

**Biochemische Charakterisierung der Ribonucleotid-Reduktase aus  
*Corynebacterium glutamicum* im Vergleich zum  
Manganenzym aus *Corynebacterium ammoniagenes***

DEM FACHBEREICH BIOLOGIE  
DER UNIVERSITÄT HANNOVER

ZUR ERLANGERUNG DES GRADES  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

GENEHMIGTE DISSERTATION

VON

**DIPL.-ING. BOUZIANE ABBOUNI**

GEBOREN AM 23. 11. 1963

IN SIDI BEL ABBES

**Referent:** Prof. Dr. G. Auling  
**Korreferent:** Prof. Dr. Müller  
**Tag der Promotion:** 10. 11. 1999

## ABSTRACT

---

### ABSTRACT

BOUZIANE ABBOUNI

Biochemical characterization of ribonucleotide reductase from *Corynebacterium glutamicum* compared to the manganese enzyme of *Corynebacterium ammoniagenes*

Ribonucleotide reductases (RNRs) are common enzymes in all living organisms. They catalyse the reduction of ribonucleotides to the corresponding 2'-deoxyribonucleotides and play a central role in DNA replication and cell proliferation. A radical mechanism is involved in this enzymatic reaction and diverse metallo-cofactors are required in different organisms in order to generate a transient protein radical that initiates nucleotides reduction. The unusual ribonucleotide reductase of *C. ammoniagenes* contains a manganese in the small subunit. In this work the RNR of the closely related species *C. glutamicum* was studied in order to characterize its metallo-cofactor (CG2 protein).

The molecular weight of the CG2 protein was determined after pre-enrichment by hydrophobic interaction chromatography through Superose<sup>TM</sup>12 gel filtration as  $34 \pm 5$  kDa, and corresponds to the theoretical value calculated from the known amino acid sequence of the cloned *nrdF* gene (34.6 kDa). The recent cloning and sequencing of the ribonucleotide reductase genes (*nrdEF*) of *C. glutamicum* and *C. ammoniagenes* allowed to design a synthetic heptapeptide corresponding to the carboxy-terminal end of the CG2 protein. This heptapeptide inhibited both coryneform RNRs. For a study of its radical and metal content the CG2 protein was prepared by Superdex G-200 gel filtration and concentration under vacuum. The radical scavengers hydroxyurea (HU) and *p*-methoxyphenol, known to inhibit the RNR-activity of *C. ammoniagenes*, also inactivate the CG2 protein. The presence of a stable-free radical in the active CG2 protein is shown indirectly by UV/visible difference spectroscopy (HU inhibited CG2 protein subtracted from active sample). The strong attack of the chelating agent EDTA on the RNR activity of *C. glutamicum* may indicate a weak binding of the metal in the CG2 protein. Presence of manganese and absence of iron in the CG2 protein has been demonstrated by inductively coupled plasma mass-spectrometry (ICP-MS). The biochemical characterization of the new type of manganese enzyme revealed the similarity to the RNR of *C. ammoniagenes*.

**Key words: Manganese ribonucleotide reductase, inhibition by a carboxyterminal heptapeptide and radical scavengers, presence of stable free radical, metal-analysis**

### Zusammenfassung

Bouziane Abbouni

Biochemische Charakterisierung der Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium glutamicum* im Vergleich zum Manganenzym aus *Corynebacterium ammoniagenes*. Ribonucleotid-Reduktasen (RRasen) sind universelle Enzyme lebender Zellen, die in einer irreversiblen Reaktion die Reduktion von Ribonucleotiden zu den für DNA-Replikation und Zellproliferation benötigten 2'-Desoxyribonucleotiden katalysieren. Für ihren radikalischen Reaktionsmechanismus nutzen die RRasen unterschiedliche Metall-Cofaktoren, wobei bisher nur für das Enzym aus den Gram-positiven *C. ammoniagenes* eine manganhaltige kleine Untereinheit beschrieben ist. Um auch die RRase aus der verwandten Art *C. glutamicum* zu charakterisieren, wurde gezielt deren kleine Untereinheit, das CG2-Protein, gereinigt. Dessen Reinigung durch analytische hydrophobe Interaktionschromatographie und anschließende Gelfiltration mit Superose<sup>TM</sup> 12 ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichts ( $34 \pm 5$  kDa), welches mit der Berechnung aus den bekannten Aminosäuresequenzen des *nrdF* Gens (34,6 kDa) Übereinstimmt. Die jüngste beschriebene Klonierung und Sequenzierung der Gene der RRase (*nrdEF*) aus *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* ermöglicht die Herstellung des synthetischen Heptapeptids, das dem C-terminalen Ende des CG2-Proteins entspricht. Dieses Heptapeptid hemmt die RRase-Aktivität sowohl von *C. glutamicum* als auch *C. ammoniagenes*. Das CG2-Protein wurde durch Gelfiltration mit Superdex G-200 gereinigt und unter Vakuum konzentriert um Radikal und Metallgehalt zu ermitteln. Die Radikalfänger Hydroxyharnstoff (HU) und *p*-Methoxyphenol, welche die RRase-Aktivität aus *C. ammoniagenes* hemmen, inaktivieren ebenfalls das CG2-Protein aus *C. glutamicum*. Die Gegenwart des stabilen freien Radikals im aktiven CG2-Protein aus *C. glutamicum* konnte indirekt durch das UV/vis-Differenzspektrum (von aktiven und HU gehemmtem CG2-Protein) nachgewiesen werden. Die starke Wirkung des chelatisierenden Agens (EDTA) auf die RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* deutet an, daß das Metall im CG2-Protein schwach gebunden ist. Die Gegenwart von Mangan und die Abwesenheit von Eisen im CG2-Protein wurde durch Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry (ICP-MS-Analyse) nachgewiesen. Die biochemische Charakterisierung der neuen untersuchten RRase aus *C. glutamicum* zeigte die Ähnlichkeit zu RRase aus *C. ammoniagenes*.

**Schlagwörter: Mangan-Ribonucleotid-Reduktase, Hemmung mittels Radikalfängern und C-terminalen Heptapeptid, Die Gegenwart von stabilen freien Radikal, Metallgehaltanalyse**

---

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Einleitung</b>   | 6  |
| 1. 1 Coryneforme Bakterien   | 6  |
| 1. 2 Nutzung von <i>C. glutamicum</i> und <i>C. ammoniagenes</i> für industrielle Zwecke | 7  |
| 1. 3 Einteilung der Ribonucleotid-Reduktasen   | 10 |
| 1. 4 Reaktionsmechanismus der Ribonucleotid-Reduktion                                    | 16 |
| 1. 5 Ribonucleotid-Reduktase-Mutanten  | 17 |
| 1. 6 Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase   | 18 |
| <b>2. Problemstellung</b>  | 21 |
| <b>3 Material und Methoden</b>   | 22 |
| 3. 1 Chemikalien   | 22 |
| 3. 2 Mikroorganismen   | 25 |
| 3. 3 Medien und Lösungen   | 26 |
| 3. 4 Messung von pH-Wert und Trübung   | 29 |
| 3. 5 Stammerhaltung  | 29 |
| 3. 6 Anzucht und Zellernte von <i>C. glutamicum</i>                                      | 29 |
| 3. 7 Permeabilisierung der Zellen mit Ether  | 30 |
| 3. 8 Ribonucleotid-Reduktase-Aktivitätstest  | 31 |
| 3. 9 Zellaufschluß   | 35 |
| 3. 10 Proteinreinigungsmethoden  | 35 |
| 3. 11 Proteinbestimmung in Zellfreien Extrakten  | 35 |
| 3. 11. 1 Bradford Methode  | 36 |
| 3. 11. 2 Lowry Methode   | 36 |
| 3. 12 Fällungen  | 37 |
| 3. 13 Dialyse  | 38 |
| 3. 14 Konzentrierung der Proteine in der GenVac  | 38 |
| 3. 15 Chromatographische Methoden  | 39 |
| 3. 15. 1 Hydrophobe Interaktionschromatographie  | 39 |
| 3. 15. 2 Gelfiltration mit Superdex G-200  | 39 |
| 3. 15. 3 Gelfiltration mit Superose <sup>TM</sup> 12                                     | 40 |
| 3. 16 Polyacrylamidelektrophorese  | 40 |
| 3. 16. 1 Coomassiefärbung  | 42 |

|          |                      |    |
|----------|----------------------|----|
| 3. 16. 2 | Silberfärbung        | 42 |
| 3. 17    | UV/Vis-Spektroskopie | 43 |
| 3. 18    | ICP-MS-Spektroskopie | 43 |

#### 4 Ergebnisse

|                                |  |           |
|--------------------------------|--|-----------|
| 4. 1                           | Charakterisierung von Mutanten aus <i>C. glutamicum</i> mit veränderter RRase  | 45        |
| 4. 1. 1                        | Screening von Klonen aus <i>C. glutamicum</i> auf Thermosensitivität der Ribonucleotid-Reduktion   | 45        |
| 4. 1. 2                        | Sensitivität von den thermosensitiven Mutanten aus <i>C. glutamicum</i> im Vergleich mit dem Wildtyp gegenüber Hydroxyharnstoff, <i>p</i> -Methoxyphenol | 50        |
| 4. 2                           | Gewinnung von Biomasse mit hoher Ribonucleotid-Reduktase von <i>C. glutamicum</i>  | 53        |
| 4. 3                           | Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase aus <i>C. glutamicum</i>   | 54        |
| 4. 3. 1                        | Hydrophobe Interaktionschromatographie von partiell gereinigter RRase  | 55        |
| 4. 3. 2                        | Biochemischer Komplementationstest der Untereinheiten von RRase  | 56        |
| 4. 3. 3                        | Gelfiltration mit Superdex G-200 und der biochemische Komplementationstest der Untereinheiten der RRase  | 58        |
| 4. 4                           | Bestimmung des Molekulargewichts der RRase-Untereinheiten  | 62        |
| 4. 5                           | Hydrophobe Interaktionschromatographie des (CG2-Proteins) Metallcofaktor der Ribonucleotid-Reduktase   | 64        |
| 4. 6                           | Charakterisierung des CG2-Proteins von <i>C. glutamicum</i>  | 68        |
| 4. 6. 1                        | Hemmung mit Hydroxyharnstoff und <i>p</i> -Methoxyphenol   | 68        |
| 4. 6. 2                        | UV/vis-Spektroskopie   | 70        |
| 4. 6. 3                        | Metallgehaltanalyse des CG2-Proteins   | 73        |
| 4. 6. 4                        | Die Hemmung mit C-terminalem Heptapeptid   | 76        |
| <b>5. Diskussion</b>           |  | <b>80</b> |
| <b>6. Ausblick</b>             |  | <b>97</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b> |  | <b>99</b> |

**Abkürzungen:**

|                 |   |
|-----------------|---|
| Abb.            | Abbildung   |
| ATCC            | American Type Culture Collection, Cockville, Mo., USA                   |
| BSA             | bovine serum albumin  |
| CA1             | große katalytische Untereinheit der Mn-RRase von <i>C. ammoniagenes</i> |
| CA2             | kleine Untereinheit der Mn-RRase <i>C. ammoniagenes</i>                 |
| CG1             | große Untereinheit der RRase von <i>C. glutamicum</i>                   |
| CG2             | kleine Untereinheit der RRase von <i>C. glutamicum</i>                  |
| Ci              | Curie, $3,7 \times 10^{10}$   |
| cpm             | counts per minute   |
| Da              | Dalton  |
| dpm             | Zerfälle pro Minute   |
| DNA             | Deoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)                           |
| DTT             | 1, 4-Dithiothreitol   |
| EDTA            | Ethylendiamintetraacetat  |
| FPLC            | Fast Protein Liquid Chromatographie                                     |
| g               | Gramm   |
| h               | Stunde  |
| HEPES           | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure                         |
| HPLC            | High Performance Liquid Chromatographie                                 |
| HU              | Hydroxyharnstoff (=Hydroxyurea)   |
| k               | Kilo  |
| kb              | Kilobasenpaare  |
| kDa             | Kilodalton  |
| K               | Kelven  |
| Kap.            | Kapitel   |
| KP-Puffer       | Kalium Phosphat   |
| L               | Liter   |
| LB              | Luria Bertani (Medium)  |
| LN <sub>2</sub> | flüssiger Stickstoff (Liquid nitrogen)                                  |
| m               | Meter   |
| M               | Molar   |

---

|                |   |
|----------------|---|
| Met            | Methionin   |
| μ              | Mikro   |
| n              | nano  |
| NADPH          | Protiertes Nicotinamied-adenin-dinucleotid-phosphat             |
| <i>nrd</i>     | nucleotide reduction  |
| OD578nm        | Optische Dichte bei 578 nm                                      |
| PAGE           | Polyacrylamide Gelelektrophorese                                |
| psi            | lb/in <sup>2</sup> (pounds per square inch) 1000psi=70 bar      |
| R1             | große katalytische Untereinheit der Fe-RRasen                   |
| R2             | kleine metallhaltige Untereinheit der Fe-RRasen                 |
| RRase          | Ribonucleotid Reduktase   |
| RT             | Raumtemperatur  |
| s              | Sekunde   |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat  |
| Tab.           | Tabelle   |
| TCA            | Trichloressigsäure (trichloreacetic acid)                       |
| TEMED          | N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamine                          |
| Tris           | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol                       |
| Tyr            | Tyrosin   |
| U              | nmol h <sup>-1</sup> (Gesamt-Aktivität in Units)                |
| U/ml           | nmol h <sup>-1</sup> · ml <sup>-1</sup> (Volumen Aktivität)     |
| U/mg           | nmol h <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> (spezifische Aktivität) |
| ÜK             | Übernachtskultur  |
| Upm            | Umdrehung pro Minute  |
| VK             | Vorkultur   |
| UV             | Ultraviolett  |
| V <sub>e</sub> | Elutionsvolumen   |
| V <sub>0</sub> | Ausschlußvolumen  |
| V <sub>t</sub> | Säulenvolumen   |
| VE             | Vollentionisiertes Wasser                                       |
| v/v            | Volumen pro Volumen   |
| w/v            | Gewicht pro Volumen   |

## Nucleotide und Nucleoside

|               |                                      |
|---------------|--------------------------------------|
| AMP, ADP, ATP | Adenosin-5'-mono-, di-, triphosphat  |
| CMP, CDP, CTP | Cytidin-5'-mono-, di-, triphosphat   |
| GMP, GDP, GTP | Guanosin-5'- mono-, di-, triphosphat |
| UMP, UDP, UTP | Uridin-5'- mono-, di-, triphosphat   |
| NDP, NTP      | Nucleosid-5'-di-, triphosphat        |
| (d)-ATP       | (Deoxy)-Adenosintriphosphat          |
| (d)-CTP       | (Deoxy)-Cytidintriphosphat           |
| (d)-GTP       | (Deoxy)-Guanosintriphosphat          |
| (d)-NTP       | (Deoxy)-Nucleosidtriphosphat         |

## 1. Einleitung

### 1.1 Coryneforme Bakterien

Die Gattung *Corynebacterium* wurde ursprünglich von Lehmann und Neumann 1896 geschaffen, um Formen vom Typus des *Corynebacterium diphtheriae* einzuordnen (PASCUAL et al., 1995). Coryneforme Bakterien sind Gram-positive Bakterien, pleomorphe Stäbchen mit einem GC-Gehalt von 51-68%. Die folgenden Merkmale sind typisch für die Gattung *Corynebacterium*: meist aerob aneorob fakultativ, Katalase-positiv, unbeweglich und chemoorganotroph und die dominierenden Zellwandzucker sind Arabinose und Galactose, kurzkettige Mykolsäuren mit 22-36 Kohlenstoffatomen und der Peptidoglucaufbau der Zellwand basiert auf Meso-diaminopimelinsäure (meso-A<sub>2</sub>pm) und bilden keine Endosporen (COLLINS et al., 1986). Zu der Gruppe der Coryneforme Bakterien zählen *Gordona*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Nocardia*, wobei alle in der Zellwand die Mykolsäure enthalten. Die Bakterien enthalten Peptidoglycan und Arabinogalactan (COLLINS et al., 1982a; TOMIYASO, 1982; CHEVALIER et al., 1988). *Corynebacterium* gehört taxonomisch zu den Actinomyceten, die die Mykolsäuren in der Zellwand in Abwesenheit von Tuberkulostearinsäure enthalten (MARIENFELD et al., 1997). Die Zellwand der *Corynebacterium* enthält neben der Mykolsäuren eine starke proteinhaltige Schicht (MINNIKIN et al., 1984; NIKAIDO et al., 1993, RICHTER et al., 1985; PEYRET et al., 1993, JANG et al., 1997). Dieser Zellwandaufbau stellt einen Schutz gegenüber den enzymatischen Angriffen von Lysozym und Lysostaphin dar (KOMATSU, 1979). Die Gattung *Brevibacterium ammoniagenes* wurde erst 1987 neu definiert und in der Gattung *Corynebacterium* eingeordnet (COLLINS, 1987b). *Corynebacterium glutamicum*, der ein Genomgröße von 3,080 Mbp enthält (BATHE et al., 1996) und *C. ammoniagenes* zeigen eine phänotypische und chemotaxonomische Ähnlichkeit, unterscheiden sich aber in der Fettsäurezusammensetzung, wobei *C. ammoniagenes* im Vergleich zu *C. glutamicum* 10-Methyloktadecansäure enthält (COLLINS et al., 1982, SUZUKI, 1981).

## 1.2 Nutzung von *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* für industrielle Zwecke

Die essentiellen Aminosäuren wie L-Lysin, L-Threonin oder L-Methionin werden von Menschen und vielen Nutztieren nicht synthetisiert. Die Versorgung erfolgt mit Nahrungs- und Futtermitteln. Durch die Zugabe von essentiellen Aminosäuren kann der Nährwert wesentlich erhöht werden (FIEDLER et al., 1973; BRÖER & KRÄMER, 1991). *Corynebacterium glutamicum* wurde 1957 als klassischer Aminosäure-produzentenstamm als Ergebnis des Screeningverfahrens entdeckt (KINOSHITA et al., 1957). Subspecies dieses Bakteriums sind *C. glutamicum. ssp. flavum*, und *C. glutamicum ssp. lactofermentum* (LIEBL et al., 1991). Allerdings ist *C. glutamicum* der am häufigsten eingesetzte Stamm für die Glutamin- und Lysin-Produktion (HILLIGER et al., 1997) und *E. coli* für die Threonin- und aromatische Aminosäure-Produktion. Die Glutaminproduktion erfolgte bei *Corynebacterium glutamicum* unter Biotinmangel (KINOSHITA et al., 1957; GUTMANN et al., 1992). Mit unterschiedlichen Mutanten wurde jährlich eine Menge von Glutaminsäure (700,000 t/a) und Lysin (300,000 t/a) hergestellt (LEUCHTENBERGER, 1996). L-Glutaminsäure ist eine Aminosäure, die in Form von Natriumglutamat als Geschmacksverstärker produziert wird. Allein oder in Kombination mit 5-Nucleotiden wie Inosinmono-phosphat (IMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) hat es als Fleischaroma ähnliche Geschmackseigenschaften. Die Produkte werden als Gewürze und Zusätze zu Fertiggerichten verwendet. Im Gegensatz zur Lysinproduktion wird die Überproduktion nicht durch eine Defektmutante sondern durch einen Biotinmangel erreicht. Dieser Mangel wirkt sich auf die Membranpermeabilität aus. Einige interessante Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Prolin, Threonin und Tryptophan wurden ebenfalls mit dem Stamm *Corynebacterium glutamicum* erzeugt (LEUCHTENBERGER, 1996). *Corynebacterium flavum* und *lactofermentum* benötigen Essigsäure und Ethanol als C-Quelle für die Lysinüberproduktion. L-Lysin ist eine Aminosäure der Aspartat-Familie und wird über einen verzweigten Stoffwechselweg synthetisiert, über den auch Homoserin, Methionin, Threonin und Isoleucin gebildet werden (EGGELING et al., 1998; EGGELING et al., 1997). Die Regulation der Biosynthese erfolgt in *C. glutamicum* durch multi-valente Hemmung. Homoserin-Dehydrogenase führt zur Synthese von L-Threonin, L-Isoleucin und Methionin und wird durch Methionin induziert (NARA et al., 1961; CREMER et al., 1988). Die Hemmung der Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität für die Lysin-Biosynthese wurde durch die Hemmung der Aspartat-Kinase erzielt, wobei dieses Enzym

dieser Bakterienart durch die gleichzeitige Gegenwart von Lysin und Threonin gehemmt wird (NAKAYAMA et al., 1966; CREMER et al., 1988).

Die folgenden Merkmale sind typisch für *C. glutamicum*:

- Keine Regulation der Transcription, der an der L-Lysinbiosynthese beteiligten Enzyme in *C. glutamicum*
- *C. glutamicum* besitzen nur einen Aspartat-Kinase im Vergleich zu drei äquivalenten Isoenzyme in *E. coli*
- Eine Feedback-Kontrolle der Aspartat-Kinase erfolgt in *C. glutamicum* nur durch L-Lysin und L-Threonin
- Eine verkürzte L-Lysin-Synthese über die Diaminopimelat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* benötigt nur ein Enzym während bei *E. coli* vier Enzyme benötigt werden.

*Corynebacterium* soll sowohl für die Aminosäure- als auch für die Nucleotid-Produktion verwendet werden (Tab. 1), wobei die Nucleotide als Mittel zur Erhöhung des Nährwertes zugefügt werden (KOMATA, 1976). Die abgeleiteten Mutanten aus *C. glutamicum* werden für die Produktion von Purin-Ribonucleoside 5'-Monophosphat, (IMP, XMP, GMP) als Geschmackverstärker eingesetzt (DEMAIN, 1978).

Tab. 1: Die Aminosäure-Produktion in *Corynebacterium glutamicum* und Coryneform Bakterien darstellen (**KINOSHITA**, 1985)

| Stämme    | Produkt        | benötigte Mikroorganismen                                    |
|-----------|----------------|--|
| Wildtyp   | L-Glutamin     | <i>Corynebacterium glutamicum</i>                            |
| Mutanten  | L-Arginin      | <i>C. glutamicum</i> , <i>C. lilium</i> , <i>C. caleunae</i> |
|           | L-Isoleucin    | <i>C. acetoacidophilum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i>    |
|           | L-Histidin     | <i>B. lactofermentum</i> <i>B. diviricatum</i>               |
|           | L-Leucin       | <i>B. immariophilum</i> , <i>B. thiogenitalis</i>            |
|           | L-Lysin        | <i>B. reseau</i> , <i>Microbacterium ammoniaphilum</i>       |
|           | L-Ornithin     |  |
|           | L-Phenylalanin |  |
|           | L-Prolin       |  |
|           | L-Threonin     |  |
|           | L-Tryptophan   |  |
| L-Tyrosin |                |  |

Eine essentielle Voraussetzung für die Nucleotidfermentation ist Manganmangel. Die Fermentation von *C. ammoniagenes* durch den Manganmangel ruft eine Blockade der DNA-Synthese hervor und als Folge ein drastisches, unbalanciertes Wachstum mit Morphologieänderung (FURUYA et al., 1970, OKA et al., 1968; THALER & DIEKMANN, 1979; AULING et al., 1980). Die Mangankontrolle von Wachstum und DNA-Bildung in *C. ammoniagenes* erfolgt bei der DNA-Vorstufensynthese durch eine Mn-RRase (Abb. 1) (AULING et al., 1994; HOGENKAMP et al., 1989; VOET et al., 1990; WILLING et al., 1988).

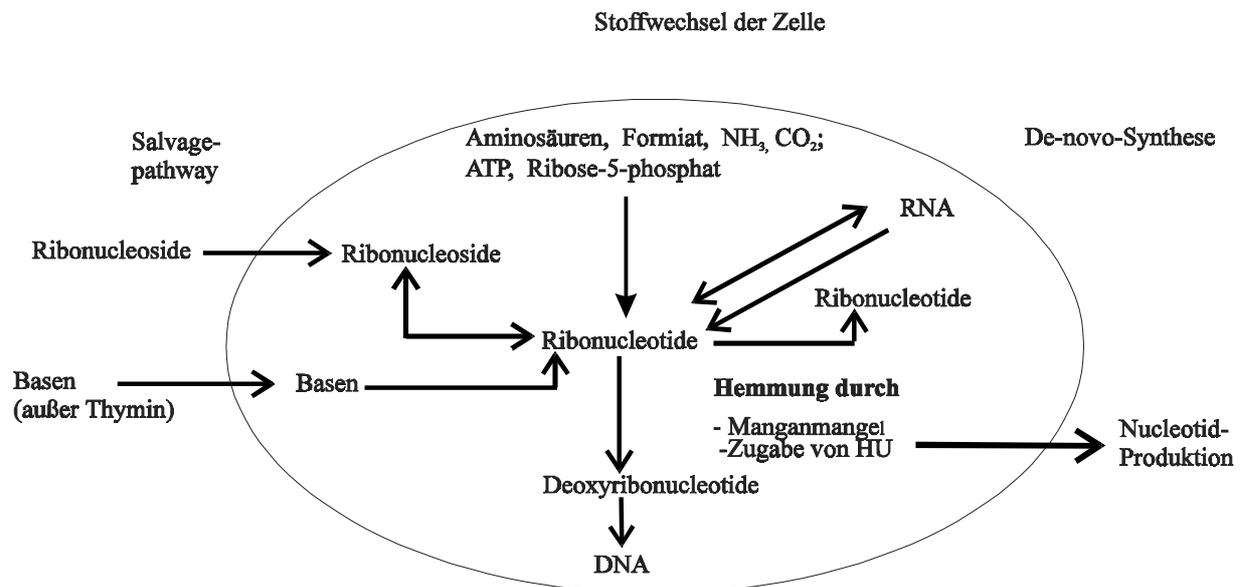


Abb. 1 : Die schematische Darstellung des Nucleotidstoffwechsels von *C. ammoniagenes*, modifiziert nach AULING & FOLLMANN, 1994.

### 1.3 Einteilung der Ribonucleotid-Reduktasen

#### 1.3.1 Ribonucleotid-Reduktase

Ribonucleotid-Reduktasen sind Enzyme, die in allen lebenden Zellen zu finden sind. Sie katalysieren die Reduktion von Ribonucleotiden zu den entsprechenden 2'-Deoxyribonucleotiden, die für DNA-Synthese verantwortlich sind (THELANDER & REICHARD, 1979; STUBBE, 1990a; LAMMERS & FOLLMANN, 1983; HOGENKAMP et al., 1987; PROBST et al., 1989; ERIKSSON & SJÖBERG, 1989). Diese Enzyme charakterisieren sich durch eine komplexe allosterische Regulation, weil sie bei der DNA-Vorstufensynthese für die Reduktion aller vier Ribonucleotiden verantwortlich sind und das bei der Kontrolle verschiedener Nucleotideffektoren unterworfen sind (HOGENKAMP, 1984). Neben den strukturellen Unterschieden der verschiedenen Klassen haben alle das gleiche Prinzip der allosterischen Regulation.

### 1. 3. 2 Einteilung der Ribonucleotid-Reduktasen

Der einzige Syntheseweg für die *de novo* Synthese von DNA-Vorstufen erfolgt durch eine Ribonucleotid-Reduktase indem es die Reduktion von Ribonucleotiden zu den 2'-Deoxyribonucleotiden katalysiert (STUBBE, 1990a; REICHARD et al., 1983). Ribonucleotid-Reduktase zeichnet sich aus verschiedenen Gründen als ein sehr intelligentes Enzym aus. Dieses Enzym enthält eine sehr breite Substrat-Spezifität, wobei es die Reduktion von Purin und Pyrimidin Nucleotide katalysiert. Die Gegenwart einer balancierten Menge an den vier dNTP in der Zelle ist für die Replikation und Reparatur der DNA erforderlich (THELANDER & REICHARD, 1979; ERIKSSON & SJÖBERG, 1989, MEUTH, 1989). Die Einteilung der Ribonucleotid-Reduktasen in vier verschiedene Klassen (Abb. 2) beruht auf dem spezifischen metallhaltigen Cofaktor, der für die Ermittlung jeder Enzymgruppe verantwortlich ist (STUBBE & VAN DER DONK, 1995). Bezüglich des metallhaltigen Cofaktors in der Ribonucleotid-Reduktase üben die RRasen die gleiche Funktion aus.

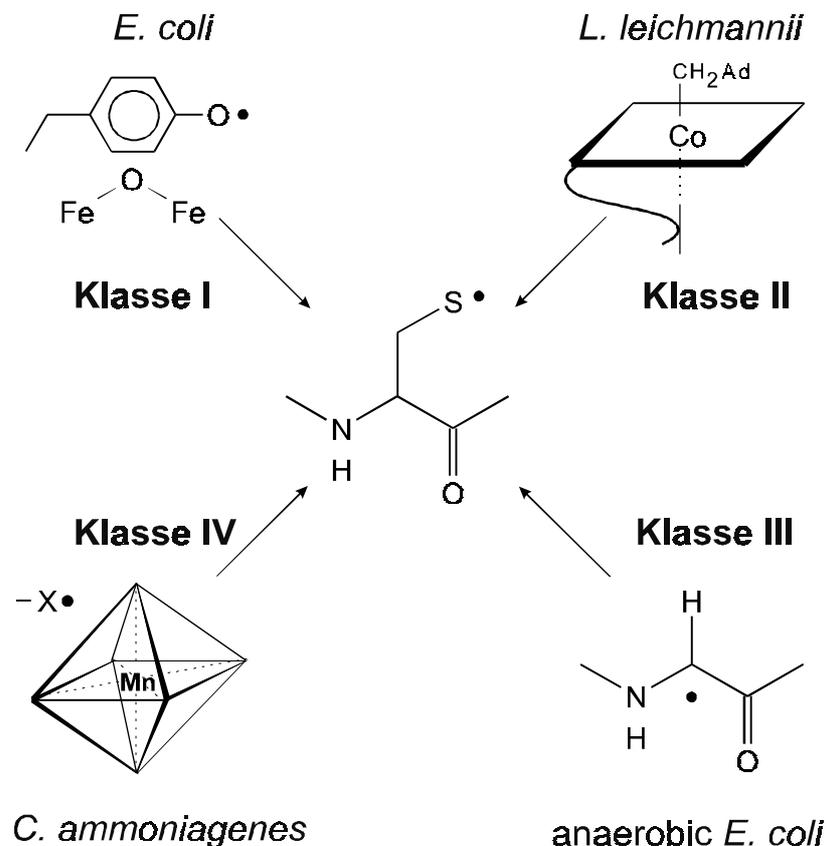


Abb. 2 : Einteilung der Ribonucleotid-Reduktasen in vier Klassen auf Grund der Art der metallhaltigen Cofaktoren mit dem Thiol-Radikal in der Mitte, modifiziert nach STUBBE & VAN DER DONK (1995).

### Klasse I: Aerobe Fe-RRase

Die Ribonucleotid-Reduktase dieser Klasse kommt bei Eukaryoten, ihren Viren und einigen Prokaryonten vor. Die Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* ist am besten untersucht worden; sie wurde als Prototyp der Klasse I dargestellt (REICHARD, 1993). Dieser Enzym-Typ besteht aus zwei homodimeren Untereinheiten  $\alpha_2\beta_2$ Struktur (FONTECAVE et al., 1992; ERIKSSON & SJÖBERG, 1989; MANN et al., 1991). Die größere R1-Untereinheit (85,7 kDa je Monomer) enthält Substratbindungsstellen und Effektorbindungsstelle und mehrere redoxaktive Thiolgruppe (REICHARD, 1993; ÅBERG et al., 1989; STUBBE, 1990a), die die Aktivität und spezifische-Aktivität reguliert werden. Die kleine Untereinheit (43,4 kDa je Monomer) enthält ein zweikerniges Fe(III)-Zentrum (SJÖBERG et al., 1982; REICHARD,

1993), die über ein  $\mu$ -Oxo-Brücke, die Carboxylgruppe verbunden sind. Das stabile Tyrosyl-Radikal, das für die RRase-Aktivität essentiell ist, wurde durch Site-directed mutagenesis auf (Tyr<sub>122</sub>) lokalisiert (ORMÖ et al., 1995; LARSEN & SJÖBERG, 1986; NORDLUND et al., 1990; EHRENBERG & REICHARD, 1972). Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse I benutzen NDPs als Substrat. Hydroxyharnstoff ist ein spezifischer Inhibitor für die Hemmung der RRase-Aktivität. Die Reaktivierung der RRase wird durch den Sauerstoff hervorgerufen (LAßMANN et al., 1992).

### **Klasse II: Co(B<sub>12</sub>)-RRase**

B<sub>12</sub>-RRase kommt hauptsächlich in aeroben aber auch in anaeroben Prokaryoten vor. Das Enzym dieser Klasse wurde zuerst aus *Lactobacillus leichmannii* isoliert und als Prototyp der Klasse II dargestellt (BLAKLEY & BARKER'S, 1964). Die B<sub>12</sub>-RRase hat eine Monomer Struktur und eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von (81,9 kDa) (Licht et al., 1996). Die B<sub>12</sub>-RRasen bevorzugen Nucleosidtriphosphate (NTP) als Substrat (COWLES et al., 1969) und benötigen Adenosyl-cobalamin als Cofaktor (BLAKLEY, 1965). Dieses Enzym enthält die Bindungsstelle für Adenosyl-cobalamin, NTP, Dithiol Substrat für die zwei Nucleotid-Effektor (PANAGOUE et al., 1972) und eine einzige Bindungsstelle für Deoxynucleosid-triphosphat. Die Adenosyl-cobalamin werden für die Erzeugung des Tiy-Radikals, das für die Nucleotide Reduktion verantwortlich ist, benötigt (LICHT et al., 1996). Das Enzym ist deutlich unempfindlich gegenüber Hydroxyharnstoff im Vergleich zur Klasse I.

### **Klasse III: Anaerobe Fe-RRase**

Die anaerobe Fe-RRase wurde erst in 1989 aus *E. coli* isoliert und als Prototyp der Klasse II dargestellt (FONTECAVE et al., 1989; REICHARD, 1993). Die zweite anaerobe Fe-RRase wurde in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (HOGENKAMP et al., 1987; Sze et al., 1992) und anderen anaeroben Mikroorganismen, *Archaeobacteria* und *Eubacteria* gefunden (REICHARD, 1997). Die anaerobe Fe-RRase besteht aus homodimeren Untereinheiten  $\alpha_2\beta_2$  Struktur, wobei das  $\beta_2$ -Protein notwendig für die katalytische Aktivität ist (SUN et al., 1995). Das  $\beta_2$ -Protein enthält gebundene 4Fe-4S-Cluster in zwei Polypeptidkette (OLLAGNIER et al., 1996). Das  $\alpha_2$ -Protein besteht aus einem Homodimer mit einem

Molekulargewicht von 160 kDa (SUN et al., 1993) und enthält zwei Glycyl-Radikal und keine Metall (SUN et al., 1993; MULLIEZ et al., 1993; SUN et al., 1996). Das Fe-S-Protein wird durch S-Adenosylmethionin aktiviert (REICHARD, 1993). Als Substrat bevorzugen die anaeroben Fe-RRasen Nucleosid-triphosphate (NTP). Diese Enzymklassen werden durch Sauerstoff gehemmt.

