

**Die Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase
von *Arthrobacter spec. Py1*, eine Flavin-abhängige
Vier-Komponenten-Monooxygenase**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Thomas Wolsch

geb. am: 27.08.1975 in: Weißwasser

Gutachter /in

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. R. G. Sawers
3. Prof. Dr. S. Fetzner

Halle (Saale), 10.9.2008

meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
<u>1.1. Die Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase von <i>Arthrobacter spec. Py1</i></u>	1
1.1.1. Pyrrol-2-carboxylat und dessen Abbau	1
1.1.2. Flavin-abhängige-Monooxygenasen	2
<u>1.2. Stress-induzierte Selenoproteine in anaeroben Bakterien</u>	11
1.2.1. Selenoproteine	11
1.2.2. Oxidativer Stress	13
1.2.3. Stressinduktion durch reaktive Stickstoffspezies.....	14
2. Material und Methoden	18
<u>2.1. Stämme und Plasmide</u>	18
<u>2.2. Anzucht von Bakterien</u>	19
2.2.1. Nährmedien	19
2.2.1.1. Medium für die Anzucht von <i>Arthrobacter spec. Py1</i> Hormann & Andreesen.....	19
2.2.1.2. Luria-Bertani-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) für <i>E. coli</i>	20
2.2.1.3. Medium für die Anzucht von <i>E. acidaminophilum</i> nach Zindel <i>et al.</i> (1988, modifiziert)	21
2.2.1.4. Medium für die Anzucht von <i>C. sticklandii</i> nach Uhde (1990, modifiziert).....	22
2.2.1.5. Medium für die Anzucht von <i>C. difficile</i> Medium nach Karasawa <i>et</i> <i>al.</i> (1995)	24
2.2.2. Anzucht von Bakterien	25
2.2.3. Stammhaltung	26
2.2.4. Wachstum von Bakterien mit ⁷⁵ Se.....	26
<u>2.3. Molekularbiologische Standardmethoden</u>	26
2.3.1. Vorbehandlung von Arbeitsmaterialien	26
2.3.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Arthrobacter spec. Py1</i>	27
2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.3.3.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> nach Birnboim und Doly (1979).....	28
2.3.3.2. Plasmidisolierung mit kommerziellen Kits	28
2.3.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arthrobacter spec. Py1</i>	29

2.3.4.1. RNA-Isolierung mittels <i>RNeasy Mini Kit</i> (Qiagen, Hilden)	29
2.3.4.2. RNA-Isolierung durch Tri Reagent	29
2.3.4.3. Qualitätskontrolle der RNA	29
2.3.5. Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen und Fällung von Nukleinsäuren	30
2.3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.3.7. PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	30
2.4.8. DNA-Sequenzierung	33
2.3.9. Analyse von Nukleinsäuren	34
2.3.9.1. Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.9.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.10. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.3.11. Verdau von DNA durch Endonukleasen	35
2.3.12. Dephosphorylierung von Vektoren	35
2.3.13. Ligation in pUC19, pASK-IBA3 und pASK-IBA5	36
2.3.14. Ligation in pGEM-T-Easy (Promega, Mannheim)	36
2.3.15. Mikrodialyse von Nukleinsäuren	36
2.3.16. Transformation von <i>E. coli</i>-Zellen	37
2.3.16.1. Herstellung elektrokompenter Zellen	37
2.3.16.2. Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)	37
2.3.17. northern-Hybridisierung	37
2.3.17.1. Markierung von DNA-Fragmenten mittels des <i>DIG-High Prime Kits</i> (Roche-Diagnostics, Mannheim)	37
2.3.17.2. Hybridisierung mit DIG markierten DNA-Sonden	38
2.3.18. Reverse Transkription (RT)	39
2.3.19. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch <i>primer extension</i>	39
<u>2.4. Proteinchemische Methoden</u>	40
2.4.1. Heterologe Expression von Proteinen mit <i>Strep-tag II</i>	40
2.4.1.1. Zellanzucht und Herstellung von Rohextrakten	40
2.4.1.2. Reinigung von <i>Strep-tag II</i> -Fusionsproteinen	40
2.4.2. Reinigung der nativen P2C MO aus <i>Arthrobacter spec.</i> Py1	41
2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)	41

2.4.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	41
2.4.5. Proteintransfer auf Membranen.....	42
2.4.6. Nachweis von <i>Strep</i> -tag II-Fusionsproteinen.....	43
2.4.7. Coomassie Färbung	44
2.4.8. Silber-Färbung nach Blum <i>et al.</i> (1987, modifiziert)	44
2.4.9. Aktivitätsfärbung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT).....	45
2.4.10. Trocknung von Polyacrylamid-Gelen	45
<u>2.5. 2D-Gelelektrophorese</u>	45
2.5.1. Zellernte und Proteinaufarbeitung.....	45
2.5.2. Isoelektrische Fokussierung.....	47
2.5.2.1. Rehydrierung der IPG-Streifen	47
2.5.2.2. Isoelektrische Fokussierung	47
2.5.2.3. Äquilibration der IPG-Streifen.....	48
2.5.3. Zweite Dimension mittels PAGE	49
<u>2.6. Bestimmung von Enzymaktivitäten</u>	50
2.6.1. Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität an der Sauerstoffelektrode	50
2.6.2. P2C-Bestimmung durch Reverse phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)	51
2.6.3. Bestimmung der Reduktaseaktivität	52
2.6.4. Bestimmung von H ₂ O ₂	53
2.6.5. Bestimmung der Flavin-Reduktion	54
2.6.6. Fluoreszenzmessung.....	54
<u>3. Experimente und Ergebnisse</u>	55
<u>3.1. Untersuchungen zur P2C-MO von <i>Arthrobacter spec. Py1</i></u>	55
3.1.1. Ausgangssituation	55
3.1.2. Identifizierung und Sequenzierung des fehlenden Genbereichs von <i>pycA</i>	56
3.1.3. Analyse der erhaltenen Gesamt-Sequenz von <i>Arthrobacter spec. Py1</i>	57
3.1.4. Nachweis der Transkripte des <i>pyc</i> -Genclusters	61
3.1.5. Heterologe Expression von von <i>pycA</i> , <i>pycB</i> , <i>pycC</i> und <i>pycD</i> in <i>E. coli</i>	63
3.1.6. Nachweis des P2C-induzierten Sauerstoffverbrauches durch PycA _C , PycB _C , PycC _C und PycD _C	65
3.1.7. Nachweis einer Cytochrom c-Reduktase-Aktivität für PycA _C und	

