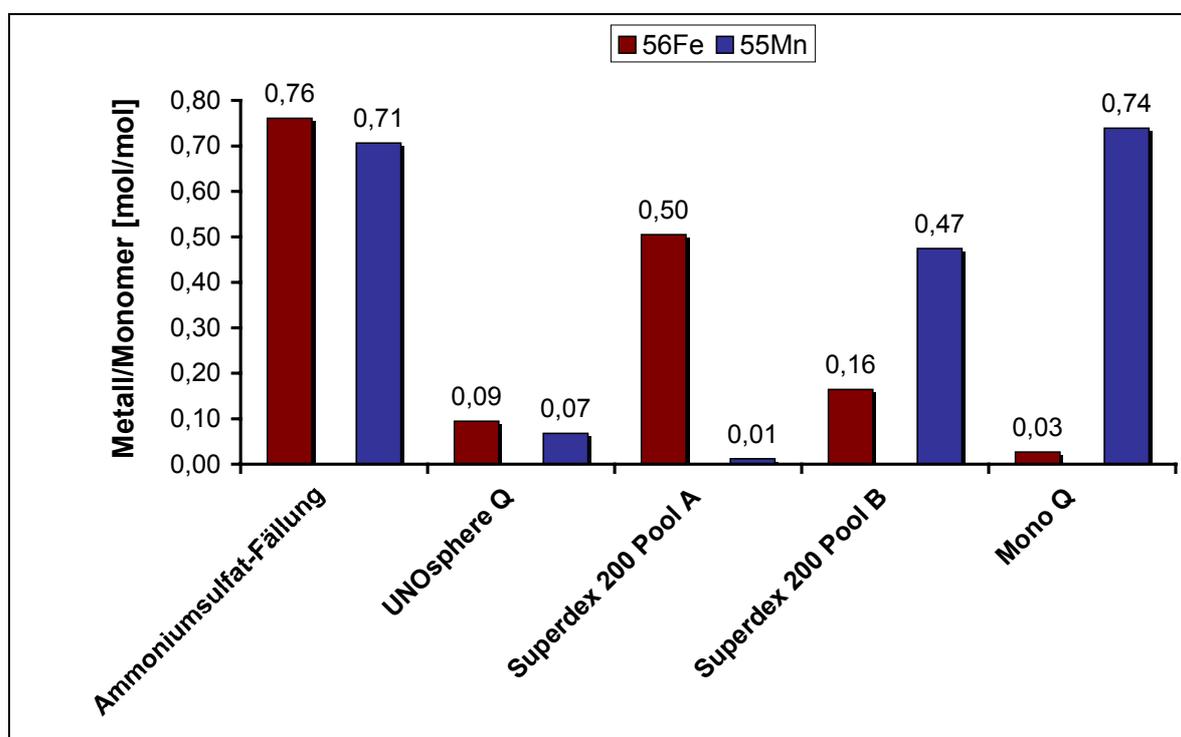


Abb. 3.14: Ergebnis der Metallbestimmung mit ICP-MS<sup>1</sup>; für die Probe Mono Q wurde Mn durch Quantifizierung des X-Band-ESR-Signals (s. Abb. 3.28) und Fe colorimetrisch bestimmt

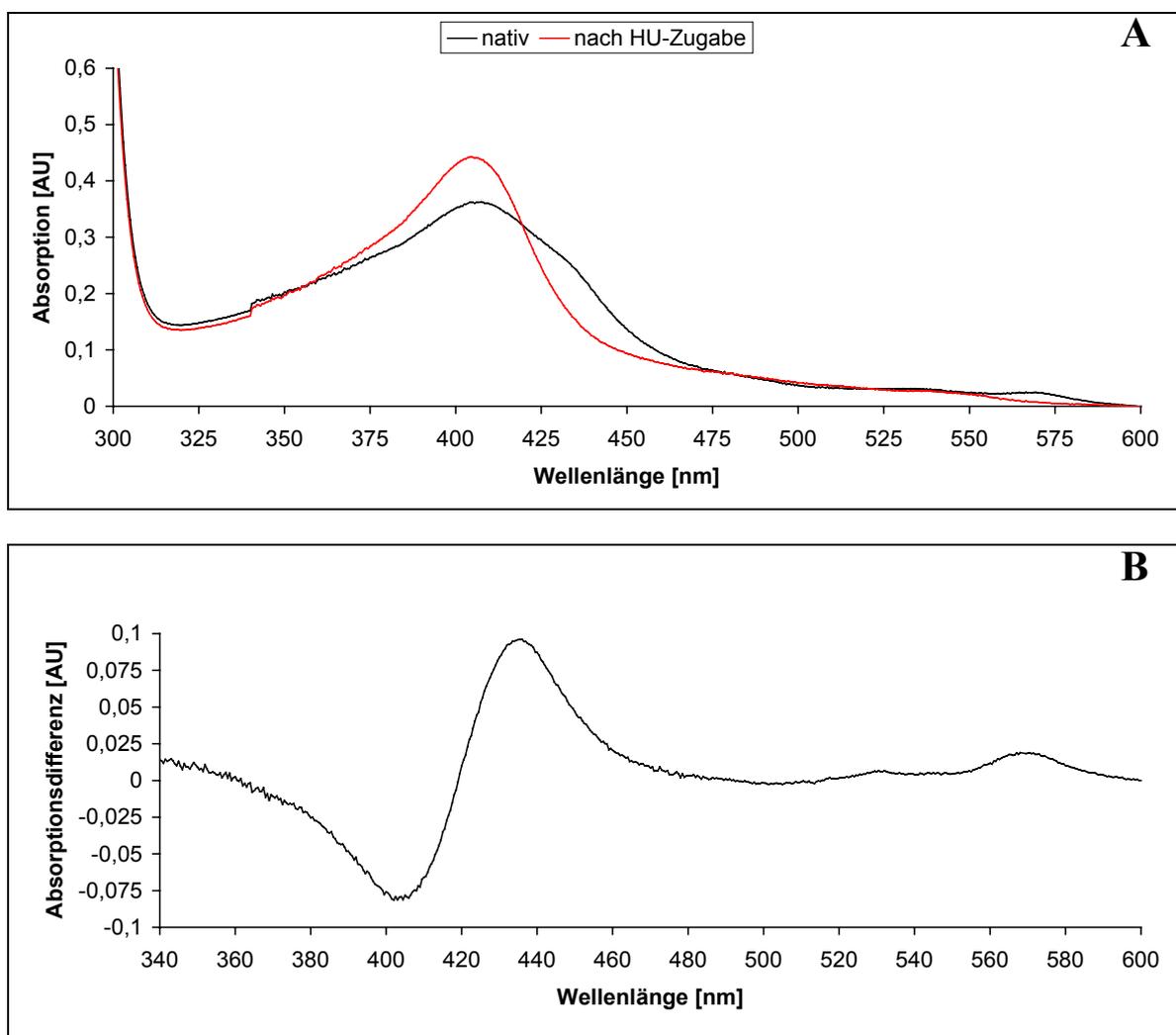
Eine Anreicherung der Mn-RNR konnte also auch auf dem Wege der Metallanalyse nachvollzogen werden.

### 3.3 UV/VIS-spektroskopischer Nachweis des Tyrosyl-Radikals

Ein typisches UV/VIS-Signal, wie es für Klasse I RNR gefunden wurde (PETERSSON, 1980; GRÄSLUND, 1996), konnte nicht nachgewiesen werden. Aus der Expression in C.

<sup>1</sup> Die Bestimmung mit ICP-MS und AAS erfolgte im Institut für Analytische Chemie der Universität Hannover (KNOBBE 2003)

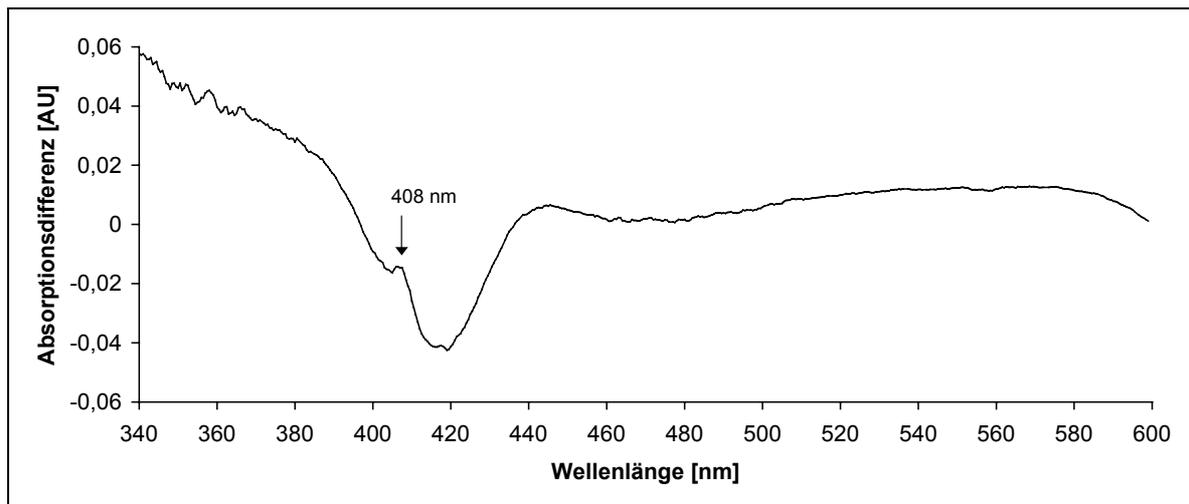
*ammoniagenes* pWCAX wurde das bereits von GRIEPENBURG (1998) beschriebene UV/VIS-Signal mit höherer Intensität wiedergefunden. Bestimmend im Spektrum war ein intensives und breites Absorptionssignal bei 406 nm mit einer Schulter bei 437 nm. Die Zugabe des Radikalfängers Hydroxyharnstoff (HU) bewirkte ein Verschwinden der Schulter bei 437 nm und eine Signalverstärkung bei 406 nm, im Differenzspektrum deutlich durch ein Positiv-Signal bei 437 nm und ein Negativsignal bei 406 nm zu erkennen (s. Abb. 3.15 B). Das Signal bei 437 nm wurde aufgrund seiner HU-Sensitivität und der unmittelbaren Zuordnung zu Enzymfraktionen mit Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität zunächst als das Radikal-Signal der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* angesehen.



**Abb. 3.15:** UV/VIS Absorptionsspektrum (A) und daraus resultierendes Differenzspektrum (B) der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression in *C. ammoniagenes* pWCAX

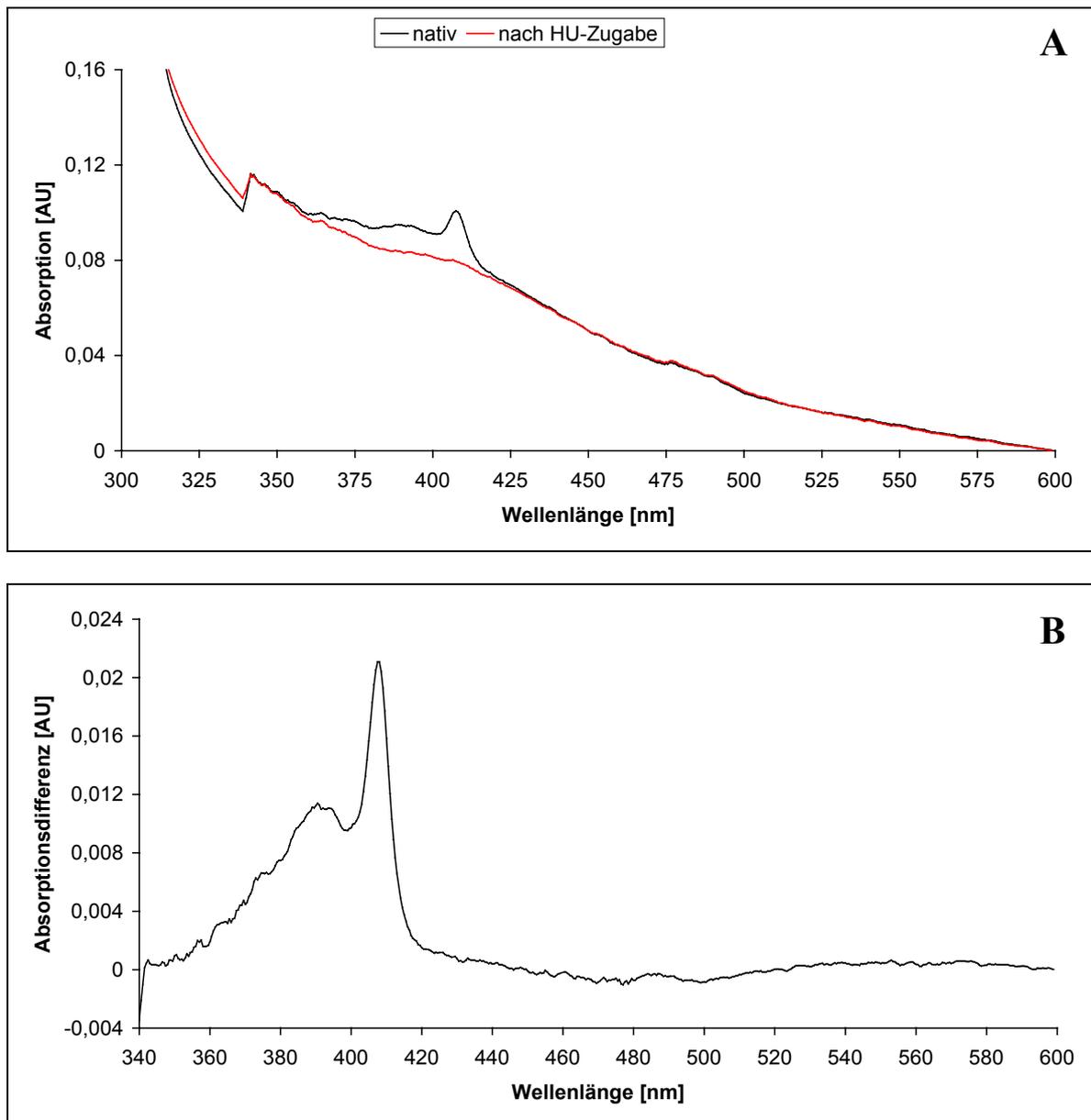
Eine Korrelation der Intensität dieses UV/VIS-Signals konnte jedoch weder mit der Intensität des X-Band-ESR-Signals, noch mit der Enzymaktivität hergestellt werden. Deshalb wurde die Charakterisierung der Mn-RNR nach Expression in *C. ammoniagenes* pWCAX aufgegeben und eine neue Expression etabliert.

Nach Expression mit dem Vektor pOCA2 konnte jedoch im Differenzspektrum nach HU-Zugabe ein zusätzliches Signal bei 408 nm beobachtet werden (s. Markierung in Abb. 3.16).



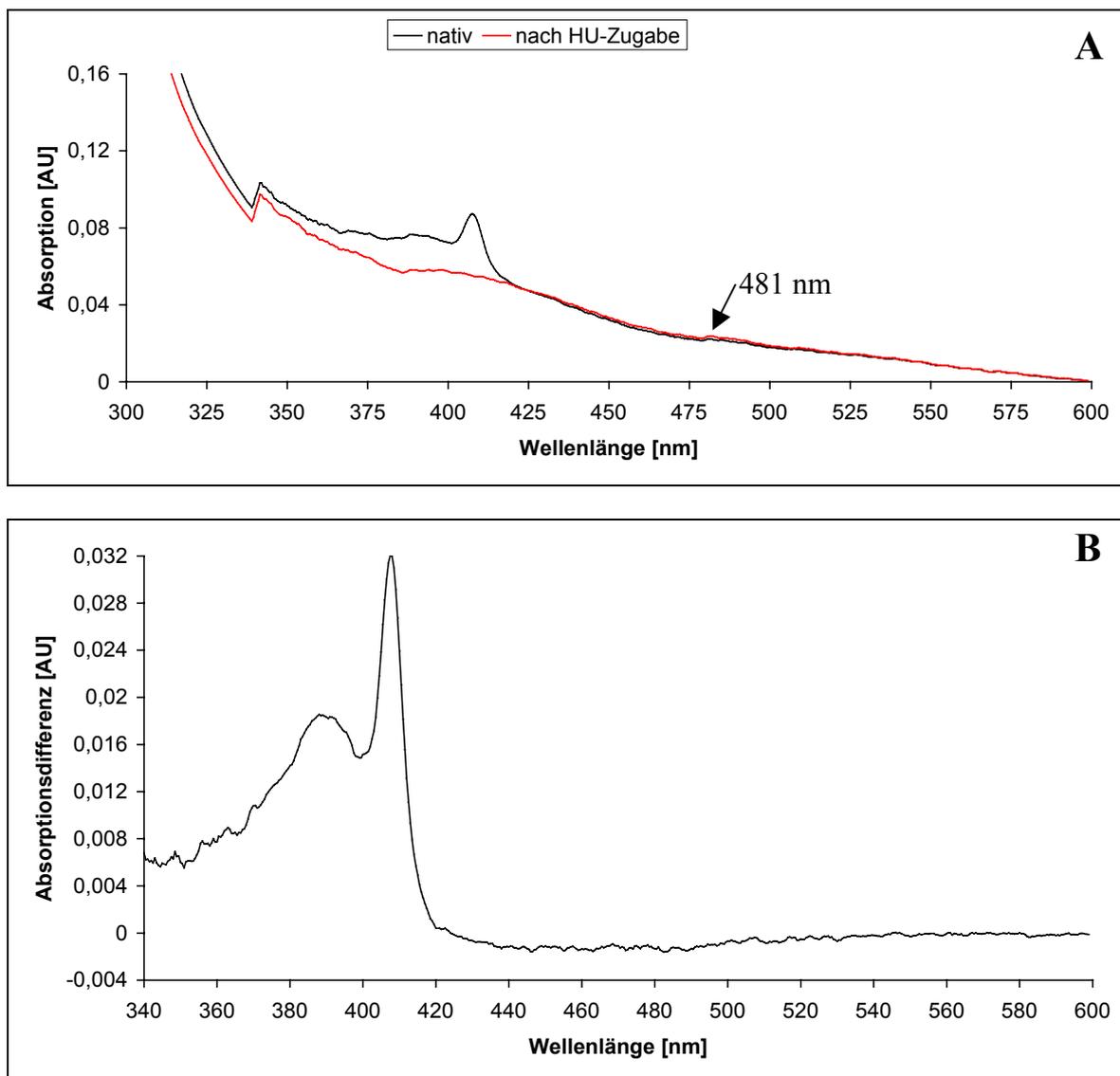
**Abb. 3.16:** UV/VIS-Differenzspektrum teilgereinigter RNR nach Zugabe von HU: Protein-Rohextrakt aus *C. ammoniagenes* pOCA2 nach Ammoniumsulfat-Fällung (40 – 60%)

Nach fraktionierender Ammoniumsulfat-Fällung und Reinigung an UNOSphere-Q trat dieses neue Signal noch zusammen mit dem bisher beobachteten Signal auf, im Verlauf der Gelfiltration an Superdex 200 wurden die beiden Signale jedoch getrennt. Das Signal bei 437 nm wurde in Pool A wiedergefunden, während Pool B (s. Ab. 3.8) ein scharfes und intensives Signal bei 408 nm zeigte (s. Abb. 3.17), das durch HU gelöscht wurde. Sowohl die Lage bei 408 nm, als auch die Breite von ca. 10 nm entsprachen den charakteristischen Eigenschaften, die bereits für Tyrosyl-Radikale von Ribonucleotid-Reduktasen berichtet wurden (ORMÖ et al., 1994; JORDAN et al., 1994).