#### **Klasse IV: Mn-RRase**

Die isolierte Mn-abhängige Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium ammoniagenes* (WILLING et al., 1988) ist der Prototyp der Klasse IV. Die Mn-RRase zeigt vom äußeren Aufbau eine große Ähnlichkeit mit der Fe-RRase der Klasse I aus *E. coli*. Dieser Enzym-Typ verhält sich in seiner Empfindlichkeit gegenüber Hydroxyharnstoff genauso wie die Klasse I der Fe-abhängigen RRasen (WILLING, 1988), indem sie sich von den B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen der Klasse II und von den anaeroben Klasse III trennen. Die Mn-RRase ist im Gegensatz zur Fe-RRase aus *E. coli* durch Sauerstoff nur teilweise reaktiviert (WILLING et al., 1988). Dieses Enzym besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten mit  $\alpha\beta_2$ Struktur. Die große Untereinheit CA1-Protein besteht aus einer monomeren mit einem Molekulargewicht von 80 kDa, sie enthält die Substratbindungstelle und Effektbindungsstelle und die kleine Untereinheit CA2-Protein besteht aus einem Homodimeren mit einem Molekulargewicht von (50 kDa jede Monomer) und jede Untereinheit enthält ein Mn-Zentrum (WILLING et al., 1988). Das Vorhandensein des stabilen freien Radikals in der kleinen Untereinheit des CA2-Proteins von *C. ammoniagenes* konnte durch ESR-spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden (GRIEPENBURG et al., 1996). Die Mangan-RRase bevorzugt Nucleosid-diphosphate (NDP) als Substrat.

Tab. 2: Die unterschiedlichen Klassen der Ribonucleotid-Reduktasen und ihre Gene, ihre Funktion

| RRase-Typ                        | Klasse | Gene                       | Unter-einheiten    | Funktion der Genprodukte   |
|----------------------------------|--------|----------------------------|--------------------|--|
| Fe-RRase                         | Ia     | <i>nrdA</i><br><i>nrdB</i> | R1<br>R2           | Ribonucleotid-Reduktase in <i>Enterobacteriaceae</i> (CARLSON et al., 1984; JORDAN et al. 1994a), in Eukaryoten (z.B. <i>H. sapiens</i> (PARKER et al., 1991 <i>M. musculus</i> (CARAS et al. 1984, CARAS et al. 1983), <i>A. thaliana</i> (PHILIPPS et al., 1995) und deren Viren |
| Fe?                              | Ib     | <i>nrdE</i><br><i>nrdF</i> | R1E<br>R2F         | Ribonucleotid-Reduktase in <i>M. tuberculosis</i> (YANG et al., 1997) und <i>B. subtilis</i> (SCOTTI et al., 1996); keine Funktion in <i>Enterobacteriaceae</i> nachgewiesen (JORDAN et al., 1994b)  |
| B <sub>12</sub> -abhängige RRase | II     | <i>nrdJ</i>                |                    | aerobe und/oder anaerobe Ribonucleotid-Reduktase in verschiedenen <i>Eubacteria</i> (HOGENKAMP, 1984; BOOKER & Stubbe 1993; JORDAN et al., 1997b) und <i>Archaea</i> (TAUER & BENNER 1997)   |
| anarobe RRase                    | III    | <i>nrdD</i>                |                    | anaerobe Ribonucleotid-Reduktase in <i>E. coli</i> (FONTECAVE et al., 1989)  |
| Mn-RRase                         | IV     | <i>nrdE</i><br><i>nrdF</i> | CA1/CG1<br>CA2/CG2 | Ribonucleotid-Reduktase in <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> (OEHLMANN, W., 1998; diese Arbeit)  |

#### 1.4 Reaktionsmechanismus der Ribonucleotid-Reduktion.

Trotz der Unterschiede in den metallhaltigen Ribonucleotid-Reduktase Klassen führen alle eine gemeinsame Aufgabe aus. Ribonucleotid-Reduktasen katalysieren in einer irreversiblen Reaktion die Reduktion von Ribonucleotiden zu den 2'-Deoxyribonucleotiden. Die Reduktion der Ribonucleotide aller Enzym-Typen wird durch einen radikalischen Reaktionsmechanismus erzielt (STUBBE, 1990a, ASHLEY et al., 1985), wobei das TiyI-Radikal innerhalb des aktiven Zentrums des Proteins stattfindet. STUBBE und Mitarbeiter haben ein Modell des Reaktionsmechanismus vorgestellt (Abb. 3), wobei eine Protein-Dithiogruppe am katalytischen Zentrum als zweites Elektronen-Reduktant fungiert (STUBBE, 1990a). Die Substratreduktion erfolgte durch die Abstraktion des 3'-Wasserstoffatom durch das gebundene Radikal im Zentrum des Proteins und dadurch wird 3'-Nucleotid-Radikal ausgebildet. Die Bildung dieses Zwischenprodukts verursacht eine Säure katalysierte Spaltung der 2'-C-OH-Bindung, wodurch ein Radikal-Intermediat entsteht. Anschließend erfolgt die Oxidation zweier Thiolgruppen, wobei das Protein reduziert wird. Die Reduktion des 2'-Deoxy-3'-Nucleotid-Radikals durch XH und intermolekulare Reduktion der Enzym-Thiolgruppen regeneriert wieder die aktive Form der Ribonucleotid-Reduktase (STUBBE & VAN DER DONK 1995; SJÖBERG et al., 1997; BRUSH et al., 1992, THELANDER, 1974).

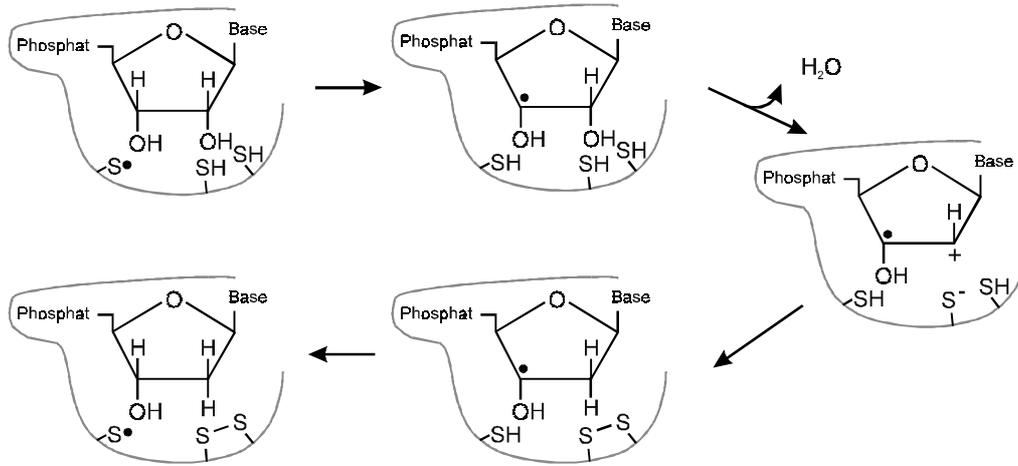


Abb.3 : Reaktionsmechanismus der Ribonucleotid-Reduktion nach SJÖBERG, 1997

## 1.5 Ribonucleotid-Reduktase-Mutanten

Bisher konnte von LUO *C. ammoniagenes* für die Charakterisierung der thermosensitiven Mutanten CH31, CH32, CH33 als Wildtyp verwendet werden, wobei alle diese thermosensitiven Mutanten eine Empfindlichkeit gegenüber Hydroxyharnstoff gezeigt hatten (LUO et al., 1997). Neue Klone (ODA1-ODA11) wurden ebenfalls nach der Vorschrift von LUO aus *C. glutamicum* isoliert, wobei dieser Gruppe von Klonen sowohl auf die Thermosensitivität als auch auf die Empfindlichkeit gegenüber dem Hydroxyharnstoff geprüft werden sollen.

## 1.6 Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase

Die Zellproliferation korreliert mit der RRase-Aktivität und der Strukturaufbau der Ribonucleotid-Reduktase ist sehr komplexiert. Aus diesen Grunde ist dieses Enzym ein attraktiver Wirkort und könnte als Angriffspunkt für die Bekämpfung sowohl von pathogenen Bakterien als auch von viralen Infektionen (DNA-Viren) verwendet werden (ROY et al., 1992; TURK et al., 1986). Eine Aktivitätshemmung der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* konnte für industrielle Zwecke verwendet werden, wobei ein Manganmangel zur Hemmung der DNA Replikation führt und dadurch wird die Nucleotidproduktion verursacht. Viele Inhibitoren wurden getestet, wobei alle durch die Hemmung der RRase eine Blockade der DNA-

Vorstufensynthese bewirken und zur Hemmung der Vermehrung der Zellen führen. Für Hemmung der RRase-Aktivität konnten bisher drei Strategien verfolgt werden, wobei jede Strategie auf das bessere Begreifen des biochemischen Systems und der Nucleotid-Metabolismus dieses Enzyms beruht (STUBBE & VAN DER DONK, 1995). Die große R1-Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase enthält die Substratbindungsstelle, wobei die RRase-Aktivität in einer irreversiblen Reaktion durch den Einsatz von einigen Nucleotid-analogen gehemmt werden konnte. Diese Nucleotid-Analoga enthalten eine Modifikation in der Position 2' der Ribose (STUBBE & VAN DER DONK, 1995; ROBINS et al., 1995; ABBRUZZESE et al., 1991; McCLARTY ET AL., 1990). Solche Nucleotid-Analoga wie Gemcitabin (2',2"-Difluoro-Deoxycytidine, dFdC) wurden für die Tumorbehandlung verwendet (ROBINS et al., 1995, Hertel et al., 1988). Gemcitabin hemmt zwei Prozesse während der Zellteilung, die für DNA-Synthese notwendig sind, die Nucleotidreduktion (HEINEMANN et al., 1989; HEINEMANN et al., 1990) und die Kettenelongation während der DNA Replikation (HUANG et al., 1991). Die zweite Strategie der RRase-Aktivitätshemmung basiert sich auf der Inaktivierung der kleinen Untereinheit, die das Tyrosyl-Radikal enthält. Das Tyrosyl-Radikal befindet sich auf Tyrosin und in der Nähe der  $\mu$ -Oxo-Brücke des zweiatomigen-Eisen. Aus dem Grund, daß die Nucleotid-Reduktion auf das Tyrosyl-Radikal angewiesen ist, könnte es als Wirkort für Inhibition der RRase-Aktivität verwendet werden (LASSMAN et al., 1992; COLLEEN et al., 1985). Eine dritte Alternative für die Hemmung der RRase-Aktivität beruht darauf, daß die Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase so schwach miteinander verbunden sind und die Zusammensetzung völlig an dem C-terminalen Ende der R2-Untereinheit liegt (CLIMEMT & SJÖBERG, 1992, COSENTINO et al., 1991; GAUDREAU et al., 1990; GAUDREAU et al., 1987, LAPLANTE et al., 1994). Durch den Einsatz von dem synthetisierte Peptid, das dem C-terminalen Ende entspricht, wird die Zusammensetzung des Holoenzym verhindert und dadurch die RRase-Aktivität inhibiert (UHLIN & EKLUND, 1994).

### **Hydroxyharnstoff**

Hydroxyharnstoff (HU) blockiert die DNA-Synthese in viele Bakterien ohne daß RNA beeinträchtigt wird. Hydroxyharnstoff wurde als erster Untersucher Inhibitor für die Hemmung der RRase-Aktivität verwendet (MOORE & HURLBERT, 1989, KRAKOFF et al., 1968). Dieser Radikalfänger wurde für die Blockade der DNA-Replikation und die

Zellproliferation eingesetzt, um der Reaktionsmechanismus dieses Systems zu verstehen. Die Hemmung der RRase-Aktivität aus *E. coli* mit (HU) beruht darauf, daß das Tyrosyl-Radikal der kleinen Untereinheit-R2 gelöscht wird.



Abb. 4 : Struktur des Radikalfängers Hydroxyharnstoff

### *p*-Alkoxyphenol-Derivate

*P*-Alkoxyphenol verursacht eine Hemmung der RRase-Aktivität sowohl von *E. coli* als auch von Maus durch die Inaktivierung von der metallhaltigen Untereinheit-R2 (PÖTSCH et al., 1994), wobei das Tyrosyl-Radikal gelöscht wird. Das Löschen des Tyrosyl-Radikals der kleinen Untereinheit in Ehrlich ascites Tumor Zellen (Carcinoma) der Maus durch *p*-Alkoxyphenol beruht darauf, daß sich ein Elektrontransfer von dem Inhibitor zum Tyrosyl-Radikal transportiert (NORDLUND et al., 1990). *P*-Alkoxyphenol stellt eine sehr wichtige Gruppe von Inhibitoren der Ribonucleotid-Reduktasen dar und kann als erfolgreiches Mittel für die chemotherapeutische Behandlung in geringeren Dosen gegenüber Tumoren eingesetzt werden. Die hohe Kapazität der *p*-Alkoxyphenolphenole für die Hemmung der RRase-Aktivität könnte für eine Entwicklung einer neuen Strategie für die Bekämpfung von HIV-1 verwendet werden (GAO et al., 1993).

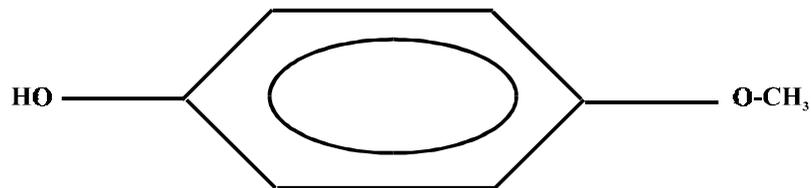


Abb. 5 : Struktur des Radikalfängers *p*-Methoxyphenol



## Problemstellung

Die Mn-Ribonucleotid-Reduktase (Mn-RRase) aus *C. ammoniagenes* enthält Mangan (AULING et al., 1980; BLASCZYK, 1994, LUO et al., 1994, GRIEPENBURG, 1998, WILLING et al., 1988) als essentielles Metall für die Reduktion von Ribonucleotiden zu den entsprechenden 2'-Deoxyribonucleotiden, die für DNA-Replikation und damit auch für die Zellproliferation benötigt werden. Es war interessant, die Verbreitung dieses Mangantyps (Klasse IV) bei anderen Gram-positiven Bakterien zu ermitteln. Aufgrund der nahen Verwandtschaft des industriell für die Aminosäureproduktion genutzten Stamms *C. glutamicum* mit *C. ammoniagenes* wurde untersucht. Zunächst sollten thermosensitive- und Hydroxyharnstoff sensitive (HU) Klone zur Verwendung für eine parallel zu dieser Arbeit beabsichtigten Genklonierung auf einen Defekt in der RRase geprüft werden. Nachdem diese Gene auf anderen Wege erhalten worden waren, wurde diese Linie nicht mehr verfolgt. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war jetzt die Anreicherung der metallhaltigen-Untereinheit (CG2-Protein) der RRase aus *C. glutamicum*, um das vermutete organische Radikal und das Metallzentrum zu charakterisieren. Dafür standen zu Beginn dieser Arbeit nur sehr geringere Kenntnisse über die Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* zur Verfügung. Da aber hochgereinigtes Enzym für eine chemische und physikalische Charakterisierung benötigt werden, sollte eine Anreicherung durch die Verwendung von FPLC-Techniken erreicht werden. Die Verfügbarkeit von Sequenzinformationen (siehe oben) ermöglichte die Synthese von Carboxy-terminalen Heptapeptid der *C. glutamicum* RRase. Damit sollte mittels biochemischer Komplementation die Hemmung der Enzym-Aktivität für den Vergleich der RRase von beiden Coryneformen Arten geprüft werden. Mit partiell gereinigtem CG2-Protein sollten die Hinweise auf die Gegenwart eines stabilen freien Radikal UV/Vis-spektroskopisch gefunden werden. Das partiell gereinigte CG2-Protein sollte ebenfalls die Gegenwart der Mangan durch die Metallgehaltanalyse mittels ICP-MS-Analyse klären.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Chemikalien**

Alle Substanzen hatten, soweit nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad "p.A" oder "reinst" oder "für biochemische Zwecke" und stammen aus den folgenden Firmen.

##### **Amersham Bucher GmbH & Co. KG, Braunschweig**

[5-<sup>3</sup>H]-CDP, Ammonium Salz (0,37-1,1 Tbq/mmol, 10-30 Ci/mmol)

##### **Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim**

Phosphatase, alkalische

Tris-2-amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-Prppandiol (Tris)

##### **Difco Laboratoires, Detroit, Mi., USA**

Bacto-Agar

Bacto-Yeast Extract

Bacto Tryptone

Bacto Yeast Extrakt

##### **E. Merck, Darmstadt**

Ammoniumchlorid

Ammoniumpersulfat; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>8</sub>

Ammoniumsulfat; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Borsäure; BH<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Folin Reagenz

Kaliumdihydrogenphosphat; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Kaliumhydrophosphat; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Natriumchlorid; NaCl

Natriumhydroxid; NaOH

Natriumthiosulfat-Pentahydrat;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Pepton aus Casein

Salzsäure; HCl

Silbernitrat;  $\text{AgNO}_3$

Streptomycinsulfat ( $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12}$ ) $_2 \cdot (\text{H}_2\text{SO}_4)_3$

### **Pharmacia LKB GmbH, Freiburg**

2',5'-ADP-Sepharose 4B

Formaldehyd 35-37% (W/V)

HITrap<sup>TM</sup> Desalting Column (Entsalzungssäulen)

hydrophobe Interaktionschromatographie

Superdex G-200

Superose<sup>TM</sup>12

### **Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg**

Acrylamid

Ammoniumpersulfat

Albumin bovine Fraction V, pH 7 (Rinderserumalbumin)

Aldolase (from Rabbit muscle, ca. 9U/mg protein)

Bisacrylamid

Coomassie Blue Brilliant, Serva Blau G 250

Ethidiumbromid

Glycerol (Glycerin)

Glycine, analytical grade;  $\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_2$

Hydroxyharnstoff

$\beta$ -Lactoglobulin bovine cryst.

Kanamycinsulfat

Nalidixinsäure

2-Mercaptoethanol;  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$

Rinderserumalbumin

SDS (Natriumdodecylsulfat)

TEMED (N, N, N', N', -Tetramethylethyldiamin)

**Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)**

5'-Cytidindiphosphat

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat

2'-Desoxycytidin

2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat

D,L-Dithiothreitol

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid)

**Zinsser Analytic, UK (Frankfurt)**

Quicksafe A

Quickszint 501

Quickzint 2000.

**Lumasafe Plus (Groningen)**

### 3. 2 Mikroorganismen

Die in der vorliegende Arbeit verwendeten Mikroorganismen und ihre Eigenschaften.

#### 3. 2. 1 Tabelle verwendete Bakterien und Plasmid

| Stamm  | genetische Eigenschaften   | Herkunft   |
|--|--|--|
| <i>C. glutamicum</i>   | Aminosäure-Produktion  | LIEBL & SCHEIN, 1990   |
| ODA1<br>ODA2<br>ODA3<br>ODA4<br>ODA5, ODA8<br>ODA6<br>ODA7<br>ODA9<br>ODA10<br>ODA11                             | thermosensitive Mutanten<br><i>nrd<sup>ts</sup> C. glutamicum</i><br><br>thermosensitive Mutanten  | Diese Arbeit   |
| <b><i>Escherichia coli</i> K-12:</b><br><i>E. coli</i> S17-1<br><br>Plasmide:<br>pECM2<br><br>pWCA5<br><br>pWCG6 | enthält RP4 Derivat<br>(chromosomal)<br>Mobilisierungsstamm<br>(Donorstamm)<br>Mobilisierungstamm<br><br>pECM2 enthält<br>Kanamycin resistenz<br><br>Kleine Untereinheit der RRase<br>von <i>C. ammoniagenes</i><br><br>Große Untereinheit der RRase<br>von <i>C. glutamicum</i> | JÄGER et al., 1992<br><br>(OEHLMANN, W., 1998)<br><br>(OEHLMANN, W., 1998) |

### 3.3 Medien und Pufferlösungen

#### 3.3.1 Seed Medium (THALER & DIEKMANN, 1979)

|                      |      |
|----------------------|------|
| D-Glucose monohydrat | 20 g |
| Pepton aus Casein    | 10 g |
| Hefe Extrakt         | 10 g |
| NaCl                 | 10 g |

entionisiertes Wasser ad 1000 ml.

Das Seed-Medium wurde mit 2N NaOH auf pH 7,6 eingestellt, für 15 Minuten (30 Minuten für 10 L Fermenter) bei 121 °C autoklaviert. Die Glucose wurde getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen zu den übrigen Mediumkomponenten zugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 g/L Agar (Oxoid) zugefügt.

#### 3.3.2 LURIA BERTANI (LB-Medium) (MILLER 1972)

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Bacto-Tryptone     | 10,0 g |
| Bacto Hefe Extrakt | 5,0 g  |
| NaCl               | 5,0 g  |

entionisiertes Wasser ad 1000 ml.

Das LB-Medium wurde mit 2N NaOH auf pH 7,6 eingestellt, für 20 min bei 121°C autoklaviert (Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald). Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde 15 g/L Agar zugegeben.

**3. 3. 3 Elektroporationsmedium für Corynebakterien (HAYNES, BRITZ, 1989)**

|                         |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|
| Trypton                 | 10,0 g                           |
| Hefe Extrakt            | 5,0 g                            |
| NaCl                    | 5,0 g                            |
| D-Glucose-Monohydrat    | 2,0 g                            |
| Glycin                  | 2,5 % (W/v) (sterile filtriert)  |
| Tween                   | 800,1% (W/v) (sterile filtriert) |
| Isonicotinsäurehydrazid | 1,5 mg/ml (sterile filtriert)    |

**3. 3. 4 SOC-Regenerationsmedium (DOWER et al.,1988)**

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

**3. 3. 5 Puffer-Lösungen**

Das benötigte Wasser wurde in einer Bidestillationsanlage (Typ BD 15, Westdeutsche Quarzschmelze, Geesthacht) mit entionisiertem Wasser aus einer "E-pure"-Anlage (Barnstead, Dubuque, Iowa, USA) hergestellt.

85 mM KP Standardpuffer

|  |       |
|--|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 85 mM |
| DTT  | 2 mM  |
| pH   | 6,6   |

**85 mM KP Standardpuffer für permeabilisierten Zellen**

|  |       |
|--|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 85 mM |
| DTT  | 2 mM  |
| Sorbitol   | 0,6 M |
| pH   | 6,6   |

**HEPES-Puffer**

|  |       |
|--|-------|
| HEPES  | 0,1 M |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 85 mM |
| DTT  | 2 mM  |
| pH   | 6,6   |

**20 mM KP Standardpuffer (KP-Puffer)**

|  |       |
|--|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 20 mM |
| DTT  | 2 mM  |
| PH   | 6,6   |

Der Puffer wurde aus den folgenden Teilen zusammen gesetzt

**Stammlösung A:** 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Wasserfrei)

**Stammlösung B:** 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O

**3. 3. 6 Antibiotikazusatz**

Der Ansatz und die Lagerung von Antibiotikastammlösungen erfolgte nach Maniatis et al. (1982). Kanamycin und Nalidixinsäure wurden in einer Konzentration von 50 mg/ml in Wasser gelöst. Die vollständige Löslichkeit der Nalidixinsäure erfolgt durch Zugabe von einigen Tropfen NaOH. Die Antibiotika wurden steril filtriert (0,45 µm, Schleicher, Schüll FP030/2, Dassel) und anschließend in der entsprechenden Endkonzentration zu dem autoklavierten Medium zugegeben.

### **3. 4 Messung von pH-Wert und Trübung**

Die potentiometrische Messung des pH-Wertes erfolgte mit einem pH-Meter, Modell pH 522, mit Einstabmeßkette und Gelfüllung, Typ E 50 (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim i.OB). Die Trübungsmessungen von Bakteriensuspensionen wurden in einem Eppendorfphotometer, Typ 1101 M, mit Rechteckblende 1770 (Eppendorf Gerätebau Netheler, Hinz GmbH, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm durchgeführt. Da die Trübungsmessung nur in einem engen Bereich proportional zur Bakterienkonzentration ist, wurden die Proben durch entsprechende Verdünnungen im Bereiche 0,1-0,3 bestimmt. Eine mit entsprechendem Medium gefüllte Küvette diente als Referenz.

### **3. 5 Die Stammerhaltung**

Die Stämme von *C. glutamicum* wurden auf Schrägagar-Röhrchen mit Seed-Medium bei 4°C aufbewahrt und zur Erhaltung alle 6 Wochen überimpft.

### **3. 6 Anzucht und Zellernte von *C. glutamicum***

#### **3. 6. 1 Anzucht in Kolben**

##### **3. 6. 1. 1 Vorkultur**

Die Zellen von *C. glutamicum* wurden vom frischen Schrägröhrchen in einem 500 bzw. 100 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane im Seed-Medium angeimpft anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei einer Temperatur von 30°C auf der Rundschüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 Upm.

##### **3. 6. 1. 2 Vorkultur**

Aus der Übernachtskultur (ÜK) wurden die Zellen von *C. glutamicum* mit einer Start OD<sub>578nm</sub> von 0,5 in 500 bzw. 100 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane im Seed-Medium überimpft, die Inkubation erfolgte für 12 Stunden bei einer Temperatur von 30°C. Das Wachstum wurde durch die Trübungsmessungen kontrolliert.

### 3. 6. 2. Anzucht im Fermenter

Die Zellanzucht von *C. glutamicum* im Fermenter des Typs MF-14 (kompaktssystem von New Brunswick Scientific Co., Inc., New Brunswick, NJ, USA) wurde aus der zweiten Vorkultur in 10 L Seed-Medium mit einer  $OD_{578nm}$  von 0,15. Als Antischaummittel wurde 0,5 ml Desmophen 3600 (Bayer) 1:1 in Ethanol zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 30°C und mit 4 L Luft/min bei 250 Upm. Die Zellen wurden nach 10 Stunden Wachstum geerntet.

### 3. 6. 3 Zellernte

Die Zellernte von *C. glutamicum* erfolgte in der spätlogarithmischen Wachstumsphase bei einer Temperatur von 4°C, dazu wurde Eisgranulat (aus entmineralisiertem Wasser) mit flüssigem Stickstoff gemischt. Die Zellsuspension wurde entnommen und anschließend in einer Kühlzentrifuge Cryofuge 6-6 (Heraeus Christ GmbH, Osterode) bei 3500 Upm für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem 85 mM KP-Puffer (pH 6,6) resuspendiert, anschließend in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5C, Du Pont De Nemours GmbH, Deutschland) bei 7500 UPM und 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach schnell in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Aus einem 10L-Fermenter wurden mehr als 100 g Zellen gewonnen.

### 3. 7 Permeabilisierung der Zellen

Sowohl Wildtypzellen *C. glutamicum* als auch die thermosensitiven Mutanten wurden nach der Vorschrift von LUO (1994) permeabilisiert. Die Zellen wurden mit kaltem 85 mM KP-Puffer (pH 7,2), 0,6 M Sorbitol zur Entfernung des Bestandteils des Mediums gewaschen und anschließend auf eine  $OD_{578nm}$  von 50 eingestellt. Die Zellen wurden in FEP-Röhrchen aus Teflon (Fluorinated ethylene propylene, Nalge Company, N. Y., USA) gefüllt und mit Diethylether (1:1, V/V) gemischt, anschließend eine Minute in der Hand leicht geschüttelt. Der organische Überstand wurde schnell abpipetiert und die permeabilisierten Zellen zweimal mit 85 mM KP-Puffer (pH 7,2), 2 mM DTT und 0,6 M Sorbitol gewaschen und auf eine  $OD_{578nm}$  von 25 gebracht, schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.8 Ribonucleotid-Reduktase-Aktivitätstest

Die gesamte Aktivitätsbestimmung erfolgte in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen (safe-Lock, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) nach der Vorschrift von LUO (1994). Der Standardtest für die Bestimmung der RRase-Aktivität sowohl mit permeabilisierten Zellen als auch mit angereicherter Mn-RRase enthielt in 85 mM KP-Puffer (pH 6,6) die folgenden Substanzen (Endkonzentration):

#### CDP als Substrat :

|                         |  |
|-------------------------|--|
| DTT                     | 6 mM                                     |
| MgCl <sub>2</sub>       | 1 mM                                     |
| dATP                    | 50 µM                                    |
| [5- <sup>3</sup> H]-CDP | 0,25 µCi (spez. Aktivität 10-30 Ci/nmol) |
| CDP                     | 25 µM                                    |

#### GDP als Substrat :

|                         |  |
|-------------------------|--|
| DTT                     | 6 mM                                     |
| MgCl <sub>2</sub>       | 1 mM                                     |
| dTTP                    | 0,5 mM                                   |
| [5- <sup>3</sup> H]-GDP | 0,25 µCi (spez. Aktivität 10-15 Ci/nmol) |
| GDP                     | 25 µM                                    |

Praktisch wurde ein Stammlösung (Testmix) aus folgenden Komponenten zusammengesetzt und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

#### CDP als Substrat

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| 120 mM DTT              | 5 µl              |
| 20 mM MgCl <sub>2</sub> | 5 µl              |
| 1 mM dATP               | 5 µl              |
| [5- <sup>3</sup> H]-CDP | 1,25µl (0,25 µCi) |
| 1 mM CDP                | 2,5 µl            |

**GDP als Substrat**

|                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| 120 mM DTT              | 5 $\mu$ l                    |
| 10 mM dTTP              | 5 $\mu$ L                    |
| 20 mM MgCl <sub>2</sub> | 5 $\mu$ l                    |
| [5- <sup>3</sup> H]-GDP | 1,25 $\mu$ l (0,25 $\mu$ Ci) |
| 1 mM GDP                | 2,5 $\mu$ l                  |

Bevor der Testmix angesetzt wurde das [5-<sup>3</sup>H]-GDP im Vakuum von Ethanol befreit. Für eine Messung einer geringeren Enzymmenge wurde die Substratkonzentration auf 12,5  $\mu$ M (1,25 nmol CDP) verringert oder kein „Kaltes“ CDP zugefügt, um noch meßbare Umsätze zu erhalten. Für den Leerwert wurde die Enzymlösung vor dem Test 3 Minuten gekocht oder der Puffer eingesetzt.

**3. 8. 1 Nachweis der RRase-Aktivität**

Zum Nachweis für Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität wurde eine untersuchende Enzymlösung auf 100  $\mu$ l Testvolumen bei einer Temperatur von 2°C (Eiskühlung) im Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und das fehlende Differenzvolumen zuvor durch 85 mM Kp-Puffer (pH 6,6) vervollständigt wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Testmix gestartet. Die Gefäße wurden durch Whirltex gründlich gemischt und die Inkubation im Eppendorf-Thermostat 5320 erfolgte bei 30°C für 20 Minuten, die Reaktion wurde anschließend durch 3 Minuten Kochen gestoppt und anschließend sofort im Eisbad gekühlt. Danach wurden 10  $\mu$ l Pronaselösung (25  $\mu$ g/10  $\mu$ l Standardpuffer, von *Streptomyces griseus*, Boehringer) zugegeben, gründlich durchgemischt und die Inkubation erfolgte für 90 Minuten bei 37°C, um hitzestabile, (Nebenreaktion) Nucleotid N-glycosidase zu inaktivieren, die die unerwünschte Zucker-Basenspaltung verursachen. Die Reaktion wurde durch dreiminütiges Kochen gestoppt und anschließend im Eisbad gekühlt. Zum Abbau von Nucleotiden zu Nucleosiden wurde danach 10  $\mu$ l 1,5 M Tris/HCl-Puffer pH 9,9 und 4  $\mu$ l alkalische Phosphatase zugegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Vor der HPLC-Trennung wurde die Testmischung für 10 min abzentrifugiert.

### **3. 8. 2 Biochemische Komplementationstest der Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase**

Zum Nachweis für Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität durch den Komplementationstest wurden die Untereinheiten bei einer Temperatur von 2°C (Eiskühlung) im Eppendorf-Reaktionsgefäß miteinander kombiniert und das fehlende Differenzvolumen zuvor durch 85 mM (pH 6,6) Kp-Puffer vervollständigt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Testmix gestartet.

### **3. 8. 3 Nachweis der RRase-Aktivität mit C-terminalem Heptapeptid**

Ein Heptapeptid, das das C-terminale Ende des CG2-Proteins von *C. glutamicum* entspricht, wurde von der Firma SYNTEM (Nimes, Frankreich) hergestellt. Für Enzymtest wurde ein Heptapeptid zu der großen Untereinheit CG1-Protein zugegeben, anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei einer Temperatur von 0°C. Danach wurde das CG1-Protein mit der kleinen Untereinheit CG2-Protein für 10 Minuten bei 0 °C komplementiert und das fehlende Differenzvolumen zuvor durch 85 mM (pH 6,6) Kp-Puffer vervollständigt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Testmix gestartet.

### **3. 8. 4 Trennung des Ribonucleotid-Deoxyribonucleosidgemisches durch HPLC**

Zur Trennung des im RRase-Test auftretenden Nucleosidgemisches wurde das "Isocratic Liquidchromatographie" System 330 der Firma Beckmann verwendet (Kolbenpumpen 110 A, System Controller 420). Daran angeschlossen waren der variable Wavelength Monitor, der ASI 120 Autosampler und der High Temperatur Oven von Knauer sowie der Fraktionssamler Frac 100 von Pharmacia und der D-2000 Chromato-Integrator von Merck.

Die Trennung erfolgte mit einer 300 x 4 mm Säule mit dem Anionenaustauscher EUROKat H von Knauer Säulentechnik (BERLIN) bei 37°C und einer 30 x 4 mm Vorsäule mit gleichen Material. Die Trennung erfolgte bei 37°C und die Aufnahme des Elutionsdiagrammes bei 254 nm. EUROKat ist ein sulfoniertes, quervernetztes Styrol/Divinylbenzol-Copolymer in der ionischen H-form mit einer typischen Partikelgröße von 10 µm. Die Trennung erfolgte nach dem Prinzip der Anionenaustausch-chromatographie in einem Boratpuffer, wobei die polaren Hydroxylgruppen komplexiert werden und die Retardierung an dem Säulenmaterial durch

hydrophobe Wechselwirkung kommt. Mit Boratpuffer komplexierte Ribonucleotide (Reste von Substrat, welche nicht durch alkalische-Phosphatase gespalten wurde) und Ribonucleoside (dephosphoryliertes Substrat) werden als Anionen ohne große Verzögerung eluiert, während neutrale Deoxyribonucleoside (Produkt) und auch Nucleobasen (Purine und Pyrimidine als Folge der Nebenreaktion) auf der Säule zurückgehalten werden (Retardierung überwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen).