PycB _C	66
3.1.8. Nachweis des P2C-Abbaus durch PycA _C mittels RP-HPLC	66
3.1.9. Bestimmung des optimalen Verhältnisses von PycA _C zu PycB _C	70
3.1.10. Charakterisierung von PycB _C	71
3.1.10.1. Bestimmung des Temperatur und pH-Optimums	71
3.1.10.2. Nutzung verschiedener Elektronendonatoren und Flavin-Substrate durch PycB _C	72
3.1.10.3. Elektronenübertragung auf verschiedene terminale Elektronenakzeptoren.....	74
3.1.10.4. Einfluss verschiedener Metallionen auf die Flavin-Reduktase- Aktivität von PycB _C	75
3.1.7.5. Untersuchungen zur Interaktion von PycA _C und PycB _C	75
3.1.11. P2C-MO-Aktivität von nativ gereinigtem PycA	76
3.1.12. Untersuchungen zur Funktion von PycC und PycD beim P2C-Abbau ..	78
3.2. Nachweis von induzierten Selenoproteinen in <i>C. difficile</i>, <i>C. sticklandii</i> und <i>E. acidaminophilum</i> unter oxidativen- und Nitrit-Stressbedingungen	85
3.2.1. Stressinduktion bei <i>E. acidaminophilum</i>	86
3.2.2. Stressinduktion bei <i>C. difficile</i>	89
3.2.2. Stressinduktion bei <i>C. sticklandii</i>	92
4. Diskussion.....	96
4.1. Charakterisierung der P2C-MO von <i>Arthrobacter spec. Py1</i> als eine Flavin-abhängigen Vier-Komponenten-MO	96
4.1.1. Das <i>pyc</i> -Gencluster von <i>Arthrobacter spec. Py1</i>	96
4.1.2. Transkription und Regulation des <i>pyc</i> -Genclusters	109
4.1.3. PycB, eine Flavin-Reduktase.....	113
4.1.4. P2C-MO von <i>Arthrobacter spec. Py1</i> , der Prototyp einer neuen Unterfamilie der Flavin-abhängigen Mehrkomponenten-MO	116
4.2. Stress-induzierte Selenoproteine in anaeroben Bakterien	134
4.2.1. Wachstum von <i>C. difficile</i> , <i>C. sticklandii</i> und <i>E. acidaminophilum</i> unter Stressbedingungen.....	134
4.2.1. Die mögliche Funktion des Diamid-induzierten Selenoproteins von <i>C.</i> <i>sticklandii</i>	136
5. Zusammenfassung.....	142
6. Literaturverzeichnis	143

Anhang	163
Anhang A	163
Anhang B	168
Anhang C	169
Anhang D	170
Anhang E	171
Anhang F	172
Anhang G	173
Anhang H	174
Anhang I	175
Anhang J	176
Danksagung	
Lebenslauf	
Erklärung	

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCPIP	2,6-Dichlorophenol-indophenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FAD	Flavinadenindinukleotid
FeCN	Ferricyanid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
Glucose-DH	Glucose-Dehydrogenase
HOCl	hyperchlorige Säure
HOONO	Peroxosalpetrige Säure
IEP	isoelektrischer Punkt
KP	Kaliumphosphat
LB	Luria Bertani
MO	Monooxygenase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NO [•]	Stickoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
5-OHP	5-Hydroxy-pyrrol-2-carboxylat
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
Orf	<i>open reading frame</i>
P1, P2, P2	putative Promotoren des <i>pyc</i> -Genclusters
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P2C	Pyrrol-2-carboxylat
<i>p</i> -Hpa	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetat
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	<i>reverse phase-high performance liquid chromatography</i>
rpm	<i>round per minute</i>
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
spec.	<i>species</i>
SSC	Na-Citrat-NaCl (<i>sodium-citrate-sodium chloride</i>)
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid
UE	Untereinheit
x	eine unbestimmte Aminosäure

Organismen

<i>A. radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
<i>A. aminovorans</i>	<i>Aminobacter aminovorans</i> (syn. <i>Chelatobacter heintzii</i>)
<i>A. aurescens</i>	<i>Arthrobacter aurescens</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>B. cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. sticklandii</i>	<i>Clostridium sticklandii</i>
<i>E. acidaminophilum</i>	<i>Eubacterium acidaminophilum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. thermoglucosidasius</i>	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
<i>K. radiotolerans</i>	<i>Kineococcus radiotolerans</i>
<i>M. capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
<i>M. trichosporium</i>	<i>Methylococcus trichosporium</i>
<i>N. farcinica</i>	<i>Nocardia farcinica</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. pickettii</i>	<i>Pseudomonas pickettii</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. tetrahydrofuranoxidans</i>	<i>Pseudonocardia tetrahydrofuranoxidans</i>
<i>R. eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>R. korensis</i>	<i>Rhodococcus korensis</i>
<i>Sa. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>T. cutaneum</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>V. fischeri</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>V. harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>