**Abb. 3.17:** UV/VIS Absorptionsspektrum (A) und daraus resultierendes Differenzspektrum (B) der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression mit pOCA2 und Reinigung an Superdex 200 (Pool B)

Die nachfolgende Reinigung an Mono Q erbrachte zwar eine deutlich erhöhte Reinheit des Proteins, was auch an der ruhigeren Basislinie im Bereich zwischen 440 und 600 nm des Differenzspektrums zu sehen war, das UV/VIS-Spektrum blieb aber weitgehend unverändert (s. Abb. 3.18).



**Abb. 3.18:** Reinigung an Mono Q (Fraktion 12): UV/VIS Differenzspektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression mit pOCA2

Hier lag also mit weitestgehender Sicherheit das Signal eines den Klasse I RNR analogen Tyrosyl-Radikals der Mn-RNR vor. Anders als bei Enzymen der Klasse I konnten jedoch keine breiten Absorptionsbanden bei 325 und 370 nm beobachtet werden, die als Signale des  $\mu$ -oxo-verbrückten zweikernigen Eisenzentrums angesehen werden (JORDAN et al. 1994).

Anhand des Signals bei 408 nm konnte die Radikalkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden. Entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für die Absorption von Licht:

$$I = I_o \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$$

---

Dabei ist  $\varepsilon$  der molare Extinktionskoeffizient,  $c$  die Konzentration der Probe und  $d$  die Weglänge des Lichtes durch die Probe. Ferner ist  $I$  die mit Probe gemessene Lichtintensität und  $I_0$  die Lichtintensität ohne Probe. Durch Umformung erhält man:

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Weitere Umformung ergibt:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ist eine Stoffkonstante, d. h. ein für die beobachtete Spezies feststehender Wert, der experimentell ermittelt wird. Die Schichtdicke  $d$  wird durch die Messküvette bestimmt und beträgt normalerweise 1 cm. Die Extinktion  $E$  ist die Messgröße des UV-Spektrometers. Bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten kann man also aus der gemessenen Signalintensität die Konzentration der beobachteten Spezies berechnen.

Zur Berechnung der Radikalkonzentration aus dem beobachteten Radikalsignal wurde der von HUQUE et al. (2000) für das Tyrosyl-Radikal der RNR aus *C. ammoniagenes* ermittelte Wert von  $\varepsilon = 3400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  eingesetzt. Die Signalintensität wurde bestimmt, indem die Signalhöhe über einer theoretischen Basislinie ausgemessen wurde. Als theoretische Basislinie wurde eine Gerade zwischen den Messwerten bei 402 und 414 nm eingezeichnet. Der so berechnete Radikalgehalt einzelner Enzymproben konnte durch Quantifizierung des ESR-Signals über den Vergleich mit einem definierten Kupferstandard jeweils bestätigt werden. Aus der Übereinstimmung der Werte wurde geschlossen, dass der verwendete molare Extinktionskoeffizient für das beobachtete Signal korrekt war. Dieser Wert wurde nachfolgend für Berechnungen der Radikalkonzentration verwendet.

Anhand dieser Berechnung konnte folgende Anreicherung des Radikals in der Probe im Verlauf der Reinigung festgestellt werden:

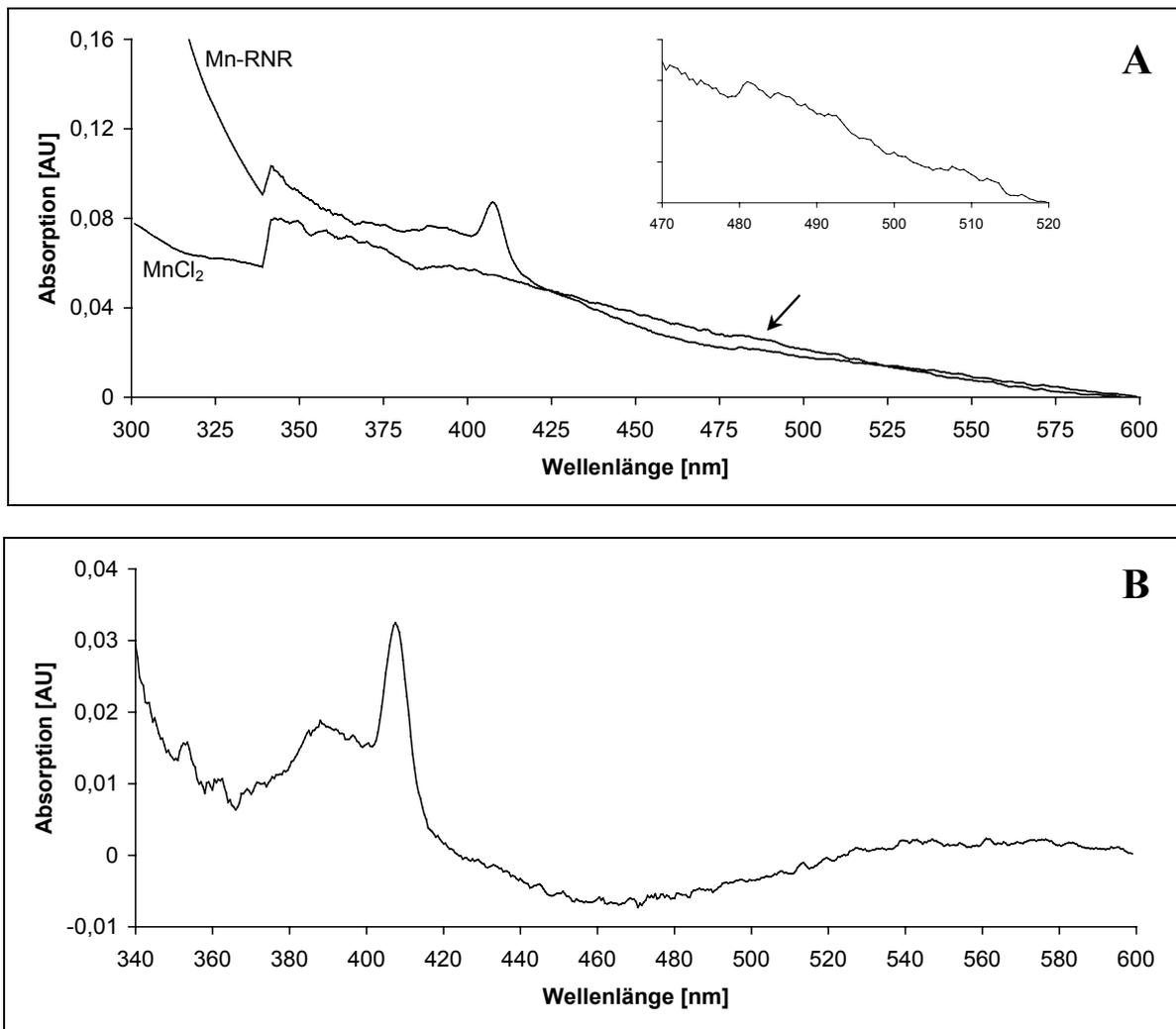
---

**Tab. 3.1:** Anreicherung des Radikals der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes*; AS: Ammoniumsulfat-Fällung; QS: Chromatographie an UNOsphere-Q; S: Chromatographie an Superdex 200; M: Chromatographie an Mono Q

	Volumen [mL]	Gesamt-Radikalgehalt [nmol]	Wiederfindung [%]	Protein-konzentration [mg/mL]	spez. Radikalgehalt [mol/mol]	Anreicherung
AS	40	134	100	30	0,004	1
QS	6,5	30,6	22,8	10	0,017	4,25
S	40	17,4	13,0	0,5	0,03	7,5
M	10,05	16,1	12,0	0,25	0,24	60

Die Anreicherung lag mit Faktor 60 deutlich unter den für die Reinigung aus dem Wildty-Stamm berichteten Werten (WILLING, 1986; BLASCZYK, 1994; GRIEPENBURG, 1998). Der Grund war vor allem in der, bezogen auf den Gesamt-Radikalgehalt, geringen Wiederfindung nach dem ersten Reinigungsschritt zu suchen, aber auch in der Tatsache, dass aufgrund der hohen Expressionsstärke eine so hohe Anreicherung gar nicht mehr notwendig war, um weitgehend sauberes Protein zu erhalten.

Beim Vergleich der Spektren weckte eine schwache, nicht HU-sensitive Bande bei 481 nm im Absorptionsspektrum der Mn-RNR das Interesse (s. Abb. 3.18 A). Um zu klären, ob diese einen Hinweis auf ein Mangan-Zentrum darstellen könnten, wurde eine 1 mM Lösung von  $MnCl_2$  in Standardpuffer gemessen und mit dem Signal der Mn-RNR verglichen (s. Abb. 3.19 A). Das schwache Absorptionssignal bei 481 nm war auch im Spektrum der  $MnCl_2$ -Lösung zu erkennen, so dass die Bande im Absorptionsspektrum als Signal von Mn(II) gedeutet werden konnte.



**Abb. 3.19:** Vergleich der Absorptionsspektren (A) und Differenzspektrum (B) der Mn-RNR und einer 1 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung; der Pfeil markiert die schwache Bande bei 481 nm

Das Differenzspektrum aus den Absorptionsspektren der Mn-RNR und der MnCl<sub>2</sub>-Lösung (Abb. 3.19 B) zeigte große Ähnlichkeit mit dem Differenzspektrum der Mn-RNR nach HU-Behandlung (Abb. 3.18 B), so dass angenommen werden konnte, dass das UV/VIS-Spektrum nach Reinigung an Mono-Q im Wesentlichen die Absorptionssignale des stabilen Radikals und von Mangan(II) zeigte. Diese Ergebnisse konnten als Hinweis auf das Vorliegen eines Manganzentrums in der RNR aus *C. ammoniagenes* angesehen werden.

### 3.4 ESR-spektroskopischer Nachweis des Tyrosyl-Radikals

Da der ESR-Spektroskopie zentrale Bedeutung in der Charakterisierung der Mn-RNR zukommt, sollen einige der für die Beurteilung der Spektren wichtigen Aspekte kurz erläutert werden.

---

Der Spin, die vierte Quantenzahl des Elektrons, ist eine rein magnetische Eigenschaft und kann nur bei Vorhandensein eines Magnetfeldes gemessen werden. Ein ungepaartes Elektron kann in zwei Spinzuständen vorliegen. Durch das Magnetfeld wird das Energieniveau des Spinzustandes, der in Richtung des Magnetfeldes zeigt, erniedrigt und das Energieniveau des anderen Spinzustandes erhöht, so dass es zu Übergängen zwischen diesen beiden Energieniveaus, verbunden mit Absorption von Mikrowellenstrahlung, kommen kann. Die Frequenz der absorbierten Strahlung ist abhängig vom vorhandenen Magnetfeld, das sich zusammensetzt aus dem angelegten Magnetfeld plus eventuell vorhandener innerer Magnetfelder an der Position des Elektrons. Die charakteristischen Größen einer paramagnetischen Spezies sind der g-Wert, das Verhältnis aus Frequenz und Magnetfeld, und Wechselwirkungen mit seiner näheren Umgebung, die im Folgenden beschrieben werden.

### 1. Die Zeemann-Aufspaltung

Die Zeemann Aufspaltung definiert den oder die g-Wert(e) der paramagnetischen Spezies. Der g-Wert eines freien Elektrons ist 2.0022. In paramagnetischen Spezies befindet sich das ungepaarte Elektron aber in Molekül- oder Atomorbitalen. Diese besitzen eine räumliche Symmetrie, die sich dergestalt auf den Elektronenspin auswirkt, dass bis zu drei g-Werte pro ungepaartem Elektron gemessen werden können. Dies ist z. B. im Tyrosylradikal der RNRs der Fall. Hier sitzt das ungepaarte Elektron in einem  $\pi$ -Orbital des aromatischen Systems und ist über den C-Ring und den Sauerstoff delokalisiert. Das Orbital hat recht unterschiedliche Ausdehnungen in die drei Raumrichtungen und daher können drei g-Werte (bei sehr hohen Magnetfeldern) gemessen werden (s. Tabelle 3.2). Ein sehr symmetrischer Fall ist dagegen high-spin Mn(II), hier befinden sich fünf ungepaarte Elektronen in den fünf d-Orbitalen des Metalls und erzeugen dadurch eine hoch-symmetrische Umgebung, so dass nur ein g-Wert bei 2.00 gemessen wird.

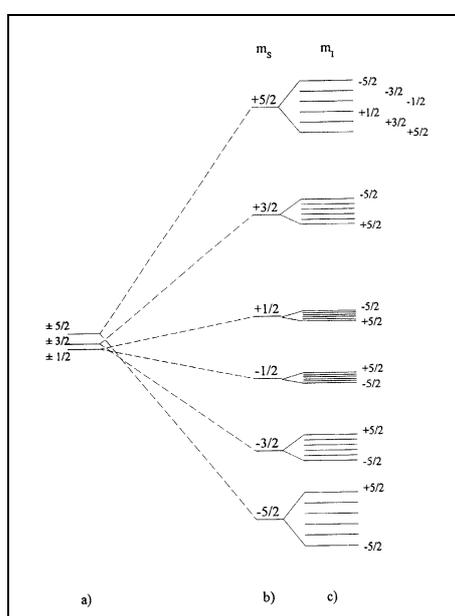
### 2. Die Nullfeldaufspaltung

Die Nullfeldaufspaltung existiert nur in paramagnetischen Spezies mit mehr als einem ungepaartem Elektron, also nicht im Tyrosylradikal, aber im high-spin Mn(II). Durch die weiteren ungepaarten Elektronen wird am betrachteten ungepaarten Elektron ein inneres Magnetfeld erzeugt, dass zu einer Aufspaltung der Energieniveaus bereits ohne äusseres angelegtes Magnetfeld führt. Diese Nullfeldaufspaltung ist zuvorderst abhängig vom Element (Metall) der paramagnetischen Spezies, aber auch um so größer je unsymmetrischer die (Liganden-)Umgebung dieser Spezies ist.

### 3. Die (Super)Hyperfeinaufspaltung

---

Zwischen der Superhyperfein- und der Hyperfeinaufspaltung, der Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem Kernspin der paramagnetischen Spezies selbst und den Kernspins benachbarter Atome, wird selten unterschieden, da sie sich im ESR-Spektrum nicht voneinander unterscheiden lassen. Sie führen allerdings beide zu sogenannten Fingerabdrücken der paramagnetischen Spezies, z. B. die Aufspaltungen durch die am  $C_\beta$  sitzenden Protonen ( $\beta$ -Protonen) und zwei der Ringprotonen im Tyrosylradikal (s. Tabelle 3.2) oder, besonders charakteristisch, das Sechs-Linien-Spektrums des Mn durch den eigenen Kernspin. Für das Beispiel des  $Mn^{2+}$ -Ions zeigt Abbildung 3.20, wie aus dem Zusammenspiel der verschiedenen Aufspaltungen 30 erlaubte ESR-Übergänge resultieren.



**Abb. 3.20:** Schematische Darstellung der Elektronenspin-Energieniveaus für ein  $Mn(II)$ -System mit nicht kubischer Symmetrie im Null- und Hochfeld (REED 1984)

- a) Ohne externes Magnetfeld (ZFS)
- b) Mit externem Magnetfeld (Zeemann-Aufspaltung)
- c) Mit Hyperfeinaufspaltung

#### 4. Spin-Kopplung

Existieren zwei paramagnetische Spezies in enger räumlicher Nachbarschaft ( $< 10 \text{ \AA}$ ) beeinflussen sich die Spinzustände in den beiden Spezies gegenseitig. Eine dipolare Wechselwirkung durch den Raum ist immer vorhanden, reicht aber nicht besonders weit ( $1/r^3$ ). Sind die beiden Spezies direkt oder über gemeinsame Liganden miteinander verbunden, sind die Kopplungen stärker, nehmen aber mit zunehmender Zahl von Zwischenatomen schnell ab. So sind z. B. die beiden high-spin  $Fe(III)$  Atome in den Klasse I

---

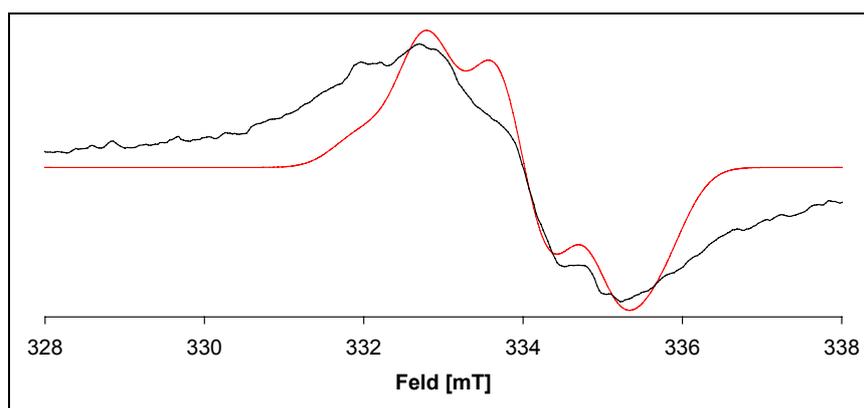
RNRs über eine  $\mu$ -oxo-Brücke (1 Atom) so stark gekoppelt, dass sie einen diamagnetischen Grundzustand einnehmen. In den reduzierten Formen sind die beiden low-spin Fe(II) über zwei Carboxylat-Brücken (3 Atome) miteinander verbunden und zeigen nur eine sehr schwache Kopplung (s. Abb. 1.8).

Der ESR-spektroskopische Nachweis eines stabilen organischen Radikals im R2F-Protein der RNR aus *C. ammoniagenes* war bereits erfolgt (GRIEPENBURG, 1998). Die Signalintensität war jedoch noch zu gering für die Analyse von Hyperfeinaufspaltungen. Ebenso hatten die Messungen im Q-Band Hinweise auf die Existenz eines mononuclearen Mangan(II)-Zentrums ergeben. Auch hier war die Signalintensität nicht ausreichend, um Aufspaltungsmuster zuverlässig analysieren zu können, die die Zugehörigkeit des Mn-Signals zum Protein hätten belegen können. Ebenso fehlte noch ein Hinweis darauf, ob eine Wechselwirkung zwischen dem Radikal und dem Mangan-Zentrum existierte, durch die sich hätte zeigen lassen, dass die Radikal-Generierung durch das Manganzentrum erfolgt und nicht, wie von Huque et al. (2000) postuliert, allein durch Mindermengen von Eisen im Protein ermöglicht wurde.

Nach Expression des *nrdF*-Gens in *C. ammoniagenes* pWCAX zeigte sich im X-Band ESR-Spektrum ein klares Singulett-Signal bei  $g = 2,0044$ . Diese Verschiebung entsprach ziemlich genau der eines freien Tyrosyl-Radikals und entsprach früheren Beobachtungen (GRIEPENBURG, 1998). Da die Spinkonzentration der Präparation immer noch nicht ausreichte, wurde auch in dieser Arbeit keine Feinaufspaltung des Signals beobachtet.