### **Trennbedingungen für Standardtests:**

|           |                                      |
|-----------|--------------------------------------|
| Puffer    | 0,1 M Borat/NH <sub>3</sub> , pH 8,0 |
| Flußrate: | 0,5 ml/min                           |

### **CDP: Fraktionierung:**

Die Gesamtdauer einer Trennung betrug 60 min und setzte sich wie folgt zusammen:

|                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| 1. Fraktion (1,6-9,6 Minuten)   | CDP und Cytidin              |
| 2. Fraktion (9,6-17,6 Minuten)  | 2-d-Cytidin(Produktfraktion) |
| 3. Fraktion (17,6-25,6 Minuten) | Cytosin (Nebenfraktion)      |
| 4. Fraktion (25,6-33,6 Minuten) | Nachlauf (Kontrolle)         |

### **GDP: Fraktionierung:**

Die Gesamtdauer einer Trennung betrug 60 min und setzte sich wie folgt zusammen:

|                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. Fraktion (0,25-14,5 Minuten) | GDP und Guanosin; |
| 2. Fraktion (14,5-17 Minuten)   | Zwischenfraktion; |
| 3. Fraktion (17-29 Minuten)     | d-Guanosin;       |
| 4. Fraktion (29-41 Minuten)     | Guanin            |

Der Fraktionsammler, UV-Detektor und "Chromato-Intergrator" werden gleichzeitig mit dem System Controller Modell 420 gesteuert. Der Autosampler wiederum kontrolliert den Controller. Anhand der Kapazität des Fraktionsammlers lassen sich nur 11 Proben über Nacht getrennt werden. Die Radioaktivitätsmenge der einzelnen Fraktionen wird nach der Zugabe

von 10 ml Scintillationscocktail (Quicksafe A oder Quickzint 2000) im Flüssigkeitszintillationszähler bestimmt. Zur Auswertung des Testes werden die direkt gemessenen DPM-werte der gesammelten Fraktionen zu Grunde gelegt. Der Leerwert wurde abgezogen. Die Summe der Radioaktivität aller getrennten Fraktionen eines Test-Aliquots (10 µl) wurde gleich 100% gesetzt und darauf der Prozentsatz der Radioaktivität in der Deoxyribonucleosidhaltigen Fraktion berechnet. Dieser Prozentsatz ergab, mit der eingesetzten Substratmenge multipliziert, den absoluten Umsatz pro Test. Für die Angabe der spezifischen Enzymaktivität wurde dieser Umsatz auf eine Zeit von 1 Stunde und eine Proteinmenge von 1 mg ( oder  $10^{10}$  Zellen) im Test bezogen : Die Angaben erfolgte in (nmol/mg·h).

### **3.9 Zellaufschluß**

Alle biochemischen Arbeiten wurden , wenn nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt. Als Standardpuffer wurde 85 mM KP-Puffer (pH 6,6) mit 2 mM DTT verwendet. Für den Zellaufschluß wurde Zellmaterial (in Puffer gewaschene , frische oder eingefrorene Zellen) in eiskaltem HEPES-Puffer aufgenommen (1g Zellen/1,5ml 0,1 M HEPES-Puffer, mit 2 mM DTT, pH 6,6). Die Proben werden in NaCl-Eiswasserbad gekühlt, wodurch bei Ultraschallbehandlung eine maximale Temperatur von 6°C nicht überschritten wird. Die Zellsuspension wurden durch fünfmal 30 Sekunden, mit 1 min Unterbrechung, mit Ultraschall (Branson Sonifier B-12, Mikrospritze bei 70 Watt) vorbehandelt und anschließend nach zweimaliger Passage in einer auf 4 °C vorgekühlten French-Press (French Pressure Cell Press mit 20KManuel-Fill Cell, SLM Instruments Inc., Urbana IL, USA) bei einem Kammerinnendruck von 1000-1300 psi aufgeschlossen. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde durch eine Proteinbestimmung nach (Kap. 3. 11) kontrolliert. Anschließend erfolgte eine Abzentrifugation bei 19000 UPM für 30 min, um der Zellfreie Überstand als Roheextrakt für die weitere Reinigung anzuwenden.

### **3. 10 Proteinreinigungsmethoden**

### **3. 11 Proteinbestimmung in Zellfreien Extrakten**

### 3. 11. 1 Bradford Methode

Zur Bestimmung von löslichen Proteine nach BRADFORD (1976) wurde folgendes Reagenz angesetzt.

Das Bradford-Reagenz setzte sich wie folgt zusammen:

100 mg Coomassie Brillant Blue G-250 (Sigma) wurden in 50 ml absol. Ethanol gelöst, daraufhin 100 ml 85%ige Phospharsäure zugegeben und auf 1 Liter Endvolumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Für die Proteinbestimmungen aus Zellextrakten wurde die 0,1 ml Proteinlösung mit 5 ml Bradfordreagenz gemischt, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595nm bestimmt. Als Standard-Proteinlösung diente Rinderserumalbumin-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg BSA Mililiter bidestilliertem Wasser. Die Proteinkonzentrationen der Proben ergeben sich anhand einer Eichreihe von BSA (einer von 0,1-1 mg/ml).

### 3. 11. 2 Lowry Methode

Zur Bestimmung der löslichen Proteine nach LOWRY (1951) müßte folgenden Lösungen wie folgt zusammengesetzt.

Die Lowry Lösungen wurden wie folgt zusammengesetzt:

Lösung I : 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 100 ml 0,5 M NaOH (2 mg/100 ml).

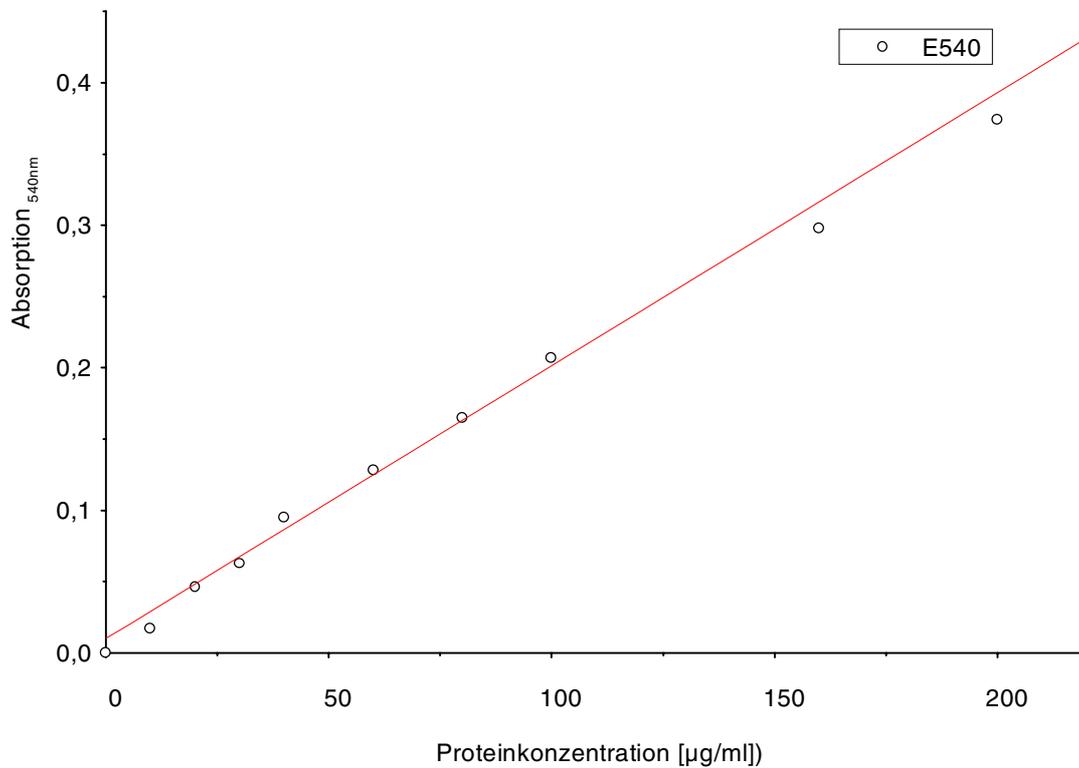
Lösung II : 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in 100 ml 1 % (w/v) iger  $\text{Na}_3$  Citrat  $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Folin Reagenz

Lösung III : 10 Teile Lösung I + 1 Teil Lösung II

Lösung IV : 10 Teile A.bidist + 1 teil Folin-Reagenz.

Für die Proteinbestimmung der Proben wurden 200  $\mu\text{l}$  Lösung III zu 200  $\mu\text{l}$  Proteinlösung zugegeben, anschließend nach intensivem Mischen erfolgte die Inkubation für 10 Minuten bei der Raumtemperatur. Danach wurden 600  $\mu\text{l}$  Lösung IV zugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde in einem Pharmacia-Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm in Mikroküvette gegen entsprechenden Blindwert gemessen. Die Probe sollte eine Proteinkonzentration zwischen 50-300  $\mu\text{g}$  Protein pro ml haben.



Ab. 8. : Eine Kalibrierungsgerade für die Standard-Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry.

### 3. 12 Fällungen

#### 3. 12. 1 Streptomycinsulfat-Fällung

Der zellfreie Rohextrakt wurde mit einer Streptomycinsulfat-Stammlösung (20%ige in Standard-Puffer) innerhalb von 30 Minuten unter Rühren bis zur Endkonzentration von 1,5 % tropfenweise zugegeben und anschließend weitere 30 min nachgerührt. Dann wurde das ausgefallene Material für 20 min bei 19000 UPM (Sorvall SS34-Rotor) zentrifugiert, der Überstand zur weiteren Reinigung verwendet und das Pellet verworfen oder ggf. zur Kontrolle in Standard-Puffer gelöst und getestet.

### **3.12.2 Ammoniumsulfat-Fällung**

Es wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung in den Bereichen 0-40% und 40-60%-Sättigung durchgeführt. Die Salzzugabe erfolgte auf Eis in einem Zeitraum von jeweils 30 Minuten. Um die Fällung zu vervollständigen wurde 30 Minuten nachgerührt. Nach jedem Fällungsschritt schloß sich eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 19000 UPM und bei 4°C.

Die Ribonucleotid-Reduktase wurde in der 40-60%ige-Fraktion nach der Zentrifugation gewonnen. Die Proteinpellets wurden in 2-4 ml des Standardpuffers aufgenommen und vor ihrer Verwendung im Enzymtest zweimal eine Stunde (mit Pufferwechsel) gegen jeweils einen Liter 85 mM KP-Puffer(pH 6,6) und 2mM DTT, bei 4°C dialysiert.

### **3.13 Dialyse**

Es wurden Dialyseschläuche (Visking 20/32, Ø 16 mm) der Firma Serva (Heidelberg) verwendet. Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch zunächst 30 Minuten in einem Liter bidestillierten Wasser mit 5 mM EDTA gekocht, danach mit bidest. Wasser gespült und in einem Liter bidestillierten Wasser für weitere 30 Minuten gekocht und noch mehrmals nachgespült, die Lagerung erfolgte bei 4°C. Die Proteinlösung wurden zur Abtrennung der Salze und niedermolekularer Verunreinigungen gegen Standard-Puffer zwei Stunden bei 4°C dialysiert.

### **3.14 Konzentrierung der Proteine in der GenVac**

Das Proteinmaterial mit einer geringeren Konzentration wurde stets in "GenVac" (Vakuumpumpe Gene Vac CVP MK IV 100 mit Spinfreezer SF 50 von Biometra (Göttingen)) konzentriert, um der Verlust an der RRase-Aktivität zu verhindern. Vor der Konzentrierung der Proteine wurde der Deckel des Eppendorfes durchgelöchert.

### 3. 15 Chromatographie Methoden

#### 3. 15. 1 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde eine Phenyl-Superose-Säule HR 5/5-Säule verwendet. Diese Säule sollte für die Suche sowohl nach dem CG2-Protein als auch CG1-Protein aus *C. glutamicum* angewandt werden. Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde die Proteinlösung direkt vor der Probenaufgabe mit 3 M Ammoniumsulfat in 85 mM KP-Puffer (pH 6,6), 2 mM DTT auf 1,5 M eingestellt. Während der Reinigung der Proteine wurde die Ammoniumsulfat-konzentration des Laufpuffers 85 mM Kp-Puffer (pH 6,6) und 2 mM DTT von Anfang 1,5 M auf 0 M gesenkt. Die Proteine wurden durch die hohen Salzkonzentration an die Säulenmaterial gebunden. Die gebundenen Proteine wurden anhand der Erniedrigung der Salzkonzentration eluiert. Bei der Verwendung der analytische Phenyl-Superose-Säule (HR 5/5-Säule) wurde die maximale aufgetragene Proteinmenge von 10 mg bei einer Flußrate von 0,25 ml/min in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Ein Gegendruck von 1,5 Mpa darf nicht überschritten. Die Salzkonzentration wurde während 12 ml auf null gesenkt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden zweimal 1 Stunde gegen 20 mM KP-Puffer, pH 6,6 und 2 mM DTT bei 4°C dialysiert und anschließend in GenVAc auf vierfach konzentriert.

#### 3. 15. 2 Gelfiltration mit Superdex G-200

Die Superdex G-200 eignet sich für die Trennung von Proteine nach der Molekulargewichtgröße (10-600 kDa). Vor der Reinigung der Proteine sollte die Säule mindestens über 2 Volumina mit 85 mM KP-Puffer, pH 6,6 und 2 mM DTT equilibrieren. Bei der Verwendung der Superdex G-200 Säule wurde die maximale aufgetragenen Proteine von 200 mg bei einer Flußrate von 0,8 ml/min (48 ml/min) in 2 ml Fraktionen aufgefangen. Ein Gegendruck von 1 Mpa wird nicht überschritten. Die Empfindlichkeit des UV-Monitors wurde auf 2.0 eingestellt. Die gesamten Fraktionen wurden im flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 3. 14. 3 Gelfiltration an einer Superose<sup>TM</sup>12-Säule

Für eine analytische Gelfiltration wurde eine Superose<sup>TM</sup>12-Säule verwendet. Diese Säule umfaßt ein Volumen von 23,56 ml und eignet sich für die Trennung von Proteine der Molekulargewichtgröße ( $10^3$ - $3 \cdot 10^5$  kDa). Vor der Reinigung der Proteine sollten die Säule mindestens über 2 Volumina mit 85 mM KP-Puffer , pH 6,6 und 2 mM DTT equilibrieren. Bei der Verwendung der Superose<sup>TM</sup>12-Säule HR 10%30 (Pharmacia, 1991) wurde die maximale aufgetragenen Proteine von 20 mg bei einer Flußrate von 0,3 ml/min (18ml/min) in 900 µl Fraktionen aufgefangen. Die gesamten Fraktionen wurden im flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 3. 16 Polyacrylamidgelelektrophorese der löslichen Zellproteine

#### SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese

Diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1973) durchgeführt. Die Trennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen aufgrund der unterschiedlichen Ladung und der Molekulargewicht. Die Konzentration des Acrylamides des Trenngels betrug 16%. Für ein großes Trenngel wurden folgenden Lösungen zusammengesetzt und anschließend unter Vakuum für 10 min in einer Saugflasche entgast:

|                     |        |    |
|---------------------|--------|----|
| Acrylamid 30%       | 20     | ml |
| Bisacrylamid 1%     | 2,75   | ml |
| 1 M Tris/Hcl pH 8,7 | 14,5   | ml |
| 20 % SDS            | 0,1875 | ml |
| Amoniumpersulfat    | 0,1875 | ml |

Für die Polymerisation wurden 0,0325 ml TEMED zugegeben und anschließend in der vorbereiteten Gelplatte der Größe 160 X 180 X 1 mm gefüllt. Die Lösung wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und danach das Sammelgel zugegossen.

Der Sammelgel wurde wie folgt angesetzt:

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 30 % Acrylamid          | 1,67 ml |
| 1 % Bisacrylamid        | 1,30 ml |
| 0,25 M Tris/Hcl, pH 6,8 | 5,0 ml  |
| 20% SDS                 | 0,05 ml |
| H <sub>2</sub> O bidist | 1,95 ml |
| Ammoniumpersulfat       | 0,05 ml |
| TEMED                   | 0,01 ml |

Der Probenkamm wurde sofort im Sammelgel eingeführt. Nach etwa 10 min ist das Sammelgel auspolymerisiert. Berücksichtigt werden muß, daß das Gel vor der Anwendung in die gefüllte Doppelkammer mit Laufpuffer gesetzt wurde, indem die Luftblasen entfernt werden.

#### Laufpuffer SDS-PAGE

Der Laufpuffer wurde in 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wie folgt angesetzt:

|        |         |
|--------|---------|
| Tris   | 12,12 g |
| Glycin | 7,52 g  |
| SDS    | 1,00 g  |

Die Proben wurden für die Silberfärbung auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml eingestellt. Je 30 µl dieser Lösung wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 10 µl Probenaufnahmepuffers (PAP) für SDS-PAGE versetzt und für 10 min gekocht, 5 min auf Eis gekühlt, anschließend erfolgte eine Abzentrifugation für eine Minute. Als Molekulargewichtsstandard wird der Elektrophorese Standard Kit (Pharmacia-Freiburg) eingesetzt:

|                                  |      |     |
|----------------------------------|------|-----|
| Phosphorylase b                  | 94   | kDa |
| Rinderserumalbumin               | 67   | kDa |
| Ovalbumin                        | 43,0 | kDa |
| Carboanhydrase                   | 30,0 | kDa |
| Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen | 20,1 | kDa |
| ∞-Lactalbumin                    | 14,4 | kDa |

Mit der Pipette wurden 50 µl der Proben in die Taschen eingesetzt. Die Stromstärke wurde von 20 mA auf 40 mA erhöht wenn das Trenngel erreicht wird. Wenn die Bromophenolblaubande das untere Gelende erreicht, wird der Stromfluß ausgeschaltet und das Gel aus der Platten gelöst.

### 3. 16. 1 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese in einer Lösung von 25% Methanol, 10 % Essigsäure und 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) für eine Stunde fixiert und gefärbt. Das Gel wurde in einer Lösung aus 25 % Methanol und 10 % Essigsäure entfärbt. Die Nachweisgrenze für die Coomassie-Färbung liegt im Bereich von 0,1 bis 2 µg Protein pro Bande.

### 3. 16. 2 Silberfärbung ( Nach BIUM et al., 1987)

Für die Durchführung wurden folgenden Lösungen immer frisch angesetzt:

|                  |        |  |           |
|------------------|--------|--|-----------|
| <b>Lösung 1</b>  | 50 %   | Methanol   |           |
|                  | 12 %   | Essigsäure   |           |
|                  | 0,5 ml | Formalin (37%)   |           |
| <b>Lösung 2:</b> | 50 %   | Ethanol  |           |
| <b>Lösung 3:</b> | 30 %   | Ethanol  |           |
| <b>Lösung 4:</b> |        | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O | 0,2 g/l   |
| <b>Lösung 5:</b> |        | AgNO <sub>3</sub>  | 2,00 g/l  |
|                  |        | 37 % Formaldehyd   | 0,75 ml   |
| <b>Lösung 6:</b> |        | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                    | 60,00 g/l |
|                  |        | 37 % Formaldehyd   | 0,5 ml    |
|                  |        | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O | 4,00 mg/l |



Dafür wurden 100  $\mu\text{l}$  der Probe in das Graphitrohr einpipettiert und mit den folgenden Temperaturen verdampft.

## 4.1 Charakterisierung von Mutanten aus *C. glutamicum* mit veränderter RRase

### 4.1.1 Screening von Klonen aus *C. glutamicum* auf Thermosensitivität der Ribonucleotid-Reduktion

Am Anfang dieser Arbeit stand die Gewinnung von Mutanten mit defekter Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum*. Dafür waren 11 Klone mit einem möglichen Defekt der Ribonucleotid-Reduktase von W., OEHLMANN zur Verfügung gestellt worden, die nach der Vorschrift LUO (1994) isoliert. Die Klone waren auf erhöhte Temperaturempfindlichkeit bzw. HU-Sensitivität selektiert worden. Aus der phänotypischen Vorprüfung hatten sich zwei Kategorien von verdächtigen Klonen ergeben: 1) Die thermosensitiven Klone ODA1-ODA6, die bei 27°C aber nicht bei 37°C wuchsen, die HU-sensitiven Klone ODA7-ODA11, die anders als der Wildtyp, schon bei einer Konzentration von 1 mM Hydroxyharnstoff empfindlich sind (W. OEHLMANN, persönliche Mitteilung). Mit der Erwartung, daß auch die zweite Kategorie der Klone ODA7-ODA11 thermosensitiv ist (Kap. 2), könnte auf die Thermosensitivität untersucht werden. Aufgrund der Verwandtschaft zwischen *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* wurde *C. glutamicum* für die Charakterisierung der isolierten Klone ODA1-ODA11 als Wildtyp vorgenommen. Für ein erstes Screening wurden der Wildtyp und die zweite Kategorie der Klone auf die Thermosensitivität geprüft. Dafür wurden die Zellen im Seed-Medium bei 27°C bis zur spätlogarithmischen Phase angezogen und anschließend eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert, ein Enzymtest mit permeabilisierten Zellen durchgeführt. Das Screening der ersten Kategorie zeigt eine sehr geringe RRase-Aktivität sowohl bei 27°C als auch nach der Erhöhung der Temperatur bei 37°C der Klone ODA1, ODA2, ODA3, ODA4 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 9), so daß sie nicht als thermosensitive Mutante betrachtet werden kann. Die RRase-Aktivität des Klons ODA5 beträgt die Hälfte des Wildtyps sowohl bei 27°C als auch bei 37°C und kann sie als thermosensitive Mutante bezeichnet werden. Die Untersuchung auf die Thermosensitivität der RRase-Aktivität der zweiten Kategorie der Klone im Vergleich zum Wildtyp zeigte eine höhere Aktivität sowohl bei 37°C als bei 27°C von den Klone ODA8, ODA9. Im Unterschied dazu wiesen die Klone ODA7, ODA10 die Hälfte der RRase-Aktivität vom Wildtyp sowohl bei 27°C als auch bei 37°C auf.

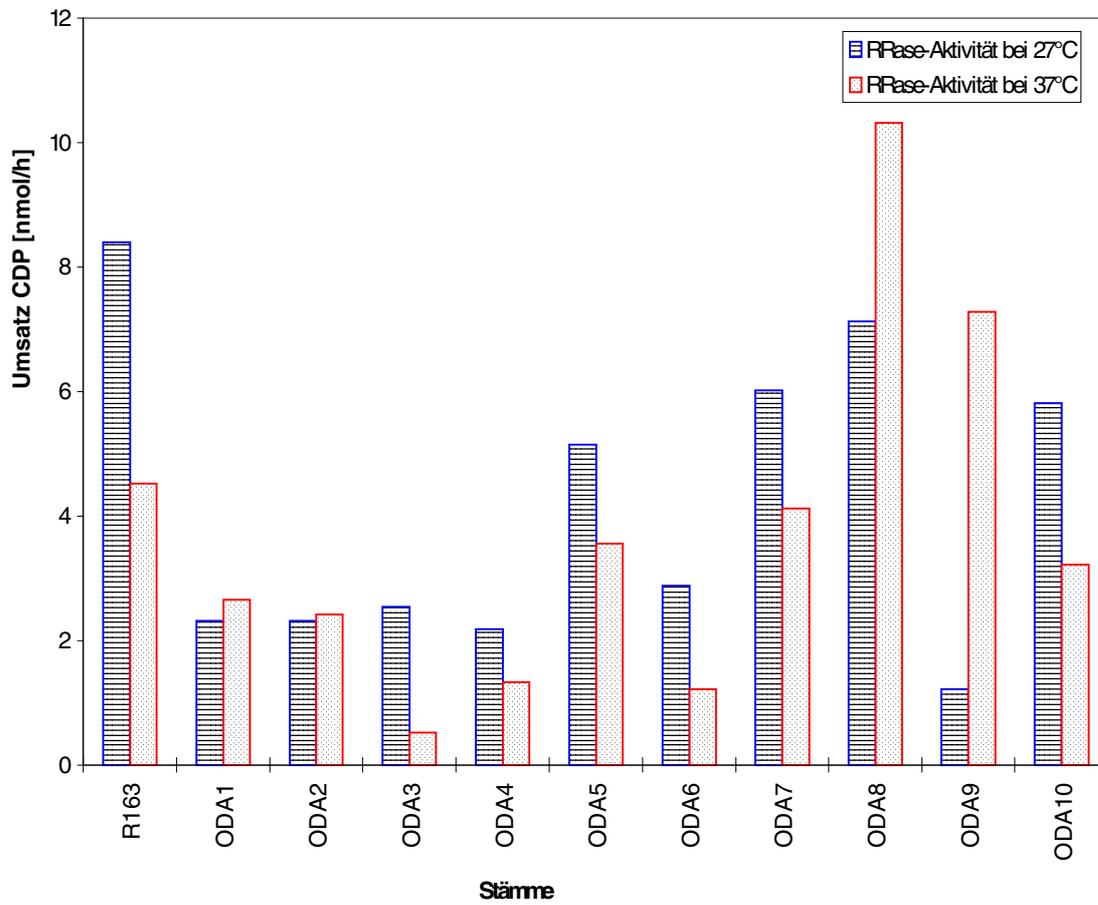


Abb. 9: Screening der Klone aus *C. glutamicum* auf Defekte in der Mn-Ribonucleotid-Reduktase, angegeben als Gesamtaktivität bei 27°C, 37°C in  $\text{nmol h}^{-1}$  pro  $3 \times 10^9$  Zellen. Test für 20 min, pH 7,2 mit  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-CDP}$  (0,25  $\mu\text{Ci}$ ) als Substrat.

Bezüglich des unterschiedlichen Verhaltens von Klonen im Vergleich zum Wildtyp war die Ermittlung des Temperaturoptimums vom Wildtyp und eine zweite Vorprüfung der Klone ODA5, ODA7, ODA8 ODA10 notwendig. Dafür sollte eine Ribonucleotid-Reduktion sowohl vom Wildtyp als auch von den obengenannten vorgeprüften Klone für einen Enzymtest bei verschiedenen Temperaturen (27, 30, 33, 35, 37°C) durchgeführt werden. Die maximale Aktivität des Klons ODA5 (0,197 nmol/h) wurde schon bei der ersten untersuchten Temperatur 27°C erzielt (Abb. 10). Danach hat sich die Aktivität um das vierfache bei dem Temperaturoptimum des Wildtyps, das bei 30°C liegt, verringert, während bei den übrigen untersuchten Temperaturen nur geringere Aktivität festgestellt werden konnte. Die Abbildung 11 zeigt die Aktivität der Ribonucleotid-Reduktion der Klone ODA7, ODA8 und ODA10. Der Klon ODA10 wies eine vergleichbare Aktivität bei den untersuchten Temperaturen wie der Wildtyp auf. Die Aktivität des Klons ODA8 ist bei der ersten untersuchten Temperatur 27°C höher, bei 30°C ging die Aktivität auf die Hälfte zurück und bei den übrigen untersuchten Temperaturen hat sie stark im Vergleich zum Wildtyp abgenommen, so daß sie als mittlere thermosensitive Mutante betrachtet werden kann. Die Aktivität des Klons ODA7 ist bei 27°C maximal während bei den übrigen untersuchten Temperaturen nur eine geringere Abnahme der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden konnte. Trotz der unerwünschten geringeren RRase-Aktivität von *C. glutamicum* nach einer Stunde Inkubation bei 37°C (Abb. 9) hat sich ergeben, daß die Klone ODA7, ODA10 keine thermosensitive Mutanten sind, während die Klone ODA5, ODA8 als thermosensitive Mutanten betrachtet werden können.

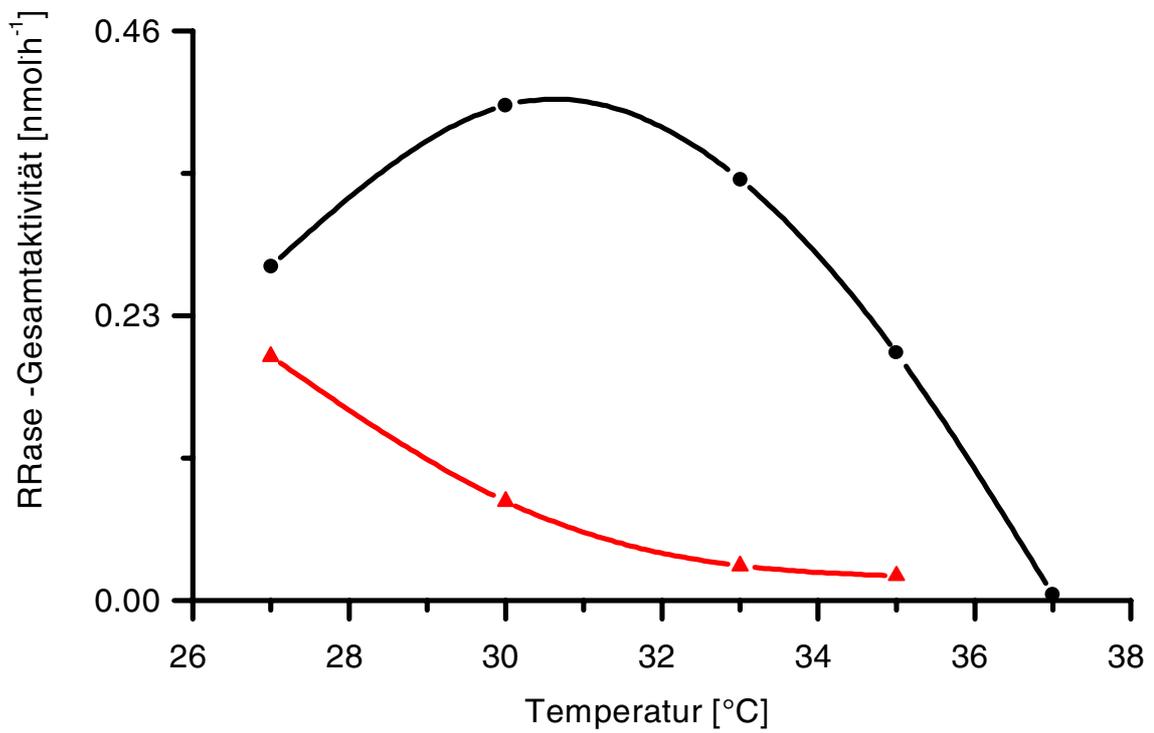


Abb. 10: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Ribonucleotid-Reduktion von *C. glutamicum* (●—●) und dem Klon ODA5 (▶—▶), angegeben als Gesamtaktivität in  $\text{nmol h}^{-1}$  pro  $3 \times 10^9$  Zellen. Test für 20 min mit  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-CDP}$  (0,25  $\mu\text{Ci}$ ) als Substrat.

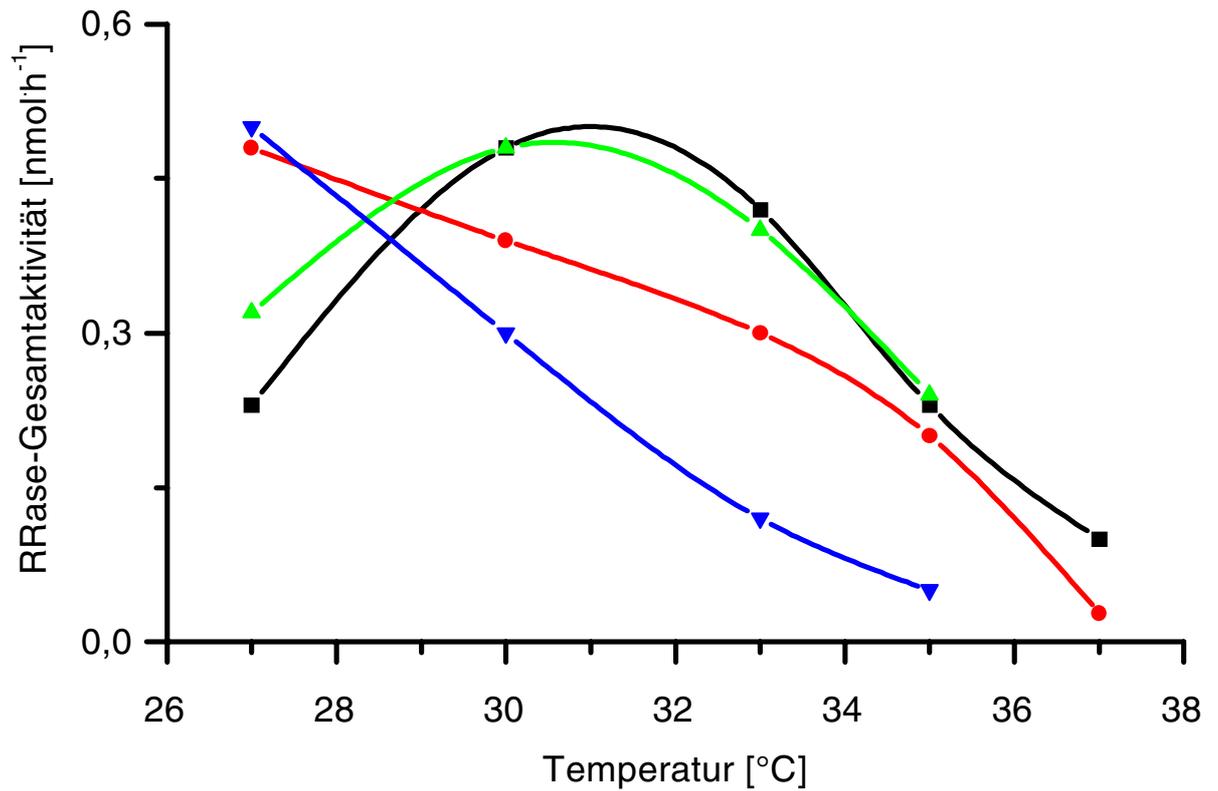


Abb. 11: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Ribonucleotid-Reduktion von *C. glutamicum* (▲—▲) und der Klone ODA7 (●—●), ODA8 (▼—▼), ODA10 (■—■), angegeben als Gesamtaktivität in nmol·h<sup>-1</sup> pro 3×10<sup>9</sup> Zellen. Test für 20 min mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 μCi) als Substrat.

#### 4. 1. 2 Sensitivität von thermosensitiven Mutanten aus *C. glutamicum* gegenüber Hydroxyharnstoff und *p*-Methoxyphenol im Vergleich mit dem Wildtyp

Für eine weitere Charakterisierung der thermosensitiven Mutanten ODA5, ODA8 sollte die Ribonucleotid-Reduktion sowohl gegenüber Hydroxyharnstoff als auch gegen *p*-Methoxyphenol geprüft werden. Für die Ermittlung der Ribonucleotid-Reduktion der thermosensitiven Mutanten ODA5, ODA8 im Vergleich zum Wildtyp wurden die permeabilisierten Zellen mit steigenden Konzentrationen von Hydroxyharnstoff (1-5 mM) behandelt, für einen Enzymtest eingesetzt. Die Abbildung 12 zeigt, daß die thermosensitive Mutante ODA5 im Gegenwart von Hydroxyharnstoff keinen Unterschied der Aktivitätshemmung im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Der  $I_{50}$ -Wert des Wildtyps beträgt 2,7 mM, während er bei der Mutante ODA5 um 2,2 mM liegt, so daß diese nicht als HU-sensitive Mutante betrachtet werden kann. Damit ist Mutante ODA8 wenig empfindlich gegenüber Hydroxyharnstoff im Vergleich zum Wildtyp. Die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion sowohl vom Wildtyp als auch von den bisher vorgeprüften Mutante ODA5, ODA8 könnte durch steigenden Konzentrationen von *p*-Methoxyphenol (1-5 mM) gezeigt werden (Abb. 13), wobei die Mutanten ODA5, ODA8 ein ähnliches Verhalten im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Der  $I_{50}$ -Wert des Wildtypes betrug 2,1 mM während von ODA8 bei 2,2, ODA5 bei 1,8 mM liegt, so daß sie keine Überempfindlichkeit gegenüber diesem Wirkstoff aufweisen können.