Proteine

AamD	akzessorisches Protein der Alkene-Monooxygenase von <i>Xanthobacter</i> spec. Pyl
ABMO	Antibiotika-Biosynthese-Monooxygenase
Abm	putative Antibiotika-Biosynthese-Monooxygenase des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Pyl
ActVA-Orf6-MO	6-Deoxydihydrokalafungin-Monooxygenase von <i>Streptomyces coelicolor</i>
AhpC	Peroxidase von <i>Salmonella typhimurium</i>
AhpF	Disulfid-Reduktase von <i>Salmonella typhimurium</i>
BMM	bakterielle Multi-Komponenten-Monooxygenasen
BphS	Regulator der GntR-Familie von <i>Pseudomonas</i> spec. KKS102
BSA	Bovin serum albumin von <i>Bos taurus</i>

C ₁	Reduktase-Komponente der <i>p</i> -Hydroxyphenylacetat-Monooxygenase von <i>Acinetobacter baumannii</i>
C ₂	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetat-Monooxygenase von <i>Acinetobacter baumannii</i>
CatM	Regulator der GntR-Familie von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
CatR	Regulator der GntR-Familie von <i>Pseudomonas putida</i>
DmpK	akzessorisches Protein der Phenol-Monooxygenase von <i>Pseudomonas</i> spec. CF600
DmpM	akzessorisches Protein der Phenol-Monooxygenase von <i>Pseudomonas</i> spec. CF600
ElmH	Tetracenomycin (F1)-Monooxygenase von <i>Streptomyces olivaceus</i>
FadR	Regulator der GntR-Familie von <i>Escherichia coli</i>
Fre	Flavin-Reduktase von <i>Escherichia coli</i>
FRG _F	Flavin-Reduktase der Luciferase von <i>Vibrio fischeri</i>
FRP _H	Flavin-Reduktase der Luciferase von <i>Vibrio harveyi</i>
Hmp	Flavohämoglobin von <i>Escherichia coli</i>
HpaB	Reduktase-Komponente der <i>p</i> -Hydroxyphenylacetat-Monooxygenase von <i>Thermus thermophilus</i> HB8
HpaC _{Tt}	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetat-Monooxygenase von <i>Thermus thermophilus</i> HB8
HpaC _{Ec}	Reduktase-Komponente der <i>p</i> -Hydroxyphenylacetat-Monooxygenase von <i>Escherichia coli</i>
Mem	putative P2C-Transporter des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
MMO	Methan-Monooxygenase
MmoD	akzessorisches Protein der Methan-Monooxygenase von <i>Methylococcus capsulatus</i>
MmoB	akzessorisches Protein der Methan-MO von <i>Methylococcus capsulatus</i>
Nit	putative Nitrilase des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
NmoA	Nitrilotriacetat-Monooxygenase von <i>Aminobacter aminovorans</i>
NmoB	Flavin-Reduktase der Nitrilotriacetat-Monooxygenase von <i>Aminobacter aminovorans</i>
NROR	NADH-Rubredoxin-Oxidoreduktase
P2C-MO	Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase
Phi	akzessorisches Protein der Phenol-Monooxygenase von <i>Acinetobacter radioresistens</i>
PycA	Monooxygenase-Komponente der Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
PycA _C	C-terminales Strep-tag II-Fusionsprotein von PycA
PycB	Flavin-Reduktase-Komponente der Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
PycB _C	C-terminales Strep-tag II-Fusionsprotein von PycB
PycC	Helfer-Protein der Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
PycC _C	C-terminales Strep-tag II-Fusionsprotein von PycC
PycD	Helfer-Protein der Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
PycD _C	C-terminales Strep-tag II-Fusionsprotein von PycD
PyrA	Monooxygenase-Komponente der Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase von <i>Rhodococcus koreensis</i> Sedi2
PyrB	Flavin-Reduktase-Komponente der Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase von <i>Rhodococcus koreensis</i> Sedi2
PheA1	Phenol-Monooxygenase von <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> A7

PheA2	Reduktase-Komponente der Phenol-Monooxygenase von <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> A7
<i>p</i> -Hpa-MO	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetat-Monooxygenase
Rb	Rubredoxin
Reg	putativer Regulator des <i>pyc</i> -Gencluster des Stammes <i>Arthrobacter</i> spec. Py1
SOR	Superoxid-Reduktase
SmoA	Alkansulfonat-Monooxygenase von <i>Escherichia coli</i>
SmoB	Flavin-Reduktase-Komponente der Alkansulfonat-Monooxygenase von <i>Escherichia coli</i>
SsuD	Styren-Monooxygenase von <i>Escherichia coli</i>
SsuE	Flavin-Reduktase-Komponente der Styren-Monooxygenase von <i>Escherichia coli</i>
StyB	Flavin-Reduktase-Komponente der Styren-Monooxygenase von <i>Pseudomonas</i> spec. VLB120
TC-FDM	<i>two component monooxygenases with diffusible flavin cofactor</i>
T4moD	akzessorisches Protein der Toluol-2-Monooxygenase von <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1
TcbR	Regulator der GntR-Familie von <i>Pseudomonas</i> spec. P51
TcmH	Tetracenomycin (F1)-MO von <i>Streptomyces glaucescens</i>
TftC	Flavin-Reduktase-Komponente der 2,4,5-Trichlorphenol-MO von <i>Burkholderia cepacia</i>
TouD	akzessorisches Protein der Xylene-Monooxygenase von <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Vhb	Flavohämoglobin von <i>Vitreoscilla</i>