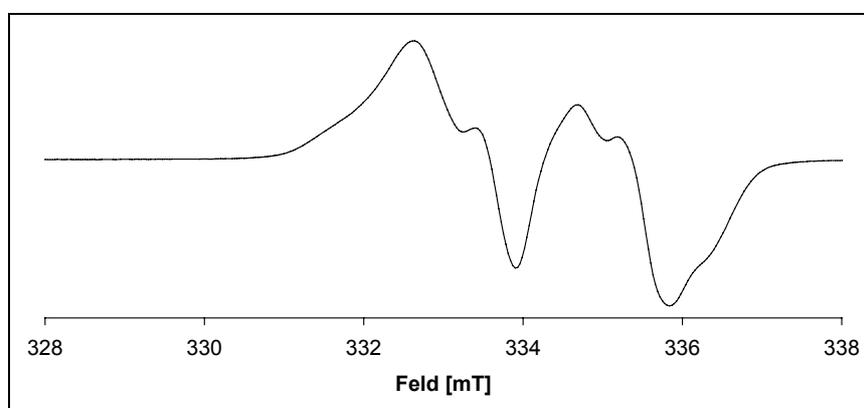
Erst die Expression in *C. ammoniagenes* pOCA2 erbrachte genügend Proteinmaterial für eine genauere Untersuchung des Signals. Messungen bei 80 K zeigten ein scharfes Signal bei  $g = 2,0044$  mit einer Breite von 2,48 mT. Dieses Signal zeigte eine Hyperfeinstruktur, die mit der von Klasse Ib-Reduktasen vergleichbar war (Abbildung 3.21). Durch eine Simulation des Spektrums konnte gezeigt werden, dass die der Simulation zugrunde liegenden Daten im Bereich der Werte von Klasse Ib-Reduktasen vergleichbar waren, wie ein Vergleich der zugrundeliegenden Werte mit experimentellen Daten repräsentativer Klasse Ib-Reduktasen zeigt (Tabelle 3.2). Einzig eine Verbreiterung des Signals sowohl zu tiefem wie zu hohem Feld konnte durch die Simulation nicht erfasst werden, wofür sich zunächst keine schlüssige Erklärung bot. Durch das in der Folge bei tieferen Temperaturen Auftreten des Signals einer Spinkopplung (s. Kap. 3.5.1) war die Signalverbreiterung bei 80 K jedoch als verbleibender Einfluß dieser Spinkopplung zu deuten.

---



**Abb. 3.21:** X-Band Spektrum nach Expression mit pOCA2, (—) gemessenes Signal und (—) Simulation; Aufnahmebedingungen: 80 K, 0,4 mW, 1,6 G Modulationsamplitude, 9 scans; Spinkonzentration 6,5  $\mu$ M

Deutlich erkennbar war auch der Unterschied zum Tyrosyl-Radikal des *E. coli* R2-Proteins (NrdB, s. Abbildung 3.22), das ebenfalls bei 80 K als Standard vermessen wurde und einen Vergleich zu Klasse Ia-Reduktasen bot. Damit war die Abgrenzung zu den RNR der Klasse Ia deutlich und anhand der Übereinstimmung der Simulationsdaten die erartete Verwandtschaft zu den RNR der Klasse Ib erwiesen. Infolgedessen konnte für die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* die Existenz eines Tyrosyl-Radikals als erwiesen betrachtet werden.



**Abb. 3.22:** *E. coli* R2<sup>2</sup>; Aufnahmebedingungen: 80 K, 0,0125 mW, 1,6 G Modulationsamplitude, 1 scan

<sup>2</sup> Die Probe wurde freundlicherweise von Dr. B. Katterle zur Verfügung gestellt

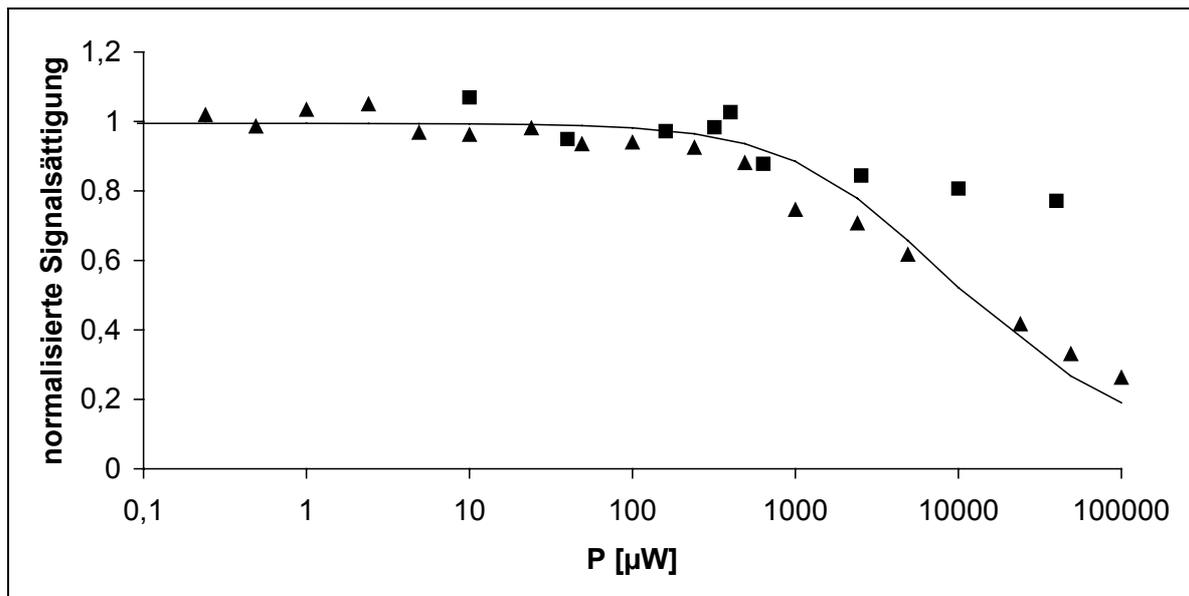
**Tab. 3.2 :** Komponenten des  $g$ -Tensors und Hyperfein-Kopplungswerte der Klasse Ib-Ribonucleotid-Reduktasen aus *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* im Vergleich zu den Simulationsdaten für das R2F-Protein aus *C. ammoniagenes*; Vergleichswerte aus: ALLARD et al. 1996

	<i>E. coli</i> R2F	<i>S. typhimurium</i> R2F	<i>C. ammoniagenes</i>
$g_x$	2,00912	2,0089	2,0090
$g_y$	2,00457	2,0043	2,0044
$g_z$	2,00225	2,0021	2,0022
$A_{3,5x}$	-9,6	-11,5	-10,0
$A_{3,5y}$	-2,8	-2,5	-3,2
$A_{3,5z}$	-7,0	-7,1	-6,6
$A_{\beta 1x}$	19,6	10,5	11,3

### 3.4.1 Mikrowellen-Sättigung des Radikal-Signals

Das Tyrosyl-Radikal in Klasse I-Ribonucleotid-Reduktasen wie den Fe-RNR aus *E. coli* oder *S. typhimurium* steht in Wechselwirkung mit dem Metallzentrum der kleinen Untereinheit (GRÄSLUND et al. 1982, REICHARD & EHRENBERG, 1983) und zeigt mit steigender Leistung der Mikrowelleneinstrahlung eine charakteristische Sättigung des Signals. Dementsprechend ist der Wert der halbmaximalen Sättigung ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung des Radikals mit dem Metallzentrum.

Überraschender Weise war das Radikal-Signal der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* pOCA2 bei 80 K nur schwer zu sättigen, so dass ein Wert für die halbmaximale Sättigung nicht unmittelbar zu bestimmen war. Der Vergleich mit der Fe-RNR aus *S. typhimurium* (s. Abb. 3.23) zeigte den Unterschied zu einer typischen Klasse Ib-RNR. Dies sprach für eine sehr enge Kopplung des Radikals der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* mit dem benachbarten Metallzentrum.

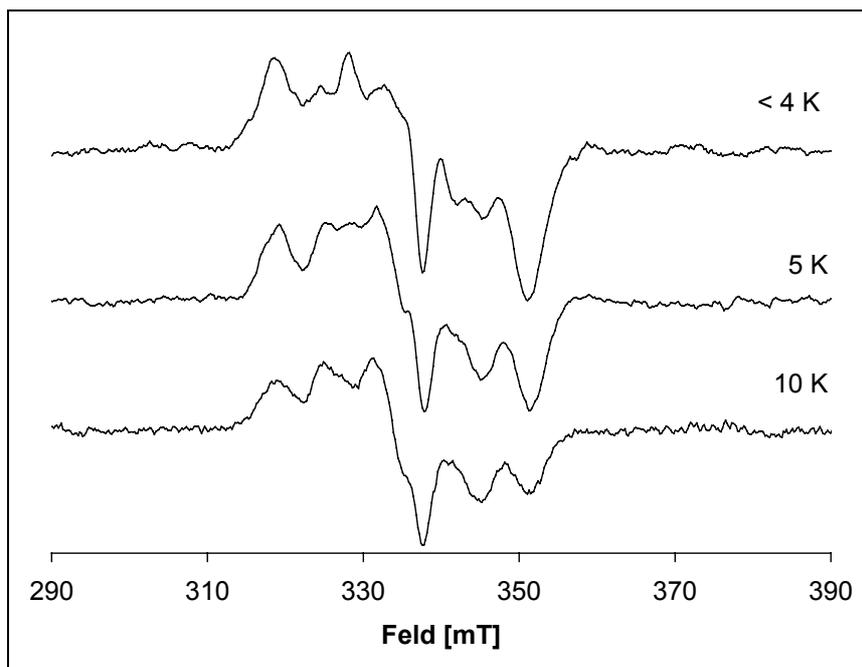


**Abb. 3.23:** Mikrowellensättigung der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* pOCA2 (■) im Vergleich zur Fe-RNR aus *S. typhimurium* (▲) (Vergleichsdaten mit freundlicher Genehmigung von P. P. Schmidt wiedergegeben)

### 3.5 Charakterisierung des neuen ESR-Kopplungssignals

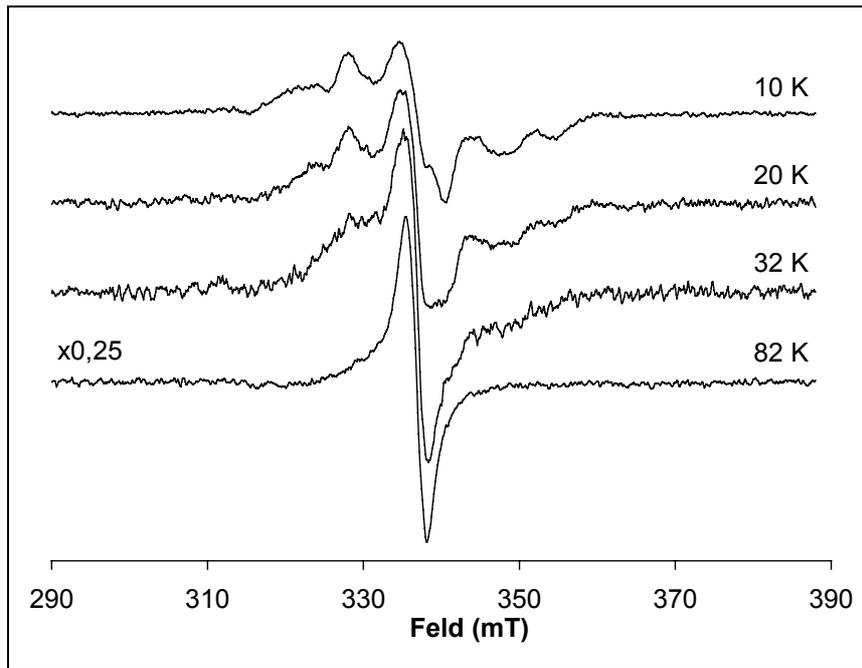
#### 3.5.1 X-Band-Messungen

Die obigen Messungen zur Charakterisierung des Tyrosyl-Radikals waren bei 80 K durchgeführt. Wurde die Messtemperatur jedoch unter 30 K gesenkt, so zeigte das Spektrum (s. Abb. 3.21) eine zunehmende Breite und zusätzliche Signale. Je weiter die Temperatur gesenkt wurde, desto deutlicher trat das Muster eines gekoppelten Spinsystems zutage, dessen schwer zu interpretierendes Muster eine Breite von 43 mT und ungleichmäßige Linienabstände zeigte (s. Abbildung 3.24). Ein solches Signal stellt eine völlige Neuheit dar, da gekoppelte Spinsysteme für Ribonucleotid-Reduktasen bisher nicht nachgewiesen werden konnten.



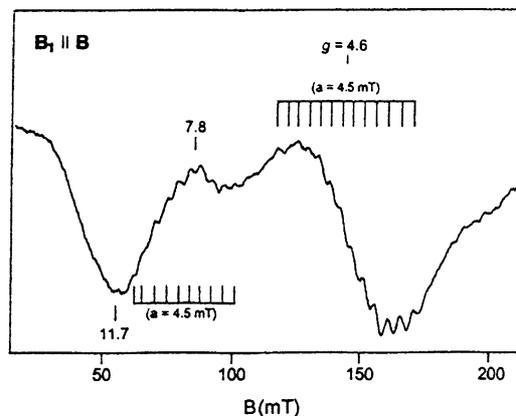
**Abb. 3.24:** X-Band Spektren des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* pOCA2 bei unterschiedlichen Temperaturen; Aufnahmebedingungen: Temperatur wie angegeben, 0,2 mW, 10 G Modulationsamplitude, 5 scans

Das Signal wies eine eindeutige Temperaturabhängigkeit auch über einen großen Temperaturbereich auf (s. Abb. 3.25). Für alle Temperaturen im Bereich von 10 bis 80 K ergab die Doppelintegration des Signals Werte vergleichbarer Größenordnung. Dies zeigte, dass das Signal bei allen Temperaturen annähernd dieselbe Intensität besaß und durch das Kopplungsmuster lediglich stark verbreitert wurde. Damit konnte angenommen werden, dass es sich bei dem Kopplungssignal um eine Kopplung des Tyrosyl-Radikals mit einer benachbarten paramagnetischen Spezies, wahrscheinlich dem Metallzentrum, handelte. Scans über die gesamte spektrale Breite ergaben keine Ergebnisse, die Hinweise auf die Existenz eines mehrkernigen Metallzentrums oder die eines zweiten Radikals hätten geben können, mit denen dieses ungewöhnliche Spektrum zu erklären gewesen wäre.



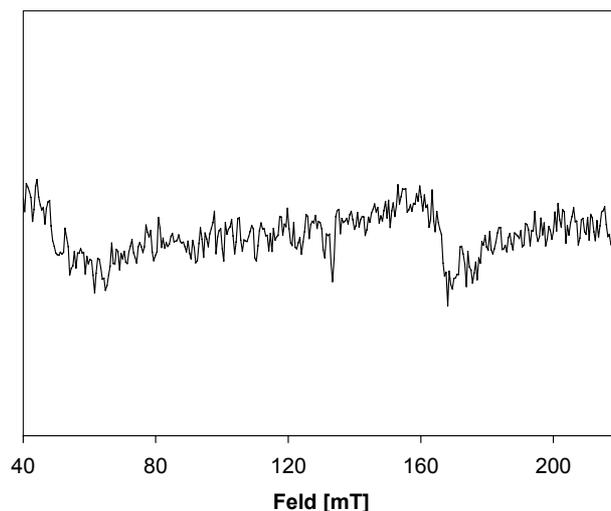
**Abb. 3.25:** Temperaturabhängigkeit des X-Band-Signals; Aufnahmebedingungen: Temperatur wie angegeben, 2 mW (20 dB), Modulationsamplitude 12 G, 1 scan

Es waren daher weitere Messungen nötig, um zu klären, ob ein einkerniges oder mehrkerniges Zentrum vorlag. PIERCE et al. (2003) hatten durch Substitution des Eisen in dem *E. coli* R2-Protein mit Mangan sowohl RNR mit einem einkernigen als auch mit einem di-Mangan-Zentrum erhalten. Beide Zustände wurden spektroskopisch untersucht, wobei diese Autoren bei Messung im Parallelmodus für das  $\text{Mn}_2(\text{II})$ -Zentrum bei  $g = 4,6$  ein zusätzliches Signal erhielten (s. Abb. 3.26). Im Parallelmodus werden die Mikrowellen, anders als normalerweise, parallel zum äußeren Magnetfeld eingestrahlt.



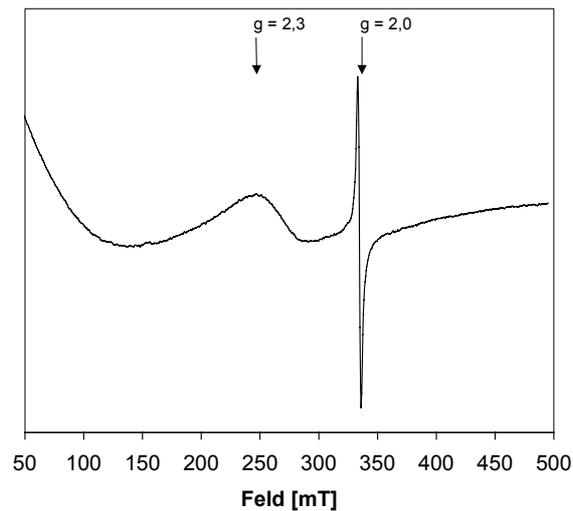
**Abb. 3.26:** Ausschnitt aus dem X-Band-Spektrum des dinuclearen Mn-Zentrums in *E. coli* R2, gemessen im Parallelmodus (PIERCE et al. 2003)

Für das R2F-Protein schien deshalb ein Vergleich von Signalen im Parallelmodus sinnvoll, da unter diesen Bedingungen die Möglichkeit bestand, Signale zu erhalten, die nicht von der Spin-Kopplung beeinflusst waren. Damit wäre es möglich gewesen, gezielt Eigenschaften des Metallzentrums zu beobachten. Es wurde jedoch kein Signal gefunden, das einen Hinweis auf ein di-Manganzentrum, wie es von Pierce et al. beschrieben wurde, hätte geben können (s. Abb. 3.27).

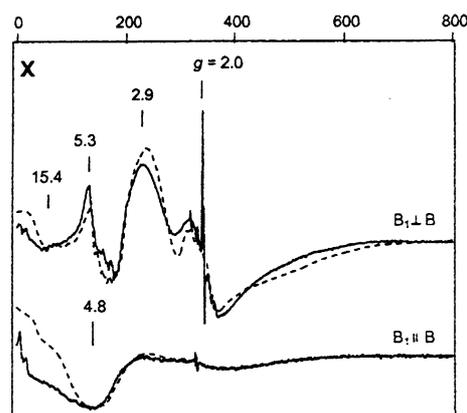


**Abb. 3.27:** X-Band-Spektrum der Mn-RNR im Parallelmodus; Aufnahmebedingungen: 4,64 K, 20mW, 10 G Modulationsamplitude, 10 scans

Da somit das Vorliegen eines einkernigen Mangan-Zentrums wahrscheinlicher wurde, war es angebracht, wieder im Normalmodus zu messen. Nach Erhöhung der Messtemperatur auf 80 K wurde bei hoher Mikrowellen-Leistung ein Spektrum erhalten, in dem sich Strukturen fanden, die in ähnlicher Form bei Spektren eines mononuclearen Mn(II)-Zentrums der Mn-substituierten Fe-RNR aus *E. coli* zu sehen waren (vgl. Abbildungen 3.28 und 3.29).