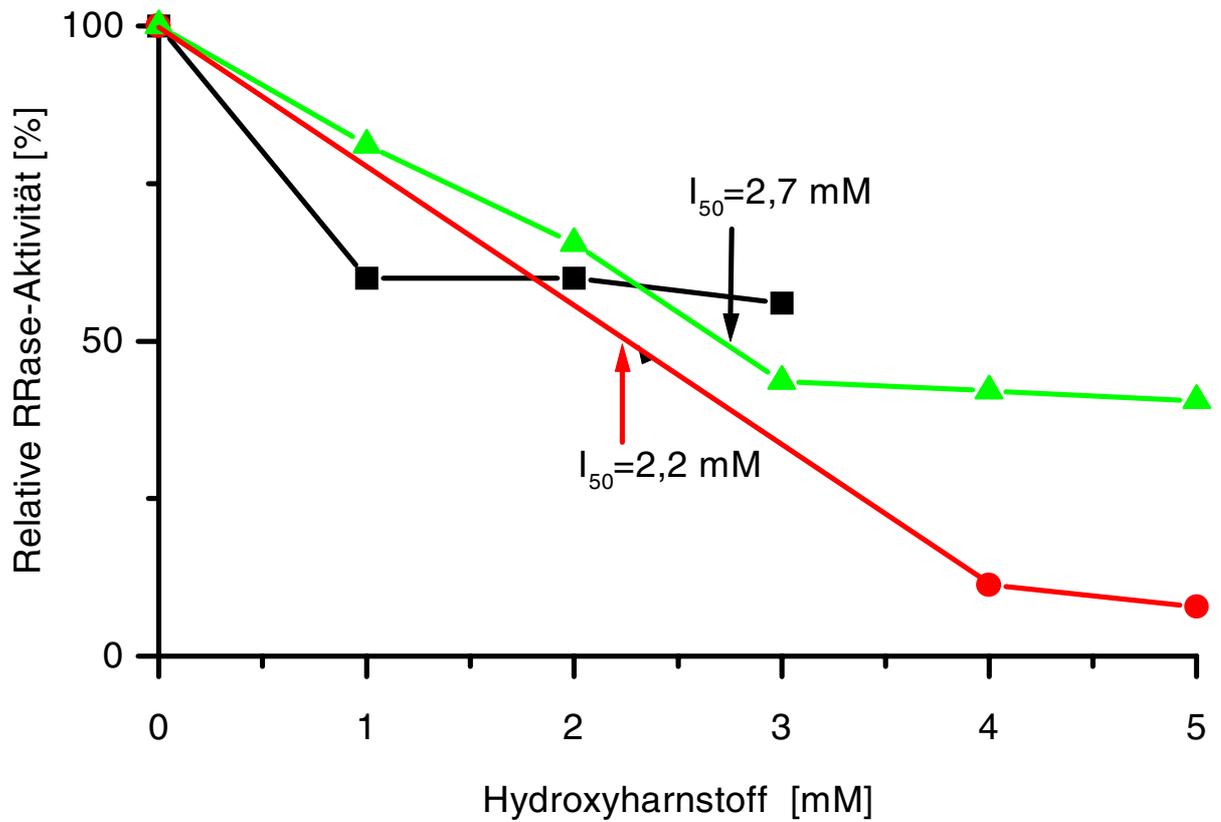


Abb. 12: Die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion von dem Wildtyp *C. glutamicum* (▲—▲) und den thermosensitiven Mutanten (ODA5 (●—●), ODA8 (■—■)) mit steigenden Konzentrationen von Hydroxyharnstoff. Test für 20 min bei 30°C mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 μCi) als Substrat. Die Gesamtaktivität ohne HU-Behandlung wurde als 100% gesetzt.

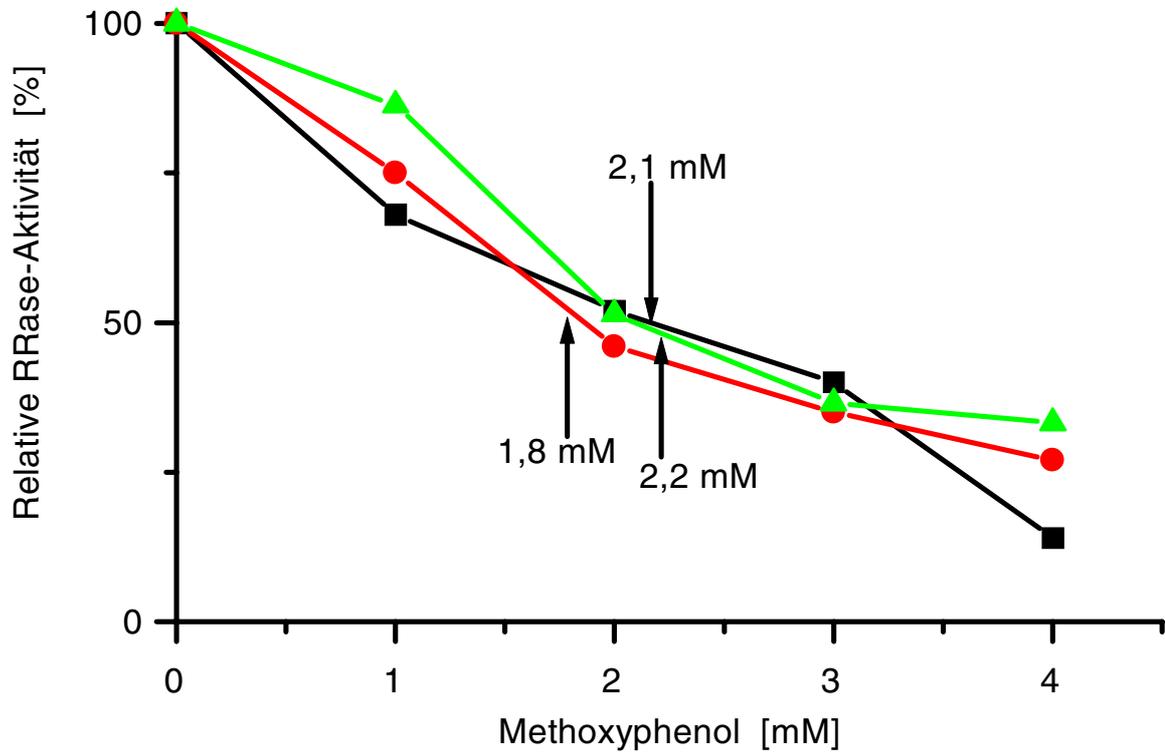


Abb. 13: Die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion von dem Wildtyp *C. glutamicum* (■—■), den thermosensitiven Mutanten ODA5 (●—●), ODA8 (▲—▲) mit steigenden Konzentrationen von *p*-Methoxyphenol. Test für 20 min bei 30°C mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 µCi) als Substrat. Die Gesamtaktivität ohne *p*-Methoxyphenol-Behandlung wurde als 100% gesetzt.

**4.2 Gewinnung von Biomasse mit hoher Ribonucleotid-Reduktase von *C. glutamicum***

Für die geplante Enzymreinigung wird ausreichend Biomasse mit hoher RRase-Aktivität benötigt. Daher muß zunächst der Aktivitätsverlauf der Ribonucleotid-Reduktion während des Wachstums im Fermenter geprüft werden, um einen geeigneten Zeitpunkt für die Zellernte zu bestimmen. Das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* im Seed-Medium bei einer Temperatur von 30°C wird in Abbildung 14 gezeigt.

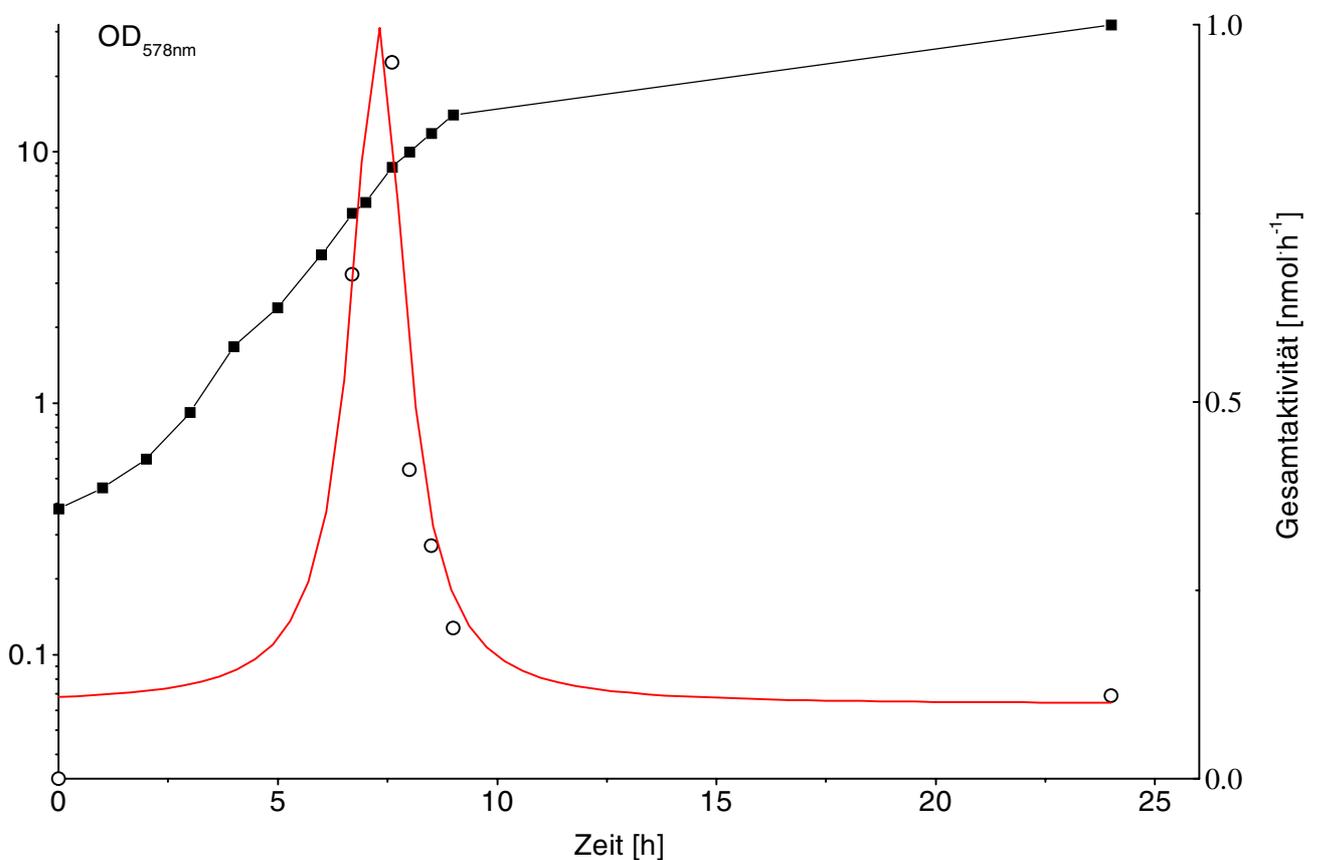


Abb.14: RRase-Aktivität (o—o) in Abhängigkeit vom Wachstumsverlauf (■—■) des Stammes *C. glutamicum* im Seed-Medium im 10 L-Fermenter (4 L Luft/min, 250 Upm, 30°C), angegeben als Gesamttaktivität in nmol·h<sup>-1</sup> pro 3x10<sup>9</sup> Zellen. Die Zellen wurden mit Ether (1:1, V:V) für 1 min permeabilisiert. Test für 20 min bei 30 °C mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 µCi) als Substrat.

Der Fermenter wurde mit einer  $OD_{578\text{nm}}$  von 0,38 angeimpft und die Zelldichte ( $OD_{578\text{nm}}$ ) hat während der logarithmischen Phase von 0,38 auf 14 zugenommen, wobei diese Phase etwa 9 Stunden gedauert hat. Anschließend gingen die Zellen in die stationäre Phase über. Daraus ergibt sich eine Verdopplungszeit von etwa 1,5 Stunden. Für die Ermittlung des Aktivitätsmaximums der Ribonucleotid-Reduktion wurden die Zellen von *C. glutamicum* bei verschiedenen Zelldichten geerntet und anschließend mit Ether für 1 min nach der Vorschrift von LUO (1994) permeabilisiert. Die maximale Aktivität der Ribonucleotid-Reduktion (0,95 nmol/h) wurde nach 7,6 Stunden Inkubation bei einer  $OD_{578\text{nm}}$  von 8,7 erzielt. Unmittelbar danach fällt die RRase-Aktivität steil ab, sie nimmt innerhalb einer halben Stunde um die Hälfte ab und beträgt nur noch 0,41 nmol/h. Während der stationären Wachstumsphase hat die Aktivität nochmals sehr stark bis auf einen geringen Restwert abgenommen. Das Verhalten der Aktivität der Ribonucleotid-Reduktion zeigt, daß es sich um ein sogenanntes Peak-Enzym handelt.

Als Schlußfolgerung ergibt sich aus diesem Experiment, daß die höchste Aktivität der Ribonucleotid-Reduktion im letzten Drittel der exponentiellen Wachstumsphase liegt. Damit besteht für die Bereitsstellung einer großen Menge von Ribonucleotid-Reduktase mit hoher Aktivität von *C. glutamicum* bei Anzucht im 10L-Fermenter der Vorteil, daß die Zellen für zukünftige Anzuchten unmittelbar in der spätlogarithmischen Phase geerntet werden.

### 4.3 Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum*

Weil Ribonucleotid-Reduktase nur in geringer Menge in Zellen vorkommt und ein sehr labiles Enzym ist, war in den ersten Schritten die Bemühung für die Optimierung der Biomassegewinnung (Kap. 4. 2) notwendig. Eine erfolgreiche chemische und physikalische Charakterisierung des Enzyms benötigt ein hochgereinigtes Protein, dafür sind unterschiedliche Wege unternommen worden. Im Laufe der Proteinreinigung ist zu erwarten, daß die Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase entweder zusammenbleiben oder auseinandergehen und dann in einzelnen Schritten weiter gereinigt werden müssen. Die getrennten Untereinheiten können für sich allein keine Aktivitäten aufweisen. In diesem Fall müssen die Untereinheiten durch das Hinzufügen der fehlenden Untereinheit komplementiert werden, um ein aktives Holoenzym auf Aktivität testen zu können.

#### 4. 3. 1 Hydrophobe Interaktionschromatographie von partiell gereinigter RRase

Bei der Reinigung der besser untersuchten Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* erfolgte bisher im ersten Schritt zur Trennung der Untereinheiten die Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration (GRIEPENBURG et al., 1996). Bei *C. glutamicum* hat A. WALTER (1996) nur die kleine Untereinheit (CG2-Protein) mittels H.I.C gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurde die H.I.C-Säule für die Suche sowohl nach dem CG2-Protein als auch dem CG1-Protein aus *C. glutamicum* verwendet. Wegen der nahen Verwandtschaft zwischen *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes*, war es in dem ersten Schritt die Suche nach dem metallhaltigen CG2-Protein notwendig, nachdem sich die Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* mit den RRase-Untereinheiten aus *C. ammoniagenes* komplementieren lassen (WALTER 1996, OEHLMANN, 1998). Aus diesem Grund war von Anfang an zu erwarten, daß es sich bei *C. glutamicum* ebenfalls um eine Mn-RRase handelt. Zum Aktivitätstest für die Suche nach dem CG2-Protein wurde das dialysierte Proteinmaterial von H.I.C Fraktionen (Nr. 11-20) mit dem von OEHLMANN, zur Verfügung gestellten CA1-Protein aus der Affinitätschromatographie von *C. ammoniagenes* komplementiert. Der Komplementationstest (Abb. 16) zeigte, daß das CG2-Protein von *C. glutamicum* über einen Bereich von 3 Fraktionen (Nr. 17-19) eluiert wurde, wobei die Fraktion Nr. 19 die höchste spezifische-Aktivität (0,51 nmol/mg·h) enthielt. Hierbei hat sich die Aussage ergeben, daß das CG2-Protein sich aus der H.I.C-säule nach Absenkung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 30 bis 15 % löst. Das CG2-Protein aus *C. glutamicum* nach der Reinigung durch H.I.C wurde in den Fraktionen (Nr. 17-19) um einen Faktor von 4,25 (Tab. 3) angereichert. Das H.I.C eluierte CG2-Protein könnte für eine weitere Charakterisierung der Ribonucleotid-Reduktase verwendet werden.

Tab. 3 : Anreicherung des CG2-Proteins nach hydrophober Interaktionschromatographie

| Schritt                 | Protein<br>mg | spezifische<br>Aktivität<br>$\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ | Gesamt<br>Aktivität<br>$\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$ | Anreicherungs-<br>Faktor |
|-------------------------|---------------|--|--|--------------------------|
| AS-Fällung<br>(40-60 %) | 22,0 mg       | 0,12   | 2,64   | 1,00                     |
| CG2-Protein             | 03,2 mg       | 0,51   | 1,63   | 4,25                     |

#### 4. 3. 2 Biochemischer Komplementationstest der Untereinheiten von RRase

Die Tatsache, daß sich die Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase nach der Trennung miteinander komplementieren lassen, bietet die Möglichkeit für eine Suche nach dem komplementären Untereinheit CG1-Protein. Um zu ermitteln, bei welchen Fraktionen wird das CG1-Protein eluiert, wurde der Komplementationstest der Untereinheiten miteinander ebenfalls verwendet. Dafür wurde das H.I.C eluierte zusammengepoolte CG2-Protein Fraktionen (Nr. 17-19) mit den vermuteten CG1-Protein-Fraktionen (Nr. 18-23) aus der analytischen H.I.C komplementiert. Die Abbildung 16 zeigt die Elution des CG1-Protein über einen Bereich von 3 Fraktionen (Nr. 20-22), wobei die Fraktion Nr. 21 die stärkste spezifische-Aktivität ( $0,74 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) enthielt. Nach der Reinigung durch H.I.C-Säule wurde das gepoolte CG1-Protein Fraktionen (Nr. 20-22) von *C. glutamicum* um einen Faktor von 6,16 (Tab. 4) angereichert. Die Schlußfolgerung dieses Experiment ist, daß das CG1-Protein starke Wechselwirkung mit der Phenyl-Superose Säule im Vergleich zu dem CG2-Protein hat, weshalb es später aus der Säule eluiert wurde. Damit ermöglicht H.I.C die Trennung der Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase als auch die Lieferung von genügend gereinigtem CG2-Protein erfüllen.

Tab. 4: Anreicherung des CG1-Proteins nach hydrophober Interaktionschromatographie

| Schritt                 | Protein<br>mg | spezifische<br>Aktivität<br>$\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ | Gesamte<br>Aktivität<br>$\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$ | Anreicherungs-<br>faktor |
|-------------------------|---------------|--|---|--------------------------|
| AS-Fällung<br>(40-60 %) | 22 mg         | 0,12   | 2,64  | 1.00                     |
| CG1-Protein             | 2,47 mg       | 0,74   | 1,82  | 6,16                     |

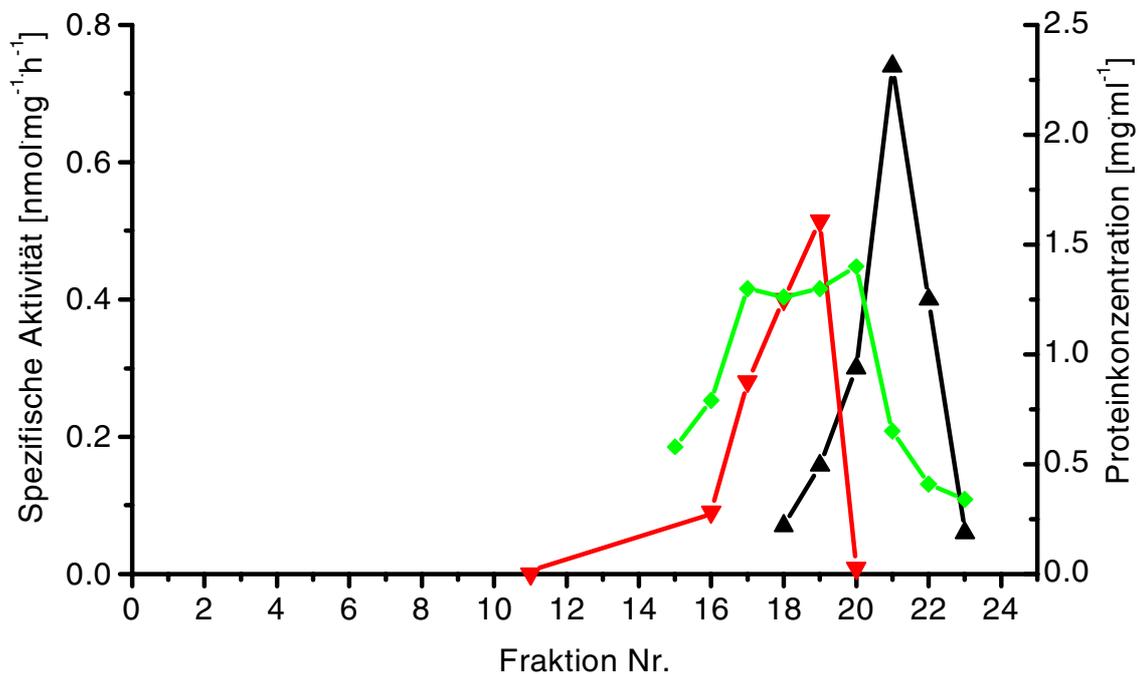


Abb. 16: Elution der RRase von *C. glutamicum* von Material aus der 40-60%  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  als getrennte Untereinheiten CG2-Protein ( $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ ) und CG1-Protein ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) durch H.I.C, Proteinkonzentration ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ). Zur CG2-Aktivitätsbestimmung Komplementationstest mit dem CA1-Protein aus *C. ammoniagenes*. Säule : Phenyl-Superose HR, Volumen: 1 ml; Puffer: 1,5 M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  85 mM KP, pH 6,6 mit 2 mM DTT. Flußrate; 0,25 ml/min.

#### 4. 3. 3 Gelfiltration mit Superdex G-200 und der biochemische Komplementationstest der Untereinheiten der RRase

Die präparative Superdex G-200 Säule eignet sich für die Trennung der Proteine nach dem Molekulargewicht. Zum Aktivitätstest für die Suche nach der Ribonucleotid-Reduktase wurde am Anfang das Proteinmaterial aus den Fraktionen (Nr. 9-23) getestet. Die RRase aus *C. glutamicum* wurde über einen Bereich von 8 Fraktionen (Nr. 13-20) (Abb. 17) eluiert, wobei fast alle Fraktionen eine gleichniedrige spezifische-Aktivität (0,6 nmol/mg<sup>h</sup>) aufwiesen. Die Tatsache, daß die Elution der RRase durch die Gelfiltration mit Superdex G-200 sehr weit über mehrere Fraktionen stattfindet, hat sich der Gedanke an eine Dissoziation in die zwei Untereinheiten ergeben. Mit der Vermutung, daß die Gelfiltration mit Superdex G-200 einen

Zerfall der RRase hervorruft, wurde die Bemühung für die Wiedergewinnung der dissoziierten Untereinheiten erforderlich. Da die Bestätigung dieser Hypothese allerdings durch einen Aktivitätstest nachgewiesen werden sollte, wurde für die Suche nach dem metallhaltigen CG2-Protein das Proteinmaterial aus den Fraktionen (Nr. 13-20) der obigen Gelfiltration mit dem von OEHLMANN zur Verfügung gestellten CA1-Protein aus der Affinitätschromatographie von *C. ammoniagenes* komplementiert. Die Abbildung 17 zeigt, daß das CG2-Protein über einen Bereich von 5 Fraktionen (Nr. 15-19) eluiert wurde, wobei die Fraktion Nr. 18 die stärkste spezifische-Aktivität (6,33 nmol/mg·h) enthielt. Das CG2-Protein wurde durch die Reinigung mittels präparativer Gelfiltration um einen Faktor von 13 in der Fraktion Nr. 18 (Tab. 5) angereichert. Das CG2-Protein wurde durch die präparative Gelfiltration im Vergleich zu der analytischen H.I.C Säule (Kap. 4. 3. 2) stark angereichert. Diese Methode bietet einen Vorteil für die Bereitsstellung größerer Menge von Mn-RRase mit hoher Aktivität. Nachdem das metallhaltige CG2-Protein gewonnen worden war, sollte es auch für die Suche nach dem CG1-Protein verwendet werden. Weil das CG1-Protein ein großes Molekulargewicht im Vergleich zu dem CG2-Protein besitzt, sollte durch die Reinigung mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 früher aus der Säule gelöst werden. Deshalb wurde zum Aktivitätstest für die Suche nach der großen Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase das Proteinmaterial aus den Fraktionen (Nr. 10-15) mit dem gereinigten CG2-Protein durch die Gelfiltration mit Superdex G-200 komplementiert. Das CG1-Protein wurde über einen Bereich von 3 Fraktionen (Nr. 12-14) eluiert, wobei eine ganze niedrige spezifische-Aktivität (1,03 nmol/mg·h) aufwies. Damit konnte die große Untereinheit CG1-Protein nach der Reinigung durch die Gelfiltration mit Superdex G-200 Säule um einen Faktor von 2,2 (Tab. 6) angereichert werden. Als Schlußfolgerung ergibt sich aus diesem Experiment, daß das CG2-Protein stark angereichert ist, während das CG1-Protein fast verloren gegangen ist.

Tab. 5: Anreicherung des CG2-Proteins nach Gelfiltration mit Superdex G-200

| Schritt   | Protein | spezifische-Aktivität<br>nach Kompletation<br>mit CA1-Protein | Gesamt-<br>Aktivität    | Ausbeute | Anreicherungs-<br>faktor |
|---|---------|---|-------------------------|----------|--------------------------|
|   | mg      | nmol · mg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>                     | n mol · h <sup>-1</sup> |          |                          |
| <b>NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b><br><b>(40-60 %)</b> | 431,0   | 0,46  | 198,2                   | 100,0    | 1,0                      |
| <b>Fr. Nr. 15</b>   | 19,2    | 1,50  | 28,0                    | 14,1     | 3,1                      |
| <b>Fr. Nr. 16</b>   | 19,2    | 3,10  | 58,0                    | 29,2     | 6,7                      |
| <b>Fr. Nr. 17</b>   | 12,6    | 4,80  | 60,7                    | 30,6     | 10,4                     |
| <b>Fr. Nr. 18</b>   | 11,8    | 6,30  | 74,8                    | 37,7     | 13,0                     |
| <b>Fr. Nr. 19</b>   | 11,8    | 3,80  | 44,4                    | 22,4     | 8,2                      |
| <b>Fr. Nr. 20</b>   | 11,5    | 3,80  | 44,4                    | 22,4     | 8,2                      |

Tab.6 : Die Anreicherunug des CG1-Proteins nach der Gelfiltration mit Superdex G-200

| Schritt   | Protein | spezifische-Aktivität<br>Kompletation<br>mit CG2-Protein | Gesamt-<br>Aktivität    | Ausbeute | Anreicherungs-<br>faktor |
|---|---------|--|-------------------------|----------|--------------------------|
|   | mg      | nmol · mg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>                | n mol · h <sup>-1</sup> |          |                          |
| <b>NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b><br><b>(40-60 %)</b> | 43,0 mg | 0,46   | 198,26                  | 100,0    | 1,0                      |
| <b>CG1- Protein</b>   | 28,5 mg | 1,03   | 29,30                   | 14,7     | 2,2                      |

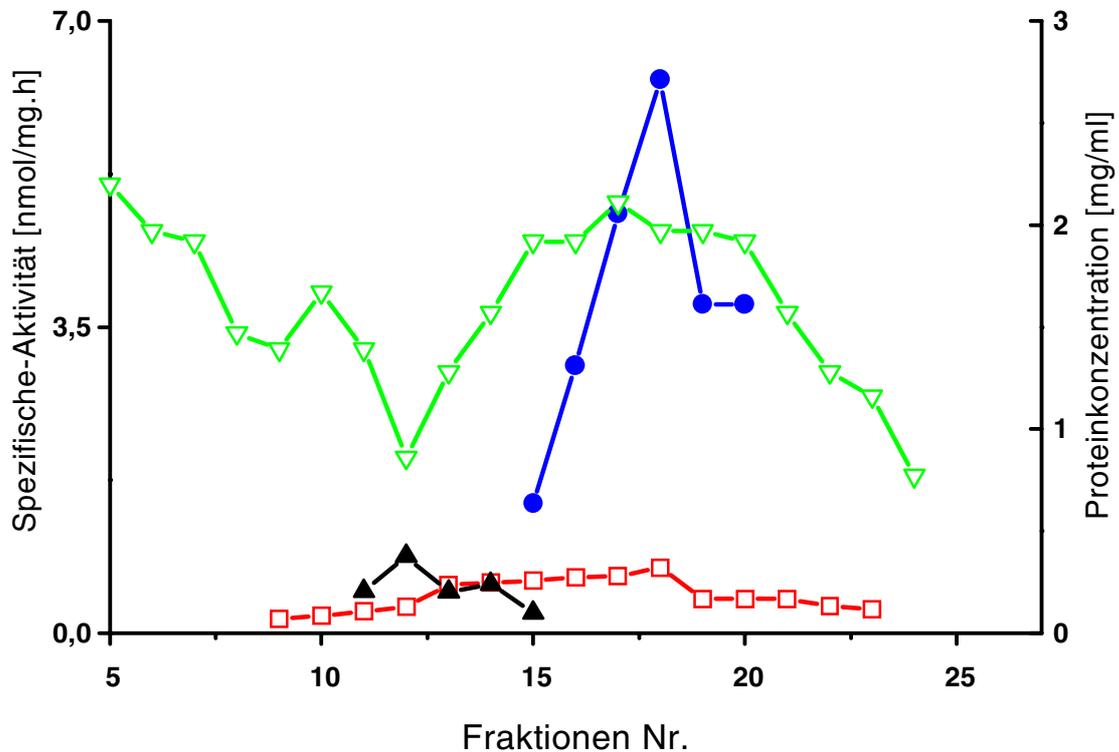


Abb. 17: Profil der Proteinelution ( $\nabla-\nabla$ ) und Zerfall der RRase ( $\square-\square$ ) aus der fraktioniert Ammoniumsulfat-Fällung (40-60%  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  von *C. glutamicum* während der Gelfiltration mit Superdex G-200. Die CG2-Aktivität ( $\bullet-\bullet$ ) wurde durch Komplementation mit dem CA1-Protein aus *C. ammoniagenes* ermittelt. Die CG1-Aktivität ( $\blacktriangle-\blacktriangle$ ) wurde mit CG2-Protein aus der Gelfiltration von Superdex G-200 komplementiert. Test für 20 min bei 30°C mit  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-CDP}$  (0,25  $\mu\text{Ci}$ ) als Substrat. Säule: Superdex G-200, Volumen: 124 ml; Puffer: 85 mM KP, pH 6,6 mit 2 mM DTT. Flußrate; 0,8 ml/min.

#### 4.4 Bestimmung des Molekulargewichts der RRase-Untereinheiten

Die Superose<sup>TM</sup>12 Säule eignet sich für die Trennung der Proteine nach dem Molekulargewicht. Die leichte Dissoziierbarkeit der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* in die Untereinheiten während der Reinigung ist für dieses Enzym charakteristisch. Der RRase-Zerfall erleichtert einerseits die Bestimmung des Molekulargewichts der getrennten Untereinheiten, andererseits erschwert die Bestimmung des Molekulargewichts des Gesamtzyms. Nach der Trennung der RRase-Untereinheiten durch analytische H.I.C wurde das CG2-Protein Fraktionen (Nr. 17-19) zusammengepoolt, konzentriert und für die Molekulargewichtsbestimmung durch die Gelfiltration mit Superose<sup>TM</sup>12 weiter gereinigt. Bezüglich der Elution des CG2-Proteins durch die Gelfiltration mit Superose<sup>TM</sup>12 wurden die Proteine nur im geringeren Bereich der Fraktionen (Nr. 6-12) eluiert. Dadurch wurde zum Aktivitätstest für die Suche nach dem eluierten gereinigten CG2-Protein das konzentrierte Proteinmaterial aus den Fraktionen (Nr. 7-12) mit dem CG1-Protein Fraktion Nr. 21 aus der analytischen H.I.C komplementiert. Die Abbildung 19 zeigt, daß das metallhaltige CG2-Protein über einen Bereich von 3 Fraktionen eluiert wurde, wobei die Fraktion Nr. 10 die stärkste RRase-Gesamtaktivität ( 3,7 nmol/h) enthielt. Anhand der graphischen Eichkurve (Abb. 18) ergibt sich, daß das Molekulargewicht dieser kleinen Untereinheit (CG2-Protein) etwa  $34 \pm 5$  kDa beträgt.