1. Einleitung

1.1. Die Pyrrol-2-carboxylat-Monooxygenase von *Arthrobacter spec. Py1*

1.1.1. Pyrrol-2-carboxylat und dessen Abbau

Pyrrol-2-carboxylat (P2C) ist ein Pyrrolderivat an dessen zweitem C-Atom sich eine Carboxylgruppe befindet. Es gehört zu den heteroaromatischen Verbindungen. Pyrrol ist Bestandteil vieler organischer Verbindungen wie z.B. der Tetrapyrrolringe des Hämoglobins, des Chlorophylls sowie der Corrinoide. Im Zuge des Abbaus dieser Substanzen kann es zur Entstehung von P2C kommen. Weiterhin stellt P2C ein Intermediat des Collagenabbaus der Mammalia dar (Heacock & Adams, 1973, 1974, 1975; Adams & Frank, 1980). Dabei wird 4-Hydroxyprolin, ein Hauptbestandteil des Collagens, von einer Aminosäureoxidase zu Δ^1 -Pyrrolin-4-hydroxy-2-carboxylat oxidiert, welches unter Wasserabspaltung spontan zu P2C reagiert. P2C wird anschließend über den Urin ausgeschieden.

Bisher wurden zwei Abbauwege von P2C nachgewiesen. Zum einen wird es durch eine P2C-Decarboxylase von *Bacillus megaterium* PYR2910 zu Pyrrol und CO₂ umgesetzt (Omura *et al.*, 1998). Zum anderen wurde die Oxidation von P2C für ein *Flavobacterium spec.*, einen *Vibrio spec. YC1* und *Paracoccus denitrificans* MK33 beschrieben, ohne dass jedoch weitere biochemische Untersuchungen vorgenommen wurden (Amphlett & Callely, 1969; Evans & Venables, 1990; Koenig & Andreesen, 1990). Im Gegensatz dazu konnten die beiden Enzyme, welche den oxidativen, einleitenden Schritt des P2C-Abbaus katalysieren, bei den Stämmen *Arthrobacter spec. Py1* und *Rhodococcus spec. Sedi2* gereinigt und als Flavin-abhängige-Monooxygenasen charakterisiert werden (Hormann, 1991; Hormann & Andreesen, 1991, 1994; Becker *et al.*, 1997). Von Hormann & Andreesen (1991) wurde ein P2C-Abbauschema postuliert, das in Abb. 1 dargestellt ist. Im einleitenden Schritt katalysiert eine P2C-MO die Hydroxylierung am C5-Atom des P2C zu 5-Hydroxy-pyrrol-2-carboxylat (5-OHP). Dieses Zwischenprodukt ist instabil. Nach Umlagerung durch Keto-Enol-Tautomerie zu Δ^2 -Pyrrolidone-2-carboxylat und anschließender hydrolytischer Spaltung durch eine Amidase entsteht ein En-Amin, das sich zu α -Iminoglutarat umlagert. Durch die spontane hydrolytische Abspaltung der Iminogruppe kommt es zur Bildung von α -Ketoglutarat, das in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist wird.

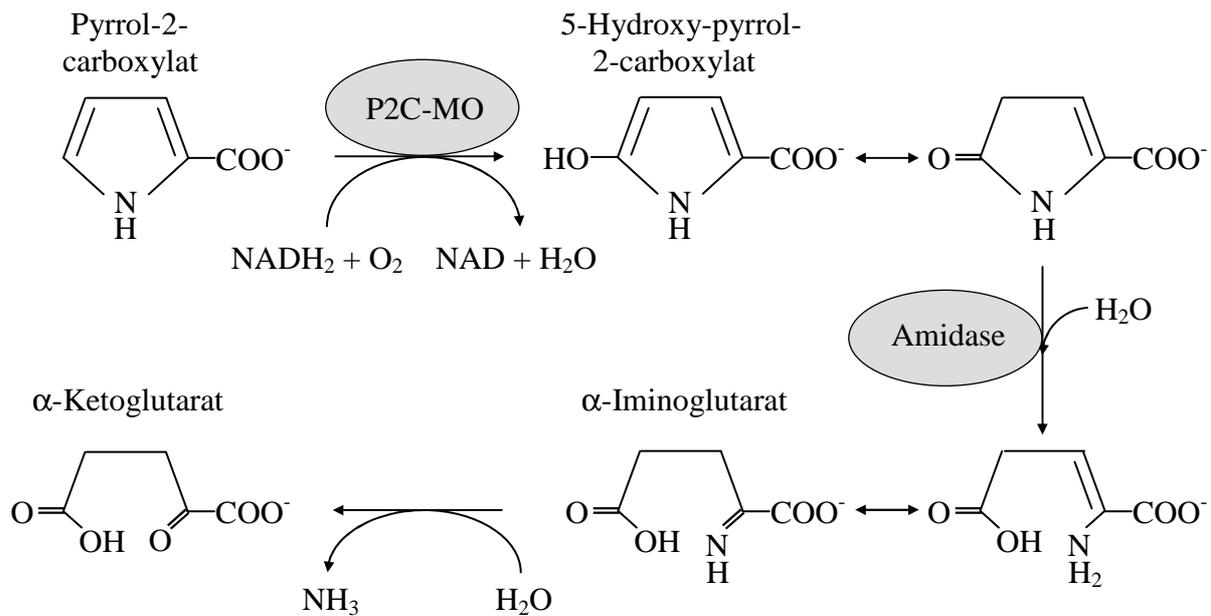


Abb. 1: Von Hormann & Andreesen (1991) postuliertes Abbauschema von P2C

Hier sei kurz angemerkt, dass aufgrund von 16S rRNA- und physiologischen Untersuchungen nunmehr der Stamm *Rhodococcus spec. Sedi2* als Vertreter der Art *Rhodococcus koreensis* (Yoon *et al.*, 2000; Lechner persönliche Mitteilung) erkannt wurde und deshalb im Folgenden als *R. koreensis* Sedi2 bezeichnet wird. Im Falle des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* konnte ebenfalls die 16S rRNA-Sequenz sequenziert werden (Wolsch, 2001), jedoch zeigten sich zu den Stämmen *A. nicotinovorans* und *A. histidinovorans* zu denen diese Sequenz die höchste Identität aufwies deutliche Unterschiede in der L-Rhamnose-, Maloat-, Formiat- und Nikotin-Nutzung, so dass es sich hier eventuell um eine neue Art handelt. Aus diesen Gründen wurde der Name *Arthrobacter spec. Py1* belassen.