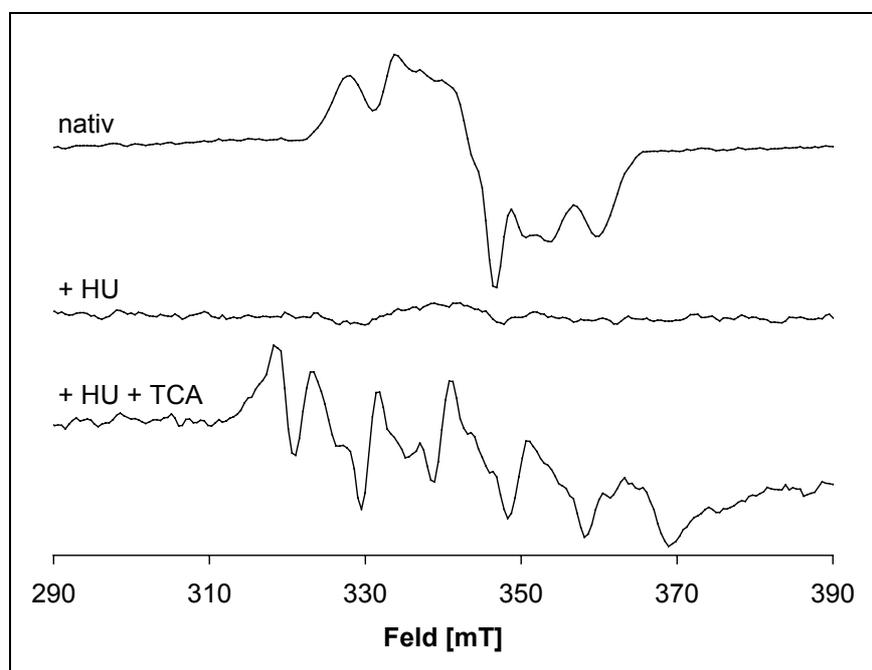
**Abb. 3.28:** X-Band-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* pOCA2; Aufnahmebedingungen: 80 K, 20 mW, 10 G Modulations-amplitude; 1 scan



**Abb. 3.29:** X-Band-Spektren eines mononuclearen Mn-Zentrums in *E. coli* R2, gemessen im Normalmodus (oberer Scan) und im Parallelmodus (unterer Scan) (PIERCE et al., 2003)

Anschließend wurde die Probe noch einmal bei tiefer Temperatur (4,6 K) vermessen (Abb. 3.30, oberer Scan) und dann Hydroxyharnstoff (HU) zur Probe gegeben. Die Behandlung der Probe mit dem Radikalfänger HU zerstörte das Signal (s. Abb. 3.30, mittlerer Scan), was die Annahme der Kopplung des Radikals mit dem Metallzentrum unterstrich. Die anschließende Behandlung des Proteins mit Trichloressigsäure (TCA, s. Abb. 3.29, unterer Scan) setzte auch das Metall frei frei, das als  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  im X-Band leicht detektiert werden konnte. Da dieses Signal in den vorherigen Spektren nicht vorhanden war, handelte es sich hierbei um aus der Mn-RNR freigesetztes Mangan. Für die Vervollständigung der

Metallbestimmung (s. Kap. 3.2.4) erfolgte eine Quantifizierung dieses Mangan-Signals durch Vergleich mit einem ESR-Kupfer-Standard (s. Kap. 2.19.2).



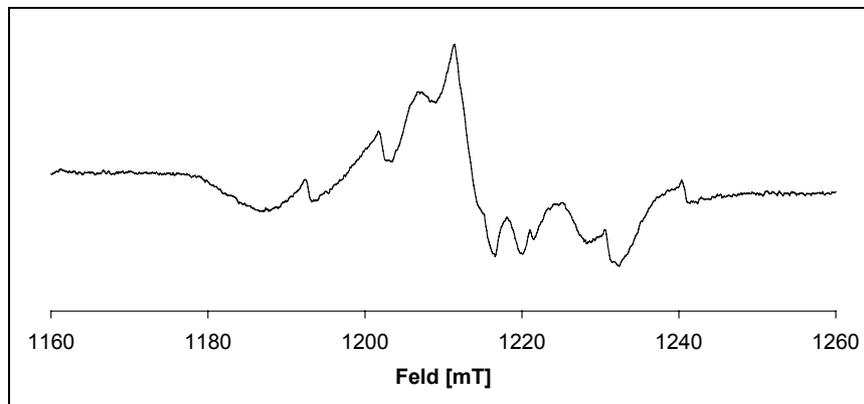
**Abb. 3.30:** X-Band Spektren des R2F-Proteins wie isoliert (nativ), nach Zugabe von Hydroxyharnstoff (HU) und nach zusätzlicher Zugabe von Trichloressigsäure (TCA); Aufnahmebedingungen: 4,6 K, 20 mW, 10 G Modulationsamplitude, 5 scans

Da das X-Band-ESR-Signal bei tiefen Temperaturen eine so ungewöhnliche Breite aufwies, war anzunehmen, dass sich diese Signalverbreiterung auch bei 80 K noch auswirkte und deshalb die Breite des Radikal-Signals bei 80 K als Effekt der intensiven Kopplung erklärt werden konnte. Es war folglich davon auszugehen, dass die Daten der Simulation des Spektrums bei 80 K das Tyrosyl-Radikal der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* hinreichend exakt beschrieben.

### 3.5.2 Q-Band-Messungen

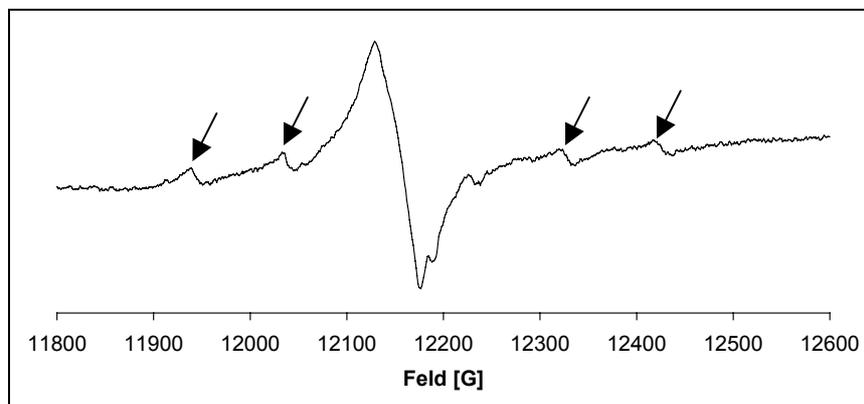
Während der Untersuchungen am Wildtyp-Enzym (GRIEPENBURG, 1998) hatten die Messungen im X-Band deutlich das Signal des Radikals gezeigt, während im Q-Band das Mangan-Signal vorherrschend war. Da bereits die Untersuchungen im X-Band das Signal einer Spin-Kopplung gezeigt hatten, wurde ein entsprechendes Signal auch im Q-Band erwartet. Die Kopplung zeigte im X-Band bei tiefen Temperaturen ein deutlicheres Aufspaltungsmuster als bei höheren, daher wurden die Messungen im Q-Band bei tiefen

Temperaturen begonnen. Bei 5 K war das komplexe Signal einer gekoppelten Spezies zu sehen (Abb. 3.31), das temperaturabhängig war und mit zunehmender Temperatur schmaler und intensiver wurde.



**Abb. 3.31:** Q-Band-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression mit pOCA2; Aufnahmebedingungen: 5 K, 0,0121 mW, 10 scans

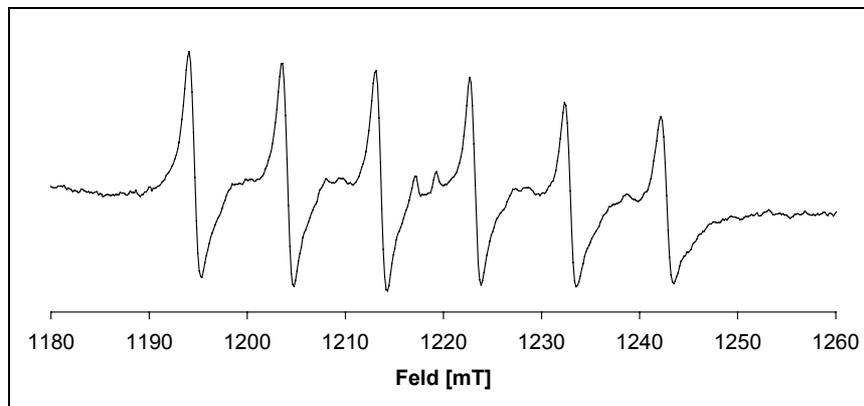
Es hatte bei 77 K die Form eines breiten Singulett, außerdem waren Satelliten (s. Pfeilmarkierungen) geringer Intensität, die einen Linienabstand von 9 bis 9,5 mT aufwiesen, zu erkennen (s. Abb. 3.32).



**Abb. 3.32:** Q-Band-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression mit pOCA2; Aufnahmebedingungen: 77 K, 0,0121 mW, 10 scans

Da in den vorhergehenden Untersuchungen das proteingebundene Mangan im Q-Band gut sichtbar war (GRIEPENBURG et al. 1998), stellte sich die Frage, ob dieses nicht in der nun gefundenen Spin-Kopplung verborgen war. Daher wurde auch für die Q-Band Messungen HU zur Probe gegeben, um die Kopplung durch Zerstörung des Radikals aufzulösen. Die Zugabe

von HU ließ ein  $\text{Mn}^{2+}$ -Signal sichtbar werden (s. Abb. 3.33), das dem des proteingebundenen Mangan in der Untersuchung von Griepenburg et al. (1998) ähnelte.

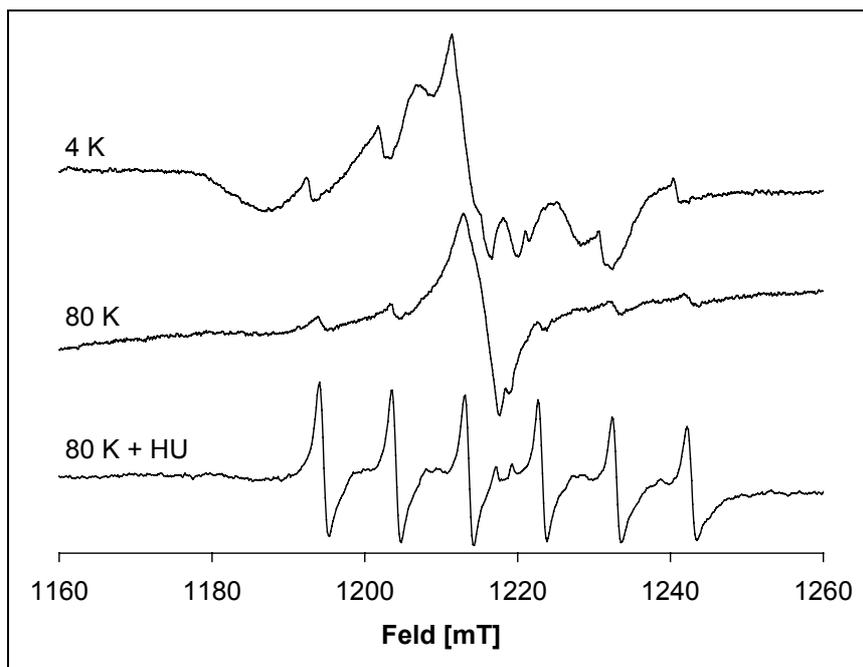


**Abb. 3.33:** Q-Band-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression mit pOCA2 **nach HU-Zugabe**; Aufnahmebedingungen: 77 K, 0,125 mW, 10 scans

Im diesem Spektrum (s. Abb. 3.33) war ein Mangan-Signal zu sehen, das sich deutlich von dem des  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ -Komplexes des freien Mangans in Lösung unterschied. Sichtbar waren Signale von sog. verbotenen Übergängen, die Zeichen für eine erhebliche Nullfeldaufspaltung durch die Bindung im Protein waren, da die Liganden der Metallbindungsstelle für eine Verzerrung der Koordinationssymmetrie sorgten. Dies zeigte, dass das Mangan fest im Protein gebunden war und nicht nur unspezifisch anhaftete.

Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass die vorher sichtbare Spin-Kopplung tatsächlich eine Kopplung von Mangan und Radikal war. Die Tatsache, dass das Mangan nach HU-Zugabe nur im Q-Band, nicht jedoch im X-Band (s. Abb. 3.30) sichtbar war, zeigte, dass das Mangan im Protein gebunden war und durch die dadurch verursachte Nullfeldaufspaltung im X-Band unsichtbar wurde. Es war daher weitgehend sicher, dass in den Signalen vor der Hemmung mit HU (s. Abb. 3.24, 3.25, 3.31 und 3.32) eine Spin-Kopplung zwischen Mangan-Zentrum und Tyrosyl-Radikal sichtbar war.

Ein Vergleich der Q-Band-Spektren (s. Abbildung 3.34) zeigte deutlich, dass die Satelliten im Signal bei 77 K die gleiche Position hatten wie die Signale des ungekoppelten  $\text{Mn}^{2+}$ . Es war folglich wahrscheinlich, dass es sich bei den Satelliten um die Signale ungekoppelten Mangans im nativen Protein handelte, dass also die Probe einen bestimmten Anteil RNR ohne Radikal enthielt.



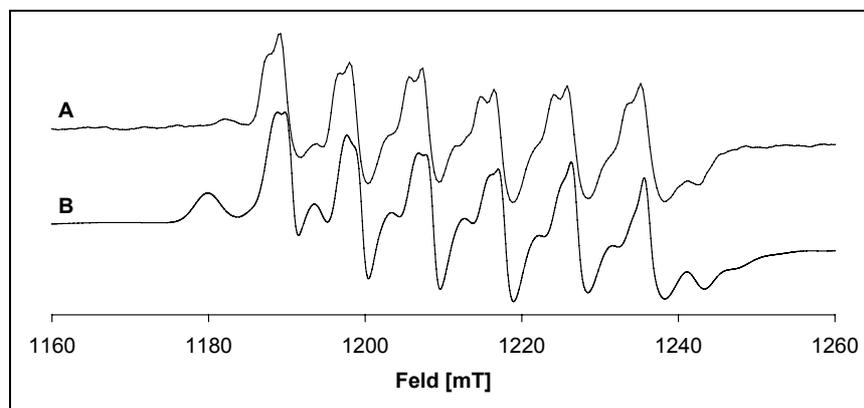
**Abb. 3.34:** Q-Band-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* bei 10 K, 77 K und bei 77 K nach HU-Zugabe; Aufnahmebedingungen wie in den Abbildungen 3.31 bis 3.33

Ein Vergleich der Signalintensität des  $\text{Mn}^{2+}$ -Signals vor und nach der Zugabe von HU zeigte, dass etwa 12% des Mangans nicht in die Kopplung von Metall und Radikal mit einbezogen waren. Dies sprach dafür, dass in einem Teil des Proteins im Verlauf der Reinigung das Radikal zerstört wurde, so dass das proteingebundene Mangan keine Kopplung mit dem Tyrosylradikal mehr erfahren konnte.

### 3.6 Spektrensimulationen zur Charakterisierung des Mangan-Zentrums

Die Eigenschaften von ESR-Signalen wie g-Wert, Nullfeldauspaltung oder Hyperfein-aufspaltung unterliegen Gesetzmäßigkeiten, die mathematisch formuliert werden können. Durch Einsetzen theoretischer Zahlenwerte für die spezifischen Parameter in den daraus resultierenden Gleichungen kann ein theoretisches ESR-Spektrum im Computer erzeugt werden, man nennt dies die Simulation eines Spektrums. Durch Vergleich der experimentellen mit den theoretischen Spektren kann man beurteilen, wie gut die Simulation die experimentellen Daten wieder gibt. Im Fall einer guten Übereinstimmung der Simulation mit einem experimentellen Spektrum können die der Simulation zugrunde liegenden Daten zur Interpretation des experimentellen Spektrums dienen.

Nach Expression in *C. ammoniagenes* pWCAX war im Q-Band (36,34 GHz) ein gut aufgelöstes Sextett-Signal zu beobachten (s. Scan A in Abb. 3.35). Der G-Wert von 2,00 und der Abstand der sechs Linien von ca. 90 G wiesen auf ein  $Mn^{2+}$ -Ion im High Spin Zustand mit Spin 5/2 hin. Das sprach für ein Metallzentrum mit einem einzelnen  $Mn^{2+}$ -Ion, wie es bereits für das R2F-Protein vorgeschlagen wurde (GRIEPENBURG et al., 1998; FIESCHI et al., 1998).



**Abb. 3.35:** Q-Band Spektrum des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* nach Expression mit pWCAX; Aufnahmebedingungen: 20 K, 0,02 mW, 10 scans; **A:** experimentelle Daten; **B:** Simulation<sup>3</sup>

Um eine Interpretationshilfe für das Aufspaltungsmuster zu erhalten, wurde eine Simulation dieses Spektrums durchgeführt (s. Scan B in Abb. 3.35). Der Simulation lagen folgende Parameter zugrunde:

$$D = 650 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

$$E/D = 0,275$$

$$\sigma_D = 65 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

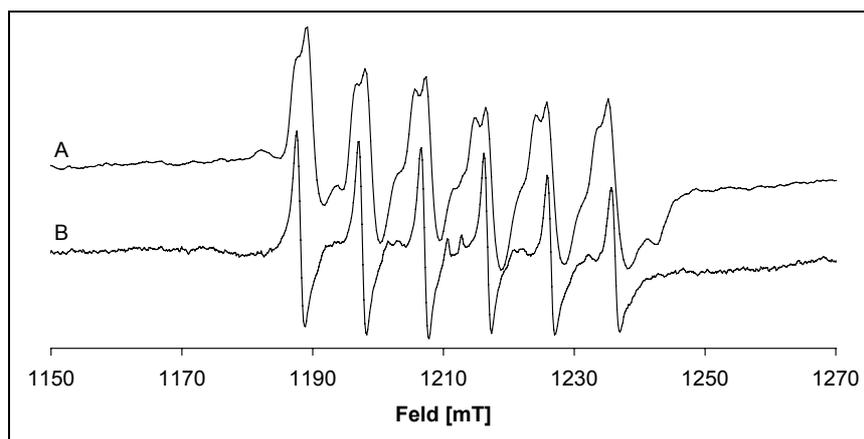
$$A = 85,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

Der Parameter D ist der axiale Parameter der Nullfeldaufspaltung, E der Rhombizitätsparameter der Nullfeldaufspaltung. D steht für das Maß der Nullfeldaufspaltung, d. h., er stellt ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung des Metallions mit dem Ligandenfeld der Metallbindungsstelle dar. Der Rhombizitätsparameter E/D stellt ein Maß für die Verzerrung der Elektronenverteilung am Metallion dar und gibt damit Aufschluss über die Symmetrie des Ligandenfeldes. Der Parameter  $\sigma_D$  steht für das Maß der Verteilung der Elektronen über das Ligandenfeld. Die Hyperfeinstruktur-Konstante A enthält den Linienabstand der sechs Hauptlinien des Mangan-Spektrums.

<sup>3</sup> Die Simulation wurde von Dr. Peter Paul Schmidt am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie durchgeführt

In diesem Fall wies der Nullfeldaufspaltungsparameter  $D$  auf eine sehr feste Bindung des Mn in der Metallbindungsstelle eines Protein hin, während das Verhältnis  $E/D = 0,275$  eine weitgehend rhombische Verzerrung des Ligandenfeldes dokumentierte. Der gaussche Verteilungsparameter  $\sigma_D = 0,1$  stand für eine relativ weiträumige Verteilung der Elektronen des Metallions. Diese Daten damit passend für die Bindung eines  $Mn^{2+}$ -Ions in der Metallbindungsstelle des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes*.