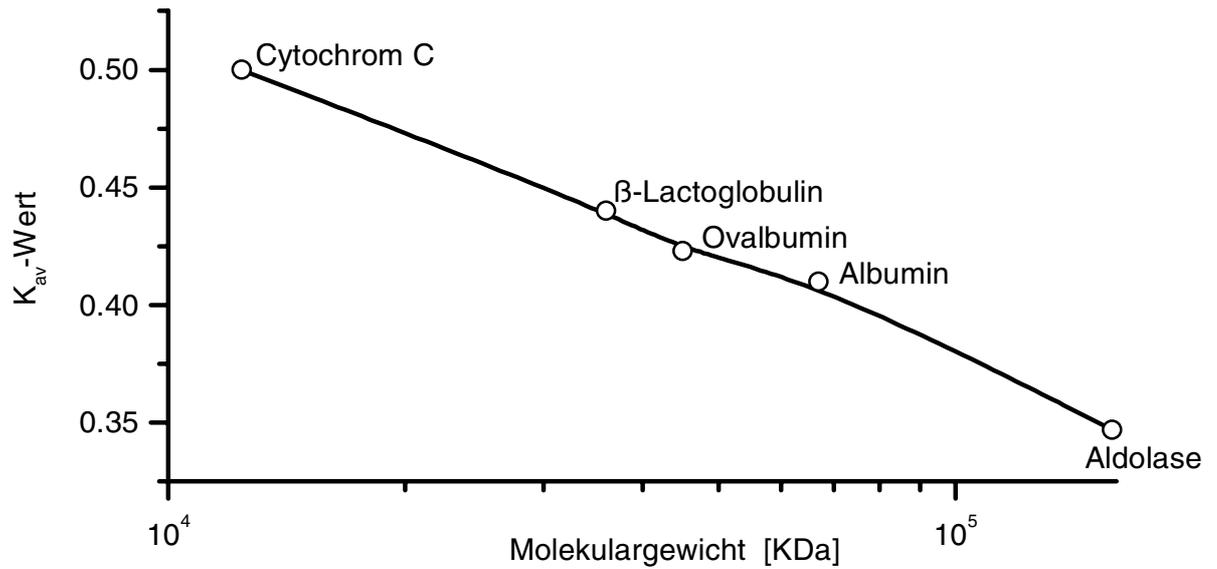


Abb. 18: Eichkurve für Superose™12, Abhängigkeit der  $K_{av}$ -Werte verschiedener Proteine von dem Molekulargewicht.

| Elutionsvolumen ( $V_e$ ) | (halbmaximale Peakhöhe) |
|---------------------------|-------------------------|
| Totvolum ( $V_o$ )        | 7 ml                    |
| Gesamtvolum ( $V_t$ )     | 24 ml                   |
| Cytochrom C               | 15,5 ml                 |
| CG2-Protein               | 14,55 ml                |
| $\beta$ -Lactoglobulin    | 14,5 ml                 |
| Ovalbumin                 | 14,2 ml                 |
| Albumin                   | 14 ml                   |
| Aldolase                  | 12,9 ml                 |

Als Molmarker dienten Stammlösungen von 3 mg/ml folgender proteine :

|                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| Aldolase (Kaninchenmuskel)    | $158 \times 10^3$  |
| Albumin Bovine                | $67 \times 10^3$   |
| Ovalbumin                     | $45 \times 10^3$   |
| $\beta$ -Lactoglobulin bovine | $36,5 \times 10^3$ |
| Cytochrome C                  | $12,4 \times 10^3$ |

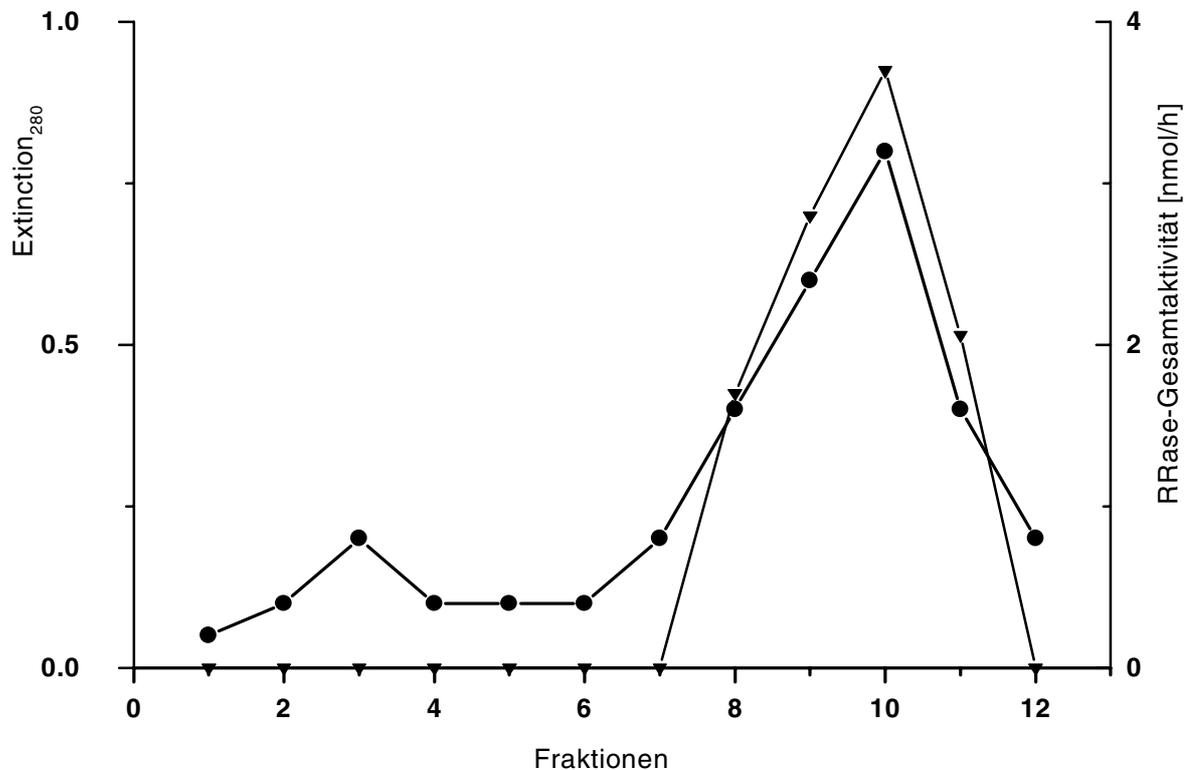


Abb. 19: Elutionsprofil (●—●) von CG2-Protein aus *C. glutamicum* während der Gelfiltration mit Superose™12 und Aktivitätsbestimmung (▼—▼) nach Komplementations-test von mit CG1-Protein (aus H.I.C). Säule: Superose™12, Volumen: 23,56 ml, Puffer: 85 mM Kp-Puffer, pH 6,6 mit 2 mM DTT. Flußrate; 0,3 ml/min. Test für 20 min bei 30°C mit [5-H<sup>3</sup>]-GDP (0,25 µCi) als Substrat.

#### 4.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie des Metall-Cofaktors der Ribonucleotid-Reduktase (CG2-Protein)

Für die Bereitsstellung einer ausreichenden Menge von dem CG2-Protein aus *C. glutamicum* ergab sich bisher die höchste Anreicherung durch die Gelfiltration mit Superdex G-200. Eine chemische und physikalische-Bestimmung erfordert jedoch ein hochgereinigtes Protein. Für diesen Zweck sollte das CG2-Protein nach der Gelfiltration mit Superdex G-200 noch weiter gereinigt werden. Im Kapitel (4. 3. 1) ist erläutert worden, daß das CG2-Protein von *C.*

*glutamicum* sich aus der H.I.C-Säule nach Absenkung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 30 bis 15 % löst. Diese verfügbare Information wurde bei der erneuten H.I.C Reinigung des CG2-Proteins genutzt, um das CG2-Protein leichter detektieren zu können. Für die Suche nach dem metallhaltigen CG2-Protein nach der Reinigung durch die H.I.C-Säule wurde das Proteinmaterial zum Aktivitätstest bezüglich der obengenannten Salzkonzentration ausgewählt (Hierbei wurde das Programm umgeschrieben). Die eluierten Fraktionen (Nr. 21-23) wurden mit dem von OEHLMANN zur Verfügung gestellten CA1-Protein aus der Affinitätschromatographie von *C. ammoniagenes* komplementiert. Das CG2-Protein wurde durch die H.I.C-Säule über einen Bereich von 3 Fraktionen eluiert, wobei die Fraktion Nr. 22 die stärkste-Aktivität enthielt (Abb. 20). Ebenfalls wurde das metallhaltige CG2-Protein nach Absenkung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 30 bis 15 % aus der H.I.C-Säule eluiert. Die gepoolten Fraktionen (Nr. 21-23) des CG2-Proteins aus *C. glutamicum* wurden um einen Faktor von 3,6 (Tab. 7) angereichert. Zur Kontrolle der Reinigung von dem CG2-Protein wurden die aktiven Fraktionen der aus der Gelfiltration mit Superdex G-200 Fraktionen (Nr. 15-19) und analytische H.I.C Fraktionen (NR. 22-23) auf ein 16 % SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die Abbildung 21 zeigt verschiedene Bande, wobei wahrscheinlich eine Bande bei der Größe von 38 kDa dem CG2-Protein entspricht. Für die Protein-Sequenzierung wurde diese Bande aus mehreren Geltaschen ausgeschnitten und auf ein neues 16% SDS-Polyacrylamid Gel wieder aufgetragen (Abb. 22), um genügend Protein zu erhalten.

Tab. 7: Anreicherung des CG2-Proteins nach Gelfiltration mit Superdex G-200 und anschließender analytischer hydrophober Interaktionschromatographie

| Schritt                     | Protein<br>mg | spezifische-Aktivität<br>nmol·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> | Gesamt<br>Aktivität<br>nmol·h <sup>-1</sup> | Anreicherungs-<br>Faktor |
|-----------------------------|---------------|---|---|--------------------------|
| AS-Fällung (40-60 %)        | 431,00        | 0,46  | 198,26                                      | 1,0                      |
| CG2-Protein (Gelfiltration) | 14,00         | 3,90  | 53,18                                       | 8,2                      |
| CG2-Protein (H.I.C)         | 07,15         | 1,65  | 11,80                                       | 3,6                      |

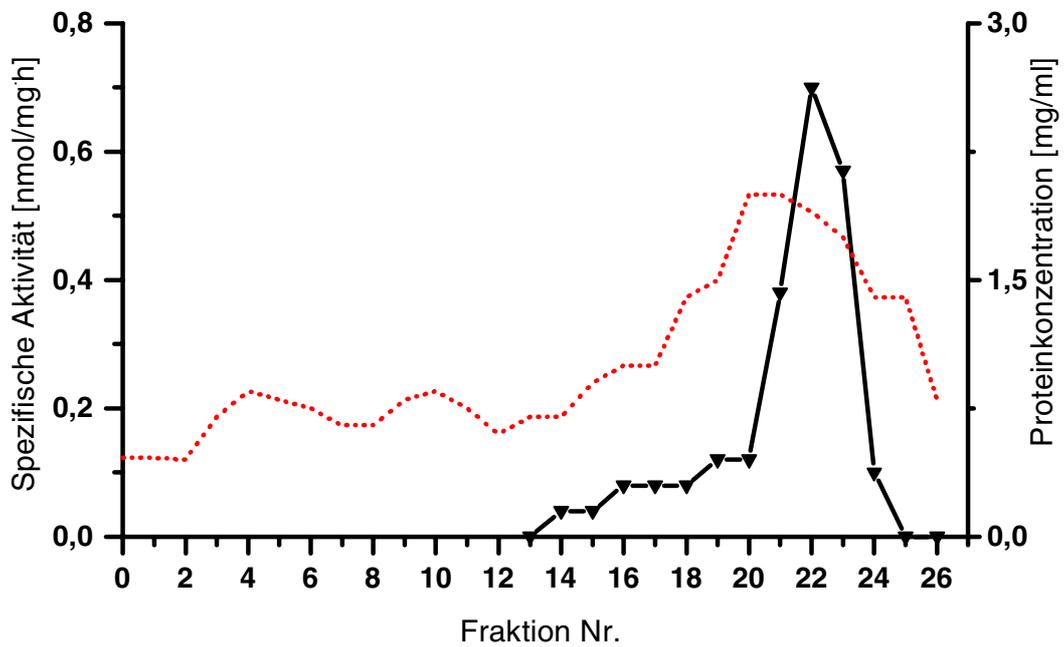


Abb. 20: Elutionsprofil (.....) des CG2-Proteins aus *C. glutamicum* in der neuen analytischen H.I.C nach der Gelfiltration mit Superdex G-200 und Aktivitätsbestimmung nach dem Komplementationstest mit dem CA1-Protein aus *C. ammoniagenes* (▼—▼). Säule: Phenyl-Superose HR, Volumen: 1 ml; Puffer: 1,5 M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  85 mM KP, pH 6,6; mit 2 mM DTT. Flußrate; 0,25 ml/min.

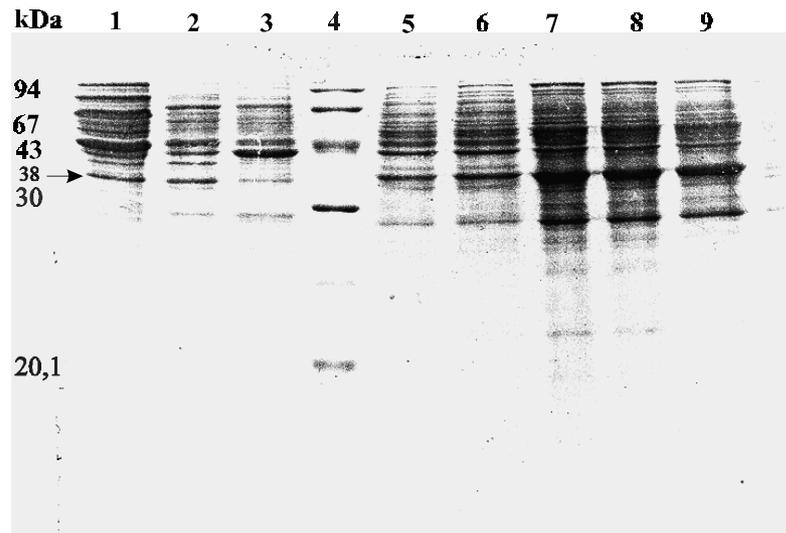


Abb. 21: SDS-Gelelektrophorese von Proteine nach der Reinigung des CG2-Proteins mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 und analytische H.I.C.

- Spur 1-2: H.I.C Fraktion Nr. 23
- Spur 3 : H.I.C Fraktion Nr. 22.
- Spur 4 : Proteinmarker des SDS-Gels.
- Spur 5 : Gelfiltration Fraktion Nr. 15
- Spur 6 : Gelfiltration Fraktion Nr. 16
- Spur 7-9: Gelfiltration Fraktionen (Nr. 17-19)

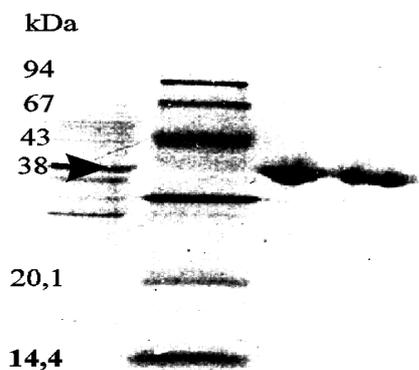


Abb. 22: SDS-Gelelektrophorese des CG2-Proteins nach der Reinigung des CG2-Proteins mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 und anschließend analytische H.I.C

- Spur 1 : Fraktion Nr. 22 aus H.I.C
- Spur 2 : Proteinmarker des SDS-Gels
- Spur 3 : CG2-Protein nach der Reinigung durch Gelfitration und analytischer H.I.C (Fraktion Nr. 23)

## 4.6 Charakterisierung von CG2-Protein mit spezifischen Inhibitoren

### 4.6.1 Hemmung der RRase-Aktivität mit Hydroxyharnstoff und *p*-Methoxyphenol

Für die Charakterisierung der kleinen Untereinheit CG2-Protein der RRase von *C. glutamicum* sollte die Wirkung verschiedener spezifischer Inhibitoren untersucht werden. Unter der Vermutung, daß es sich bei diesem Enzym ebenfalls um eine manganhaltige-RRase handelt, basierten die Untersuchungen auf dem Kenntnisstand des metallhaltigen CA2-Proteins der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes*. So ist zum Beispiel das organische gebundene Radikal des aktiven CA2-Proteins von *C. ammoniagenes* gegenüber den Radikalfänger Hydroxyharnstoff empfindlich. Die Inaktivierung durch Hydroxyharnstoff beruht auf dem Löschen dieses Radikales im CA2-Protein (GRIEPENBURG et al., 1996). Für die Charakterisierung der RRase aus *C. glutamicum* konnte bisher eine Ermittlung der RRase-Aktivität auf Wirksamkeit gegenüber Hydroxyharnstoff sowohl mit permeabilisierten Zellen im (Kap. 4. 1. 2) als auch mit dem angereicherten CG2-Protein durchgeführt werden. Dafür wurden 100 µg CG2-Protein aus den gepoolten Fraktionen (Nr. 15-19) der Gelfiltration mit Superdex G-200 mit steigenden Konzentrationen von Hydroxyharnstoff (1-5 mM) behandelt. Nach der Wirkung des Hemmstoffs auf das CG2-Protein wurde die fehlende große Untereinheit CG1-Protein aus den analytischen H.I.C Fraktionen (Nr. 25-26) zugegeben. Durch die Hemmung der RRase-Aktivität mit Radikalfänger (HU) beträgt der  $I_{50}$ -Wert von permeabilisierten Zellen 2,7 mM, von gereinigtem CG2-Protein 1,7 mM (Abb. 23). Das Enzym aus *C. glutamicum* verhält sich in seiner Empfindlichkeit gegenüber dem Radikalfänger (HU) wie die Mn-RRase aus *C. ammoniagenes*. Der primäre Angriffspunkt von HU auf diesem Enzym ist das organische Radikal, kann man ebenfalls vermuten, daß auch die RRase aus *C. glutamicum* ein organische Radikal enthält. Ein weiterer Inhibitor für die Charakterisierung der RRase aus *C. glutamicum* ist *p*-Methoxyphenol. Die Wirkung dieses Hemmstoffs auf das CG2-Protein ist in Abb. 24 dargestellt. Das Enzym wurde durch *p*-Methoxyphenol stark gehemmt, wobei der  $I_{50}$ -Wert 0,5 mM beträgt. Vergleicht man den  $I_{50}$ -Wert der Hemmung der RRase-Aktivität (CG2-Protein aus der Gelfiltration mit Superdex G-200) mit dem entsprechenden  $I_{50}$ -Wert der Hemmung der RRase-Aktivitätsaus den permeabilisierten Zellen (Kap. 4. 1. 2), so sieht man, daß das gereinigte CG2-Protein in seiner Empfindlichkeit gegenüber *p*-Methoxyphenol starker inhibiert. Daraus ergibt sich, daß *p*-Methoxyphenol ein starkes Potential für die Hemmung der RRase aus *C. glutamicum* besitzt.

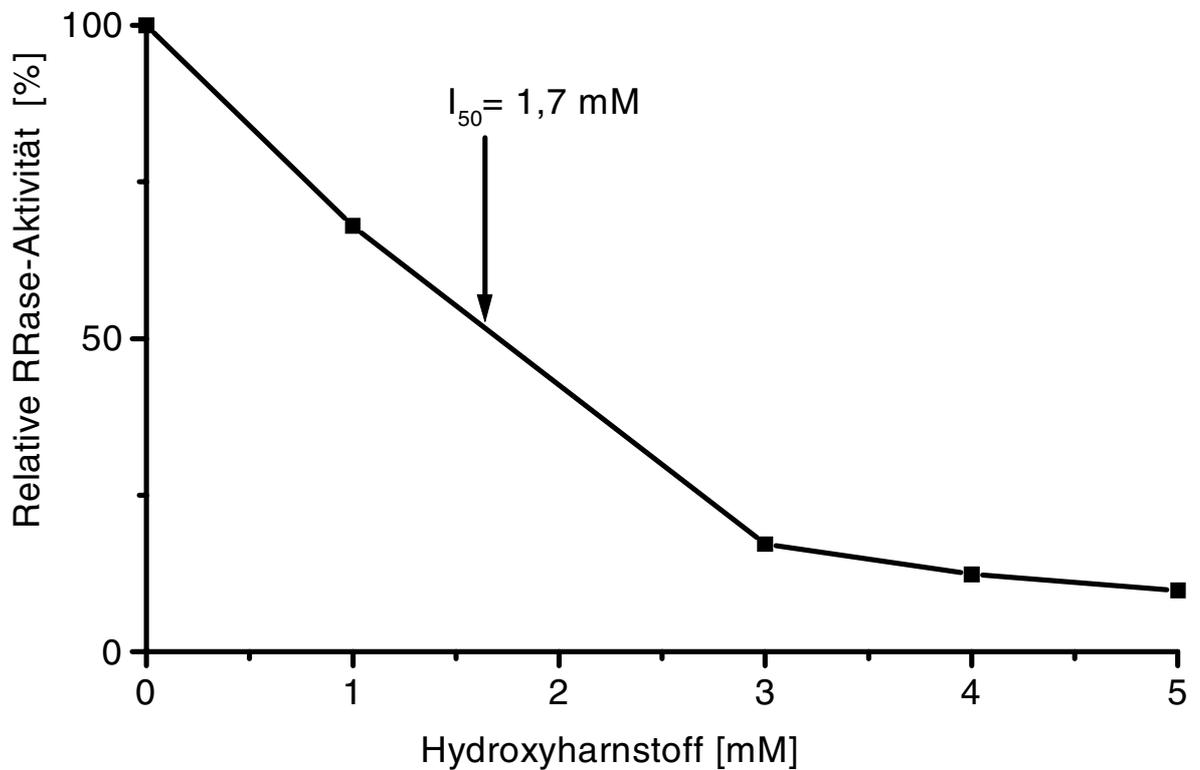


Abb. 23 Die Hemmung des über Gelfiltration mit Superdex G-200 angereicherten CG2-Proteins in Gegenwart steigender Konzentration von Hydroxyharnstoff (■—■). Test für 20 min bei 30°C mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 µCi) als Substrat. Das CG2-Protein wurde 10 min bei 0°C mit HU vorinkubiert, die RRase-Aktivität anschließend im Komplementationstest mit CG1-Protein (aus H.I.C) geprüft und die Ausgangsaktivität ohne Inhibitorzugabe als 100 % gesetzt.

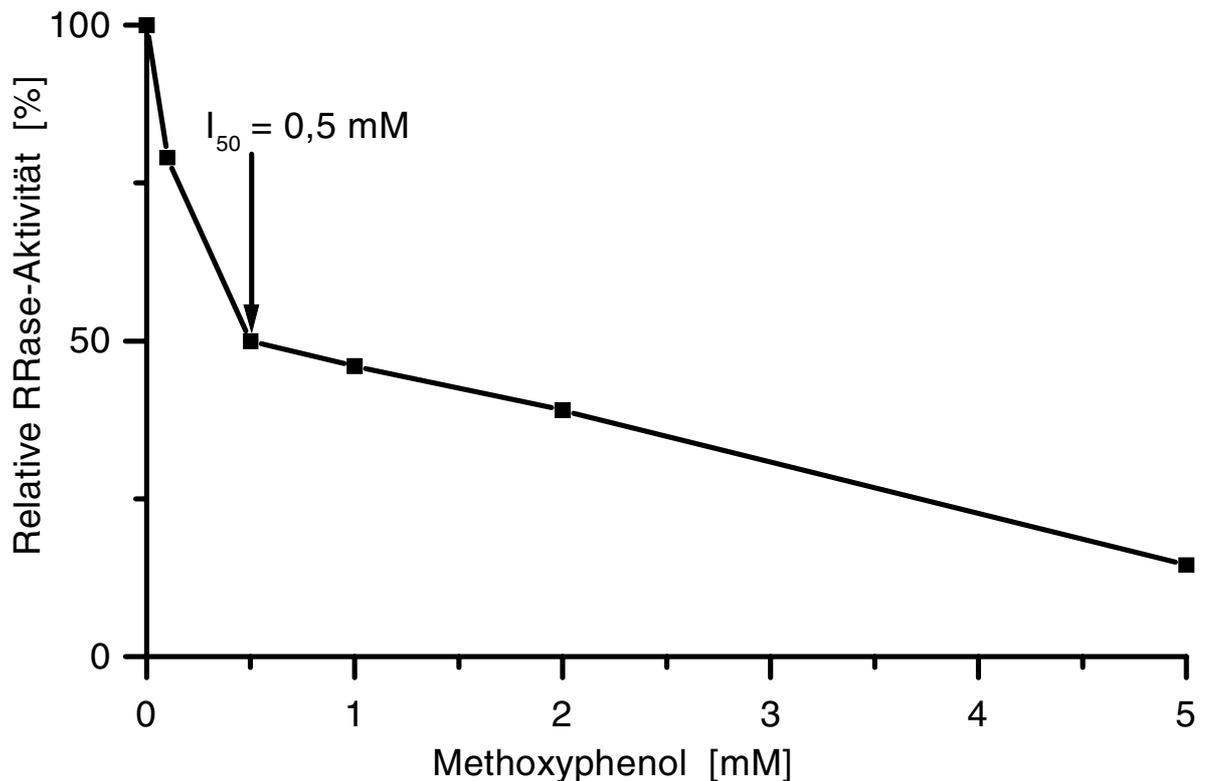


Abb.24: Die Hemmung des über Gelfiltration mit Superdex G-200 angereicherten CG2-Proteins in Gegenwart steigender Konzentration von *p*-Methoxyphenol (■—■). Test für 20 min bei 30°C mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 μCi) als Substrat. Das CG2-Protein wurde 10 min bei 0°C mit HU vorinkubiert, die RRase-Aktivität anschließend im Komplementationstest mit CG1-Protein (aus H.I.C) geprüft und die Ausgangsaktivität ohne Inhibitorzugabe als 100 % gesetzt.

#### 4. 6. 2 UV/vis-Spektroskopie

Die zuvor beobachtete Sensitivität des CG2-Proteins von *C. glutamicum* gegenüber dem Radikalfänger Hydroxyharnstoff deutet darauf hin, daß dieser ein stabiles organisches Radikal gelöscht. Diese Inaktivierung erlaubt die Anwendung weiterer Untersuchungsmethoden, zum Beispiel der UV/vis-Spektroskopie. So kann ermittelt werden, bei welchen Wellenlängen die Absorption des CG2-Proteins mit spezifischen Hemmstoffen gestört wird. Zusätzlich kann die UV/vis-Spektroskopie im langwelligen Bereich auch Hinweise zum Metallzentrum im CG2-Protein ergeben. Damit beruht der gezielte Einsatz dieser Methode auf der möglichen Störung

bestimmter Absorptionsmaxima oder Schultern, die möglicherweise dem organische Radikal oder dem Metall im CG2-Protein der hier untersuchten Ribonucleotid-Reduktase von *C. glutamicum* entsprechen. Für diese Untersuchungen wurden 3 mg/ml gereinigtes konzentriertes aktives CG2-Protein durch Gelfiltration mit Superdex G-200 auf die UV/vis-Spektroskopie aufgenommen. Für die Vermeidung von unspezifischen Absorptionbanden wurden die Spektren von dem enzymatisch inaktiven CG2-Protein durch 20 mM HU subtrahiert. Das Spektrum von dem nativen CG2-Protein ist zusammen mit dem Spektrum von HU-behandeltem CG2-Protein in (Abb. 25) dargestellt. Das Spektrum von dem nativen CG2-Protein zeigte deutlich eine dominante Absorptionbande bei 415 nm und eine Schulter um 435 nm. Nach der HU-Behandlung von dem nativen CG2-Protein hat sich die Intensität dieses dominanten Absorptionbande verstärkt während die Absorptionbande der Schulter verschwächt. Das Differenzspektrum des CG2-Proteins ist in (Abb. 26) dargestellt, wobei deutlich ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 435 nm zu sehen ist. Dieses Absorptionsmaximum zeigte eine Hinweis auf die Gegenwart eines organischen Radikal in der kleinen Untereinheit. Für die Ermittlung der Strukturähnlichkeit sollte das Differenzspektrum von *C. glutamicum* mit dem von GRIEPENBURG untersuchten Mn-RRase von *C. ammoniagenes* verglichen werden. Der Vergleich zwischen den beiden UV/Vis-Spektren der gereinigten RRase aus *C. glutamicum* mit der Mn-RRase *C. ammoniagenes* (OEHLMANN et al., 1998) zeigte eine sehr starke Ähnlichkeit.

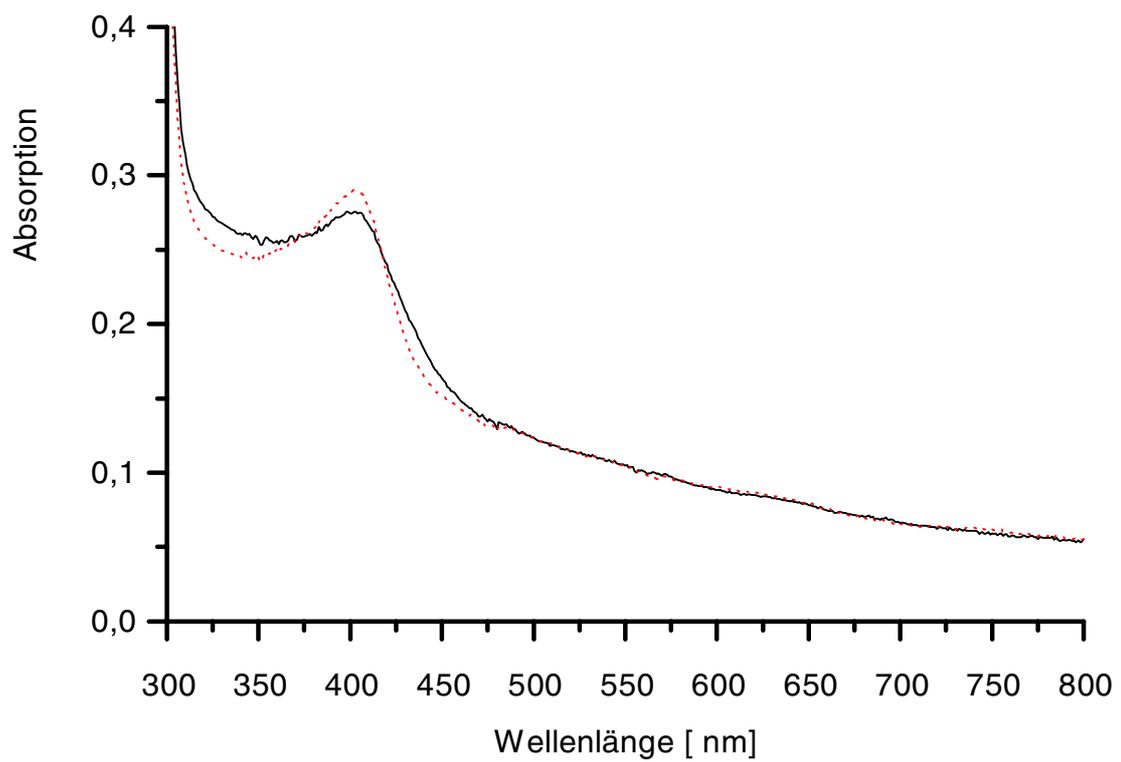


Abb. 25 UV/vis-Spektren von nativem (—) und mit HU-behandeltem (...) CG2-Protein (3 mg/mL) bei einer Temperatur von 8 °C.

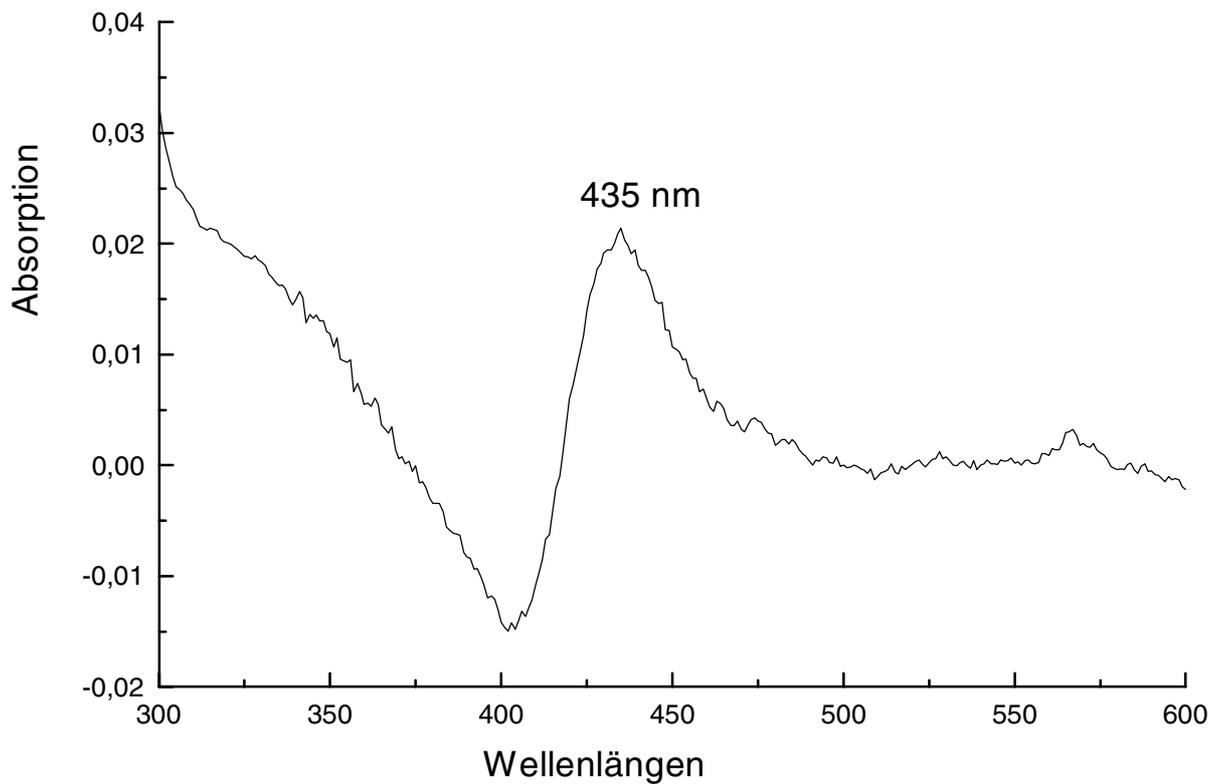


Abb. 26 UV/vis-Differenzspektrum des metallhaltigen CG2-Proteins (3 mg/mL) von *C. glutamicum* aus der Gelfiltration mit Superdex G-200. HU (20 mM) behandelte Probe substrahiert von dem nativen Protein.

#### 4. 6. 4 Analyse des Metallgehalts des CG2-Proteins

Um eine Idee über die Teilnahme der Metalle im den Reaktionsmechanismus der Ribonucleotid-Reduktion zu erhalten, verwendet man oft Chelatoren, durch die auch eine Zuordnung der Klassen der Ribonucleotid-Reduktase erfolgen kann. Mit der Vermutung, dass die Ribonucleotid-Reduktion von *C. glutamicum* durch ein Metall hervorruft wird, war die Ermittlung der Chelatisierung von der metallhaltigen-RRase notwendig. Eine Verwendung von chelatisierenden Agentien ist für eine Charakterisierung des Metallzentrums der RRase von *C. glutamicum* nützlich. Dafür konnte eine Ermittlung der RRase-Aktivität auf Wirksamkeit gegenüber chelatisierendem Agens EDTA durchgeführt werden. Die Wirkung dieses Hemmstoffs auf das CG2-Protein ist in (Abb. 27) dargestellt. Das Enzym wird durch chelatisierendem Agens (EDTA) stark gehemmt, wobei der  $I_{50}$ -Wert 2,4 mM beträgt. Die Empfindlichkeit der RRase gegenüber EDTA zeigt, dass die Ribonucleotid-Reduktion von

dem Metall abhängig ist. Um den Status der Ribonucleotid-Reduktase von *C. glutamicum* zu klären, eventuell weiter zu charakterisieren und die RRase als Klasse IV der Ribonucleotid-Reduktase zuzuordnen, war eine Analyse des Metallgehalts des CG2-Proteins notwendig. Dafür sollte eine quantitative Bestimmung des Mangangehalts der Ribonucleotid-Reduktase durchgeführt werden. Für die quantitative Analyse des Metallgehalts der Ribonucleotid-Reduktase stand die ICP-MS-Analyse zur Verfügung. Diese Methode bietet die Bestimmung der totalen vorhandenen Metalle im Protein. Auch für diese Analyse bietet sich die ICP-MS-Methode, da diese Elemente gleichzeitig in einem Meßdurchgang gemessen werden können. Für diese Messung wurden 100 µl angereicherte CG2-Protein aus den gepoolten Fraktionen (Nr. 15-19) der Gelfiltration mit Superdex G-200 für die ICP-MS-Analyse eingesetzt und parallel dazu der 85 mM Kp-Puffer, pH 6,6 mit 2 mM DTT als Leerwert verwendet. Eine entscheidende Bedingung für diese Berechnung ist, daß das metallhaltige CG2-Protein und die Leerwerte gleich aufgearbeitet werden, um die geringst mögliche Verfälschung durch die unterschiedliche Aufarbeitung von dem CG2-Protein und die Leerwerten zu vermeiden. Parallel zu der Analyse vom Mangangehalt des CG2-Proteins wurden auch andere wichtige Übergangsmetalle (Fe, Co, Ni, Cu) gemessen. Die Abbildung 28 zeigt, daß der Mangangehalt des CG2-Proteins in einer großen Menge (66,4 ng/mg Protein) vorkommt. Der Cu-Gehalt im CG2-Protein beträgt eine Menge (35,6 ng/mg Protein). Das CG2-Protein enthält eine sehr geringe Menge sowohl an Eisen-Gehalt als auch an Ni-Gehalt und betrug etwa (5ng/mg Protein).