1.1.2. Flavin-abhängige-Monooxygenasen

Monooxygenasen (MO) aktivieren den molekularen Sauerstoff durch einen Metall- bzw. organischen Cofaktor und katalysieren so die Übertragung eines Atoms des molekularen Sauerstoff auf das Substrat, wohingegen das andere zu H_2O reduziert wird (van Berkel *et al.*, 2006). Sauerstoff kann in Anwesenheit vieler Reduktionsmittel coexistieren, ohne dass es mit diesem reagiert (Ho *et al.*, 1995). Diese Eigenschaft ist darauf zurückzuführen, dass Sauerstoff hauptsächlich im Triplett-Zustand mit zwei ungepaarten Elektronen mit parallelem Spin vorliegt. Die meisten organischen Moleküle liegen dagegen im Singulett-Zustand vor. Eine Reaktion solcher Moleküle mit Sauerstoff widerspricht der Hundschen Regel und ist somit nicht möglich. Um eine Reaktion von molekularem Sauerstoff mit organischen

Molekülen zu ermöglichen, ist es nötig, diesen zu aktivieren. Dazu werden im Fall der Flavin-abhängigen-MO Flavine genutzt. Die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs durch eine Flavin-abhängigen-MO ist in Abb. 2 vereinfacht dargestellt. Dabei wird ein Protein-gebundenes Flavin mittels NAD(P)H reduziert. Das reduzierte Flavin reagiert im Anschluss daran mit molekularem Sauerstoff. Dabei kommt es zur Übertragung eines Elektrons vom reduzierten Flavin auf den Sauerstoff, wobei ein Superoxid-Semichinonpaar ausgebildet wird. Nach dem Kollaps dieses Paares entsteht ein C(4a)-Hydroperoxi-Flavin. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften des Sauerstoffs ist dieses Intermediat nicht stabil. Flavin-abhängige-MO sind jedoch in der Lage, das C(4a)-Hydroperoxi-Flavin zu stabilisieren und für die Hydroxylierung eines organischen Substrates zu nutzen (Entsch & van Berkel, 1995). Nach erfolgter Hydroxylierung verbleibt an der MO ein instabiles C(4a)-Hydroxi-Flavin, welches unter Wasserabspaltung zu oxidiertem Flavin reagiert. Wenn kein Substrat für die Hydroxylierung zur Verfügung steht, reagiert das C(4a)-Hydroperoxi-Flavin unter Abspaltung von H_2O_2 zu oxidiertem Flavin. Diese Reaktion wird als Entkopplung bezeichnet. In beiden Fällen ist der Reaktionszyklus geschlossen und es kann sich ein weiterer anschließen.

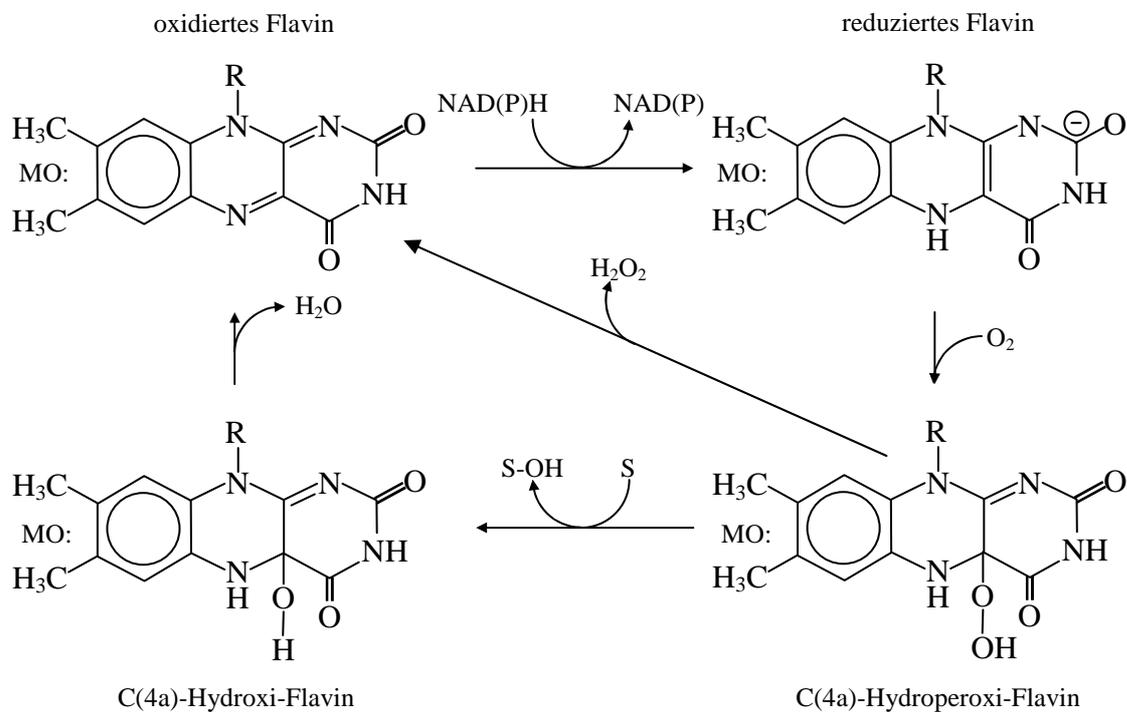


Abb. 2: Sauerstoffaktivierung mittels reduziertem Flavin durch eine Flavin-abhängige-MO

S und S-OH stehen für das Substrat und das Hydroxylierungsprodukt der MO. R steht für den Ribityldiphosphoadenosin-Rest.