Nach Expression in *C. ammoniagenes* pOCA2 war nach Zugabe von HU zur Probe wurde ebenfalls das Sextett-Signal des Mn(II) sichtbar (s. Abb. 3.33). Der Vergleich dieses Mangan-Spektrums mit dem Mangan-Spektrum nach Expression in *C. ammoniagenes* pWCAX (s. Abb. 3.35) zeigte, dass es Unterschiede in beiden Spektren gab (s. Abbildung 3.36). Ob hier die Auswirkungen einer Konformationsänderung zu sehen waren oder nur das Ergebnis einer größeren Proteinreinheit, war ohne Simulation der Spektren nicht zu entscheiden.



**Abb. 3.36:** Vergleich des Mn-Spektrums nach Expression mit *C. ammoniagenes* pWCAX (A) und *C. ammoniagenes* pOCA2 (B)

Es wurde daher eine Simulation des Spektrums der Mn-RNR aus Abbildung 3.33 durchgeführt (s. Abbildung 3.37). Dieser Simulation lagen folgende Parameter zugrunde:

$$D = 190 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

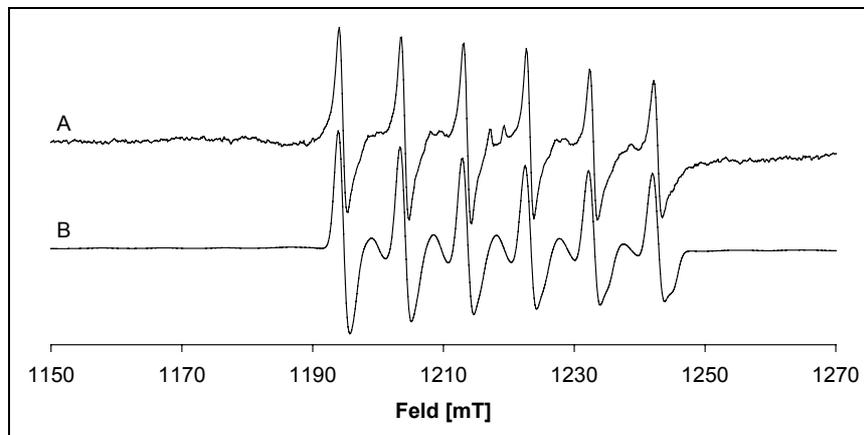
$$E/D = 0,27$$

$$\sigma_D = 0,1$$

$$A = 89,9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

Damit wies diese Simulation große Ähnlichkeit zu der vorherigen (s. Abb. 3.35) auf, so dass auch hier die Bindung des Mn in der Metallbindungsstelle des R2F-Proteins mehr als

wahrscheinlich war. Eine Interpretation der Differenz des Parameters  $D$  konnte jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht erfolgen.



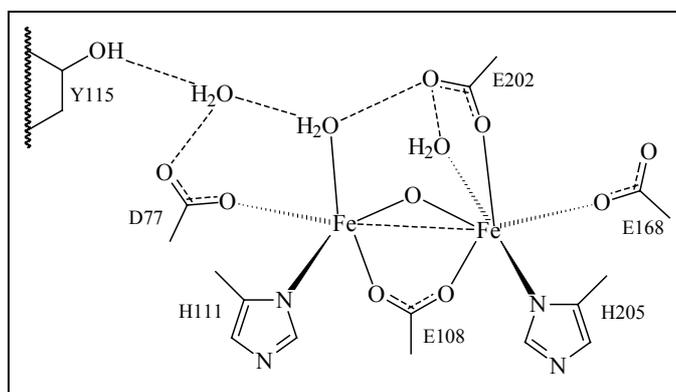
**Abb. 3.37:** Mn-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Zugabe von HU; **A:** experimentelle Daten (vgl. Abb. 3.31); **B:** Simulation<sup>3</sup>

Über das Mn-Atom im Spektrum der Mn-RNR nach HU-Behandlung konnte festgestellt werden, dass sich das Mn-Ion in einer starken Bindung eines Ligandenfeldes befand und eine leicht verzerrt rhombische Koordination aufwies. Der Parameter  $\sigma_D$  wies eine relativ breite Verteilung der Elektronen des Mn-Ions über das Ligandenfeld auf, während die Hyperfeinkopplung mit 96 G und die Linienbreite mit 7,5 G den üblichen Werten für ein Mn(II)-Ion entsprachen (REED & MARKHAM, 1984). Diese Daten wiesen alle auf die feste Bindung des Mn im Ligandenfeld eines Proteins hin, so dass das ESR-Spektrum mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bindung des Mn in der Metallbindungsstelle der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* zeigte.

Folglich konnte geschlossen werden, dass die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* in ihrer aktiven Form ein Manganenzym mit einem mononuclearen Mn(II)-Zentrum ist.

## 4 Diskussion

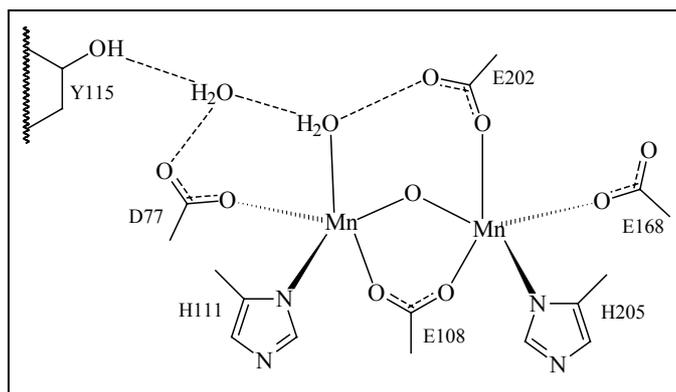
Bisher konkurrieren drei verschiedene Vorstellungen über den Aufbau des Metallzentrums der RNR von *C. ammoniagenes*. Wie in der Einleitung (Kap. 1.1) vorgestellt, befindet sich dieses Metallzentrum in der kleinen Untereinheit des Enzyms, dem R2F-Protein. Dieses wird in *C. ammoniagenes* durch das *nrdF*-Gen codiert, welches eine hohe Sequenzhomologie zu den *nrdF*-Genen von *Escherichia coli* (82%) und *Salmonella typhimurium* (80%) aufweist. Das Metallzentrum der Klasse Ib RNR von *S. typhimurium* wurde nach Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli* als  $\mu$ -oxo-verbrückter di-Eisen-Komplex charakterisiert (JORDAN et al., 1998). Im Analogieschluss postulierten HUQUE et al. (2000) und HÖGBOM et al. (2002) nach Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli* und anschließender Charakterisierung auch einen  $\mu$ -oxo-Eisencluster für das Metallzentrum der *C. ammoniagenes* RNR (s. Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Struktur der Metallbindungsstelle im eisenhaltigen R2F-Protein nach Expression des *nrdF*-Gens aus *C. ammoniagenes* in *E. coli* und nachfolgender Reinigung des R2F-Proteins aus *E. coli* (gezeichnet nach HÖGBOM et al. 2002)

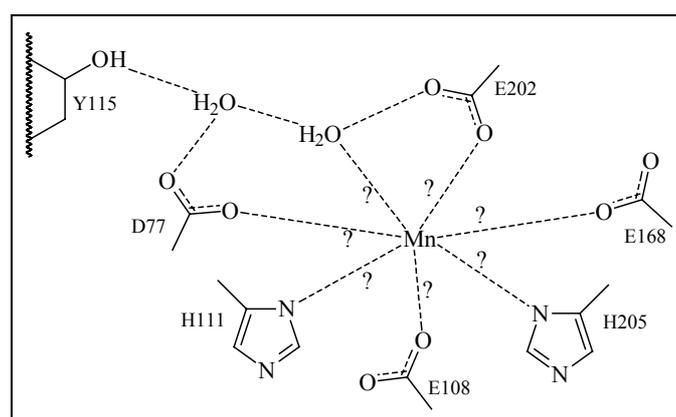
Aufgrund des nachweisbaren Einbaus von  $^{54}\text{Mn}$  in die RNR von *C. ammoniagenes* und anhand der Eigenschaften des Absorptionsspektrums des Holoenzym wurde jedoch bei der Erstbeschreibung dieses Enzyms (WILLING et al., 1988) ein den eisenhaltigen Reduktasen analoges di-Mangan-Zentrum vorgeschlagen. Ein Vorschlag für die Struktur dieses Metallzentrums wurde von der publizierten Struktur des di-Eisen-Zentrums (s. Abb. 4.1) für diese Arbeit abgeleitet (Abb. 4.2). Mangan sollte in dem di-Mangan-Zentrum als Mangan (III) vorliegen, wie aus der Ähnlichkeit von Spektren zweikerniger  $\mu$ -oxo-Diacetat-verbrückter Mangan (III)-Modellkomplexe (WIEGHARDT et al., 1985) mit dem Spektrum des *C. ammoniagenes*-RNR Holoenzym gefolgert wurde (WILLING, 1986).

In späteren Untersuchungen der radikaltragenden, manganhaltigen Untereinheit, dem R2F-Protein, wurde bei der Metallanalytik mit ICP-MS weniger Mangan gefunden als für ein di-Mangan-Zentrum nötig gewesen wäre. Daraufhin wurde ein mononucleares Mn(II)-Zentrum für die *C. ammoniagenes*-RNR vorgeschlagen (BLASCZYK, 1994). Nachfolgend kamen GRIEPENBURG et al. (1998) durch ESR-Messungen im Q-Band zu dem Ergebnis, dass die RNR aus *C. ammoniagenes* ein mononucleares Mangan(II)-Zentrum enthält (s. Abb. 4.3).



**Abb. 4.2:** Mögliche Struktur der Metallbindungsstelle des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* mit einem di-Mangan-Zentrum, abgeleitet von Abb. 4.1

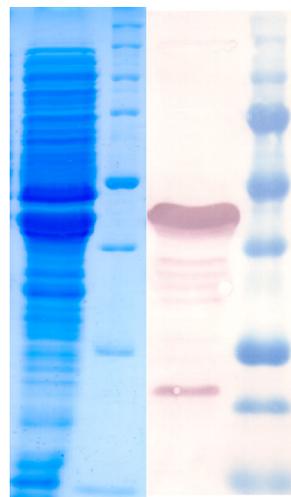
Da eine möglichst genaue Charakterisierung des Metallzentrums das vorrangige Ziel dieser Arbeit war, sollen deren Ergebnisse vor dem Hintergrund der obigen Modelle diskutiert werden.



**Abb. 4.3:** Vorschlag für ein mononucleares Mn-Zentrum in der Metallbindungsstelle des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes*

Da die Expression des *nrdF*-Gens mit dem Plasmid pWCAX im Wesentlichen nur dem mitklonierten eigenen Promotor und nicht merklich dem induzierbaren *tac*-Promotor des

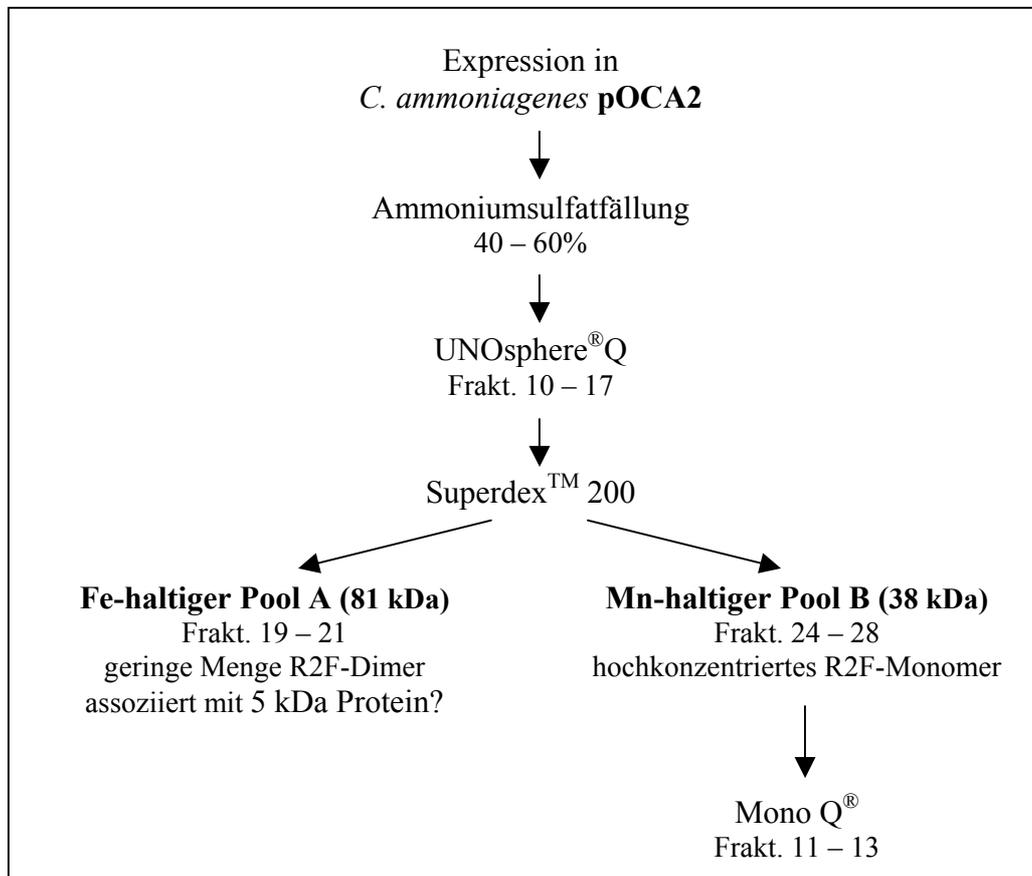
Expressionsvektors pEKEX2 unterlag (s. Kap. 3.1.1), war auch die vergleichsweise geringe Steigerung der Expression, gemessen an einer fünffach erhöhten HU-Toleranz über dem Niveau des Wildtyps (persönliche Mitteilung W. Oehlmann), hinreichend erklärt. Dementsprechend war zunächst in dieser Arbeit eine Bestätigung der spektroskopischen Ergebnisse von GRIEPENBURG (1998/a) möglich (s. Kap. 3.3, 3.4 und 3.6). Darüber hinausgehende Erkenntnisse wie Anzeichen für eine Wechselwirkung von Radikal und Metall konnten jedoch nicht gewonnen werden. Es gab daher weiterhin keinen Nachweis dafür, dass Mangan und Radikal gemeinsam im Protein vorlagen. Ferner war durch die noch immer ungenügende Proteinreinheit auch nicht gesichert, ob alle beobachteten spektroskopischen Eigenschaften wirklich dem R2F-Protein der Mn-RNR zugeordnet werden konnten. Vor allem die Ergebnisse der UV/VIS-Spektroskopie blieben zweifelhaft, da das Signal bei 437 nm im Differenzspektrum nach HU-Zugabe zu breit für ein Radikal-Signal war (s. u.). Erst die Etablierung der Überexpression des *nrdF*-Gens unter ausschließlicher Kontrolle des *tac*-Promotors mit dem Plasmid pOCA2 lieferte so hohe Ausgangsmengen des R2F-Proteins (s. Abb. 4.4), dass in der vorliegenden Arbeit ein mehrstufiges Reinigungsverfahren möglich wurde.



**Abb. 4.4:** SDS-Gel und Western-Blot partiell gereinigter Mn-RNR nach fraktionierender Ammoniumsulfatfällung mit Vergleichsstandard von BIO-RAD

Nachfolgend soll das in Abb. 4.5 vorgestellte Protokoll für die Diskussion der in dieser Arbeit erzielten Fortschritte bei der Reinigung genutzt werden. Ferner wird vorgeschlagen, in Zukunft den Metallocofaktor der RNR von *C. ammoniagenes* und ebenso von *C. glutamicum*

(ABBOUNI, 1999) auf diese Weise für physikalische Untersuchungen zu präparieren, da dieses Protokoll die Reinigung der Mn-RNR nahezu zur Homogenität gewährleistet.

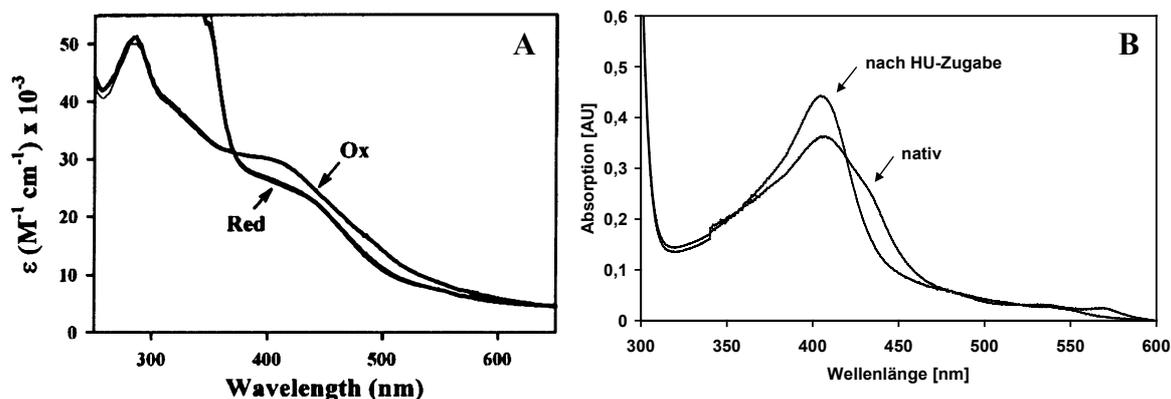


**Abb. 4.5:** Reinigungsschema für die Mn-RNR nach Expression in *C. ammoniagenes* pOCA2

Die Veränderung im Elutionsverhalten der Mn-RNR im Verlauf der Gelfiltration an Superdex 200 (vgl. Kap. 3.2.2) stand für eine Veränderung der aktuellen Molekülgröße. Entsprechend dem Elutionsvolumen vorher einem Molekulargewicht von 81 kDa, so waren es jetzt 38 kDa. Dies sah zunächst nach einem Zerfall des Proteindimers in seine Monomere aus. Es blieb dabei jedoch noch eine Differenz von ca. 5 kDa zu erklären. Da auch eine Trennung von Eisen und Mangan in verschiedene Fraktionen erfolgte (vgl. Kap. 3.2.4), bestand die Vermutung, dass bei 81 kDa (Pool A) Spuren des R2F-Dimers in einem Komplex mit einem noch unbekanntem zweiten (eventuell eisenhaltigen) Protein mit einer Molekülgröße von ca. 5 kDa eluierten, während in Pool B die Hauptmenge des R2F-Monomers zu finden war, welches aufgrund der Überproduktion keinen Komplex mit einem weiteren Protein eingehen konnte.