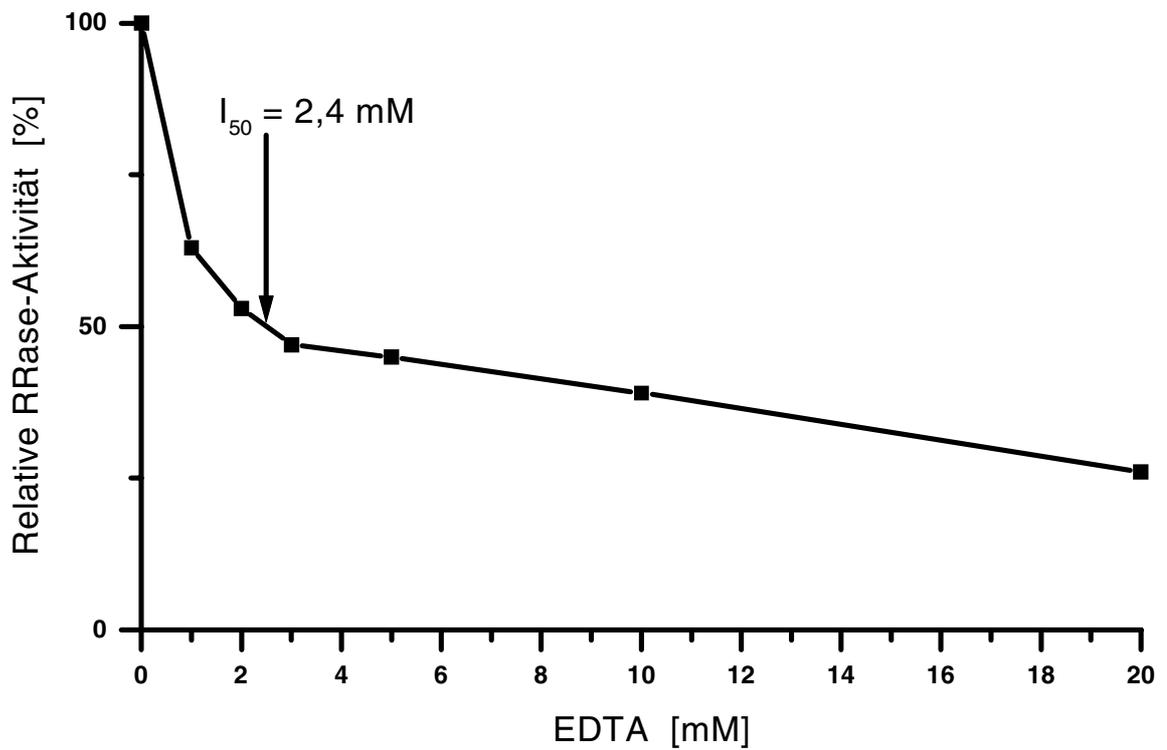


Abb.27: Die Hemmung des über Gelfiltration mit Superdex G-200 angereicherten CG2-Proteins in Gegenwart steigender Konzentration von EDTA (■—■). Test für 20 min bei 30°C mit [5-<sup>3</sup>H]-CDP (0,25 µCi) als Substrat. Das CG2-Protein wurde 10 min bei 0°C vorinkubiert, die RRase-Aktivität im Komplementationstest mit CG1-Protein (aus H.I.C) geprüft und die Ausgangsaktivität ohne Inhibitorzugabe als 100 % gesetzt.

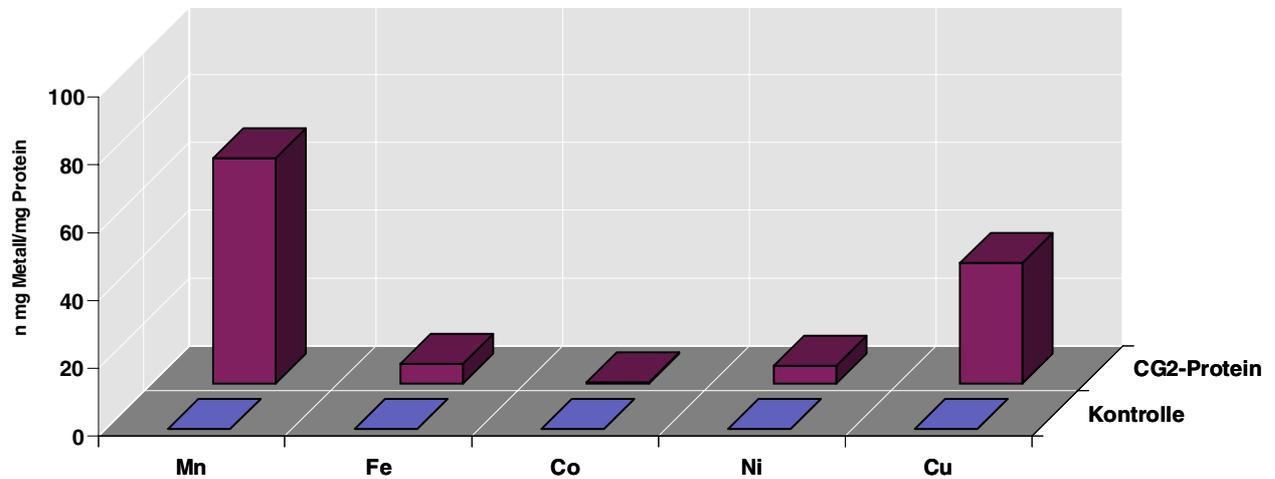


Abb. 28 ICP-MS-Analyse des metallhaltigen CG2-Proteins (3 mg/mL) von *C. glutamicum* aus Gelfiltration mit Superdex G-200. Der Metallgehalt ist in ng Metall/mg Protein angegeben.

#### 4. 6. 5 Die Hemmung der RRase-Aktivität mit C-terminalem Heptapeptid

Ein neues Prinzip der Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion wurde aufgrund der wissenschaftlichen Erkenntnis entwickelt, daß die C-terminale Region der kleinen Untereinheit der Klasse I RRasen entscheidend für die Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten ist. Dementsprechend wurden Peptide, die den C-terminalen Regionen entsprechen, synthetisiert und als neuartige kompetitive Inhibitoren der RRase-Aktivität eingesetzt (CLIMEMT & SJÖBERG, 1991, UHLIN & EKLUND, 1994; UHLIN & EKLUND, 1996). Nachdem durch die Klonierung der RRase-Gene von *C. glutamicum* die Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten (CG1- und CG2-Protein) verfügbar waren (OEHLMANN et al., 1998), ließ sich auch für das Enzym aus diesem coryneformen Bakterium ein spezifisches Peptid herstellen, das der C-terminalen Region der kleinen Untereinheit (CG2-Protein) entspricht. Das entsprechende Heptapeptid (E-D-D-D-W-D-F) wurde auf Wirksamkeit gegen die RRasen von *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* getestet. Die Wirkung von den steigenden Konzentrationen des Heptapeptids auf die Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten der

Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* ist in (Abb. 29) dargestellt. Die RRase-Aktivität wurde durch dieses Heptapeptid stark inhibiert, wobei der  $I_{50}$ -Wert 37  $\mu\text{M}$  beträgt. Eine Hemmung der RRase-Aktivität aus *C. ammoniagenes* durch steigenden Konzentrationen von Heptapeptid wurde ebenfalls durchgeführt, wobei in diesem Fall die Mn-RRase als Holoenzym eingesetzt wurde. Die Wirkung dieses Hemmstoffs auf die Mn-RRase konnte nur geringere Empfindlichkeit nachgewiesen werden, wobei der  $I_{50}$ -Wert 94  $\mu\text{M}$  beträgt (Abb. 30).

Vergleicht man den  $I_{50}$ -Wert für die gereinigten Untereinheiten der RRase aus *C. glutamicum* mit dem  $I_{50}$ -Wert für das Holoenzym aus *C. ammoniagenes* so sieht man, daß das Enzym aus *C. glutamicum* in seiner Empfindlichkeit gegenüber dem Heptapeptid starker beeinträchtigt, während die Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* schwach gehemmt. Aus diesen Versuch ergab sich, daß die Hemmung der RRase-Aktivität durch das Heptapeptid spezifisch für den Spezies ist, wobei durch den Einsatz von Heptapeptid die Bildung von dem Holoenzym gehemmt wird. Die Tat, daß das Heptapeptid an der C-terminalen Region der großen Untereinheit spezifisch bindet, eine Hemmung der RRase-Aktivität hervorruft, könnte es als Wirkort für die zukünftige Bekämpfung der pathogenen Mikroorganismen verwendet werden.

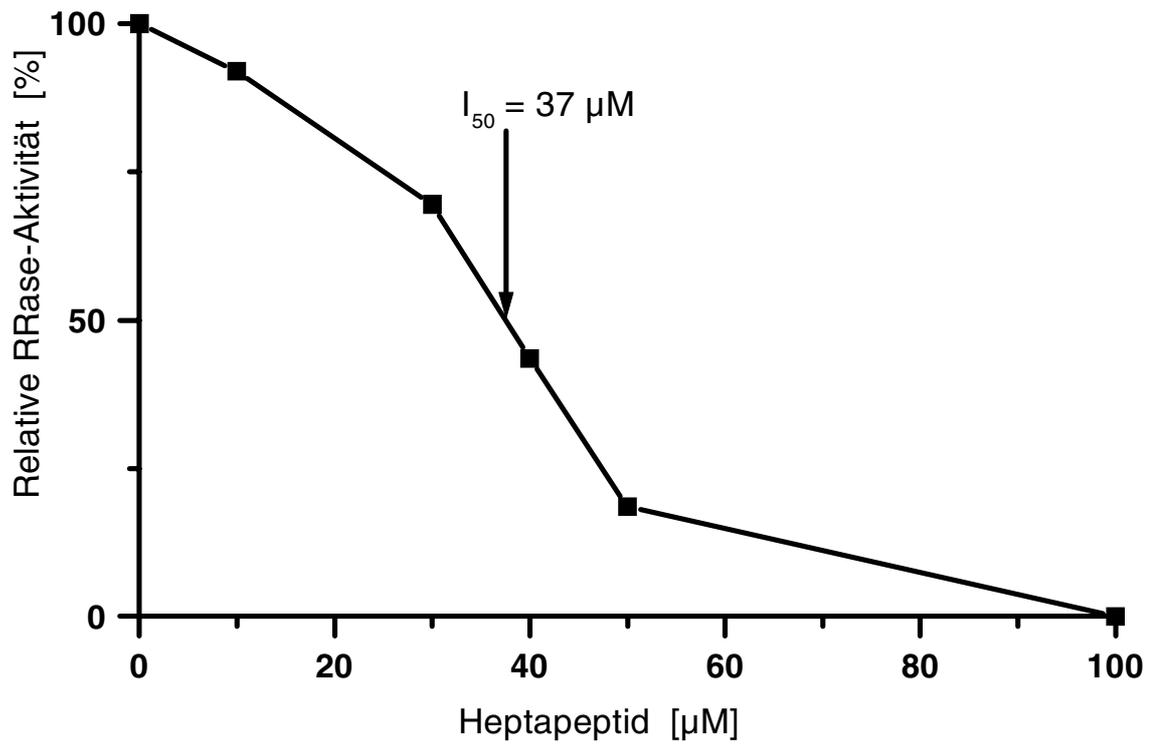


Abb.29: Die Hemmung der RRase von *C. glutamicum* (■—■) mit spezifischem Heptapeptid abgeleitet vom C-Terminus des CG2-Proteins. Die RRase-Aktivität wurde im Komplementationstest mit angereicherten Untereinheiten (CG2-Protein aus Gelfiltration, CG1-Protein aus H.I.C) in Gegenwart steigender Konzentrationen von Heptapeptid (10-100  $\mu\text{M}$ ) geprüft. Die Ausgangsaktivität ohne Heptapeptidzugabe wurde als 100 % gesetzt.

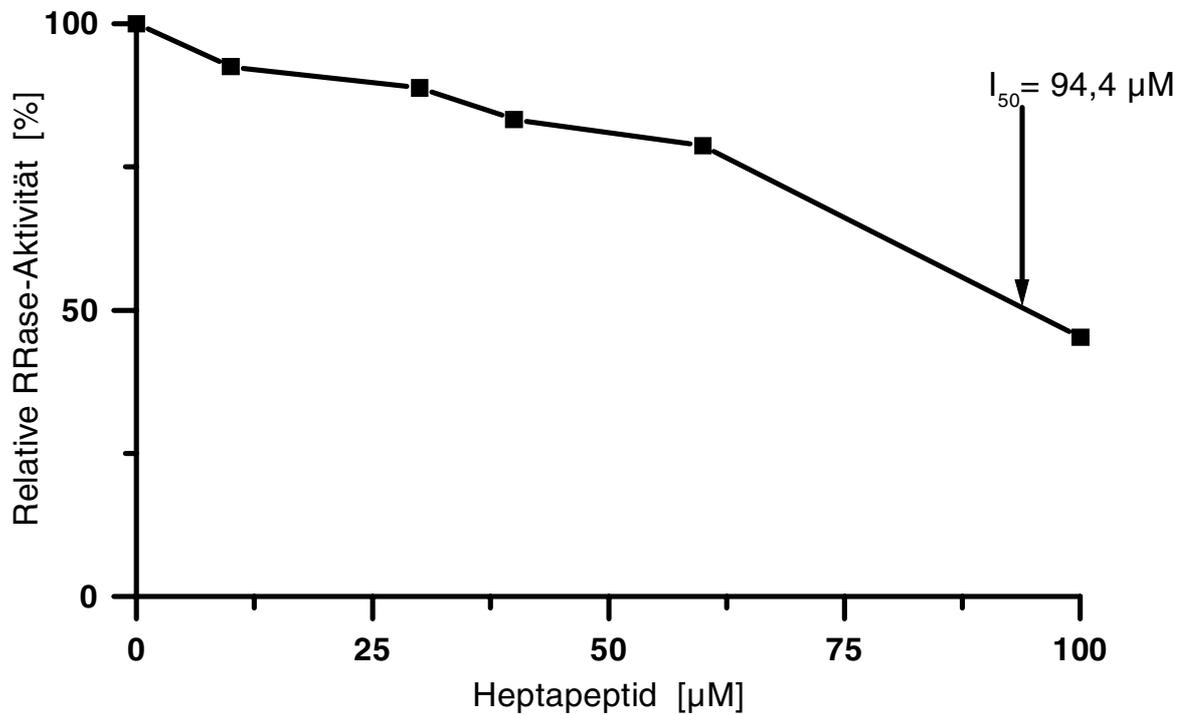


Abb. 30: Die Hemmung der RRase von *C. ammoniagenes* (■—■) mit spezifischem Heptapeptid abgeleitet vom C-Terminus des CG2-Proteins nach der Reinigung durch Gelfiltration mit Superdex G-200. Die RRase-Aktivität wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen von Heptapeptid (10-100 µM) geprüft. Die Ausgangsaktivität ohne Heptapeptidzugabe wurde als 100 % gesetzt.

## 5. Diskussion

Aus biochemischer Sicht stellen die Ribonucleotid-Reduktasen wegen ihrer komplexen Metallkatalyse und ihrer regulatorischen Schlüsselstellung im Zellteilungszyklus aller lebenden Organismen aus biologischer Sicht eine besondere Klasse von Enzymen dar, indem sie für einen konstanten Vorrat an Vorstufenverbindungen für die DNA-Synthese in den Zellen sorgen. Eine neue RRase-Typ wurde in *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* gefunden (JORDAN et al., 1994a, JORDAN et al., 1994b; JORDAN et al., 1996), wobei dieser Enzym-Typ mit den Enzyme der Klasse I eine starke Identität der Aminosäure Sequenz, die die hohe konservierte Aminosäuren für die Eisen-Ligand, Tyrosyl-Radikal und das aktive Zentrum Cystein enthält, auszeichnet. Schließlich wurde die RRase der Klasse I nach der Entdeckung der neuen Gen-Typen *nrdEF* dieses Enzyms und den neuen Weg für die allosterische Regulation der Aktivität in zwei Ia und Ib eingeteilt (JORDAN et al., 1996). Die Klasse Ia der RRase ist sowohl bei Eukaryoten, Viren als auch bei einigen Prokaryoten wie *E. coli* vorhanden, während die Klasse Ib bei verschiedenen Prokaryonten, welche wie *Salmonella Typhimurium* (JORDAN et al., 1994b) *Lactobacillus lactis* (JORDAN et al., 1996), *Mycoplasma genitalium* (FRASER et al., 1995), *Mycoplasma pneumonia* (HIMMELREICH et al., 1997) und *Mycobacterium tuberculosis* (YANG et al., 1994) gefunden wurden (JORDAN et al., 1994a; JORDAN et al., 1994b; GARRIGA et al., 1996; ELIASSON et al., 1996). Die homodimeren Untereinheiten (R1, R2) der Fe-RRase von der Klasse Ia wurden von den folgenden *nrdA* und *nrdB* Gene und die homodimeren Untereinheiten (R1E, R2E) der Klasse Ib von den *nrdE* und *nrdF* Gene codiert (JORDAN et al., 1996; ELIASSON et al., 1996). Die Klasse Ib der RRase unterscheidet sich von der Klasse Ia der Enzyme, indem die RRase-Aktivität durch die dATP nicht inhibiert wird, in der Tat, daß dATP die Reduktion des Substrats stimuliert (JORDAN et al., 1994b; ELIASSON et al., 1996). Durch die starke Identität der Aminosäure Sequenz zwischen der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* und der Fe-RRase der Klasse Ib, die ein zweikerniges Fe(III)-Zentrum in der metallhaltigen Untereinheit enthält (JORDAN et al., 1994b) und ebenfalls die gefundenen konservierten Aminosäuren der Eisenbindungsstellen der Fe-RRase (Klasse Ia, Ib) in der Mn-RRase (FIESCHI et al., 1998) wurde die RRase aus *C. ammoniagenes* für die Klasse Ib neue zugeordnet (FIESCHI et al., 1998). Die DNA-Synthese ist bei einige Gram-positiven Bakterien durch die Mangan beeinflusst (WEBLEY et al., 1960; WEBLEY et al., 1962, SCHIMPF-WEILAND et al., 1981; PLÖNZIG & AULING, 1987; LAMMERS &

FOLLMANN, 1983; WILLING et al., 1988). Die Verwandtschaft zwischen *Mycobacterium* und *Corynebacterium* und andere Mykolsäure Bakterien (siehe Einleitung) lässt uns erwarten, daß die DNA-Synthese dieser Bakteriengruppe ebenfalls durch die Mangan beeinflusst. Die homodimeren Untereinheiten (R1E, R2E) der RRase von *Mycobacterium tuberculosis* wurden von den *nrdE* und *nrdF* Gene codiert (YANG et al., 1997) und ebenfalls die DNA-Synthese in *Bacillus subtilis* erfolgt durch die Manganversorgung (MOHAMMED et al., 1998). Dadurch hat sich die Erwartung ergeben, daß die RRasen der Klasse Ib eine Mangan in der metallhaltigen Untereinheit enthalten. Die biochemisch untersuchten Ribonucleotid-Reduktasen der Klasse Ib →IV (Mn) zeichnen sich als eigne Klasse aus, der bisher nur das Mangan Cluster in der kleinen Untereinheit, die analog zum *E. coli* der Klasse I Enzym ein zweikerniges Fe(III)-Cofaktor vorhanden ist (WILLING et al., 1988; GRIEPENBURG et al., 1996; MOHAMMED et al., 1998; STUBBE & VAN DER DONK, 1995; STUBBE et al., 1998, SCOTTI et al., 1996). Für die Zuordnung der RRase aus *C. glutamicum* wird vergleichend die Mn-RRase mit der Fe-RRase aus *E. coli* (Klasse Ia) diskutiert, indem man sich nur auf das metallhaltige-Protein dieses Enzyms konzentriert.

Tab. 8: Die unterschiedlichen Klassen der Ribonucleotid-Reduktasen und ihre Gene, ihre Funktion.

| RRase-Typ | Klasse        | Gene                       | Untereinheiten | Funktion der Genprodukte   |
|-----------|---------------|----------------------------|----------------|--|
| Fe-RRase  | Ia            | <i>nrdA</i><br><i>nrdB</i> | R1<br>R2       | Ribonucleotid-Reduktase in <i>Enterobacteriaceae</i> (CARLSON et al., 1984; JORDAN et al. 1994a), in Eukaryoten z.B. <i>H. sapiens</i> (PARKER et al., 1991 <i>M. musculus</i> (CARAS et al. 1984, CARAS et al. 1983), <i>A. thaliana</i> (PHILIPPS et al., 1995) und deren Viren.               |
| Fe?       | Ib→IV<br>(Mn) | <i>nrdE</i><br><i>nrdF</i> | R1E<br>R2F     | Ribonucleotid-Reduktase in <i>M. tuberculosis</i> (YANG et al., 1997) und <i>B. subtilis</i> (SCOTTI et al., 1996); keine RRase-Aktivität in <i>Enterobacteriaceae</i> nachgewiesen (JORDAN et al., 1994b) <i>C. ammoniagenes</i> und <i>C. glutamicum</i> (OEHLMANN et al., 1998, diese Arbeit) |

Unter geeigneten Anzuchtbedingungen mußten zuerst ausreichender Mengen der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* mit hoher Aktivität bereitgestellt werden. Nach der Ermittlung der RRase-Aktivität in Abhängigkeit von dem Wachstumsverlauf (Kapitel 4. 2) müssen die wachsenden Zellen für die zukünftigen Anzucht in den optimalen Zeitpunkt geerntet werden. In der Diplomarbeit von JENS HANSEN (1994) konnte die RRase-Aktivität in Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten dargestellt werden. Die Zellen von *C. ammoniagenes* sind ebenfalls in der spätlogarithmischen Phase für die Gewinnung einer ausreichenden Biomasse mit höherer RRase-Aktivität geeignet. Schließlich stellt sich heraus, daß Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* ein Peak-Enzym ist. Aus dem Vergleich des Wachstumsverhaltens von *C. glutamicum* mit *C. ammoniagenes* hat sich diese Frage ergeben, ob während des Wachstums von *C. glutamicum* eine Korrelation zwischen dem Wachstum und

der RRase-Aktivität nachgewiesen werden kann. In wachsenden Zellen von *C. glutamicum* konnte ein Peak Anstieg der RRase-Aktivität in der spätlogarithmischen Phase ermittelt werden (Kap. 4. 2). Die Kontinuität des Zellzyklus beruht darauf, daß immer genügend DNA in der Zellen vorhanden ist. Darüber hinaus müssen die notwendigen Deoxyribonucleotiden für die DNA-Synthese zur Verfügung stehen. Weil die Zellen besitzen keine Vorrat, aus dem sie bei dem Bedarf liefern können sondern die Deoxyribonucleotiden wurden nur bei dem Bedarf synthetisiert. Eine andere beteiligte Enzymen für die Zellproliferation solche wie Tymidin Kinase, Tymidylate Synthetase (LITTLEFIELD, 1966), Topoisomerase II (HECK et al., 1988) sind in der exponentiellen Phase sehr aktiv. Der Peak Anstieg ist eine Folge einer *de novo*-Proteinsynthese der Enzyme, die entweder auf der Ebene der Transkription oder der Translation reguliert sein kann. Die Rücknahme der RRase-Aktivität nach Ende der exponentiellen Phase erfolgt durch die Inhibierung und katabolen Abbau. Das R1-Protein der Ribonucleotid-Reduktase aus Maus ist in der proliferierenden Zellen nachweisbar (ENGSTRÖM et al., 1984, MANN et al., 1991, LOWDON et al., 1973), wobei ihre Menge während der unterschiedlichen Wachstumsphasen konstant bleibt. Die Aktivität des Holoenzym wird bei *de novo*-Proteinsynthese in der exponentiellen Wachstumsphase und später durch die Inaktivierung der kleinen Untereinheit R2-Protein reguliert (ERIKSSON et al., 1984; ENGSTRÖM et al., 1985). Die konstante Menge von der großen Untereinheit R1-Protein in wachsenden Zellen während der unterschiedlichen Wachstumsphasen bezieht sich darauf, daß die Halbwertszeit der großen Untereinheit R1-Protein über 24 Stunden dauert (MANN et al., 1988; Björklund et al., 1993; Björklund et al., 1990), während der kleinen Untereinheit R2-Protein nur 3 Stunden betrug (ERIKSSON et al., 1984). Die konstante Menge an der Deoxyribonucleotid-Pool für die Replikation der Zellen zeigte eine strenge Regulation der Ribonucleotid-Reduktase während der Zellteilung (LAMMERS & FOLLMANN, 1983; THELANDER & REICHARD, 1979). Die RRase-Aktivität von *C. glutamicum* wies ein ähnliches Verhalten im Vergleich zu *C. ammoniagenes* auf, wobei sich schon bei dem Anzucht der Zellen die unmittelbare Erwartung ergibt, daß es sich ebenfalls bei *C. glutamicum* um ein Mangan-Enzym handelt. Ribonucleotid-Reduktase stellt eine schwierige Handhabung dar. Aufgrund ihres Vorkommens in geringerer Konzentration in der Zellen, ihrer Enzymaktivität und der auftretenden Schwierigkeiten der Anreicherung und die leichte Dissoziierbarkeit dieses Enzyms war von Anfang an notwendig eine ausreichende Biomasse mit hoher Enzymaktivität zur Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* zu gewinnen. Anhand des ähnlichen Verhaltens der Ribonucleotid-Reduktion zwischen

*C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* wurde mit den bisherigen Kenntnissen über den Testbedingungen von *C. ammoniagenes* für den Enzymtest der RRase aus *C. glutamicum* verwendet. Bisher konnte von WALTER (1996) ein Enzymtest für die RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* mit dem Roheextrakt, mit dem partiell gereinigten Proteinmaterial nach der Ammoniumsulfat-Fällung, Gelfiltration mit Superose<sup>TM</sup>12 und analytische H.I.C durchgeführt werden. Mit der Annahme, daß die Zellen von *C. glutamicum* ebenfalls erfolgreicher wie *C. ammoniagenes* permeabilisiert werden kann, ermöglicht eine Messung der RRase-Aktivität *in situ* und vermeidet dabei auch noch eine RRase-Inaktivierung durch die Aufreinigungsvorgänge. Neben der einfachen Durchführung des Enzymtests mit den permeabilisierten Zellen ergibt sich parallel ein aufwendige Zeitsparen. Dadurch wurde ein Screening der zahlreichen isolierten thermosensitiven Mutanten aus *C. glutamicum* erleichtert. So daß man auf den Zellaufschluß und die partielle Aufreinigung der Ribonucleotid-Reduktase verzichten kann. Der Enzymtest der RRase-Aktivität wurde bei der neuen untersuchten Stamm *C. glutamicum* nur auf die Temperatur für die Charakterisierung der thermosensitiven Mutanten optimiert während die anderen Testbedingungen (pH, Temperatur, Substratkonzentration, und die allosterischen Effektoren) nicht untersucht wurden. Gelungen war nach Screening und dem Prüfen von den verdächtigen Klonen aus *C. glutamicum* auf die Thermosensitivität eine Gewinnung von zwei thermosensitiven Mutanten ODA5, ODA8. Die thermosensitiven Mutanten ODA5, ODA8 können Defekte in der DNA-Replikation, in der Ribonucleotid-Reduktase enthalten. Aus diesen Gründen war es notwendig die isolierten thermosensitiven Mutanten ODA5, ODA8 weiter zu untersuchen. Die bisherigen Bemühungen für die Gewinnung von den thermosensitiven Mutanten, die ein Defekt im Ribonucleotid-Reduktase Strukturgen haben, um die Gene der Ribonucleotid-Reduktase von *C. glutamicum* klonieren zu können, wurden parallel zu dieser Arbeit die Gene der Ribonucleotid-Reduktase von OEHLMANN (1998) gesucht. Seit der Zeit, in der die Sequenzen der Gene der Ribonucleotid-Reduktase sowohl von *C. ammoniagenes* als auch *C. glutamicum* gefunden wurden, wurden die zwei isolierten thermosensitiven Mutanten ODA5, ODA8 sowohl für die Suche nach den Sequenzen von den Genen der Ribonucleotid-Reduktase nicht weiter verwendet.

Am Anfang dieser Untersuchungen standen keine Informationen über die biochemischen Charakterisierung dieses Enzyms zur Verfügung. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *C. glutamicum* mit *C. ammoniagenes* waren die Experimenten mit dem neuen Stamm nach der

biochemischen Arbeit mit der manganhaltigen-RRase aus *C. ammoniagenes* angeknüpft (WILLING et al., 1988). Der Schlüsselpunkt für den Aufbau dieser Arbeit war die Annahme, daß es sich bei *C. glutamicum* ebenfalls um eine Mn-RRase handelt. Weil die Reduktion der Ribonucleotiden zu den Deoxyribonucleotiden von dem Metallgehalt, organischen Radikal bei der Fe-RRase und Mn-RRase abhängig ist, ist der intakte Zustand des organischen Radikals notwendig für die Reaktion. Die Stabilität des Tyrosyl-Radikals in der NrdD-Untereinheit der RRase der aeroben Fe-RRase aus *E. coli* dauert über mehrere Tage, während die Halbwertszeit des stabilen freien Radikales im CA2-Protein aus *C. ammoniagenes* nur 1,5 Stunden betrug (ATTKIN et al., 1973; GRIEPENBURG (1998). Die Diskussion dieser Arbeit wird einen Vergleich der Ergebnissen des neuen untersuchten Stamm *C. glutamicum* mit den publicierten Ergebnissen aus den Arbeiten von A. Willing (1988), K. BLASCZYK (1994) und U. GRIEPENBURG (1998) und die Hemmung der RRase-Aktivität durch das synthetisierte Heptapeptid aufgebaut. Verschiedene Reinigungsvorgänge wurden für die Gewinnung von ausreichend Menge an der aktiven metallhaltigen-Untereinheit der RRase aus *C. glutamicum* verwendet. Die Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* stellte ein ernsthaftes Problem dar, weil die RRase-Untereinheiten einerseits leicht dissoziiertbar sind und andererseits separat keine Aktivität nachweisen können. Für die Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase sind verschiedenen Wege vorgenommen worden. Die erste Möglichkeit ist, die Untereinheiten in der Frühreinigung voneinander getrennt und anschließend Separat weiter gereinigt werden. Die zweite Möglichkeit ist, die Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase gemeinsam in einer Fraktion eluiert werden. Vor der Reinigung der Ribonucleotid-Reduktasen müssen viele Faktoren berücksichtigt werden. Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* ist temperaturempfindlich, dadurch ist zu empfehlen, daß die ganzen Reinigungsvorgänge bei einer niedrigen Temperatur durchgeführt werden müssen, damit die RRase-Aktivität nicht verloren geht. Die Durchführung der Reinigung von der Ribonucleotid-Reduktase aus dem näherverwandten Stamm *C. ammoniagenes* durch 2', 5'ADP Sepharose hat über mehreren Stunden gedauert und von daher war die Suche nach einer neuen alternativen Methode notwendig, um sowohl für die Gefahr der Inaktivierung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* zu minimisieren als auch die Zeit zu sparen. Mit den Zielen, mehrere Reinigungsvorgänge in kurzer Zeit zu schaffen und gleichzeitig das organische Radikal in seinem intakten Zustand zu halten, damit die RRase-Aktivität nicht verloren geht, wurde eine Reinigung der Ribonucleotid-Reduktase direkt aus der ersten Anreicherung (40-60 %ige Ammoniumsulfat-Fällung) über die analytische H.I.C versucht. Die RRase-Untereinheiten aus

*C. glutamicum* wurden nach der Reinigung durch die analytische H.I.C separat eluiert, indem sie allein keine Aktivität aufweisen können. Für den Nachweis der RRase-Aktivität müssen die Untereinheit der RRase miteinander komplementiert werden. Ein Vorteil der nahen Verwandtschaft zwischen *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* ist, daß die RRase-Untereinheiten sich auch im heterologen System komplementieren lassen, wobei eine Bildung der funktionellen Hybrid-RRase sowohl aus CG2 und CA1 als auch CG1 und CA2 früher von WALTER (1996) nachgewiesen werden konnte. Das CG2-Protein wurde nach dem Komplementationstest der einzelnen Fraktionen aus der H.I.C mit dem heterologen CA1-Protein gefunden und das CG1-Protein nach dem Komplementationstest mit dem gefundenen homologen CG2-Protein ermittelt. Bis dieser Zeitpunkt war die analytische H.I.C die einzige erfolgreiche Methode für die Anreicherung der RRase aus *C. glutamicum*. Das eluierten CG2-Protein der RRase aus *C. glutamicum* aus der analytischen H.I.C-Säule wurde mit Ammoniumsulfat beladen (siehe Kapitel 4. 3. 1) und die direkte Konzentrierung des gereinigten CG2-Proteins aus H.I.C ohne Dialyse in der GenVac verursacht eine Hemmung der RRase-Aktivität. Die RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* ist gegenüber Ionenstärke-schwankungen des Kaliumphosphatpuffers sehr empfindlich. Die Einstellung des Kaliumphosphatpuffers erfolgte durch eine Dialyse, jedoch die 2 stündige Dialyse des CG2-Proteins für die Entfernung von dem Kaliumphosphat nicht ausreichend ist und ein Verlust an der RRase-Aktivität hervorruft. Eine zeitsparende Methode für die Entzaltung des CG2-Proteins aus der H.I.C konnte die Verwendung von HITrap<sup>TM</sup>-Säulen sein, bei der die Entzaltung innerhalb weniger Minuten erfolgt. RRase wurde durch die analytische H.I.C nur in einer geringeren Menge angereichert und für die metallhaltige-Analyse der Ribonucleotid-Reduktase wurde eine ausreichende Menge vom Protein benötigt. Bisher ist die Reinigung der RRase durch die Gelfiltration mit superdex G-200 trotz des Zerfalles der RRase das einzige Anreicherungsmittel, das die Gewinnung einer großen Menge der metallhaltigen-Untereinheit erleichtert, wobei das metallhaltige CG2-Protein bei den Fraktionen (Nr. 15-19) stark angereichert wird. Die Gelfiltration mit Superdex G-200 favorisiert eine hohe Reproduzierbarkeit mit guter Anreicherung (siehe Tab. 5) des CG2-Proteins der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum*.

