



Doctoral Thesis

Isolierung der Ribonukleotid-Reduktase aus *Thermoplasma acidophila* Klonierung und Expression des Gens

Author(s):

Tauer, Andreas

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000961575> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 10683

**Isolierung der Ribonukleotid-Reduktase aus *Thermoplasma acidophila*.
Klonierung und Expression des Gens**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
eines Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

Andreas Tauer
Dipl. Chem. ETH
geboren am 23. Januar 1964 von Luzern (Schweiz)

angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. S. A. Benner, Referent
Prof. Dr. T. Leisinger, Korreferent
Zürich, 1994

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ribonukleosiddiphosphat-Reduktase aus dem thermoacidophilen Archaeobakterium *Thermoplasma acidophila* wurde gereinigt und partiell charakterisiert.

Das Enzym katalysierte die Reduktion von Adenosindiphosphat zu 2'-deoxy-Adenosindiphosphat in Gegenwart von Coenzym B12, 2'-deoxy-Guanosintriphosphat und 1,4-Dithio-DL-Threitol. Das Enzym weist ein Temperaturoptimum von 55°C auf und katalysiert den Tritium-Austausch ausgehend von 5'-[³H]-deoxy-Adenosylcobalamin auf Wasser. Diese auch für andere Coenzym B12-abhängige Ribonukleotid-Reduktasen typische Reaktion zusammen mit einem Molekulargewicht von 100'000 für das native Protein aus *Thermoplasma* liess auf eine Aehnlichkeit der untersuchten Reduktase zum Enzym aus *Lactobacillus leichmannii* schliessen.

Interne Aminosäure-Sequenzen wurden nach Bromcyan-Verdau des Proteins zusammen mit der N-terminalen Aminosäure-Sequenz des gereinigten Enzymes erhalten. Hiervon ausgehend wurden mit einer nicht-degenerierten 62 Basen langen Oligonukleotid-Probe genomische Genbanken in EMBL3 und partielle Genbanken in pUC18 nach dem Gen für die Ribonukleotid-Reduktase aus *Thermoplasma acidophila* untersucht. Das Gen wurde schlussendlich in pUC18 kloniert und sequenziert.

Die hieraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz stimmte mit den Sequenzen des N-Terminus und den erhaltenen Bromcyanfragmenten überein. Von Aminosäure 200 bis Aminosäure 600 konnte eine Sequenzidentität von 25% zu den eukaryontischen, eisenabhängigen Ribonukleotid-Reduktasen nachgewiesen werden. Diese homologe Region wurde als wichtiger Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung der Ribonukleotid-Reduktasen aus Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten im allgemeinen und der von Coenzym B12 abhängigen und eisenabhängigen Reduktasen im besonderen bewertet. Ausserhalb dieser Region konnten keine Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen festgestellt werden.

Um das Gen der Ribonukleotid-Reduktase aus *Thermoplasma acidophila* in *Escherichia coli* zu exprimieren, wurde genomische DNA mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pET23b kloniert. Die Expression des Gens unter der Kontrolle eines T7-Promotors erfolgte in BL21pLysS(DE3) nach Induktion für 4 Stunden bei 37°C. Aktive Ribonukleotid-Reduktase von *Thermoplasma acidophila*

konnte mit einer Ausbeute von 5 mg pro Liter in einer Drei-Schritt-Reinigung aus *Escherichia coli* isoliert werden.

SUMMARY

The ribonucleotide reductase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophila* was purified and partially characterized.

The enzyme was shown to catalyze the conversion of adenosine diphosphate to 2'-deoxy-adenosine diphosphate in presence of coenzyme B12, 2'-deoxy-guanosine triphosphate and 1,4-dithio-DL-threitol. It showed a temperature optimum of 55°C and catalyzed the exchange of tritium from 5'-[³H]-deoxyadenosyl cobalamin to water, a reaction that is typical for all coenzyme B12-dependent ribonucleotide reductases. Together with the estimated molecular weight of 100'000 a similarity to the coenzyme B12-dependent ribonucleotide reductases of the *Lactobacillus leichmannii* type was deduced.

Internal amino acid sequences were obtained from peptides after cyanogen bromide digestion of the ribonucleotide reductase together with the N-terminal amino acid sequence. A non-degenerate 62-mer oligonucleotide was used to screen genomic libraries in EMBL3 and subgenomic libraries in pUC18 for the gene of the ribonucleotide reductase from *Thermoplasma acidophila*. The gene was finally cloned in pUC18 and sequenced.

The derived amino acid sequence was in agreement with the priorly obtained N-terminal and internal amino acid sequences. It revealed from amino acid 200 to 600 a striking sequence identity of 25% to the eucaryotic, iron-dependent ribonucleotide reductases. This homology was regarded as conclusive evidence for a common ancestry of the enzymes from eubacteria, archaeobacteria and eucaryotes and for the evolutionary relatedness of the coenzyme B12 dependent and the iron-dependent ribonucleotide reductases. No sequence similarity could be detected for the N-terminal 200 amino acids and the C-terminal 250 amino acids of the protein to any other protein.

To express the protein in *Escherichia coli*, the gene was amplified from genomic DNA in a polymerase chain reaction and cloned into the expression-vector pET23b. The gene was expressed under control of the T7-promotor in the *Escherichia coli* strain BL21pLysS(DE3) for 4 hours at 37°C after induction. Active ribonucleotide reductase of *Thermoplasma acidophila* was purified from *Escherichia coli* with a yield of 5 mg per liter in a simple three step procedure.