Flavin-abhängige-MO werden aufgrund der Herkunft der Elektronen in interne und externe MO und aufgrund ihres Aufbaues in Ein- und Mehr-Komponenten-MO eingeteilt. Im Falle der seltenen internen MO wie z.B. der Lactat-MO erfolgt eine oxidative Decarboxylierung, wobei das Substrat ebenfalls als Elektronendonator dient (van Berkel & Müller, 2000). Interne MO spielen jedoch eine untergeordnete Rolle, da es bislang nur wenige bekannte Vertreter gibt. Im Gegensatz zu den internen MO sind die externen MO auf die Elektronen des NAD(P)H angewiesen.

Van Berkel *et al.* (2006) teilten die externen MO aufgrund ihrer Proteinsequenz und ihrer Struktur in sechs verschiedene Gruppen ein. In Tab. 1 ist diese Einteilung wiedergegeben. Auf die Gruppen B und F soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden, da sie für diese Arbeit nicht relevant sind.

Gruppe A bzw. die klassischen Ein-Komponenten-MO besitzen eine Rossmann-Falte, dessen N-terminal lokalisiertes Motiv GxGxxG charakteristisch für diese Proteine ist (Rossmann *et al.*, 1974; Wierenga *et al.*, 1983, 1985, 1986). Die Polypeptidkette bindet an den Ribityldiphosphoadeninrest des Flavins bzw. des NAD(P)H. Ein weiteres Flavin-Bindemotiv wurde von Eggink *et al.* (1990) identifiziert und in der Konsensussequenz TxxxxhΦhhGD formuliert. Diese, C-terminal lokalisierten, Aminosäuren binden an die Ribitylkette des Flavins. Eine Interaktion dieser beiden Motive mit dem Flavin konnte für die *p*-Hydroxybenzoat-MO von *Pseudomonas fluorescens* und die Phenol-MO von *Trichosporon cutaneum* mittels Strukturanalysen gezeigt werden (Wierenga *et al.*, 1979; Schreuder *et al.*, 1989; Enroth *et al.*, 1998). Eppink *et al.* (1997) beschrieben ein weiteres hoch konserviertes DG-Sequenzmotiv, dessen Aminosäuren in die Bindung des Pyrophosphatrestes von FAD und NADPH involviert sind. Weiterhin ist diesen Proteinen gemein, dass sie selbst in der Lage sind, das Flavin mittels NAD(P)H zu reduzieren. Speziell bei dem am besten untersuchten Protein dieser Gruppe, der *p*-Hydroxybenzoat-MO von *P. fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa*, konnte gezeigt werden (Entsch & van Berkel, 1995; Entsch *et al.*, 2005), dass die Bindung des Substrates *p*-Hydroxybenzoat als ein „Passwort“ fungiert, wie es Palfey *et al.* 1999 ausdrückten. Nach erfolgter Substrat-Bindung konnte man eine Konformationsänderung des Proteins beobachten, welche die Flavin-Reduktion ermöglichte. Dieser Mechanismus stellt einen Schutz vor der Entkopplung der Flavin-Reduktion dar, welcher jedoch in Folge der Bindung eines Substratanalogons versagt, da es nicht hydroxyliert werden kann. Typische Substrate der MO der Gruppe A sind aromatische Verbindungen mit einem aktivierenden Substituenten wie z.B. *p*-Hydroxybenzoat (Entsch &

Tab. 1: Einteilung externer MO nach van Berkel *et al.*, 2006

Gruppe	Prototyp	Reaktionen ¹⁾	Komponenten	Cofaktor	Coenzym	Bemerkungen
A	<i>p</i> -Hydroxybenzoat-MO	Hydroxylierung, Epoxylierung	1	FAD	NAD(P)H	FAD/NAD(P)-Bindedomäne
B	Cyclohexanon-MO	Baeyer-Villiger, N-Oxidation	1	FAD	NADPH	2 FAD/NAD(P)-Bindedomänen
C	Styrene-MO	Epoxidierung	2	-	FAD, NAD(P)H	1 FAD/NAD(P)-Bindedomäne
D	Luciferase	Licht Emission, S-Oxidation, Baeyer-Villiger	2 bzw. 3	-	FMN, NAD(P)H	Interaktion von Reduktase- und MO-Komponente
E	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetate-MO	Hydroxylierung	2	-	FMN, FAD, Riboflavin, NAD(P)H	Diffusion des Flavin-Cosubstrates
F	Tryptophan-7-Halogenase	Halogenierung	2	-	FAD, NAD(P)H	FAD/NAD(P)-Bindedomäne

¹⁾ die häufigste gefundene *in vivo*-Aktivität

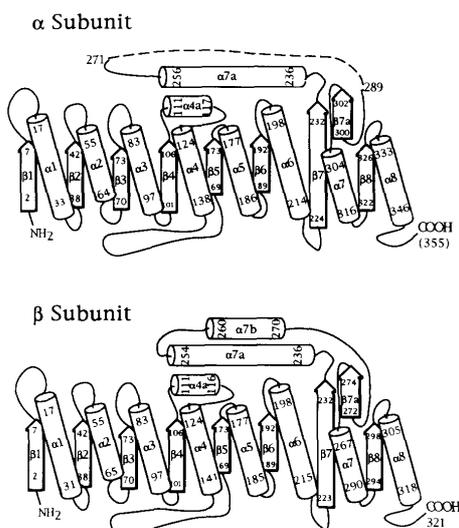
van Berkel, 1995; Entsch *et al.*, 2005), *p*-Hydroxyphenylacetat (Wierenga *et al.*, 1979; Schreuder *et al.*, 1989), Phenol (Enroth *et al.*, 1998) und 2,4-Dichlorophenol (Perkins *et al.*, 1990).