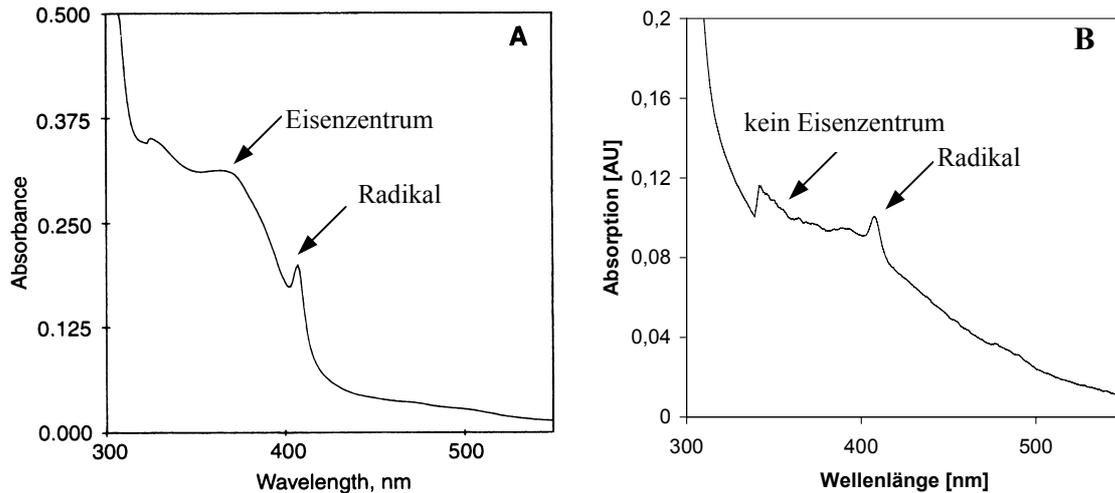
Pool A hatte ein UV/VIS-Spektrum mit den Charakteristiken eines  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Clusters einschließlich einer Signalabschwächung zwischen 430 und 440 nm durch Oxidation sowie

der Signalverstärkung zwischen 400 und 415 nm (s. Abb. 4.6 A). Diese Beobachtung kann die Erklärung liefern, wieso in früheren Arbeiten die breite Schulter bei 437 nm (s. Abb. 4.6 B) in UV/VIS-Spektren mit weniger gut gereinigten Fraktionen des R2F-Proteins (vgl. Fig. 4 OEHLMANN et al., 1998; GRIEPENBURG, 1998) als Radikal-Signal der Mn-RNR gewertet wurde.

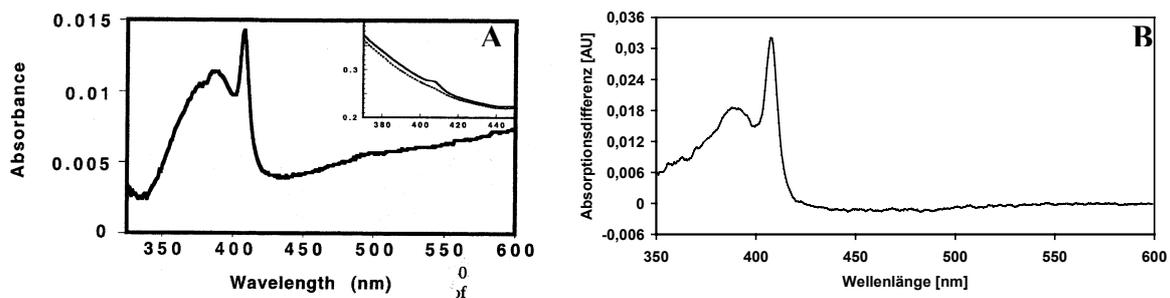


**Abb. 4.6:** A: 4Fe-4S-Cluster des Ferredoxin I aus *Azotobacter vinelandii* in reduzierter (Red) und oxidierter (Ox) Form (CHEN et al., 2002); B: Spektrum aus Abbildung 3.14 A; die reduzierte Form in Abb. A entspricht dabei der nativen Form in Abb. B

Demgegenüber erlaubte in der vorliegenden Arbeit ein Spektrenvergleich des manganhaltigen Pool B mit den UV/VIS-Spektren anderer Ribonucleotid-Reduktasen (vgl. Abb. 4.6 und 4.7), erstmals ein Tyrosyl-Radikal anhand des Signals bei 408 nm klar zu identifizieren. Ferner ließ die Beobachtung einer gesteigerten Stabilität der Mn-RNR in Pool B vermuten, dass ein direkt mit dem Metall oder Radikal wechselwirkendes Protein abgetrennt wurde.

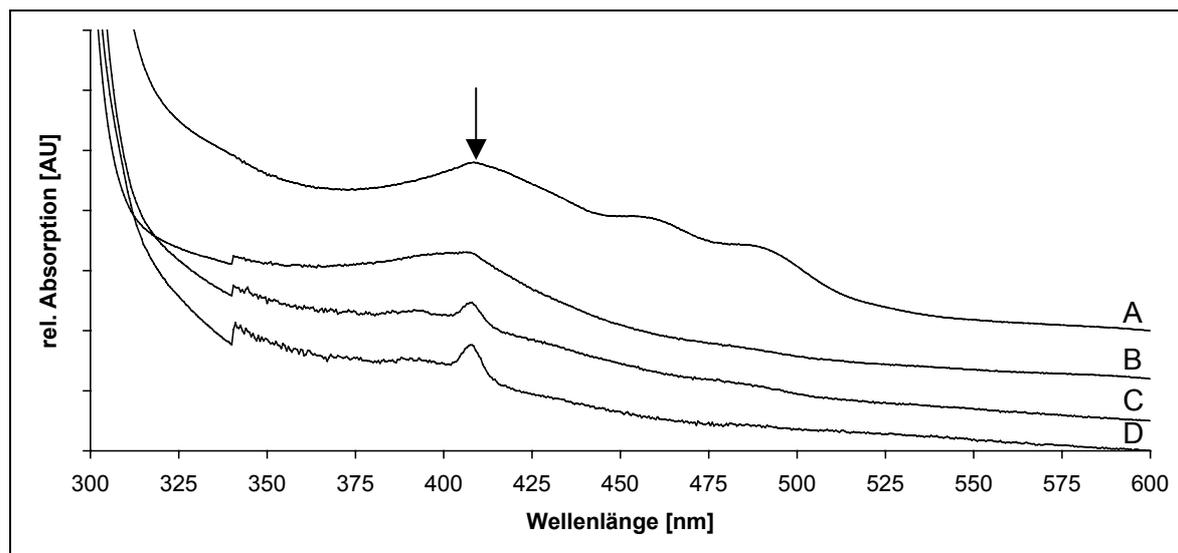


**Abb. 4.7:** A Absorptionsspektrum der RNR aus *S. typhimurium* (JORDAN et al. 1994); B UV/VIS-Spektrum der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Reinigung an Superdex 200 (Pool B) (Spektrum Abb. 3.16); die Pfeile markieren den Unterschied bei 388 nm und die Übereinstimmung bei 408 nm



**Abb. 4.8:** UV/VIS-Differenzspektren der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes*; A: Spektrum nach Expression in *E. coli* (HUQUE et al. 2000); B: Spektrum aus Abb. 3.17 B

Diese erheblich größere Stabilität der Mn-RNR erlaubte in dieser Arbeit die Etablierung einer dritten Reinigungsstufe und damit erstmals die Reinigung zur Homogenität. Dementsprechend soll die Anreicherung der Spinkonzentration des Radikals im Verlauf der hier vorgestellten Reinigung anhand der zunehmenden Intensität des Signals bei 408 nm diskutiert werden (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Vergleich der UV/VIS-Absorptionsspektren der nativen Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* in verschiedenen Reinigungsstufen; **A** Ammoniumsulfatfällung 40 – 60%; **B** UNOsphere-Q Fraktion 10 – 17; **C** Superdex 200 Pool B; **D** Mono-Q Fraktion 12; alle Spektren sind der besseren Sichtbarkeit wegen in der Intensität angepasst und vertikal verschoben

Bemerkenswert war dabei, dass eine Verringerung der Mangan-Zugabe während der Fermentation eine Verringerung der Intensität dieses Signals nach Ammoniumsulfat-Fällung zur Folge hatte (vgl. Kap. 3.1.4). Diese Abhängigkeit der UV-Signalintensität ließ vermuten, dass die Radikal-Generierung direkt abhängig von der Mangan-Konzentration im Fermentationsmedium war. Dies widersprach Vermutungen, denen zufolge die RNR aus *C. ammoniagenes* zwar Mangan binden kann, das dann aber keine Funktion in der Radikal-Generierung besitzt (HUQUE et al., 2000). Zusätzlich lieferte das Fehlen der Absorptionsbanden eines  $\mu$ -oxo-Eisen-Clusters im UV/VIS-Spektrum der RNR aus *C. ammoniagenes* und die Anreicherung von Mangan im Verlauf der Reinigung der RNR ein wesentliches Argument gegen das Modell der Fe-RNR. Statt dessen hatte die Mn-RNR in Pool B und in Fraktion 12 nach Mono Q ein schwaches, nicht HU-sensitives Absorptionssignal bei 481 nm (s. Abb. 3.18), das in den Spektren der Fe-RNR nicht vorhanden war. Ein Vergleich mit einer Lösung von  $\text{MnCl}_2$  zeigte, dass dieses Signal tatsächlich mit  $\text{Mn(II)}$  in Verbindung gebracht werden konnte. Darüber hinaus war das Differenzspektrum, erzeugt aus den Spektren der Mn-RNR und des  $\text{MnCl}_2$ , den Differenzspektren der Mn-RNR nach HU-Behandlung (s. Abb. 3.18 B) auffallend ähnlich. Da freies Mangan in beiden diskutierten Proben nicht vorhanden war (s. Kap. 3.5.1), war möglicherweise schon im UV/VIS-Spektrum ein Hinweis auf ein Mangan-Zentrum zu sehen.

---

Eine tiefer gehende Diskussion des Metall-Zentrums der Mn-RNR soll anhand der Ergebnisse der ESR-Spektroskopie erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass Daten zum Radikalstatus im Wesentlichen mit X-Band, Befunde zum Manganzentrum vorwiegend mit Q-Band erhalten wurden. Das X-Band-ESR-Spektrum von Fraktion 12 nach Mono Q zeigte bei 80 K ein Singulett-Signal mit einer schwachen Hyperfeinaufspaltung (s. Abb. 3.20), das mit Hilfe einer Simulation als das etwas verbreiterte Signal eines Tyrosyl-Radikals identifiziert wurde. Zusammen mit dem UV/VIS-Absorptionssignal bei 408 nm war damit nachgewiesen, dass die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* wie von GRIEPENBURG et al. (1998) vermutet ein Tyrosyl-Radikal enthielt. Durch die Simulation ließen sich jedoch die breiten Ausläufer des Signals nicht erfassen, ein Umstand, der zunächst nicht zu klären war. Diese Erklärung ergab sich jedoch aus den überraschenden Ergebnissen, die sich aus der Variation der Meßtemperatur ergaben. Wurde die Messtemperatur auf unter 30 K gesenkt, traten völlig neue Strukturen im Spektrum zutage, die nicht mehr dem Tyrosyl-Radikal zugeordnet werden konnten (s. Abb. 3.24). Das Spektrum wurde erheblich breiter und es traten Satelliten-Signale hervor, die mit weiterem Absenken der Temperatur weiter an Intensität gewannen, bis sie schließlich bei 4 K und darunter das Spektrum dominierten. Dies konnte nur so gedeutet werden, dass in der Mn-RNR ein System aus zwei gekoppelten paramagnetischen Spezies vorlag. Eine genauere Interpretation des Spektrums war zunächst nicht möglich. Es war jedoch zu vermuten, dass eine enge Spin-Kopplung des Radikals mit einem benachbarten Metallzentrum vorlag. Die Tatsache, dass die Zugabe des Radikalfängers Hydroxyharnstoff (HU) zur Probe das Signal zerstörte, belegte, dass wirklich eine Kopplung des Radikals zu sehen war. Das Vorliegen eines gekoppelten Signals bei tiefen Temperaturen erklärte die ungewöhnliche Signalverbreiterung bei 80 K als verbliebener Einfluss der Kopplung auf das Radikal-Signal. Eine solche Spin-Kopplung ist nur zwischen paramagnetischen (und damit ESR-aktiven) Zentren möglich, was das Vorliegen eines  $\mu$ -oxo-di-Eisen-Zentrums ausschloss, da dieses ESR-silent ist. Durch Denaturierung des Proteins mit TCA wurde Mangan freigesetzt. Damit war erwiesen, dass im Protein Mangan gebunden war, und es war daher sehr wahrscheinlich, dass auch die Kopplung des Radikals zu diesem Mangan erfolgte. Die Bestimmung des Mangangehaltes der Probe ergab einen Mangangehalt von 0,74 Mangan-Ionen pro Protein-Monomer (s. Abb. 3.14). Dies deutete auf das Vorliegen eines einkernigen Manganzentrums hin, da dieser Wert für ein zweikerniges Zentrum deutlich zu niedrig war, während dieser Wert für ein einkerniges Zentrum durchaus passend war. Eine analoge Unterversorgung des Metallzentrums mit Metalionen wird auch für die Fe-RNR gefunden.

---

---

Bei diesen beträgt der Eisengehalt für das zweikernige Zentrum 1,5 bis 1,6 Metallionen pro Monomer (HUQUE et al. 2000, HÖGBOM et al. 2002).

Damit gab es also nicht nur Hinweise gegen ein Eisen-Zentrum, sondern auch gegen ein di-Mangan-Zentrum. Auch die konkrete Suche nach Anzeichen für das Vorliegen eines di-Mangan-Zentrums war nicht erfolgreich (vgl. Kap. 3.5.1). Daher konnte auch dieses Modell verworfen werden. Alle weiteren Untersuchungen standen deshalb unter der Fragestellung, ob ein mononucleares Mn(II)-Zentrum zweifelsfrei nachzuweisen sein würde.

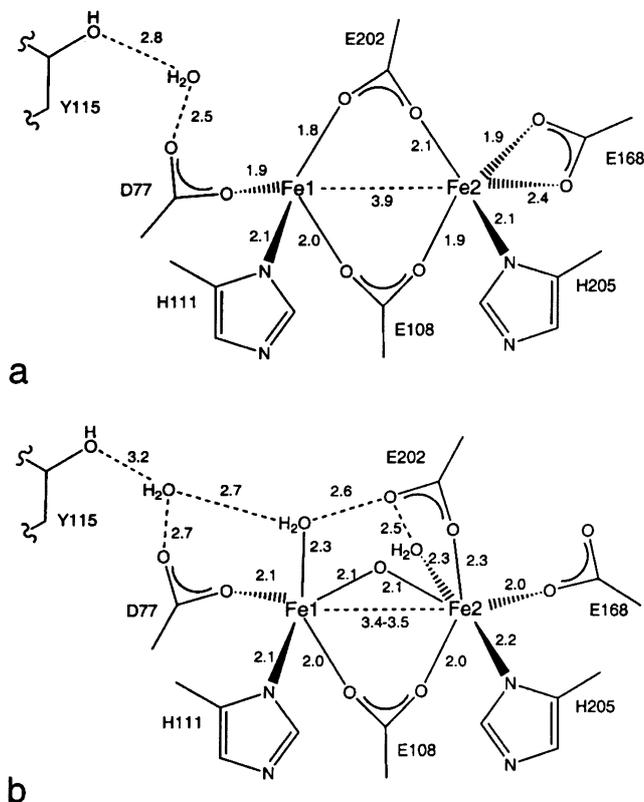
Analog den ESR-Messungen im X-Band wurde auch im Q-Band ein temperatursensitiver Signal gefunden, das zu tiefen Temperaturen breiter wurde und komplexere Strukturen aufwies. Dies und die Zentrierung bei  $g = 2$  sprachen dafür, das es sich bei diesem Signal um dieselbe Spezies wie im X-Band handelte. Da sich das Signal im X-Band empfindlich gegen HU gezeigt hatte, wurde auch bei den Messungen im Q-Band HU zur Probe gegeben. Da daraufhin wieder proteingebundenes Mangan im Spektrum zu erkennen war, war es nun weitgehend sicher, daß es sich bei der gefundenen Spin-Kopplung um eine Kopplung des Tyrosyl-Radikals mit dem Mangan-Zentrum handelte, die durch die Zerstörung des Radikals mit HU aufgelöst wurde und so das proteingebundene Mangan sichtbar werden ließ. Die Simulation dieses Spektrums ergab Daten, die das Modell des einkernigen Mangan-Zentrums stützten. Der Parameter  $D$  der Nullfeldaufspaltung sprach mit einem Wert von 203 G (entsprechend  $190 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) für eine feste Bindung des Mangan-Ions. Das Verhältnis der ZFS-Parameter  $E/D = 0,27$  zeigte eine verzerrt rhombische Koordination an. Dies alles sprach für die Bindung in der Metallbindungsstelle eines Proteins, so dass es weitgehend sicher war, dass das Mangan in der Metallbindungsstelle des Metallocofaktors der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* gebunden war.

Angesichts der Komplexität der Aufspaltung sowohl im X-Band, als auch im Q-Band war eine detaillierte Analyse des gekoppelten Spektrums im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Existenz der Kopplung ließ jedoch den Schluss zu, dass sich Radikal und Metall in relativer Nähe befanden, sich also innerhalb desselben Protein-Monomers befinden mussten.

Eine vergleichbare Spin-Kopplung ist im pflanzlichen Photosystem II zwischen einem Tyrosyl-Radikal und dem  $\text{Mn}_4$ -Cluster zu finden, deren Abstand 5 Å beträgt (DORLET et al., 1999). In den Fe-RNR der Klasse Ib aus *E. coli* und *S. typhimurium* wurde der Abstand des Metallzentrums zum radikaltragenden Tyrosin ebenfalls mit 5 Å bestimmt (HÖGBOM et al., 2002), ein vergleichbarer Abstand war auch für die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* anzunehmen. Damit lagen Bedingungen vor, in denen die beobachtete Kopplung auftreten konnte (P. P. Schmidt, persönliche Mitteilung). Es sprach also einiges dafür, dass das Mangan

---

der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nach Expression in *C. ammoniagenes* pOCA2 eine Spin-Kopplung mit dem Tyrosyl-Radikal aufwies.



**Abb. 4.10:** Kristallstruktur-Daten des R2F-Proteins aus *C. ammoniagenes* nach Expression in *E. coli* (HÖGBOM et al. 2002); **a** reduzierte Form; **b** oxidierte Form

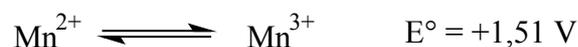
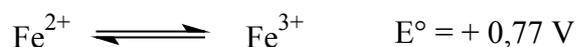
### Die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* – Klasse Ib oder Klasse IV?

Aufgrund der besonderen Eigenschaften der Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* war eine vierte Klasse von RNR mit diesem Enzym als Prototyp postuliert worden (STUBBE et al., 1995). Dafür sprach vor allem die Mangan-Abhängigkeit der Ribonucleotid-Reduktion *in vivo*, die Erstbeschreibung des Holoenzym als Manganenzym und ESR-spektroskopische Hinweise auf ein einkerniges Mangan(II)-Zentrum im R2F-Protein (s. Einleitung). Autoren einer anderen Arbeitsgruppe hatten die RNR aus *C. ammoniagenes* nach Präparation aus dem Wildtyp zunächst noch als Manganenzym der Klasse Ib charakterisiert (FIESCHI et al., 1998), dann jedoch nach Expression des *nrdF*-Gens in *E. coli* die Existenz eines Mangan-Enzyms in Zweifel gezogen (HUQUE et al., 2000) und letztlich gänzlich zurückgewiesen (HÖGBOM et al., 2002).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse haben jedoch zeigen können, dass die Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* ein Manganenzym ist. Die Ergebnisse dieser

Arbeit geben erstmals nachhaltige Hinweise auf die Wechselwirkung von Mangan und Radikal und auf die Beteiligung des Mangans an der Generierung des Radikals.