Die Hemmung der gereinigten RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* mittels den eingesetzten Inhibitoren, eignet sich für die Klassifizierung der RRase z. B. werden die eisenhaltige RRase aus *E. coli* (THELANDER & REICHARD, 1979; Fuchs et al., 1972), die manganhaltige

RRase in *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* durch den Radikalfänger (HU) stark gehemmt (AULING et al., 1980; WILLING et al., 1988a, LUO et al., 1997; GRIEPENBURG (1998), während die B<sub>12</sub>-abhängigen RRasen gegenüber dem Radikalfänger (HU) unempfindlich sind (LAMMERS & FOLLMANN, 1983). Ribonucleotid-Reduktasen benötigen für ihre vollständige Funktion einerseits ein intaktes Radikal, andererseits ein Metallzentrum, wobei teilweiser oder vollständiger Verlust an einer der beiden zur Inaktivierung der RRase-Aktivität führt. Aus der dreidimensionalen Struktur des R2-Proteins aus *E. coli* läßt sich ermitteln einerseits der Zustand des R2-Proteins ohne das organische Radikal (MetR2-Protein) (NORDLUND et al., 1990; NORDLUND & EKLUND, 1993) andererseits die Gegenwart des organischen Tyrosyl-Radikals in der Tiefe der metallhaltigen-Untereinheit 10 Å gezeit (NORDLUND et al., 1990; NORDLUND & Eklund, 1993) und die Distanz zwischen dem Tyrosyl-Radikal (Tyr<sup>122</sup>) und dem Eisen-Atom beträgt etwa 0,5 nm (ELLEINGAND et al., 1998). Ein wichtiger Parameter für die stabile Haltung des Radikals ist die Hydrophobizität der Umgebung, die einen Schutz des stabilen freien Radikals gegenüber fremden Angriffen baut. Die Struktur der separaten RRase-Untereinheiten wurde kristallisiert, während der bewegliche Arm, der die Untereinheiten der RRase miteinander verbunden, ist abwesend, deswegen wurde ein Modell der R1-R2 Interaktion postuliert, wobei die Distanz zwischen dem aktiven Zentrum der großen Untereinheit R1 und die Trp<sub>48</sub> der kleinen Untereinheit etwa 25 Å beträgt (UHLIN & EKLUND, 1994). Die RRase-Struktur ermöglicht die Bestimmung der spezifischen Radikaltransfer zwischen dem Tyrosyl-Radikal der kleinen Untereinheit und dem aktiven Zentrum der großen Untereinheit R1-Protein (NORDLUND et al., 1990; CLIMENT & SJÖBERG, 1992; NORDLUND & EKLUND, 1993; UHLIN & EKLUND, 1994; SJÖBERG, 1994; ROVA et al., 1995; EKBERG et al., 1996), wobei der Elektrontransfer zwischen dem Tyrosyl-Radikal (Tyr<sub>122</sub>) der kleinen Untereinheit über das Eisenzentrum und seine Ligande, die konservierten beteiligten Aminosäure Asp<sub>237</sub>, Trp<sub>48</sub>, Tyr<sub>356</sub> der kleinen Untereinheit mit dem folgenden Aminosäure der großen Untereinheit R1-Protein Tyr<sub>731</sub>, Tyr<sub>730</sub>, anschließend zum Cys<sub>439</sub> und Substrat erfolgt. In den aktiven Enzyme ist die Aminosäure Tyrosin in der Wirklichkeit ein Tyrosyl- Radikal, das durch verschiedene spektroskopischen Untersuchungen und die "Site-directed mutagenesis" gezeigt wurde (LARSSON & Sjöberg, 1986; SJÖBERG et al., 1978). Das Tyrosyl-Radikal dient zur Herstellung von katalytischen essentiellen Cysteinyl Radikal in der großen Untereinheit R1-Protein durch "long range electron transfer". Eine Reduktion der Ribonucleotide benötigt eine Oxidation des organischen Radikals, daß es sich durch "long-Range electron transfer" von der

metallhaltigen-Untereinheit zur katalytischen-Untereinheit übertragen wird. Hydroxyharnstoff ist der Radikalfänger und ein sehr effektiver Inhibitor für die Hemmung des Radikals der metallhaltigen-Untereinheit der RRase und eignet sich für die Blockade der DNA-Synthese in viele Organismen (LAMMERS & FOLLMANN, 1983). Eine Ermittlung einer Gegenwart eines stabilen freien organischen Radikals in der metallhaltigen Untereinheit der RRase aus *C. glutamicum* konnte durch die Wirkung des spezifischen Radikalfängers Hydroxyharnstoff (HU) auf die Enzymextrakte der RRase aus der Ammoniumsulfat-Fällung (40-60 % Sättigung-  $I_{50}$ -Wert 2,7 mM) und das angereicherte CG2-Protein mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 (Kap. 4. 6. 1) ( $I_{50}$ -Wert 1,7 mM) nachgewiesen werden, indem sich eine Reduktion des Radikals ereignet und zur Folge eine Inaktivierung der RRase-Aktivität. Die Betrachtung des radikalhaltigen-Proteins ist auf die Ladung und die Hydrophobizität des Radikalfängers angewiesen (GEREZ et al., 1997), wobei das organische Radikal stärker durch die positiv geladene Radikalfänger (HU) beeinträchtigt wird. Ein weitere Radikalfängern Derivate der *p*-Alkoxyphenole wurden für die Charakterisierung der metallhaltigen Untereinheit der RRase aus *C. glutamicum* verwendet, sie eignen sich als wichtige Inhibitoren für die Chemotherapie zur Behandlung von Melanomen (PÖTSCH et al., 1994), wobei diese Wirkstoffe sehr stark auf das R2-Protein der Ribonucleotid-Reduktase sowohl aus Säugerzellen als auch *E. coli* wirkt (RILEY, 1984; BELCHER et al., 1992; RUSTIN et al., 1992). Die Löschung des organischen Radikals benötigt einen Elektrontransfer von einem reduzierten Inhibitor zum Tyrosyl-Radikal (Tyr<sup>122</sup>) in der kleinen Untereinheit R2-Protein (NORDLUND et al., 1990). Die Teilnahme des organischen Radikals der metallhaltigen Untereinheit an der Ribonucleotid-Reduktion in *C. glutamicum* konnte ebenfalls durch die Wirkung des *p*-Methoxyphenols sowohl auf die Enzymextrakte der RRase aus der Ammoniumsulfat-Fällung (40-60 % Sättigung-  $I_{50}$ -Wert 2,2 mM) als auch das angereicherte CG2-Protein mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 (Kap. 4. 6. 1) ( $I_{50}$ -Wert 0,5 mM) nachgewiesen werden. Die starke Hemmung der RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* durch die zunehmenden Konzentrationen vom hydrophobem Inhibitor *p*-Methoxyphenol zeigte die Dominanz des Radikalslöschens in dem molekularen Mechanismus der Inhibition für die Inaktivierung der RRase-Aktivität. Das chelatisierende Agens (EDTA) ist weder ein spezifischer noch effektiver Inhibitor für die Hemmung der RRase-Aktivität. Dieser Wirkstoff eignet sich für die Destabilisierung des Holoenzym durch die Entfernung von Metallionen. Die Gegenwart des Metalls in der kleinen Untereinheit der RRase aus *C. glutamicum* konnte durch die Wirkung von chelatisierendem Agens (EDTA) auf die Enzymextrakte der RRase

aus der Ammoniumsulfat-Fällung (40-60 % Sättigung-  $I_{50}$ -Wert 2,4 mM) und das angereicherte CG2-Protein mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 ermittelt werden. Eine Chelatisierung der Mn-RRase von *C. ammoniagenes* konnte früher durch das chelatisierende Agenz (EDTA) nachgewiesen werden (WILLING et al., 1988), wobei der  $I_{50}$ -Wert 10 mM beträgt. Die Hemmung der RRase-Aktivität beruht darauf, daß das Metall aus dem Protein entfernt wird (WILLING et al., 1988). Der schwache Einfluß des chelatisierenden Agenz (EDTA) auf Mn-RRase-Aktivität aus *C. ammoniagenes* erschwert die Herstellung von dem Apo-Protein, das für die Metallgehaltsanalyse notwendig war. Während die starke Empfindlichkeit der RRase von *C. glutamicum* erleichtert die Metallgehaltsanalyse dieses Enzym. Nach der Untersuchung der RRase-Aktivitätshemmung aus *C. glutamicum* durch verschiedenen Inhibitoren sollen die Halbhemmkonzentrationen ( $=I_{50}$ -Wert) mit dem ( $=I_{50}$ -Wert) des verwandten Stamm *C. ammoniagenes* verglichen werden. Die Hemmversuche der RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* sind mit dem angereicherten Proteinmaterial aus der Gelfiltration mit Superdex G-200 durchgeführt worden. Es konnte nachgewiesen werden, daß ein freies organisches Radikal, das unabhängig vom Metallzentrum im Protein gebunden ist, in der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* (GRIEPENBURG et al., 1996; WILLING et al., 1988; LUO et al., 1998). Bisher ist die biochemische Charakterisierung der metallhaltigen-RRase aus *C. glutamicum* nicht vorliegend, ein Vergleich der RRase-Aktivitätshemmung durch das chelatisierende Agenz EDTA zwischen *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* läßt sich feststellen, daß die RRase aus *C. glutamicum* stark empfindlich gegenüber EDTA, wobei der  $I_{50}$ -Werte bei 2,4 mM liegt (Kap. 4. 6. 2). Während RRase aus dem verwandten Stamm *C. ammoniagenes* zeigte eine geringe Sensitivität von EDTA 10 mM (WILLING; 1988). Daraus konnte die Vermutung erstellt werden, daß das Metall in *C. glutamicum* eine nicht so starke Bindungsstelle im Vergleich zu *C. ammoniagenes* aufwies und dadurch könnte das Metall durch EDTA aus dem Protein leichter entfernt und ein Apo-Protein leichter hergestellt werden.

Tab. 9: Vergleich der RRase-Aktivitätshemmung von *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* durch verschiedene Inhibitoren

| Inhibitoren             | I <sub>50</sub> -Wert der RRase aus <i>C. glutamicum</i> | I <sub>50</sub> -Wert der RRase aus <i>C. ammoniagenes</i> |
|-------------------------|--|--|
| Hydroxyharnstoff        | 1,7 mM → diese Arbeit                                    | 2,5 mM (Willing et al., 1988)                              |
| <i>p</i> -Methoxyphenol | 0,5 mM → diese Arbeit                                    | 5,3 mM (GRIEPENBURG et al., 1996)                          |
| EDTA                    | 2,4 mM → diese Arbeit                                    | 10,0 mM (Willing et al., 1988)                             |

Bei Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* und *C. glutamicum* handelt es sich um eine eigne Klasse von Enzymen, die sich von den anderen Klassen unterscheidet. Sowohl die Mn-RRase als auch die Fe-RRase einigen sich in den konservierten Domänen der katalytischen Untereinheit. Andererseits unterscheiden sich der Fe-RRase und Mn-RRase in dem Molekulargewicht und die Aminosäure Homologie ist nur 30%. Durch die Heptapeptide, die der C-terminale Region der kleinen Untereinheit entspricht, konnte eine Verhinderung der Bildung vom Holoenzym verursacht werden (YANG et al., 1990), wobei die RRase-Aktivität zuerst bei Herpes simplex virus mit dem acetylierten Nonapeptid AcYAGAV-VNDL gehemmt wurde. Der I<sub>50</sub>-Wert beträgt 10-20 µM (DUTIA et al., 1986; COHEN et al., 1986; MCCLEMENTS et al., 1988; PARADIS et al., 1988). Daraus hat sich ergeben, daß das C-terminalen Ende des R2-Proteins eine große Bedeutung für die Bindung an der R1-Untereinheit und für die Hemmung der RRase-Aktivität haben (CLIMENT & SJÖBERG, 1991; GAUDREAU et al., 1987; GAUDREAU et al., 1990). In *E. coli* spielt das C-terminale Ende des metallhaltigen-Proteins der RRase eine zentrale Rolle für die Bildung des Holoenzym der RRase. Darüber hinaus konnte ein Nachweis für die Abhängigkeit der Interaktion der RRase-Untereinheiten (R1, R2) an dem C-terminalen erbracht werden (CLIMENT & SJÖBERG, 1991). Nachweisbar ist, daß das synthetisierte Peptid aus dem C-terminalen Ende der metallhaltigen-Untereinheit aus *E. coli* die Interaktion zwischen der Untereinheiten hemmen konnte (I<sub>50</sub>-Wert=20 µM), während die Behandlung der RRase-Aktivität der Säugetiere durch dasselbe Peptid mit der Konzentration von 50 µM keine Hemmung aufweisen konnte. In *E. coli* konnte sogar

nachgewiesen werden, daß die invariablen Aminosäuren Glutamin 350 und Tyrosin 356 des C-terminalen Endes der metallhaltigen-Untereinheit der RRase nicht Elemente der Bindung sondern für die Elektrontransfer Weg zwischen den Untereinheiten notwendig sind (CLIMENT & SJÖBERG, 1992). Die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktion durch die Heptapeptide wurde ebenfalls in *Mycobacterium tuberculosis* nachgewiesen, wobei die Kapazität der Hemmung durch die Veränderung der Heptapeptide im Vergleich zum natürlichen C-Terminus R2F abnimmt, weil die veränderten Heptapeptide schlecht an der C-terminale R1E-Untereinheit binden konnte (YANG et al., 1997). Die Tatsache, daß die C-terminale Ende der metallhaltigen-Untereinheit für die Bindung an der katalytischen Untereinheit verantwortlich ist, werden verschiedene interessante Fragen gestellt. Spielt das C-terminale Ende eine strukturelle oder eine katalytische Rolle und was für eine Funktion wird von den Aminosäuren dieser Region ausgeübt? Das C-terminale Ende der metallhaltigen Untereinheit hat ein dominante Anweisung in der Interaktion zwischen den Untereinheiten der Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* miteinander (GAUDREAU et al., 1987). Die Untereinheiten der RRase aus *C. glutamicum* sind so schwach miteinander verbunden, so daß sie bisher nach der Reinigung sowohl mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 als auch mit analytischer H.I.C separat eluiert wurden. Das synthetisierte Heptapeptid aus *C. glutamicum* hat 85,7 % Homologie zu dem C-terminalen Ende des CA2-Proteins aus *C. ammoniagenes*. Ein Aminosäuresequenzvergleich des C-terminalen Endes des metallhaltigen CG2-Proteins zwischen *C. glutamicum* und *C. ammoniagenes* ist im folgenden dargestellt:

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| <i>C. glutamicum</i>   | E-D-D-D-W-D-F |
| <i>C. ammoniagenes</i> | T-D-D-D-W-D-F |

Nach der Ermittlung der RRase-Aktivitätshemmung durch das abgeleitete synthetisierte Heptapeptid aus der C-terminalen Ende des metallhaltigen-Untereinheit aus *C. glutamicum*, hat sich diese Aussage ergeben, daß das synthetisierte Heptapeptid ein spezifischer Inhibitor für die Hemmung der RRase-Aktivität ist.

### Möglicher Hemmechanismus der Ribonucleotid-Reduktasen durch C-terminale Peptide

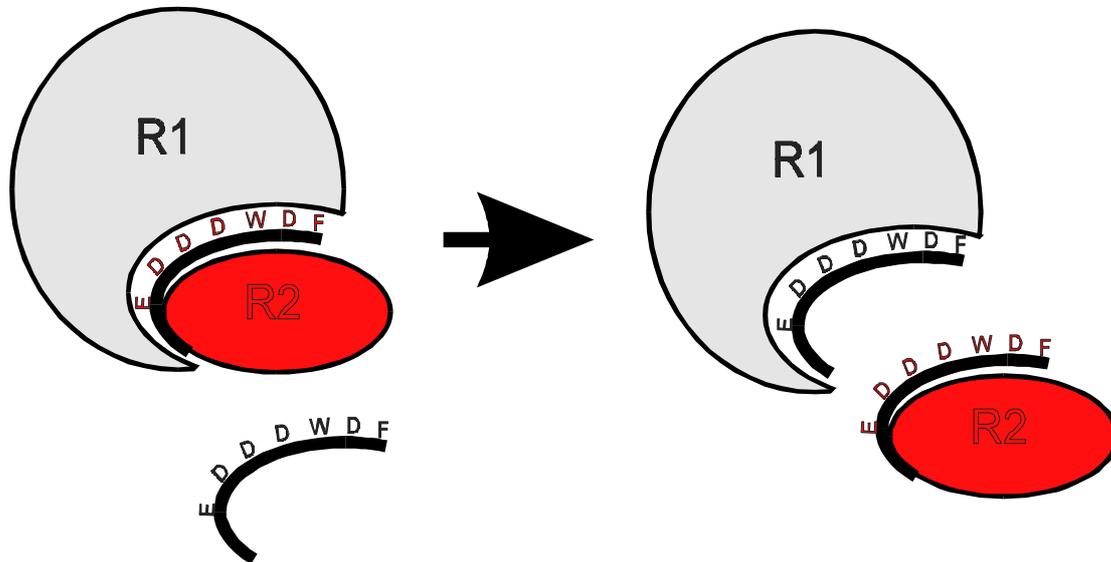


Abb. 32: Modell der Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* durch das synthetisierte Heptapeptid modifiziert nach DUTIA et al., 1986.

Die kinetische Untersuchung (Kap. 4. 6. 5) der RRase-Aktivitätshemmung durch das C-terminale Ende der metallhaltigen-Untereinheit Heptapeptid ermöglicht eine Vertiefung der Kenntnisse über dem Mechanismus der Hemmung und die Lieferung eines starken Nachweis, daß das C-terminale Ende der Ribonucleotid-Reduktase an der Interaktion der Untereinheiten teilnimmt und für die Bildung von der Brücke des organischen Radikaltransfers verantwortlich ist. Die Tatsache, daß die RRase-Aktivität nur spezifisch für den Species *in vitro* durch das synthetisierte Heptapeptid gehemmt wird, stellt Ribonucleotid-Reduktase eine sehr attraktive Wirkort Moleküle für die Bekämpfung sowohl von Tumorzellen als auch von pathogenen Mikroorganismen und DNA Viren dar. Die Hemmung der RRase-Aktivität wurde bisher durch das synthetisierte Heptapeptid *in vitro* untersucht. Für die mögliche Hemmung der RRase-Aktivität in den lebenden Zellen werden verschiedenen interessanten Fragen gestellt. In welcher Wachstumsphase werden das synthetisierte C-terminale Peptide für die Hemmung der RRase-Aktivität der lebenden Zellen eingesetzt. Mit welchem Mechanismus werden die Peptide in den Zellen transportiert.

Das System der Ribonucleotid-Reduktion konnte durch die dreidimensionale Struktur der RRase-Untereinheiten besser verstanden werden (NORDLUND et al., 1990; NORDLUND & EKLUND, 1993; UHLIN & EKLUND, 1994; UHLIN & EKLUND, 1996; ERIKSSON et al., 1997). In diesem System ist das aktive Zentrum des R1-Proteins mit dem stabilen Tyrosyl-Radikal des R2-Proteins über "long rang electron transfer" für den Aufbau des Radikaltransferweges gebunden, wobei die konservierten Aminosäure der kleinen Untereinheit (R2-Protein) Tyr<sub>122</sub>, Asp<sub>84</sub>, His<sub>118</sub>, Asp<sub>237</sub>, Trp<sub>48</sub>, Tyr<sub>356</sub> und der großen Untereinheit (R1-Protein) Tyr<sub>730</sub>, Tyr<sub>731</sub>, Cys<sub>439</sub> beteiligt sind. Später konnte die Existenz eines Radikaltransfersweges in der Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* durch die Kombination von dreidimensionale Struktur der RRase und "Site-directed mutagenesis" nachgewiesen werden (Ekberg et al., 1998). Das Tyrosyl-Radikal des R2-Proteins aus *E. coli* wird durch den Radikalfängern (HU) reduziert, der Eisengehalt bleibt intakt (BARLOW et al., 1983), während im R2-Protein aus Maus sowohl das freie organische Radikal (NYHOLM et al., 1993) als auch das Eisen durch diesen Hemmstoff reduziert werden (McCLARTY et al., 1990). In der Fe-RRase aus *E. coli* bilden die folgenden Aminosäure-reste Phe<sub>208</sub>, Phe<sub>212</sub> und Ile<sub>234</sub> eine hydrophobe Tasche, die eine große Bedeutung für die Stabilität des Tyrosyl-Radikals haben und wahrscheinlich zum Schutz des Radikals vor H<sub>2</sub>O dienen (LOGAN et al., 1998; ORMÖ et al., 1995). Hierbei könnte nachgewiesen werden, daß ein Austausch dieser hydrophoben Aminosäure durch "site-directed mutagenesis" verringert die NrdF2-Aktivität in *E. coli* (ORMÖ et al., 1995). Sowohl die Reduktion des Tyrosyl-Radikals mit dem intakten Zustand der Fe (III) als auch die Reduktion von Fe (III) mit dem Löschen des Tyrosyl-Radikals führt zur Inaktivierung der Ribonucleotid-Reduktase (Fontecave et al., 1990). Das dominante Vorkommen von dem zweikernigen Fe(III)-Zentrum in metR2-Protein aus Maus tritt bei der Absorption 320 nm und 380 nm (DAVYDOV et al., 1997), jedoch sind diese beide Absorption breit und wenig intensiv hier im Vergleich zum metR2-Protein aus *E. coli* (DAVYDOV et al., 1997). Durch die Behandlung des aktiven R2-Proteins mit Hydroxyharnstoff sowohl von *E. coli* als auch von Maus bleibt die Absorption bei 380 nm durch die Teilnahme des zweikernigen Fe(III)-Zentrums intakt während bei 414 nm, wo das Tyrosyl-Radikal auftritt, verschwand (DAVYDOV et al., 1997). Auch die Teilcharakterisierung des metallhaltigen-Proteins der Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* könnte durch das Absorptionsspektrum erzielt werden (Kap. 4. 6. 2). Die Absorptionsspektren des mittels Gelfiltration mit Superdex G-200 aktiven gereinigten CG2-Proteins aus *C. glutamicum* zeigte ein Schulter zwischen 340-500 nm, mit dem

Hauptmaximum bei 415 nm. Die Behandlung des CG2-Proteins aus *C. glutamicum* mit dem Radikalfänger (HU) verursacht eine deutliche Veränderung des Spektrums, wobei das organische stabile freie Radikal gelöscht wird. Das stabile organische Radikal konnte durch das Maximum der Absorption vom aktiven gereinigten CG2-Protein und mit 20 mM HU gehemmter neuen RRase aus *C. glutamicum* bei 435 nm aus dem Differenzspektrum ermittelt werden (Kap. 4. 6. 2). Jedoch wurden weitere undeutliche Veränderung im UV/Vis-Spektrum beobachtet. Daraus hat sich ergeben, daß das Mangan-Zentrum aus *C. glutamicum* in seiner Empfindlichkeit gegenüber dem Radikalfänger (HU) genauso wie das Eisen-Zentrum aus *E. coli* verhält und völlig intakt bleibt (DAVYDOV et al., 1997, diese Arbeit). Das über die Gelfiltration mit Superose<sup>TM</sup>12 gereinigte CA2-Protein der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* zeigte ein ähnliches Absorptionsspektrum wie *C. glutamicum* (GRIEPENBURG et al., 1996), wobei neben dem Hauptpeak bei 410 nm tritt noch eine weitere bei 437 nm auf. Über ein Differenzspektrum (CA2-Protein ohne und mit 100 mM HU) konnte das Absorptionsmaximum bei 437 nm eine deutliche Aussage über die Gegenwart vom organischen stabilen freien Radikal in der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* nachgewiesen werden (AULING et al., 1997; GRIEPENBURG, 1998; OEHLMANN, et al., 1998). Das Absorptionsspektrum der Fe-RRase aus *Arabidopsis thaliana* zeigte über einen Bereich von 300-600 nm vier Bande bei den folgenden Wellenlänge 325 nm, 370 nm und 390 nm, 410 nm, wobei die ersten Bande für das Eisenzentrum geeignet sind während die übrigen Bande das Tyrosyl-Radikal entsprechen (SAUGE-MERLE et al., 1997; LARSSON & SJÖBERG, 1986; SJÖBERG, 1997). Ebenfalls könnte durch das Absorptionsspektrum des nativen und HU-behandelten NrdF-Proteins der Fe-RRase aus *E. coli* nach der Erscheinung der Peake bei den folgenden Wellenlänge 325 nm, 370 nm, 390 nm, 410 nm, 500 nm und bei 600 nm und eine Verschwindung der Peake bei 390 nm und 410 nm des HU-behandelten Proteins nachgewiesen werden, daß das Tyrosyl-Radikal durch HU beeinträchtigt wird und die Eisenhaltige-RRase nicht entfernt wird (PETERSSON et al., 1980). Das Absorptionsspektrum der RRase in Herpes virus zeigten Bande über einen Bereich von 300-600 nm, die sowohl für Eisen als auch das Tyrosyl-Radikal charakteristisch mit den Beteiligung aromatischen Aminosäuren sind (MANN et al., 1991, OCHIAI et al., 1990). Es handelt sich sowohl bei der Fe-RRase als auch bei Mn-RRase um ein ähnliches gebundenes Protein-Radikal. Da diese Messungen mit partiell gereinigtem CA2 durchgeführt wurden, kann es durch die Verunreinigungen zu der leichten Verschiebung im Vergleich mit dem Fe-Enzym gekommen sein und es sich sehr wohl um gleichartige Radikale in Fe- und Mn-RRase handeln.

Die UV/Vis-spektroskopische Analyse des CG2-Proteins aus *C. glutamicum* zeigte deutliche Unterschiede zwischen dem Absorptionsspektrum der metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase aus *C. glutamicum* und dem Fe-RRase aus *E. coli*. Aus der Differenzspektren des aktiven gereinigten CG2-Proteins aus *C. glutamicum*, die im Kapitel (4. 6. 2) bereits erwähnt wurde, traten neben dem maximalen Differenzspektrum der Mn-RRase bei 435 nm (OEHLMANN et al., 1998, diese Arbeit) noch weitere Peake bei den 480 nm, 527 nm und 567 nm auf, welche durch das manganhaltige CG2-Protein der RRase aus *C. glutamicum* verursacht sein könnten. Das maximale Differenzspektrum der metallhaltigen Untereinheit der Fe-RRase tritt in einem Bereich von 410-415 nm auf (PETERSSON et al., 1980; MANN et al., 1991). Willing konnte ertsmal ein Manganspektrum der RRase aus *C. ammoniagenes* nachweisen und vermutete, daß dieses System ein gebundenes Mangan in der kleinen Untereinheit enthält. BLASCZYK (1994) berechnete auf der Basis der ICP-MS-Spektroskopie ein mononucleares Manganzentrum pro Untereinheit CA2-Protein in *C. ammoniagenes*. WILLING et al (1988a) und BLASCZYK (1994) vermuteten aufgrund längerer durchgeführter Dialyse, daß das Mangan fest im CA2-Protein sitzt und sehr stark in der kleinen Untereinheit der RRase gebunden. Wie breit diskutiert wurde, daß die UV/Vis-Spektroskopische Übereinstimmung der Mn-RRase aus *C. ammoniagenes* (WILLING et al., 1988) mit der Mn-Pseudokatalase aus *Lactobacillus plantarum* (KONO & FRIDOVICH, 1983; QUE & TRUE, 1990; FRANKO et al., 1986), die Mn-Katalase von *Thermus thermophilus* (BARYNIN et al., 1986), die Mn-Superoxide Dismutase aus *Thermus thermophilus* (STALLINGS et al., 1985), *Bacillus stearothermophilus* (PARKER & BLAKE, 1988) und der Mitochondrien der menschlichen Leber (WAGNER et al., 1989) und Concanavalin A (MARKHAM et al., 1981, HARDMAN et al., 1982), indem sie einkernige Mn-Zentrum enthalten. Die Gegenwart von Eisen im aktiven R2-Protein der RRase aus *E. coli* verhindert die Bindung des  $Mn^{+2}$ -Ionen wenn das aktive R2-Protein mit dem Mangan inkubiert (ATTA et al., 1992). Die Chelatisierung vom Eisen des aktiven R2-Proteins aus *E. coli* für die Herstellung vom Apo-Protein *in vitro* führt zum Verlust vom Eisen und zum Löschen des Tyrosyl-Radikals und zur Folge eine Inaktivierung der RRase-Aktivität (PETERSSON et al ; 1980). Das Apo-R2-Protein wird durch die Inkubation mit Fe (II) im Gegenwart vom Sauerstoff reaktiviert (ATTA et al., 1992, Pertersson et al., 1980). Während der Reaktion bindet das Eisen im aktiven Zentrum der Polypeptidkette und wird *in situ* zu Fe (III) zusammen mit dem Tyrosyl-Radikal oxidiert (ATTA et al., 1992). Die Fe (II) Eisenzentrum wurde unter anaebenen Bedingungen und das Tyrosyl-Radikal durch die Eisen-Oxidation

hergestellt. Im aktiven R2-Protein wird das  $\text{Fe}^{+2}$  schnell in  $\text{Fe}^{+3}$  oxidiert (MANN et al., 1991). Das aktive Zentrum Tyr<sub>122</sub> des R2-Proteins wurde durch "Site directed mutagenesis" zu Phenylalanin mutiert (LARSSON & Sjöberg, 1986). Diese Mutante enthält *in vivo* die normale zweikernige Eisen, jedoch fehlt ihr das freie Tyrosyl-Radikal, so daß das Enzym inaktiv wird (LARSSON et al., 1988). Die Verwendung von der sensitiven EPR-Spektroskopische Untersuchungen von zwei kernige Mangan zeigte, daß das ApoR2-Protein eine Hohe Affinität sowohl für das Eisen als auch für das Mangan hat und das R2-Protein enthält ebenfalls vier Metallbindungstelle, wobei zwei Bindungstelle für jede Polypeptidkette. Das freie  $\text{Mn}^{+2}$  und das Mangangebunden-Protein wiesen verschiedene EPR-Spektren auf (ATTA et al., 1992). EPR-Charakteristik des Mn-R2-Proteins zeigte, daß das gebundene-mangan-Protein ist stabil bei den zweikernige Mn (II) Zustand, dadurch wird sowohl eine Aktivierung von Dioxygen als auch eine Herstellung von dem Tyrosyl-Radikal nicht verursacht (ATTA et al., 1992). In *Mycobacterium tuberculosis* das Tyrosyl-Radikal ist mehr stabil als in *E. coli* (LIU et al., 1998). Eine Reaktivierung des Tyrosyl-Radikals des ApoNrdF2-Proteins aus *Mycobacterium tuberculosis* konnte nach der Inkubation mit den Fe-Ionen im Gegenwärt von Sauerstoff erzielt werden, während die Inkubation mit den folgenden Metallionen  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ , und  $\text{Mg}^{+2}$  keine Regeneration des Radikals verursacht (LIU et al., 1998).

## Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß die Ribonucleotid-Reduktase aus *C. glutamicum* wie das Enzym aus *C. ammoniagenes* der Klasse IV zuordnen ist, da nur Mangan und kein Eisen in der kleinen Untereinheit nachgewiesen wurde. Darüber hinaus eröffnet die Klonierung der Gene der RRasen die Möglichkeit, bisher ungelöste Probleme der Metallbindung in beiden Mn-RRasen zu bearbeiten. Zunächst soll eine Überexpression der metallhaltigen Untereinheit (CG2-Protein) der Ribonucleotid-Reduktase erzielt werden. Damit kann endlich genügend gereinigtes aktives CG2-Protein für die chemische und physikalische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden, um über ICP-MS- und ESR-Spektroskopie Informationen über den Metallgehalt und die Struktur des Metallzentrums der neuen Mn-RRase aus *C. glutamicum* zu erhalten. Unter der Voraussetzung, daß diese Überexpression gelingt und eine höhere Proteinausbeute als bisher erreicht werden kann, müssen auch die bisher vorgestellten Ergebnisse der UV/vis-Spektroskopie und der ICP-MS-Spektroskopie wiederholt werden. Die ESR-Spektroskopie ist eine sehr wichtige Untersuchungsmethode von Radikalen und Metall in Proteinen. Die ESR-Analyse ermöglicht eine Zuordnung verschiedener paramagnetischer Zentren gebundene Radikal und die Metallionen. Die hier vorgestellten Hemmung der RRase-Aktivität aus *C. glutamicum* durch das Heptapeptid, das dem C-terminalen Ende der kleinen Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase entspricht, könnte für die Entwicklung einer neuen chromatographischen Methode zur Reinigung der katalytischen Untereinheit (CG1-Protein) verwendet werden. Dieses Heptapeptid würde man zur Vorbereitung einer Affinitätsmatrix einsetzen können, da es an der C-terminalen Region der katalytischen Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase bindet. Beispielweise wurden rekombinant hergestellte Apo-Proteine aus *E. coli* (ATTA et al., 1992) und *Arabidopsis thaliana* (SAUGE-MERLE et al., 1997) mit verschiedenen Metallionen in Gegenwart von Sauerstoff inkubiert. Da wurde in beiden Fällen die Reaktivierung des Tyrosyl-Radikals nur durch die Gegenwart von Eisen hervorgerufen. Im Gegensatz dazu wurde eine Reaktivierung des Apo-Proteins der Mn-RRase ausschließlich mit Mangan in *C. ammoniagenes* (AULING et al., 1980, BLASCZYK, 1994; LUO, 1994) und in *Bacillus subtilis* (MOHAMED et al., 1998) bisher nur *in vivo* beobachtet. Rekombinantes Apo-Protein könnte durch Behandlung der metallhaltigen Untereinheit der Mn-RRase mit den chelatisierenden Agentien hergestellt werden, das CG2-Protein durch die Entfernung des Metall-Ions schonend inaktivieren. Durch die anschließende Inkubation mit verschiedenen Metall-Ionen wie  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  in

Gegenwart von Sauerstoff könnte eine Reaktivierung erzielt werden, wobei das organische Radikal und damit auch das Apo-Protein nur im Gegenwart des richtigen Metalls in den aktiven Zustand zurückverwandelt würde.

## Literaturverzeichnis

Abbruzzese, J. I., Plunkett, W. (1991). A phase clinical, plasma and cellular pharmacology study of 2', 2'-difluorodeoxycytidine. *Journal of Clinical Oncology* 9:491-498.

Åberg, A., Hahne, S., Karlsson, M., Larsson, Å., Ormö, M., Åhgren, A., Sjöberg, B.-M. (1989). Evidence for two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 264:12249-12252.

Ashley, G., W., Stubbe, J. (1985). Current on the chemical mechanism of Ribonucleotide reductases. *Pharmacology, Therapeutics* 30:301-329.

Atkin, C. L., Thelander, L., Reichard, P. (1973). Iron and free radical in ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 248:7464-7472.

Auling, G., Thaler, M., Diekmann, H. (1980). Parameters of unbalanced grows and reversible inhibition of deoxyribonucleic acid syntheses in *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 induced by depletion of  $Mn^{+2}$ . Inhibitor studies on the reversibility of deoxyribonucleic acid syntheses. *Archives of Microbiology* 127:105-114.

Auling, G., Prella, H., Diekmann, H. (1982). Incorporation of deoxyribonucleotides into DNA of Coryneform bacteria and relevance of deoxyribonucleotide kinase. *European Journal of Biochemistry* 121:365-370.