Die Flavin-abhängigen Mehr-Komponenten-MO der Gruppen C bis F bestehen aus mindestens zwei Protein-Komponenten, einer Flavin-Reduktase-Komponente und einer MO-Komponente. Die Flavin-Reduktase-Komponenten nutzen NAD(P)H für die Reduktion von Riboflavin, FMN und/oder FAD, welche im Folgenden von der MO-Komponente zur Substrat-Hydroxylierung genutzt wird.

Der Gruppe C gehören ausschließlich Styren-MO verschiedener *Pseudomonas*-Stämme an (Hartmans *et al.*, 1990; Di Gennaro *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000; O'Leary *et al.*, 2002). Ein gut untersuchtes Protein-System stellt die Styren-MO von *Pseudomonas spec.* VLB120 dar (Otto *et al.*, 2002). Die Reduktase-Komponente StyB ist in der Lage, Riboflavin, FMN und FAD mittels NADH zu reduzieren. Im Falle der Styren-MO von *Pseudomonas putida* S12 konnte weiterhin gezeigt werden, dass die beiden Protein-Komponenten während der Flavin-Reduktion interagieren. Die Reduktase-Komponente bindet dabei den Isoalloxazin-Rest und die MO-Komponente den Ribityldiphosphoadenin-Rest. Nach erfolgter Reduktion bindet die MO-Komponente den reduzierten Isoalloxazin-Rest, woraufhin es zur Substrathydroxylierung kommt (Kantz *et al.*, 2005). Aufgrund des Vorhandenseins einer Dinukleotid-Bindestelle (Rossmann-Faltung) könnten diese MO mit denen der Gruppe A verwandt sein (van Berkel *et al.*, 2006).

Die Vertreter der Gruppe D bestehen aus zwei bzw. drei Komponenten. Die am besten untersuchten Enzyme dieser Gruppe stellen die Luciferasen von *Vibrio harveyi* und *Vibrio fischeri* dar. Beide bestehen aus einer NAD(P)H-abhängigen Flavin-Reduktase und einer FMNH₂-abhängigen Luciferase-Komponente. Zusammen katalysieren sie die NAD(P)H-abhängige Hydroxylierung eines Aldehyds zu der entsprechenden Säure, wobei blaugrünes Licht emittiert wird. Die Flavin-Reduktase der Stämme *V. harveyi* und *V. fischeri* sind ca. 26 kDa groß und nutzen NADH und/oder NADPH für die Reduktion von FMN (Lei *et al.*, 1994, Inouye, 1994). Weitere Flavinsubstrate können nicht reduziert werden. Im Zuge der Flavin-Reduktion kommt es innerhalb der Luciferase-Systeme beider *Vibrio*-Stämme zur Interaktion der Reduktase- und der korrespondierenden Luciferase-Komponente, was sich darin äußert, dass sich die K_m -Werte der Reduktasen für die Substrate NAD(P)H und FMN ändern (Lei &

Tu, 1998; Jeffers & Tu, 2001). Weiterhin ändert sich in Anwesenheit der Luciferase das Reaktionsschema der Flavin-Reduktasen von einem Ping-Pong-Bisubstrat-Biprodukt- zu einem sequentiellen Mechanismus (Lei *et al.*, 1994). Die Luciferase-Komponente besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, deren Molekulargewicht ca. 40 und 35 kDa beträgt (Baldwin *et al.*, 1995). Die beiden Untereinheiten sind homolog (Baldwin *et al.*, 1979; Baldwin & Ziegler, 1992). Es wird vermutet, dass sie das Produkt einer Genduplikation darstellen. Der Größenunterschied ist auf die so genannte Protease-labile Domäne der α -Untereinheit zurückzuführen, welche der β -Untereinheit fehlt (Abb. 3; Holzman & Baldwin, 1980 a,b; Holzman *et al.*, 1980). Diese Region des Proteins ist sehr flexibel, so dass es bisher nicht gelang eine Struktur zu gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Konformation der entsprechenden Region der α -Untereinheit nach Bindung von FMNH₂ und Sauerstoff ändert, so dass sie nicht mehr durch Proteasen gespalten werden kann (Baldwin *et al.*, 1984; Aboukhair *et al.*, 1985). Scheinbar fungiert diese Region wie eine Klappe, um den Zugang des Lösungsmittels zum aktiven Zentrum zu unterbinden. Wenn kein Aldehyd zur Hydroxylierung zur Verfügung steht, könnte dies ein wirksamer Schutz vor der Entkopplung der Flavin-Reduktion darstellen. Beide Untereinheiten besitzen eine TIM-barrel-Faltung, welche für diese Gruppe von Proteinen typisch ist. Diese spezielle Faltung wurde als erstes bei der Triosephosphat-Isomerase beschrieben (Banner *et al.*, 1975) und besteht im Fall der Luciferasen aus acht β/α -Motiven (Abb. 3). Da α - und β -Untereinheit zu 32 % identisch sind, sollte man annehmen, dass jede Untereinheit ein aktives Zentrum besitzt. Dem ist jedoch nicht so. Vielmehr stellt die α -Untereinheit den katalytisch aktiven Teil des Proteins dar,



aus Baldwin *et al.* 1995

Abb. 3: Sekundärstruktur der α - und β -Untereinheit der Luciferasen

Die gestrichelte Linie der α -Untereinheit stellt die Protease-labile Region dar. Für sie existieren bisher keine Strukturdaten.

wohingegen die β -Untereinheit für eine hohe Umsatzrate notwendig ist. Als Homodimere besitzen beide Untereinheiten nur eine geringe Hydroxylierungs-Aktivität (Anderson *et al.*, 1980; Waddle *et al.*, 1987; Sinclair *et al.*, 1993). Es wird vermutet, dass die β -Untereinheit für die Konformation der α -Untereinheit wichtig ist (Baldwin & Ziegler; Baldwin *et al.*, 1995). In der Aminosäuresequenz dieser MO konnten keine Flavin-Bindemotive identifiziert werden.