Die hauptsächlichen Kriterien für die Einordnung einer Ribonucleotid-Reduktase in die Klasse Ib ist die Codierung durch die *nrDEF*-Gene und das Fehlen der Aktivitäts-Bindungsstelle im R1E-Protein, woraus eine Stimulierung der Enzymaktivität durch dATP resultiert. Beide Kriterien treffen auf die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* zu, wie an der Sequenzhomologie der Gene (OEHLMANN et al., 1998) und am kinetischen Verhalten (WILLING et al., 1988) deutlich wird. Eine Einordnung dieses Enzyms in die Klasse Ib erscheint also auf den ersten Blick korrekt. Jedoch muss betont werden, dass die bisher nach Überexpression in *E. coli* studierten Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I alle ein zweikerniges Eisenzentrum aufweisen. Die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* weist durch ihr einkerniges Mangan (II)-Zentrum entscheidende Unterschiede zu diesen Fe-RNR auf. Ein wichtiger Unterschied am Mn-Zentrum der RNR aus *C. ammoniagenes* ist, dass es nicht auf „herkömmlichem“ Wege, d. h. mit Sauerstoff, reaktiviert werden kann wie die eisenhaltigen Enzyme. Mangan(II) hat ein höheres Oxidationspotential als Eisen und kann nicht so leicht durch Luftsauerstoff oxidiert werden. Für die Redoxreaktionen beider Metalle zwischen den Oxidationsstufen 2 und 3 gelten folgende Potentiale (RIEDEL, 1990):



Daher ist für die Mn-RNR die Existenz eines gesonderten Systems zur Oxidation des Metallzentrums für die Radikalerzeugung oder sogar ein System zur direkten Radikalerzeugung zu erwarten. Ferner scheint für den Einbau des Metalls in das Enzym in *C. ammoniagenes* ein Mechanismus zu existieren, der in *E. coli* fehlt, da das Enzym nur in *C. ammoniagenes* mit einem einkernigen Mangan-Zentrum aufgebaut wird. Darüber hinaus zeigt die Mn-RNR auch andere spektroskopische Eigenschaften als die Enzyme der Klasse I. Die ESR-Spektren sind einzigartig für Ribonucleotid-Reduktasen und deuten auf eine geänderte Umgebung von Radikal und Metallzentrum hin. Darüber hinaus zeigen neuere Untersuchungen, dass die Regulation der *nrDEF*-Expression in *C. ammoniagenes* durch Mangan stimuliert wird, während weder Eisenzugabe noch Eisenmangel einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation haben (TORRENTS et al., 2003).

Die Bedeutung von Mangan für das Wachstum von Organismen konnte dabei bisher nicht nur für *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* nachgewiesen werden, sondern auch für eine Reihe

---

weiterer Organismen wie einigen *Arthrobacter* Spezies (PLÖNZIG & AULING, 1987), *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae* (QUE & HELMANN, 2000), *Saccharomyces cerevisiae* (LUK et al., 2003) oder *Treponema pallidum* (POSEY et al., 1999). Eine Untersuchung der Ribonucleotid-Reduktasen steht in vielen dieser Fälle noch aus oder erfolgte nach Expression in *E. coli*, so dass die Zahl der Mn-RNRs noch wachsen könnte.

Zusammen mit den bereits genannten Gründen scheint es daher nach wie vor sinnvoll, die Mn-RNR nicht einfach nur als ein weiteres Klasse Ib-Enzym zu betrachten, sondern als Vertreter einer eigenen Klasse von RNRs anzusehen. Wenn die Nomenklatur die Nähe zu den Klasse Ib-RNR berücksichtigen soll, könnte die Zuordnung zu einer Klasse Ic oder Klasse Ib1 erfolgen. Es scheint jedoch sinnvoller, die Ribonucleotid-Reduktasen anhand ihres Metallzentrums zu unterscheiden, da dies bereits ein entscheidendes Kriterium in der Klasseneinteilung ist. Bereits jetzt umfasst die Klasse I alle Reduktasen mit einem  $\mu$ -oxo-di-Eisen-Zentrum, Klasse II die von Adenosyl-Cobalamin abhängigen und Klasse III die über ein Eisen-Schwefel-Zentrum aktivierten Reduktasen, so dass die Klasse IV als Klasse der Mangan-abhängigen Reduktasen erhalten bleiben sollte. Ferner ist es möglich, dass die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* nicht die einzige Mn-abhängige RNR ist, schließlich sind schon lange Organismen bekannt, die eine mangan-abhängige Ribonucleotid-Reduktion zeigen (WILLING, 1986; MOHAMED et al., 1998), und bei keinem der Organismen, bei denen heute manganabhängiges Wachstum bekannt ist, wurde die Ribonucleotid-Reduktase aus homologer Überproduktion charakterisiert. Die Charakterisierung der RNR aus *C. glutamicum*, einem Organismus mit naher Verwandtschaft zu *C. ammoniagenes* ist noch nicht abgeschlossen, zeigt jedoch die gleichen Eigenschaften wie die Mn-RNR aus *C. ammoniagenes*.

Die Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 wird daher als Prototyp der Klasse IV vorgeschlagen.

---

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine homologe Überexpression des *nrdF*-Gens aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 etabliert werden, deren Expressionsrate hoch genug war, um das Radikal des R2F-Proteins der manganabhängigen Ribonucleotid-Reduktase aus *C. ammoniagenes* ATCC 6872 (codiert durch das *nrdF*-Gen) bereits im Rohextrakt UV/VIS-spektroskopisch detektieren und quantifizieren zu können. Durch Entwicklung eines dreistufigen Reinigungsprotokolls, das Methoden der Anionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie für den präparativen Maßstab nutzte, konnte das R2F-Protein zur Homogenität gereinigt werden. Mit den Methoden der UV/VIS- und ESR-Spektroskopie wurden die Ergebnisse aus der Charakterisierung des Wildtyp-Enzyms (GRIEPENBURG 1998) bestätigt und dramatisch erweitert. Die Identifizierung des stabilen freien Radikals als Tyrosyl-Radikal war erfolgreich. Die Charakterisierung des Metallzentrums als mononucleares Mn(II)-Zentrum konnte durch erweiterte spektroskopische Ergebnisse bestätigt werden. Darüber hinaus wurde ein für Ribonucleotid-Reduktasen völlig neues ESR-Signal einer Spin-Spin-Kopplung gefunden. Dieses Signal wurde mittels vergleichender Messungen am radikalhaltigen und (durch Zugabe des Radikalfängers Hydroxyharnstoff erzeugten) radikalfreien Enzym als Kopplung des Tyrosyl-Radikals mit dem Mangan(II)-Zentrum charakterisiert. Ergebnisse aus der Zellanzucht erbrachten nachhaltige Hinweise auf die essentielle Funktion des Mangans für die Radikalgenerierung *in vivo*.

Die Einordnung der manganabhängigen Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* in die Klasse IV der Ribonucleotid-Reduktasen wurde somit bestätigt.

Problematisch in der Bearbeitung des Enzyms ist seine geringe Stabilität in teilgereinigten Fraktionen, so dass der Verlust an Spinkonzentration zu Beginn der Aufreinigung noch immer erheblich ist. Für eine zukünftige Bearbeitung wird daher eine weitere Optimierung der Reinigungsmethoden unerlässlich sein, um die spezifische Spinkonzentration für eine Kristallisation des katalytisch aktiven Enzyms weiter zu steigern. Mit der nun erreichbaren Enzymreinheit sollte es möglich sein, durch Anwendung weiterer spektroskopischer Methoden wie Circular-Dichroismus (CD) und magnetischem Circular-Dichroismus (MCD) genaueren Aufschluss über die Koordination des Metallzentrums und die Geometrie der Metallbindungsstelle zu erhalten. Erfolge aus der Anwendung fortgeschrittener Techniken der ESR-Spektroskopie wie ENDOR oder Elektron-Spin-Echo-Detektion sind dagegen wegen der auftretenden Spin-Spin-Kopplung bei dem derzeitigen Stand der Ergebnisse fraglich.

Ferner wird eine eingehende Charakterisierung der übrigen Proteine des *nrd*-Genclusters, NrdH und NrdI sowie des zwischen *nrdE* und *nrdF* liegenden *open reading frame* (s. Abbildung 1.7) möglicherweise entscheidende Einblicke in die Funktion der Mn-RNR aus *C. ammoniagenes* und darüber hinaus für die RNR der Klasse Ib ermöglichen.

Ferner wäre zu überprüfen, ob *Corynebacterium ammoniagenes* als Alternative zu *E. coli* für die Expression von Genen anderer Gram-positiver (eventuell pathogener) Organismen mit hohem GC-Gehalt wie etwa *Mycobacterium*-Spezies dienen kann, um bei der Expression der Gene dem biologischen Hintergrund des Originalstammes so nahe wie möglich zu bleiben.

Eine Kristallisation der R2F-Proteins aus der in dieser Arbeit vorgestellten homologen Überexpression des *nrdF*-Gens scheint möglich und sollte daher eins der vorrangigen Ziele der näheren Zukunft sein.

---

---

## 6 Literatur

- Abbouni, B.:** Biochemische Charakterisierung der Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium glutamicum* im Vergleich zum Manganenzym aus *Corynebacterium ammoniagenes*; Dissertation, Universität Hannover, 1999
- Abbouni, B.; Ellhariry, H. and Auling, G.:** Arrest of cell cycle by inhibition of ribonucleotide reductase induces accumulation of NAD<sup>+</sup> by Mn<sup>2+</sup>-supplemented growth of *Corynebacterium ammoniagenes*; Biotechnol. Lett. (2003) 25, 143 – 147
- Åberg, A.:** Ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. Structural aspects of protein function; Dissertation, Universität Stockholm, 1993
- Åberg, A.; Hahne, S.; Karlsson, M.; Larsson, Å.; Ormö, M.; Åhgren, A. and Sjöberg, B.-M.:** Evidence for two different classes of redox-active cysteins in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*; J. Biol. Chem. (1989) 264, 12249 – 12252
- Allard P.; Barra A. L.; Andersson K. K.; Schmidt P. P.; Atta M. and Gräslund, A.:** Characterization of a New Tyrosyl Radical in *Salmonella typhimurium* Ribonucleotide Reductase with EPR at 9.45 and 245 GHz; J. Am. Chem. Soc. (1996) 118, 895 – 896
- Auling, G.:** Nucleotid-Stoffwechsel bei *Brevibacterium ammoniagenes* und *Micrococcus luteus*; Habilitationsschrift, Universität Hannover 1980
- Auling, G.; Thaler, M. and Diekmann, H.:** Parameters of unbalanced growth and reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 induced by depletion of Mn<sup>2+</sup>. Inhibitor studies on the reversibility of deoxyribonucleic acid synthesis; Arch. Microbiol. (1980) 127, 105 – 114
- Auling, G.:** The effect of manganese limitation on DNA precursor synthesis during nucleotide fermentation with *Brevibacterium ammoniagenes* and *Micrococcus luteus*; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1983) 18, 229 – 235
- Auling, G. and Follmann, H.:** Manganese dependent ribonucleotide reduction and overproduction of nucleotides in coryneform bacteria. In: Metal Ions in Biological Systems (eds.: Siegel H.; Siegel A.), Vol. 30, Metalloenzymes Involving Amino Acid-Residue and Related Radicals; Marcel Dekker Inc., New York, 1994, 131 – 161
- Ausubel, F. A.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidemann, J. G.; Smitz, J. A. and Struhl, K. (eds):** Current protocols in molecular biology; Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1990
- Beratan, D. N.; Onuchic, N. J.; Winkler, J. R. and Gray, H. B.:** Electron tunnelling pathways in proteins; Science (1992) 258, 1740 – 1741
-

- 
- Birnboim, H. C. and Doly, J.:** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucleic Acids Res.* (1979) 7, 1513 – 1523
- Blasczyk, K.:** Radikalstatus und Metallzentrum der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872; Dissertation, Universität Hannover, 1994
- Blum, H.; Beier, H. and Gross, H. J.:** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels; *Electrophoresis* (1987) 8, 93 – 99
- Booker, S. and Stubbe, J. A.:** Cloning, sequencing and expression of the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90, 8352 – 8356
- Bradford, M. M.:** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* (1976) 72, 248 – 257
- Brown, N. C. and Reichard, P.:** Role of Effektor Binding in Allosteric Control of Ribonucleoside Diphosphate Reductase; *J. Mol. Biol.* (1969) 46, 39 – 55
- Caras, I. W.; Levinson, B. B.; Fabry, M.; Williams, S. R. and Martin, D. W. Jr.:** Cloned mouse ribonucleotide reductase subunit M1 cDNA reveals amino acid sequence homology with *Escherichia coli* and Herpesvirus ribonucleotide reductases; *J. Biol. Chem.* (1984) 260, 7015 – 7022
- Carlson, J.; Fuchs, J. A. and Messing, J.:** Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 4294 – 4297
- Chen, K.; Jung, Y.-S.; Bonagura, C. A.; Tilley, G. J.; Prasad, G. S.; Sridhar, V.; Armstrong, F. A.; Stout, C. D. and Burgess, B. K.:** *Azotobacter vinelandii* Ferredoxin I; *J. Biol. Chem.* (2002) 277 (7), 5603 – 5610
- Chen, L. Y.; Chen, M. Y.; Leu, W. M.; Tsai, T. Y. and Lee, Y. H.:** Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelCl. MelCl is likely a chaperone for apotyrosinase; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 18710 – 18716
- Chabes, A.; Domkin, V.; Larsson, G.; Liu, A. M.; Gräslund, A.; Wijmenga, S. and Thelander, L.:** Yeast ribonucleotide reductase has a heterodimeric iron-radical-containing subunit; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, 2474 – 2479
- Climent, I.; Sjöberg, B.-M. and Huang, C. Y.:** Site-directed mutagenesis and deletion of the carboxyl terminus of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. Effects on catalytic activity and subunit interaction; *Biochemistry* (1992) 31, 4801 – 4807
-

- 
- Cooper, T. G.:** Biochemische Arbeitsmethoden; Walter de Gruyter, Berlin / New York, 1981
- Davis, R. E. and Mathews, C. K.:** Acidic C-terminus of vaccinia virus DNA-binding protein interacts with ribonucleotide reductase; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 745 – 749
- Dean, D. R.; Bolin, J. T. and Zeng, L.:** Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis; J. Bacteriol. (1993) 175, 6737 – 6744
- Dorlet, P.; Boussac, A.; Rutherford, A. W. and Un, S.:** Multifrequency High-Field EPR-Study of the Interaction between the Tyrosyl Z Radical and the Manganese Cluster in Plant Photosystem II; J. Phys. Chem. B (1999) 103, 10945 – 10954
- Dower, W. J.; Miller, J. F. and Ragsdale, C. W.:** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation; Nucleic Acids Res. (1988) 16, 6127 – 6245
- Eikmanns, B. J.; Kleinertz, E.; Liebl, W.; Sahm, H.:** A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene (1991) 102 (1), 93 – 98
- Eliasson, R.; Pontis, E.; Jordan, A. and Reichard, P.:** Allosteric Regulation of the Third Ribonucleotide Reductase (NrdEF Enzyme) from Enterobacteriaceae; J. Biol. Chem. (1996) 271 (43), 26582 – 26587
- Farver, O. and Pecht, I.:** The role of the medium in long-range electron transfer; JBIC (1997) 2, 387 – 392
- Fieschi, F.; Torrents, E.; Touloukhonova, L.; Jordan, A.; Hellman, U.; Barbe, J.; Gibert, I.; Karlsson, M. and Sjöberg, B.-M.:** The Manganese-containing Ribonucleotide Reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* Is a Class Ib Enzyme; J. Biol. Chem. (1998) 273 (8), 4329 – 4337
- Filatov, D.; Ingemarson, R.; Gräslund, A. and Thelander, L.:** The role of herpes simplex virus ribonucleotide reductase small subunit carboxyl terminus in subunit interaction and formation of iron-tyrosyl center structure; J. Biol. Chem. (1992) 267, 15816 – 15822
- Flint, D. H.:** *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase; J. Biol. Chem. (1996) 271, 16068 – 16074
- Follmann, H.:** Deoxyribonucleotides: the unusual chemistry and biochemistry of DNA precursors; Chem. Soc. Rev. (2004) 33, 225 – 233
-

- 
- Fontecave, M.; Eliasson, R. and Reichard, P.:** Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *E. coli*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 2147 – 2151
- Ge, J.; Perlstein, D. L.; Nguyen, H.-H.; Bar, G.; Griffin, R. G. and Stubbe, J.:** Why multiple small subunits (Y2 and Y4) for yeast ribonucleotide reductases? Toward understanding the role of Y4; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98, 10067 – 10072
- Gräslund, A.; Ehrenberg, A. und Thelander, L.:** Characterization of the free radical of mammalian ribonucleotide reductase; J. Biol. Chem. (1982) 257, 5711 – 5715
- Gräslund, A. and Sahlin, M.:** Electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic resonance studies of class I ribonucleotide reductase; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (1996) 25, 259 – 286
- Gripenburg, U.; Blasczyk, K.; Kappl, R.; Hüttermann, J. and Auling, G.:** A Divalent Metal Site in the Small Subunit of the Manganese-Dependent Ribonucleotide Reductase of *Corynebacterium ammoniagenes*; Biochemistry (1998) 337 (22), 7992 – 7996
- Gripenburg, U.:** Das stabile freie Radikal und das mononucleare Manganzentrum im CA2-Protein der Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872; Dissertation, Universität Hannover, 1998
- Haynes, J. A. and Britz, M. L.:** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: Growth in tween 80 increases transformation frequencies; FEMS Lett. (1989) 61, 329 – 334
- Herbert, D.; Philipps, P. J. and Stange, R. E.:** Chemical analysis of microbial cells, 209 – 344. In: Norris J. R. and Ribbons D. W. (eds.): Methods in Microbiology, Vol. 5B; Academic Press, London, 1971
- Högbom, M.; Huque, Y.; Sjöberg, B.-M. and Nordlund, P.:** Crystal Structure of the Di-iron / Radical Protein of Ribonucleotide Reductase from *Corynebacterium ammoniagenes*; Biochemistry (2002) 41 (4), 1381 – 1389
- Hogenkamp, H. P. C.:** Nature and properties of the bacterial ribonucleotide reductases; Pharmac. Ther. (1984) 23, 393 – 405
- Howell, M. L.; Roseman, N. A.; Slabaugh, M. B. and Mathews, C. K.:** Vaccinia virus ribonucleotide reductase – correlation between deoxyribonucleotide supply and demand; J. Biol. Chem. (1993) 268; 7155 – 7162
- Huang, M. X. and Elledge, S. J.:** Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*; Mol. Cell. Biol. (1997) 17, 6105 – 6113
-