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

- Barlow, T. , Eliasson, R., Platz, A., Reichard, P., Sjöberg, B.-M. (1983). Enzymatic modification of a tyrosine residue to a stable free radical in ribonucleotide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:1492-1495.
- Barynin, V. V., Vagin, A. A., Melik-Adamyanyan, V. R., Grebenko, A. I., Khagulov, S. V., Popov, A. N., Andrianova, M. E., Vainstein, B. K. (1986). *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 288:877-880.
- Bathe, B., Kalinowski, J., Pühler, A. (1996). A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Molecular General Genetics* 252:255-265.
- Belcher, H. J., Nizam, M., Neill, J. O. (1992). Intra-arterial 4-hydroxyanisole chemotherapy for locally recurrent malignant: a reappraisal. *British Journal of Plastic Surgery* 45:208-210.
- Björklund, S., Hjortberg, K., Johansson, E., Thelander, L. (1993). Structure and promoter characterization of the gene encoding large subunit (R1 protein) of mouse ribonucleotide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11322-11326.
- Björklund, S., Skog, S., Tribukait, B., Thelander, L. (1990). S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNA<sub>s</sub>. *Biochemistry* 29:5452-5458.
- Blakley, R. L., Barker, H. A. (1964). Combamide stimulation of the reduction of ribotides to deoxyribotides in *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 16:391-397.
- Blakley, R. L., Ghambeer, R. K., Nixon, P. F., Vitols, E. (1965). THE cobamide-dependent ribonucleotide reductase triphosphate reductase of *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 20:439-445.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Bröer, S., Krämer, R. (1991). Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*: 2. Energetics and mechanism of the transport system. *European Journal of Biochemistry* 202:137-143.

Brush, E. J., Kozarich, J. W. (1992). Enzymic free radical mechanism. *In* : The enzymes (Ed.: Sigman, D. S.), Vol. 20, 3rd ed., Academic Press, Inc., San Diego, p.: 317-403.

Booker, S., Stubbe, J. A. (1993). Cloning, sequencing, and expression of the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8352-8356.

Caras, I. W., Jones, T., Eriksson, S., Martin, D. W., Jr. (1983). Direct photoaffinity labeling of the catalytic site of mouse ribonucleotide reductase by CDP\*. *Journal of Biological Chemistry* 258:3064-3068.

Caras, I. W., Levinson, B. B., Farbry, M., Williams, S. R., Martin; D. W., Jr. (1984). Cloned mouse ribonucleotide reductase subunit M1 cDNA reveals amino acid sequence homology with *Escherichia coli* and Herpesvirus ribonucleotide reductases. *The Journal of Biological Chemistry* 260:7015-7022.

Carlson, J., Fuchs, J. A. Messing, J. (1984). Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:4294-4297.

Chevalier, J., Pommier, M.-T., Cremieux, A, Michel, G. (1988). Influence of Tween 80 on the mycolic acid composition of three cutaneous corynebacteria. *Journal of General Microbiology* 134:2457-2461.

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

Climent, I., Sjöberg, B.-M. (1991). Carboxyl-terminal peptides as probes for *Escherichia coli* ribonucleotide reductase subunit interaction: Kinetic analysis of inhibition studies. *Biochemistry* 30:5164-5171.

Cohen, E. A., Gaudreau, P., Brazeau, P., Langelier, Y. (1986). Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by a nonapeptide derived from the carboxyl terminus of subunit 2. *Nature* 321:441-443.

Collins, M. D. 1987. Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 (4):442-443.

Collins, M. D., Cummins, C. S. (1986). Genus *Corynebacterium* lehmann and Neumann 1986, 350A1, p. 1266-1276. In Sneath, P. H. A, N. S. Mair, M. E. Sharp and J. G. Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. The Williams, Wilkins Co., Baltimore.

Collins, M. D., Goodfellow und Minikin, D. E. (1982). A survey of the structure of mycolic acid in *Corynebacterium* and related taxa. *Journal of General Microbiology* 128:129-149.

Colleen, M. E., Hurlbert, R. B. (1985). The inhibition of ribonucleotide reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole. *Pharmacology, Therapeutics* 27:167-196.

Cooper, T. G. (1981): *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter Gruyter, Berlin.

- Cowles, J. V., Evans, H. R., Russell, S. A. (1969). B<sub>12</sub>-coenzym-dependent ribonucleotide reductase in *Rhizobium* species and the effects of cobalt deficiency on the activity of the enzym. *Journal of Bacteriology* 97:1460-1465.
- Cosentino, G., Lavallee, P., Rakhit, S., Plante, R., Gaudette, Y., Lawetz, P., Whitehead, P. W., Duceppe, J. S., Lepine-Frenette, C., Dansereau, N. (1991). Specific inhibition of ribonucleotide reductases by peptides corresponding to the C-terminal of their second subunit. *Biochemistry and Cell Biology* 69:79-83.
- Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1988). Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of General Microbiology* 134:3221-3229.
- Davydov, R. M., Davydov, A., Ingemarson, R., Thelander, L., Ehrenberg, A., Gräslund, A., (1997). EPR study of the mixed-valent diiron sites in mouse and Herpes simplex virus ribonucleotide reductases. Effect of the tyrosyl radical on the structure and reactivity of the diferric center. *Biochemistry* 36:9093-9100.
- Demain, A. L. (1978). Production of nucleotides by microorganisms, p. 187-208. In: A. H. Rose(ed.), Primary products of metabolism. Academic Press, London.
- Dutia, B. M., Frame, M. C., Subak-Sharpe, J. H., Clark, W. N., Marsden, H. S. (1986). Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by synthetic peptides. *Nature* 321:439-441.
- Eggeling, L., Oberle, S., Sahm, H. (1998). Improved L-lysine- yield with *Corynebacterium glutamicum* :use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:24-30.
- Eggeling, L., Morbach, S., Sahm, H. (1997). The fruits of the molecular physiology: engeneering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* 56:167-182.

Ehrenberg, A., Reichard, P. (1972). Electron spin resonance of the iron-containing protein B2 from ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 247:3485-3488.

Ekberg, M., Sahlin, M., Eriksson, M., Sjöberg, B.-M. (1996). Two conserved Tyrosine Residues in Protein R1 participate in an intermolecular electron transfer in ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 271:20655-20659.

Ekberg, M., Pötsch, S., Sandin, E., Thunnissen, M., Nordlund, P., Sahlin, M., Sjöberg, B.-M. (1998). Preserved catalytic activity in an engineered ribonucleotide reductase R2 protein with a nonphysiological radical transfer pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 273:21003-21008.

Elleingand, ., Gerez C., Un, S., Knüpling, M., Lu, G., Salem, J., Rubin, H., Sauge-Merle, S., Laulhére, J. P., Fontecave, M., (1998). Reactivity studies of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and *Arabidopsis thaliana* comparison with *Escherichia coli*. *Biochemistry* 258:485-490.

Engström, Y., Rozell, B., Hansson, H.-A., Stemme, S., Thelander, L. (1984). Localization of ribonucleotide reductase. *EMBO Journal* 3:863-867.

Engström, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Thelander, L., Tribukait, B. (1985). Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 260:9114-9116.

Eriksson, S., Gräslund, A., Skog, S., Thelander, L., Tribukait, B. (1984). Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated in subunit M2 is regulated by de novo protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 259:11695-11700.

Eriksson, S., Sjöberg, B.-M. (1989). Ribonucleotide reductase. *In: allosteric enzymes* (Ed.: Hervé, G.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 189-215.

- Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Regnström, K., Sjöberg, B.-M., Eklund, H. (1997). Binding of substrate and allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1, substrate binding requires reduced active site cysteines. Structure, in Press.
- Fieschi, F., Torrents, E., Touloukhouva, L., Jordan, A., Hellman, U., Barbe, J., Gibert, I., Karlsson, M., Sjöberg, B.-M. (1998). The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. The Journal of Biological Chemistry 273:4329-4337.
- Fiedler, F., Sclifer, K., Kandler, K. (1973). Amino acid sequence of the threonine containing mureins of coryneform bacteria. Journal of Bacteriology 113:8-17.
- Fontecave, M., Gräslund, A., Reichard, P. (1987) NADPH:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 262:12325-12331.
- Fontecave, M., Eliasson, R., Reichard, P. (1989). Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86:2147-2151.
- Fontecave, M., Nordlund, P., Eklund, H., Reichard, P. (1992). The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 65:147-183.
- Fontecave, M., Gerez, C., Mansuy, D., Reichard, P., (1990). Reduction of the Fe(III)-tyrosyl radical center of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by dithiothreitol. The Journal of Biological Chemistry 265:10919-10924.
- Franko, R. M., Penner-Hahn, J. E., Bender, C. J. (1986). EPR spectral evidence for a dinuclear active site in *Lactobacillus plantarum* manganese catalase. Journal of the American Chemistry Society 110:7554-7555.

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavagne, A. R., Sutton, G., Kelly, J. M., Fritchman, J. L., Weidman, J. F., Small, K. V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T. R., Saudek, D. M., Venter, J. C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397-403.

Fuchs, J. A., Karlström, H. O. (1972). A mutant of *Escherichia coli* defective in ribonucleosidiphosphate reductase. Characterization of the enzymatic defect. *European Journal of Biochemistry* 32:457-462.

Furuya, A., Abe, S., Kinoshita, S. (1970). Effects of manganese and adenine on 5'inosinic acid accumulation by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agriculture and Biological Chemistry* 34:210-221.

Gao, W. Y., Cara, A., Gallo, R. C., Lori, F. (1993). Low levels of deoxyribonucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8925-8928.

Garriga, X., Eliasson, R., Torrents, E., Jordan, A., Barbe, J., Gilbert, I., Reichard, P. (1996). *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229:189-192.

Gaudreau, P., Paradis, H., Langelier, Y., Brazeau, P. (1990). Synthesis and inhibitory potency of peptides corresponding to the subunit 2 C-terminal region of Herpes virus ribonucleotide reductase. *Journal of Medicinal Chemistry* 33:723-730.

Gaudreau, P., Michaud, J., Cohen, E. A., Langelier, Y., Brazeau, P. (1987). Structure-activity studies on synthetic peptides inhibiting Herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 262:12413-12416.

Gerez, C., Elleingand, E., Kauppi, B., Eklund, H., Fontecave, M. (1997). Reactivity of the tyrosyl radical of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase Control by

the Protein. *European Journal of Biochemistry* 249:401-407.

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

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

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

Gutmann, M., Hoischen, C., Krämer, R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1112:115-123.

Hansen, J. (1994). Bioreaktoranzucht und biochemische Charakterisierung des Enzymdefekts von thermosensitiven Mutanten eines für die Nucleotidproduktion genutzten Industriestammes. Diplom-Ingenieur (Fachhochschule Ostfriesland, Universität Hannover).

Hardman, K. D., Agarwal, R. C., Freiser, M. J. (1982). Manganese and calcium binding sites of concanavalin A. *Journal of Molecular Biology*. 157:69-86.

Haynes, J. A., Britz, M. L. (1990). The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on transformation frequency obtained by electroporation. *Journal of General Microbiology* 136:255-263.

Heck, M. M. S., Hittelman, W. N., Earnshaw, W. C. (1988). Differential expression of DNA topoisomerase I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:1086-1090.

- Hertel, L. W., Kroin, J. S., Misner, J. W., Tustin, J. M.(1988). Synthesis of the 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-deoxy 2,2-difluoro-D-ribofuranosyl nucleosides. *Journal of Organic Chemistry* 53:2406-2409.
- Hilliger, M., Hertel, W. (1997). Regulation of L-lysine biosynthesis in prototrophic revertants of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Basic Microbiology* 37:29-40.
- Himmelreich, R., Plagens, H., Hilbert, H., Reiner, B., Herrmann, R.(1997). Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Research* 25:701-712.
- Hogekamp, H. P. C. (1984). Nature and properties of the bacterial ribonucleotide reductases. *Pharmacology, Therapeutics* 23:393-405.
- Hogekamp, H. P. C., Follmann, H., Thauer, R. K. (1987). Ribonucleotide reductase in cell extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS Letters* 219:197-201.
- Hogekamp, H. P. C., McFarlan, S. C. (1989). Nature and properties of the bacterial ribonucleotide reductases, p. 17-35. In Cory, J. G., Cory, A. H. (Eds.), *inhibitors of ribonucleotide reductase activity: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, chapt. 2. Pergamon Pr., New York.
- Huang, P., Chubb, S., Hertel, L. W., Grindey, G. B., Plunkett, W. (1991). Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Research* 51:6110-6117.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes and Wohlleben (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive Bacteria *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* 174:5462-5465.

- Jang, Ki-H., Pierotti, D., Kemp, G. W., Best, G. R., Britz, M. L. (1997). Mycolic acid composition of *Corynebacterium glutamicum* and its cell surface mutants: effects of growth with glycine and isonicotinic acid hydrazide. *Microbiology* 143:3209-3221.
- Jordan, A., Aslund, F., Pontis, E., Reichard, P., Holmgren, A. (1997a). Characterization of *Escherichia coli* *NrdH*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 18044-18050.
- Jordan, A., Pontis, E., Aslund, F., Hellman, U., Gilbert, I., Reichard, P. (1996). The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry* 271:8779-8785.
- Jordan, A., Gibert, I., Barbe, J. (1994a). Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. *Journal of Bacteriology* 176:3420-3427.
- Jordan, A., Pontis, E., Atta, M., Krook, M., Gibert, I., Barbé, I., Reichard, P., (1994b). A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12892-12896.
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957). Amino acid fermentation. I. production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology* 3:193-205.
- Kinoshita, S., (1985). Glutamic acid bacteria, p. 115-142. In: A. L. Demain, and N. A. Solomon (ed.), *Biology of industrial microroganisms*. The Benjamin/Cummins Publishing Compagny, London.
- Komata, Y., (1976). Utilization in foods, p. 299-319. In: Ogata, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T., and Aida, K. (ed.), *Microbial production of nucleic acid-related substances*. Kodansha Ltd., Tokyo; John Wiley and Sons, New York.

- Komatsu, Y. (1979). Complete lysis of glutamic acid-producing bacteria by use of antibiotics which inhibit the biosynthesis of cell walls. *Journal of General Microbiology* 113:407-408.
- Kono, Y., Fridovich, I. (1983). Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *The Journal of Biological Chemistry* 258:6015-6019.
- Krakoff, I. H., Brown, N. C., Reichard, P. (1968). Inhibition of ribonucleotide reductase by hydroxyurea. *Cancer Research* 28:1559-1565.
- Lammers, M., Follmann, H. (1983). The ribonucleotide reductases: a unique group of metalloenzymes essential for cell proliferation. *Structure and Bonding* 54:27-91.
- Laplante, S. R., Aubry, N., Liuzzi, M., Thelander, L., Ingemarson, R., Moss, N. (1994). The critical C-terminus of the small subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is mobile and conformationally similar to C-terminus peptides. *International Journal of Peptide, Protein Research* 44:549-555.
- Larsson, A., Sjöberg, B. M. (1986). Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase. *EMBO Journal* 5:2037-2040.
- Larsson, A., Karsson, M., Sahlin, M., Sjöberg, B.-M. (1988). *The Journal of Biological Chemistry* 263:17780-17784.
- Lassmann, G., Thelander, L., Gräslund, A. (1992). EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188:879-887.
- Leuchtenberg, W. (1996). Amino acids-technical production and use. In: Roehr M(Ed) *Biotechnology*, Vol. VI. VCH, Weinheim.
- Licht, S., Gerfen, G. J., Stubbe, J. (1996). Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* 271:477-481.

- Liebl, W., Ehrmann, M. Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM20297T, "*Brevibacterium flavum* ", DSM20411, "*Brevibacterium lactofermentum* " DSM20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their Distinction by rRNA gene restriction patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(2):255-260.
- Liebl, W., Schein, B. (1990). Isolation of restriction deficient mutants of *Corynebacterium glutamicum* , p. 323-327. In Behrens and Krämer, J. (eds.). DEHEMA Biotechnology conferences Vol. 4; CVH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Littlefield, J. W. (1966). The periodic synthesis of thymidine kinase in mouse fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 114:398-403.
- Liu, A., Pötsch, S., Davydov, A., Barra, A. L., Rubin, H., Gräslund, A., (1998). The tyrosyl free radical of recombinant ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* is located in a rigid hydrophobic pocket. *Biochemistry* 37:16369-16377.
- Luo, C. (1994). Isolierung und Charakterisierung von thermosensitiven Mutanten der Mn-Ribonucleotid-Reduktase aus *Corynebacterium (Brevibacterium) ammoniagenes* ATCC 6872. Dissertation, Universität Hannover.
- Lowdon, M., Vitols, E. (1973). Ribonucleotide reductase activity during the cell cycle of *Sacharomyces cerevicie*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 158:177-184.
- Mann, G. J., Musgrove, E. A., Fox, R. M., Thelander, L. (1988). Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. *Cancer Research* 48:5151-5156.
- Mann, G. J., Gräslund, A., Ochiai, E. I., Ingemarson, R., Thelander, L. (1991). Purification and characterization of recombinant mouse and herpes simplex virus ribonucleotide reductase R2 subunit. *Biochemistry* 30:1939-1947.

- Marienfeld, S., Uhlemann, E.-M., Schmid, R., Krämer, R., Burkovski, A. (1997). Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek* 72:291-297.
- Markham, G. D. (1981). Spatial proximity of two divalent metal ions at the active site of S-adenosylmethionine synthetase. *The Journal of Biological Chemistry* 256:1903-1909.
- McClarthy, G. A., Chan, A. K., Choy, B. K., Wright, J. A. (1990). Increased ferritin expression is associated with increased ribonucleotide reductase gene expression and the establishment of hydroxyurea resistance in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 265:7539-7547.
- McClements, W., Yamanaka, G., Garsky, V., Perry, H., Bacchetti, S., Colonno, R., Stein, B. R. (1988). Oligopeptides inhibit the ribonucleotide reductase of Herpes simplex virus by causing subunit separation. *Virology* 162:270-273.
- Meuth, M. (1989). The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleotide triphosphate pool imbalances in mammalian cells. *Experimental Cell Research* 181:305-316.
- Minnikin, De., O'Donnell, AG. (1984). Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition. In: Goodfellow M, Mordarski, M., Williams, ST(Eds) . *The Biology of Actinomycetes*. Academic Press, London.
- Mohamed, S., Gvozdiak, O. R., Stallmann, D., Gripenburg, U, Folmann, H., Auling, G. (1998). Ribonucleotide reductase in *Bacillus subtilis* - evidence for a Mn-dependent enzyme. *Biofactors* (in press).
- Moore, E. C., Hurlbert, R. B. (1989). The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrozoloimidazol (IMPY). *In: Cory and Cory*, p.:165-201.

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

Nara, T., Samejima, H., Fujita, C., Ito, M., Nakayama, K., Kinoshita, S. (1961). L-Homoserine fermentation. VI. Effect of threonine and methionine on L-homoserine in dehydrogenase in *Micrococcus glutamicus* 534-Co147. Agriculture and Biological Chemistry 25:532-541.

Nakayama; K., Tanaka, H., Hagino, H., Kinoshita, S. (1966). Studies on lysine fermentation. V. concerted feed-back inhibition of aspartokinase and the absence of lysine inhibition on aspartic semialdehyde-pyruvate condensation in *Micrococcus glutamicus*. Agriculture and Biological Chemistry 30:611-616.

Nikaido, H., Kim, SH., Rosenberg, EY. (1993). Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. Molecular Microbiology 8:1025-1030.

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

Nordlund, P., Eklund, H. (1993). Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. Journal of Molecular Biology 232:123-164.

Nyholm, S., Mann, G. J., Johansson, A. G., Bergeron, R. J., Gräslund, A., Thelander, L. (1993). Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. The Journal of Biological Chemistry 268:26200-26205.

Ochiai, E. I., Mann, G. J., Gräslund, A., Thelander, L., (1990). Tyrosyl free radical formation in the small subunit of mouse ribonucleotide reductase. The Journal of Biological Chemistry 265:15758-15761.

Oehlmann, W., Gripenburg, U., Auling, G. (1998). Cloning and sequencing of the *nrdF* gene of *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 encoding the functional

metalo-cofactor of the manganese-ribonucleotide reductase (Mn-RRase).

Biotechnology Letters 20(5):483-488.

Oehlmann, W. (1998). Klonierung der Gene der Ribnucleotid Reduktasen von *Corynebacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität Hannover.

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

Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, R., Fontecave, M., Reichard, P. (1996). The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase subunit structure and iron sulfur center. The Journal of Biological Chemistry 271:9410-9416.

Ormö, M., Regnström, K., Wang, Z., Jr., L. Q., Sahlin, M. (1995). Residues important for radical stability in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 270:6570-6576.

Panagou; D., Orr, M. D., Dunstone, J. R., Blakley, R. L. (1972). A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. Biochemistry 11:2378.

Paradis, H., Gaudreau, P., Brazeau, P., Langelier, Y. (1988). Mechanism of inhibition of Herpes simplex virus (HSV) ribonucleotide reductase by a nonapeptide corresponding to the carboxyl terminus of its subunit 2. The Journal of Biological Chemistry 263:16045-16050.

Parker, M. W., Blake, G. F. (1988). Crystal structure of manganese superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.4 Å resolution. Journal of Molecular Biology. 199:649-661.

- Parker, N. J., BEGLEY, C. G., FOX, R. M. (1991). Human M1 subunit of ribonucleotide reductase:cDNA sequence and expression in stimulated lymphocytes. *Nucleic Acids Research* 19:3741.
- Parkin, S. E., Chen, S., Ley, B. A., Mangravite, I., Edmondson, D. E., Huynh, B. h., Jr, J. m. B., (1998). Electron injection through a specific pathway determines the outcome of oxygen activation at the diiron cluster in the F208Y mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *Biochemistry* 37:1124-1130.
- Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A. E., Gimenez, M. N., Collins, M. D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:724-728
- Petersson, L., Gräslund, A., Ehrenberg, A., (1980). The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 255:6706-6712.
- Peyret, JL., Bayan, N., Joliff, G., Gulik,-Krzywicki, T., Mathieu, L., Shechter, E., Leblon, G. (1993). Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology* 9:97-109.
- Philipps, G., Clement, B., Gigot, C. (1995). Molecular characterization and cell cycle-regulated expression of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to the small subunit of ribonucleotide reductase. *FEBS Letters* 358:67-70.
- Plönzig, J., Auling, G. (1987). Manganese deficiency impairs ribonucleotide reduction but not DNA replication in *Arthrobacter species*. *Archives of Microbiology* 146:396-401.
- Pötsch, S., Drechsler, H., Liermann, B., Gräslund, A., Lassmann, G. (1994). *p*-Alkoxyphenols, a new class of inhibitors of mammalian R2 ribonucleotide reductase: possible candidates for antimelanotic drugs. *Molecular Pharmacology* 45:792-796.

Probst, H., Schiffer, H., Gekeler, V., Scheffler, K. (1989). Oxygen dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase *in vivo* and possible significance for replicon initiation Biochemical and Biophysical Research Communications 163:334-340.

Que, L. J., True, A. E. (1990) in Prog. Inorg. Chem. (Lippard, S. J., Ed.) John Wiley, Sons, New York, 97-200.

Reichard, P., Ehrenberg, A. (1983). Ribonucleotide reductase a radical enzyme. Science 221:514-519.

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

Reichard, P. (1993). The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 268:8383-8386.

Reichard, P., (1997). The evolution of ribonucleotide reduction. TIBS 22:81-85.

Richter, W., Hänel, F., Hilliger, M. (1985). Freeze-fracture observation of *Corynebacterium glutamicum*: the occurrence of an outer membrane-like structure and the influence of temperature on the cytoplasmic membrane. Journal of Basic Microbiology 25:527-536.

Rily, P. A. (1984). Hydroxyanisole: the current status, in *Hydroxyanisole:Recent Advances in Anti-melanoma Therapy* (Rily, P. A. ed.). IRL Press, Oxford, UK, 1-10.

Robins, M. J., Samano, M. C., Samano, V. (1995). Ribonucleotide reductase targets for chemotherapy; mechanistic aspects and biologically active agents. Nucleosides, nucleotides 14:485-493.

Rova, U., Goodtzova, K., Ingemarson, R., Behravan, G., Gräslund, A., Thelander L. (1995). Evidence by site-directed mutagenesis supports long-range electron transfer in mouse ribonucleotide reductase Biochemistry 34:4267-4275.

- Roy, B., Lepoivre, M., Decout J. L., L'homme, J., Fontecave, M. (1992). S-azidoadeninosine and ribonucleotide reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187:432-437.
- Rubin, H., Salem, J. S., Li, L.-S., Yang, F.-D., Mama, S., Wang, Z.-M., Fisher, A., Hamann, C. S., Cooperman, B. S. (1993). Cloning, sequence determination, and regulation of the ribonucleotide reductase subunits from *Plasmodium falciparum*: A target for antimalarial therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:9280-9284.
- Rustin, G. J., Stratford, M. R., Lamont, A., Bleehen, N., Philip, P. A., Howells, N., Watfa, R. R., Slack, J. A. (1992). Phase I study of intravenous 4-hydroxyanisole. *European Journal of Cancer* 28:1362-1364.
- Sauge-Merle, S., Lauthère, Jean-P., Covés, J., Le Pape, L., Ménage, S., Fontecave, M., (1997). Ribonucleotide reductase from the higher plant *Arabidopsis thaliana*: expression of the R2 component and characterization of its iron-radical center. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2:586-594.
- Schimpff-Weiland, G., Follmann, H., Auling, G. (1981). New manganese-activated ribonucleotide reductase found in Gram-positive bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 102:1276-1282.
- Schlegel, H. G. (1985). *Allgemeine Mikrobiologie*, 6 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 438-453.
- Scotti, C., Valbruzzi, A., Perrego, M., Galizzi, A., Albertini, A. M. (1996). The *Bacillus subtilis* ribonucleotide reductase is similar to the second class I NrdE/NrdF enzymes of *Enterobacteriaceae*. *Microbiology* 142:2995-3004.
- Sjöberg, B. M., Reichard, P., Graslund, A., Ehrenberg, A. (1978). The Tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 253:6863-6865.

- Sjöberg, B. M., Loeher, T. M., Sander-Loeher, J. (1982). Raman spectral evidence for a  $\mu$ -oxo bridge in the binuclear iron center of ribonucleotide reductase. *Biochemistry* 21:96-102.
- Sjöberg, B. M. (1994). The ribonucleotide reductase jigsaw puzzle: a large piece falls into place. *Structure* 2:81-100.
- Sjöberg, B. M. (1997) Ribonucleotide reductases- a group of enzymes with different metallosites. *Struct. Bond.* 88:139-173.
- Stallings, W. C., Patridge, K. A., Strong, R. K., Ludwig, M. L. (1985). The structure of manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* at 2.4 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* 260:16424-16432.
- Stubbe, J., Van der Donk, W. A. (1995). Ribonucleotide reductase: radical enzymes with suicidal tendencies. *The Journal of Biological Chemistry* 270:793-801.
- Stubbe, J., (1990a). Ribonucleotide reductases :*Adv. Enzymology* 63:349-419.
- Stubbe, J., Riggs-Gelasco, P. (1998). Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends in Biochemical Sciences* 23:438-443.
- Sun, X., Eliasson, R., Pontis, E., Andersson, J., Buist, G., Sjöberg, B.-M., Reichard, P. (1995). Generation of the glycy radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 270:2443-2446.
- Sun, X. Y., Harder, J., Krook, M., Jörnvall, H., Sjöberg, B. M., Reichard, P. (1993). A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: Nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:577-581.

Sun, X. Y., Ollagnier, S., Schmidt, P. P., Atta, M., Mulliez, E., Lepape, L., Eliasson, R., Gräslund, A., Fontecave, M., Reichard, P., Sjöberg, B. M. (1996). The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* is at glycine 681. *The Journal of Biological Chemistry* 271:6827-6831.

Suzuki, K. T. Kaneko, Komagata, K. (1981). Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31:131-138.

Sze, I. S.-Y., Mcfarlan, S. C., Spormann, A., Hogenkamp, H. P. C., Follmann, H. (1992). Possible new class of ribonucleotide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184:(2):1101-1107

Tauer, A., Benner, S. A. (1997). The B<sub>12</sub>-dependent ribonucleotide reductase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophila*: An evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:53-58.

Thaler, M., Diekmann, H. (1979). The effect of manganese deficiency on lipid content and composition in *Brevibacterium ammoniagenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 6: 379-387.

Thelander, L. (1974). Reaction mechanism of ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 249:4858-4862

Thelander, L., Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. *Annual Review of Biochemistry* 48:133-158.

Tomiyasu, I. (1982). Mycolic acid composition and thermally adaptive changes in *Nocardia asteroides*. *Journal of Bacteriology* 151:828-837.

Turk, S. R., Shipman, C., Drach, J. C. (1986) Selective inhibition of herpes simplex virus ribonucleotide reductase by derivatives of 2-acetylthiosemicarbazone. *Biochemical Pharmacology* 35:1539-1545.

Uhlen, U., Eklund, H., (1994). Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* 370:533-539.

Uhlen, U., Eklund, H. (1996). The ten-stranded  $\beta/\infty$  barrel in ribonucleotide reductase protein R1. *Journal of Molecular Biology* 262:358-369.

Voet, D., Voet, J. G. (1990). Formation of deoxyribonucleotides, p. 750-757, *Biochemistry*. John Wiley, Sons, New York.

Wagner, U., Werber, M. M., Hartman, J. R., Frolow, F., Sussman, J. (1989). Characterization of crystals of genetically engineered human manganese superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology* 206:787-788.

Webley, D. M., Duff, R. B., Anderson, G. (1962). The metabolism of iron-, zinc- and manganese deficient *Nocardia opaca*. *Journal of General Microbiology* 29:179-187.

Webley, D. M. (1960). The effect of deficiency of iron, zinc, and manganese on the growth and morphology of *Nocardia opaca*. *Journal of General Microbiology* 23:87-92.

Willing, A., Follmann, H., Auling, G. (1988a). Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme. *European Journal of Biochemistry* 170:603-611.

Willing, A., Follmann, H., Auling, G. (1988b). Nucleotide and thioredoxin specificity of the manganese ribonucleotide reductase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *European Journal of Biochemistry* 175:167-173.

Willing, A. (1986). Die Ribonucleotid reductase aus *Brevibacterium ammoniagenes* ein neuartiger Typ von Manganenzym. Dissertation, Universität Marburg.

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

Yang, F., Guizhen, L., Rubin, H. (1994). Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and cloning, expression, and purification of the large subunit. *Journal of Bacteriology* 176:6738-6743.

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

## ERKLÄRUNG

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

### DANKSAGUNG

Die experimentellen Arbeiten der vorliegende Dissertation wurden in der Zeit vom 1. Januar 1996 bis 6. Juni 1998 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Auling am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover durchgeführt. Ihm möchte ich an dieser Stelle für die gebotenen Arbeitsmöglichkeit in seiner Labor, die freundliche Unterstützung sowie die Hilfsbereitschaft und die fruchtbare Diskussion danken.

Herrn Prof. Dr. Diekmann danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Mikrobiologie und die Bereitschaft zur Discussion.

Herrn PD. Dr. Müller danke ich für die freundliche Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Frau Straßburg und Herrn Wunsch der anorganischen Chemie der Universität Hannover gilt mein besondere Dank für die ICP-MS-Analyse und ebenfalls danke ich Dr. Hubert Thole für die Unterstützung bei der Peptidsequenzierung, Dr. Sanjay Mishra für die Einführung in die 2D-Elektrophorese.

Von den Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie trifft mein besonderer Dank Herrn Dr. Plattner und Dr. J. Meens, die für jede Frage zur Verfügung standen.

Wulf Oehlmann gilt mein Dank für den Einstieg in die Welt der Mn-Ribonucleotide Reduktase, die vertiefung der Kenntnisse der Molekularbiologie und das Korrekturlesen.

Uhrich Gripenburg gilt mein Dank für die Anleitung zur Proteinreinigung und zur Benutzung von HPLC und die fruchtbare Diskussion.

Mein Dank gilt für die Zusammenarbeit Arbeit mit der Familie der Mn-Ribonucleotid-Reduktase Antje, Sahera, die die Leidenschaft der Labor 006 geteilt haben.

Ich danke der Familie des Instituts für Mikrobiologie für die freundliche Aufnahme, Hilfestellung. Ich möchte an dieser Stelle Frau Rischmüller, Herrn Schubert, Armgard,

## DANKSAGUNG

---

Christel, Detlef, Edzard, Haiming, Inge, Gengiz, Natascha, , Salwa, Sridevi, Maik, Matthias B., Matthias F., Matthias S., Ralf, Rolf, Veit, Yasser.

Mein Dank gilt Susanne für die Korrekturlesen.

Mein Dank gilt auf besonderer Weise meiner Mutter, meinem Vater, meinen Bruder, die sehr lange Zeit nicht sehen konnte.

---

## Lebenslauf

|                     |                         |
|---------------------|-------------------------|
| Name                | Abbouni                 |
| Vorname             | Bouziane                |
| Geburtsdatum        | 23.11.1963              |
| Geburtsort          | Sfisef (Sidi bel Abbes) |
| Staatsangehörigkeit | Algerisch               |

### Schulbesuch

|           |                                     |
|-----------|-------------------------------------|
| 1971-1977 | Grundschule: Ecole Ibnou Sina       |
| 1977-1981 | Hauptschule: C. E. M. AZZA A. E. K. |
| 1981-1984 | Gymnasium : Lycee AZZA A. E. K.     |
| 1984      | Baccalaureat (bestanden)            |

### Studium

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 1984-1987   | Universität Oran                      |
| Studienfach | Mikrobiologie (7 Semester studiert)   |
| Abschluß    | Diplome Etude Superieur Mikrobiologie |

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| 1987-1989   | Universität Tlemcen                 |
| Studienfach | Controle de Qualite et Analyse      |
| Abschluß    | Ing. Controle de Qualite et Analyse |

Thema meiner experimentellen Abschlußarbeit:  
Die Überwachung des Trinkwassersystems der Stadt Sidi Bel Abbes

|           |                                    |
|-----------|------------------------------------|
| 1990-1992 | Tätigkeit im Laboratoire d'hygiene |
|-----------|------------------------------------|

|            |                                |
|------------|--------------------------------|
| 1993-1994  | Erlernen der deutschen Sprache |
| 07.07.1994 | P. N. D. S. (bestanden)        |

|      |  |
|------|--|
| 1995 | Kenntnisprüfungen in Mikrobiologie,<br>Biochemie und Genetik |
|------|--|

|      |  |
|------|--|
| 1995 | Zulassung zur Promotion durch den<br>Fachbereich Biologie Hannover |
|------|--|

### Promotion

|                 |  |
|-----------------|--|
| 01.1996-06.1998 | Durchführung der experimentellen Arbeiten am Institut für Mikrobiologie der<br>Universität Hannover zur Hier vorliegenden Dissertation |
|-----------------|--|

Thema: Biochemische Charakterisierung der Ribonucleotid-Reduktase aus  
*glutamicum* im Vergleich zum Manganenzym aus *C. ammoniagenes*