- 
- Huque, Y.; Fieschi, F.; Torrents, E.; Gibert, I.; Eliasson, R.; Reichard, P.; Sahlin, M. and Sjöberg, B.-M.:** The Active Form of the R2F Protein of Class Ib Ribonucleotide Reductase from *Corynebacterium ammoniagenes* Is a Diferric Protein; J. Biol. Chem. (2000) 275 (33), 25365 – 25371
- Ingemarson, R.; Gräslund, A.; Darling, A. and Thelander, L.:** Herpes simplex virus ribonucleotide reductase: Expression in *Escherichia coli* and purification to homogeneity of a tyrosyl free radical-containing enzymatically active form of the 38-kilodalton subunit; J. Virol. (1989) 63, 3769 – 3776
- Jacoby, M.; Ngouoto-Nkili, C. and Burkovski, A.:** Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. Biotechnology Techniques (1999) 13: 437 – 441
- Jordan, A.; Pontis, E.; Atta, M.; Krook, M.; Gibert, I.; Barbé, J. and Reichard, P.:** A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: Characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme; Proc. Natl. Acad. Sci USA (1994) 91, 12892 – 12896
- Jordan, A.; Torrents, E.; Jeanthon, C.; Eliasson, R.; Hellman, U.; Wernstedt, C.; Barbé, J.; Gibert, I. and Reichard, P.:** B<sub>12</sub>-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94, 13487 – 13492
- Jordan, A. and Reichard, P.:** Ribonucleotide Reductases; Annu. Rev. Biochem. (1998) 67, 71-98
- Karpishin, T. B.; Grinstaff, M. W.; Komar-Panicucci, S.; McLendon, G. and Gray, H. B.:** Electron transfer in cytochrome c depends on the structure of the intervening medium; Structure (1994) 2, 415 – 422
- Kennedy, M.; Yu, L.; Lima, M. J.; Ascenso, C. S.; Czaja, C.; Moura, I.; Moura, J. J. G. and Rusnak, F.:** Metal binding to the tetrathiolate motif of desulfiredoxin and related polypeptides; JBIC (1998) 3, 643-649
- Knobbe, N.:** Schwermetallbestimmung in Proteinen mit ICP-MS; Diplomarbeit, Universität Hannover, 2003
- Kunz, B. A. and Kohalmi, S. E.:** Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels; Annu. Rev. Genet. (1991) 25, 339 – 359
- Kunz, B. A.; Kohalmi, S. E.; Kunkel, T. A.; Mathews, C. K.; McIntosh, E. M. and Reidy, J. A.:** International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability; Mutat. Res. (1994) 318, 1-64
-

- 
- Larsson, Å. and Sjöberg, B.-M.:** Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase; *EMBO J.* (1986) 5, 2037 – 2040
- Lee, M. H.; Pankratz, H. S.; Wang, S.; Scott, R. A. and Finnegan, M. G.:** Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly; *Protein Sci.* (1993) 2, 1042 – 1052
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J.:** Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* (1951) 193, 265 – 275
- Luk, E.; Jensen, L. T. and Culotta, V.:** The many highways for intracellular trafficking of metals; *J. Biol. Inorg. Chem* (2003) 8, 803 – 809
- Luo, C. H.:** Isolierung und Charakterisierung von thermosensitiven Mutanten der Mangan-Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium (Brevibacterium) ammoniagenes* ATCC 6872; Dissertation, Universität Hannover, 1994
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J.:** Molecular cloning. A laboratory manual; Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1982
- Mann, G. J.; Gräslund, A.; Ochiai, E.-L.; Ingemarson, R. and Thelander, L.:** Purification and characterization of recombinant mouse and herpes simplex virus ribonucleotide reductase R2 subunit; *Biochemistry* (1991) 30, 1939 – 1947
- Maier, T.; Lottspeich, F. and Böck, A.:** GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*; *Eur. J. Biochem.* (1995) 230, 133 – 138
- Mao, S. S.; Holler, T. P.; Bollinger, J. M. Jr.; Yu, G. X.; Johnston, M. I. and Stubbe, J.-A.:** Interactions of C225S R1 mutant subunit of ribonucleotide reductase with R2 and nucleoside diphosphates: Tales of a suicidal enzyme; *Biochemistry* (1992/a) 31, 9744 – 9751
- Mao, S. S.; Holler, T. P.; Yu, G. X.; Bollinger, J. M. Jr.; Booker, S.; Johnston, M. I. and Stubbe, J.-A.:** A model for the role of multiple cysteine residues involved in ribonucleotide reduction: Amazing and still confusing; *Biochemistry* (1992/b) 31, 9733 – 9743
- Mao, S. S.; Yu, G. X.; Chalfoun, D. and Stubbe, J.-A.:** Characterization of C439S R1, a mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase: Evidence that C439 is a residue essential for nucleotide reduction and C439S R1 is a protein possessing novel thioredoxin-like activity; *Biochemistry* (1992/c) 31, 9752 – 9759
- Merchant, S. and Dreyfuss, B. W.:** Posttranslational Assembly of Photosynthetic Metalloproteins; *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1999) 49, 25 - 51
-

- 
- Miller, J. H.:** Experiments in molecular genetics; Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1972
- Mohamed, S. F.; Gvozdiak, O. R.; Stallmann, D.; Gripenburg, U.; Follmann, H. and Auling, G.:** Ribonucleotide Reductase in *Bacillus subtilis* – evidence for a Mn-dependent enzyme; Biofactors (1998) 7, 337 – 344
- Moser, C. C.; Keske, J. M.; Warncke, K.; Faris, R. S. and Dutton, P. L.:** Nature of biological electron transfer; Nature (1992) 355, 796 – 802
- Moser, C. C.; Page, C. C.; Chen, X. and Dutton, P. L.:** Biological electron tunneling through native protein media, JBIC (1997) 2, 393 – 398
- Nar, H.; Huber, R.; Messerschmidt, A.; Filippou, A. C. and Barth, M.:** Characterization and crystal structure of zinc azurin, a by-product of heterologous expression in *E. coli* of *Pseudomonas aeruginosa* copper azurin; Eur. J. Biochem. (1992) 205, 1123 – 1129
- Nicholson, D. W. and Neupert, W.:** Import of cytochrome *c* into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome *c*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 4340 – 4344
- Nordlund, P.; Sjöberg, B.-M. and Eklund, H.:** Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase; Nature (1990) 345, 593 – 598
- Nordlund, P. and Eklund, H.:** Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2; J. Mol. Biol. (1993) 232, 123 – 164
- Nyholm, S.; Thelander, L.; and Gräslund, A.:** Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea; Biochemistry (1993) 32, 11569 – 11574
- Oehlmann, W.; Gripenburg, U. and Auling, G.:** Cloning and sequencing of the *nrdF* gene of *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 encoding the functional metallo-cofactor of the manganese-ribonucleotide reductase (Mn-RRase); Biotech. Lett. (1998) 20 (9), 483 – 488
- Oehlmann W.:** Klonierung der Gene der Ribonucleotid-Reduktasen von *Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium glutamicum*; Dissertation, Universität Hannover, 1998
- Oehlmann, W. and Auling, G.:** Ribonucleotide reductase (RNR) of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 – genetic characterization of a second class IV enzyme; Microbiology (1999) 145, 1595 – 1604
-

- 
- Oka, T.; Udagawa, K. and Kinoshita, S.:** Unbalanced growth death due to depletion of  $Mn^{2+}$  in *Brevibacterium ammoniagenes*; J. Bacteriol. (1968) 96, 1760-1767
- Ormö, M.; Regenström, K.; Wang, Z.; Que, L.; Sahlin, M. and Sjöberg, B.-M.:** Residues Important for Radical Stability in Ribonucleotide Reductase from *Escherichia coli*; J. Biol. Chem. (1995) 270 (12), 6570 – 6570
- Parker, N. J.; Begley, C. G. and Fox, R. M.:** Human M1 subunit of ribonucleotide reductase: cDNA sequence and expression in stimulated lymphocytes; Nucleic Acids Res. (1991) 19, 3741
- Petersson, L.; Gräslund, A.; Ehrenberg, A.; Sjöberg, B.-M. and Reichard, P.:** The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*; J. Biol. Chem. (1980) 255, 6706 – 6712
- Philips, G.; Clement, B. and Gigot, C.:** Molecular characterization and cell cycle-regulated expression of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to the small subunit of ribonucleotide reductase; FEBS Lett. (1995) 358, 67 – 70
- Pierce, B. S.; Elgren, T. E. and Hendrich, M. P.:** Mechanistic implications for the Formation of the Diiron Cluster in Ribonucleotide Reductase Provided by Quantitative EPR Spectroscopy; J. Am. Chem. Soc. (2003) 125 (29), 8748 – 8759
- Plönzig, J. und Auling, G.:** Manganese deficiency impairs ribonucleotide reduction but not replication in *Arthrobacter species*; Arch. Microbiol. (1987) 146, 396 – 401
- Poole, A. M.; Logan, D. T. and Sjöberg, B.-M.:** The Evolution of the Ribonucleotide Reductases: Much Ado About Oxygen; J. Mol. Evol. (2002) 55, 180 – 196
- Que, Q. and Helmann, J. D.:** Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of Proteins; Mol. Microbiol. (2000) 35 (6), 1454 – 1468
- Reed, G. H. and Markham, G. D.:** EPR of Mn(II) complexes with enzymes and other proteins; In: Biological Magnetic Resonance (eds. Berliner L. J. and Reuben J.), Vol. 6, Plenum Press, New York 1984, 73 – 142
- Reichard, P. and Ehrenberg, A.:** Ribonucleotide reductase – a radical enzyme; Science (1983) 221, 514 – 519
- Riedel, E.:** Anorganische Chemie, 2. Auflage; Walter de Gruyter, Berlin, 1990
- Saiki, R.; Scharf, F.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Ehrlich, H. A. and Arnheim, N.:** Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globulin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia; Science (1985) 230, 1350 – 1354
-

- 
- Salem, J. S.; Scott, C. P.; Li, L. S.; Cooperman, B. S. and Rubin, H.:** High level expression of the large subunit of mouse ribonucleotide reductase in a baculovirus system; FEBS Lett. (1993) 323, 93 – 95
- Schmidt, P. P.; Andersson, K. K.; Barra, A.-L.; Thelander, A.; and Gräslund, A.:** High Field EPR Studies of Mouse Ribonucleotide Reductase Indicate Hydrogen Binding of the Tyrosyl Radical; J. Biol. Chem. (1996) 271 (39), 23615 – 23618
- Scotti, C.; Valbruzzi, A.; Perrego, M.; Galizzi, A. and Albertini, A. M.:** The *Bacillus subtilis* ribonucleotide reductase is similar to the second class I NrdE/NrdF enzymes of Enterobacteriaceae; Microbiology (1996) 142, 2995 – 3004
- Sjöberg, B.-M.; Reichard, P.; Gräslund, A. and Ehrenberg, A.:** Nature of the free radical in ribonucleotide reductase. A sequence comparison; FEBS Lett. (1977) 252, 536 – 541
- Sjöberg, B.-M.:** Ribonucleotide reductases – a group of enzymes with different metallosites; Struct. Bond. (1997) 88, 139-173
- Skourtis, S. S.; and Beratan, D. N.:** High and low resolution theories of protein electron transfer; JBIC (1997) 2, 378 – 386
- Stallmann, D.:** Nachweis und Eigenschaften der Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Extrakten aus *Bacillus subtilis*; Diplomarbeit, Universität Kassel, 1995
- Stehr, M., Schneider, G.; Åslund, F.; Holmgren, A. and Lindkvist, Y.:** Structural Basis for the Thioredoxin-like Activity Profile of the Glutaredoxin-like NrdH-redoxin from *Escherichia coli*; J. Biol. Chem. (2001) 276 (38), 35836 – 35841
- Stubbe, J.-A. and van der Donk, W.:** Ribonucleotide reductases: radical enzymes with suicidal tendencies; Chem. Biol. (1995) 2, 793 – 801
- Stubbe, J.-A. (a) and van der Donk, W.:** Protein Radicals in Enzyme Catalysis; Chem. Rev. (1998/a) 98, 705
- Stubbe, J.-A.:** Ribonucleotide Reductases in the twenty-first century; PNAS (1998/b) 95, 2723 – 2724
- Stubbe, J.-A. and Riggs-Gelasco, P.:** Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase; Trends Biochem. Sci. (1998/c) 23(11), 438-43
- Stubbe, J.-A.:** Radicals with a controlled lifestyle; Chem. Comm. (2003/a) 20, 2511-2513
- Stubbe, J.-A.:** Di-iron-tyrosyl radical ribonucleotide reductases; Curr. Op. Chem. Biol. (2003/b) 7, 183 – 188
-

- 
- Taniuchi, H.; Basile, G.; Taniuchi, M. and Veloso, D.:** Evidence for formation of two thioether bonds to link heme to apocytochrome *c* by partially purified cytochrome *c* synthetase; *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 10963 – 10966
- Tauer, A. and Benner, S. A.:** The B<sub>12</sub>-dependent ribonucleotide reductase from the archebacterium *Thermoplasma acidophila*: An evolutionary solution to the ribonucleotide conundrum; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94, 53 – 58
- Thaler, M. and Diekmann, H.:** The effect of manganese deficiency on lipid content and composition in *Brevibacterium ammoniagenes*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1979) 6, 379 – 387
- Thelander, M.; Gräslund, A. and Thelander, L.:** Subunit M2 of mammalian ribonucleotide reductase. Characterization of a homogenous protein isolated from M2-overproducing mouse cells; *J. Biol. Chem.* (1985) 260, 2737 – 2741
- Torrents, E.; Roca, I and Gibert, I.:** *Corynebacterium ammoniagenes* class Ib ribonucleotide reductase: transcriptional regulation of an atypical genomic organization in the *nrd* cluster; *Microbiology* (2003) 149, 1011 – 1020
- Uhlen, U. and Eklund, H.:** Structure of ribonucleotide reductase protein R1; *Nature* (1994) 370, 533 – 539
- Uppsten, M.; Färnegårdh, M.; Jordan, A.; Eliasson, R.; Eklund, H. and Uhlin, U.:** Structure of the Large Subunit of Class Ib Ribonucleotide Reductase from *Salmonella typhimurium* and its Complexes with Allosteric Effectors; *J. Mol. Biol.* (2003) 330, 87 – 97
- Weatherburn, D. C.:** Manganese-Containing Enzymes and Proteins, in Bertini I.: *Handbook on Metalloproteins*; Dekker (New York) 2001, 193 – 268
- Wieghardt, K.; Bossek, U.; Ventur, D. and Weiss, J.:** Assembly and structural characterization of binuclear  $\mu$ -oxo-di-acetato bridged complexes of manganese(III). Analogues of the di-iron(III) centre in hemerythrin; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1985) 1985, 347 – 349
- Williams, R. J. P.:** The medium in electron transfer proteins; *JBIC* (1997) 2, 373 – 377
- Willing, A.:** Die Ribonucleotid-Reduktase aus *Brevibacterium ammoniagenes*. Ein neuartiger Typ von Manganenzym; Dissertation, Universität Marburg, 1986
- Willing, A.; Follmann, H. and Auling, G.:** Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme; *Eur. J. Biochem.* (1988/a) 170, 603 – 611
-

- 
- Willing, A.; Follmann, H. and Auling, G.:** Nucleotide and thioredoxin specificity of the manganese ribonucleotide reductase from *Brevibacterium ammoniagenes*; Eur. J. Biochem. (1988/b) 175, 167 – 173
- Winkler, J. R. and Gray, H. B.:** Electron tunnelling in proteins: Role of the intervening medium; JBIC (1997) 2, 399 – 404
- Yang F.; Curran, S. C.; Li, L.-S.; Avarbock, D.; Graf, J. D.; Chua, M.-M.; Lu, G.; Salem, J. and Rubin, H.:** Characterization of Two Genes Encoding the *Mycobacterium tuberculosis* Ribonucleotide Reductase Small Subunit; J. Bacteriol. (1997) 179 (20), 6408 – 6415
- Zheng, L.; White, R. H.; Cash, V. L.; Jack, R. F. and Dean, R. F.:** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 2754 – 2758
- Zumft, W. G.; Viebrock-Sambale, A. and Braun, C.:** Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins; Eur. J. Biochem. (1990) 192, 591 – 599
-

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeiten zu dieser Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt habe.

---

---

## Danksagung

Prof. Dr. Georg Auling danke ich für die interessante Themenstellung, die freundliche Unterstützung und die ständige Bereitschaft zur Diskussion und kritischer Begleitung der Arbeit.

Prof. Dr. Brakhage danke ich dafür, dass er die Arbeiten zu dieser Dissertation mit großem Interesse begleitet und großzügig unterstützt hat.

Prof. Dr. Hans Diekmann gilt der Dank für sein Interesse an dieser Arbeit, seiner Bereitschaft zum Korrekturlesen und für seine hilfreichen Ratschläge.

Prof. Dr. Wolfgang Lubitz vom Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim (Ruhr) möchte ich danken für seine Unterstützung meiner Arbeiten am dortigen Institut.

Prof. Dr. Rolf Thauer vom Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des dortigen ESR-Spektrometers.

Besonderer Dank gilt Dr. Peter Paul Schmidt und Dr. Eduard Reijerse vom Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim (Ruhr) für umfangreiche ESR-Messungen im X- und Q-Band sowie für die Durchführung der Spektrensimulationen. Peter Schmidt und seiner Frau Bettina Katterle möchte ich zusätzlich für die herzliche Aufnahme und (zum Teil sehr spontane) Bereitstellung des Gästebettes danken.

Dr. Antonio Pierik vom Institut für Mikrobiologie der Universität Marburg gilt der Dank für die spontan gewährte Bereitschaft zur Messung von X-Band ESR-Spektren und die richtungsweisenden Diskussionen zu spektroskopischen Fragestellungen.

Spezieller Dank gilt Dr. Jochen Meens vom Institut für Mikrobiologie in Hannover für seine Unterstützung bei Planung und Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten.

Dr. Hans Plattner war immer bereit zu helfen, wo es ging und sich mit Fragen löchern zu lassen.

Vielen Dank auch an Inge Reupke, Armgard Janczikowski und Michael Schubert vom Institut für Mikrobiologie für die tagtägliche Hilfe im Laboralltag. Darüber hinaus gilt allen, die im Institut für Mikrobiologie arbeiten oder gearbeitet haben der Dank für ein phantastisches Arbeitsklima.

---

Besonders erwähnt werden muss Dr. Hesham Elhariry, der es am längsten mit mir im Labor 006 ausgehalten hat und immer da war, um sich über Erfolge mit zu freuen und Misserfolge zu betauern.

Last but not least möchte ich mich bei Manuela und Ann Kristin einfach dafür bedanken, dass es sie gibt, dass sie mich in meiner Arbeit unterstützt und mich auch immer wieder davon ablenkt haben.

---

---

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Olaf Barckhausen  
Geburtsdatum: 10.07.1971  
Geburtsort: Celle  
Familienstand: ledig  
Konfession: evangelisch-lutherisch

### Schulischer Werdegang/Studium

Mai 1990 Abitur am Hölty-Gymnasium Celle  
Oktober 1990 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Göttingen  
Juli 1999 Erlangung des Grades „Diplom-Chemiker“ an der Universität Göttingen  
Thema der Diplomarbeit: „Neue Naturstoffe aus Mikroorganismen: Isolierung und Strukturaufklärung der Akkamycine und Fuchurmycine“  
Sept. 1999 bis Mai 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Organische Chemie der Universität Göttingen  
Juni 2000 bis Mai 2004 Durchführung der experimentellen Arbeiten zu der hier vorgelegten Dissertation am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover;  
Thema der Dissertation: „Nachweis eines Mangan (II)-Zentrums in der Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 nach Überexpression des den Metallocofaktor codierenden *nrdF*-Gens im Originalstamm“  
Sept. 2002 bis Feb. 2003 Wissenschaftlicher Angestellter bei den Dr. Udo Noack Laboratorien für angewandte Biologie in der chemischen Analytik

---