Zur Gruppe E gehören unter anderen die *p*-Hydroxyphenylacetat-MO (*p*-Hpa-MO) von *Acinetobacter baumannii* (Chaiyen *et al.*, 2001) und *Escherichia coli* (Prieto & Garcia, 1994). Wie die Proteine der Gruppe A hydroxylieren Vertreter der Gruppe D vor allem aromatische Verbindungen mit einem bzw. mehreren aktivierenden Substituenten, wie z.B. Phenol (Duffner *et al.*, 2000 ; Kirchner *et al.*, 2003; van den Heuvel *et al.*, 2004), *p*-Nitrophenol (Kadiyala & Spain, 1998) und 2,4,5-Trichlorphenol (Xun, 1996; Gisi & Xun, 2003). Die Gruppe E kann wohl gleichgesetzt werden mit der Familie der *two-component nonheme flavin-diffusible monooxygenases* (TC-FDM), welche von Galan *et al.* (2000) offiziell beschrieben wurde. Demnach zeichnen sich die Vertreter dieser Familie dadurch aus, dass Reduktase- und MO-Komponente durch jeweils ein Gen kodiert werden. Weiterhin nutzt die Flavin-Reduktase-Komponente, NAD(P)H zur Reduktion von Riboflavin, FMN und/oder FAD (van Berkel *et al.*, 2006). Das reduzierte Flavin diffundiert anschließend zur korrespondierenden MO-Komponente, wo es zur Substrathydroxylierung genutzt wird. Das dritte Merkmal der TC-FDM-Familie ist, dass keine der beiden Komponenten einen Flavin-Cofaktor besitzt (Galan *et al.*, 2000). Jedoch konnte mit der Phenol-MO von *G. thermoglucosidasius* A7 bereits ein Vertreter der TC-FDM-Familie gefunden werden, bei dem die Reduktase-Komponente einen fest gebundenen Flavin-Cofaktor besitzt (Kirchner *et al.*, 2003). Dieser ist jedoch nicht wie im Falle der klassischen Ein-Komponenten-MO (Gruppe A) an die Aminosäuren des konservierten Sequenzmotivs GxGxxG gebunden, sondern wird vielmehr durch Wasserstoffbrücken von elf Aminosäureresten der N-terminalen Hälfte des Proteins fixiert (van den Heuvel *et al.*, 2004). Nur zwei dieser Aminosäuren (Gly₃₀, Thr₃₂) sind ebenfalls bei den Proteinen mit den höchsten Sequenzidentitäten zu finden. Aufgrund dieser Ausnahme sollte das letztgenannte Merkmal der TC-FDM-Familie vielleicht damit ersetzt werden, dass ein eventuell vorhandener Flavin-Cofaktor nicht über ein konserviertes Flavin-Bindemotiv fixiert ist. In der Regel binden die Vertreter der TC-FDM-Familie jedoch nur schwach oxidiertes Flavin. Infolge dessen kann man nach der Reinigung keinen Flavin-Cofaktor nachweisen.

Die Reduktasen dieser interessanten Gruppe von Proteinen unterscheiden sich stark in ihrer Größe. So sind die meisten ca. 18 kDa groß (Galan *et al.*, 2000). Jedoch stellen die Flavin-Reduktasen der *p*-Hpa-MO von *A. baumannii* und die der Nitrilotriacetat-MO von *Aminobacter aminovorans* eine Ausnahme dar. Ihre Größe beträgt ca. 32 und 36 kDa (Uetz *et al.*, 1992; Chaiyen *et al.*, 2001). Einzigartig, innerhalb dieser Familie, ist, dass diese beiden Flavin-Reduktasen durch die jeweiligen Substrate der korrespondierenden MO aktiviert werden (Knobel *et al.*, 1996; Chaiyen *et al.*, 2001). Die MO-Komponenten der TC-FDM-Familie sind zwischen 40 kDa (*p*-Hpa-MO von *P. putida*) und 58 kDa groß (2,4,5-Trichlorphenol-MO von *Burkholderia cepacia* AC1100) und besitzen in der Aminosäuresequenz ebenfalls keinerlei konservierte Flavin-Bindemotive (Arunachalam *et al.*, 1992; Xun, 1996).

Durch die Diffusion des Flavins, das in der TC-FDM-Familie meist die Funktion eines Cosubstrates innehat, ist jedoch die Gefahr der Entkopplung der Flavin-Reduktion von der Hydroxylierung gegeben. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Flavin-Reduktase eine höhere Affinität zum oxidierten und die MO-Komponente zum reduzierten Flavin-Cosubstrat besitzt (Louie *et al.*, 2003; Sucharitakul *et al.*, 2007). Dadurch ist ein effizienter Austausch des Flavins zwischen Reduktase- und MO-Komponente möglich. Weiterhin konnte *in vitro* festgestellt werden, dass sich die Entkopplung der Flavin-Reduktion ebenfalls dadurch einschränken lässt, indem die MO-Komponente im Überschuss vorliegt (Becker *et al.*, 1997). Ein weiterer interessanter Aspekt der TC-FDM-Familie ist, die Fähigkeit verschiedener Vertreter, das Flavin-C(4a)-Hydroperoxid in Abwesenheit eines möglichen Substrates stabilisieren zu können (Alfieri *et al.*, 2007). So befindet sich dieses Intermediat im Falle der *p*-Hpa-MO von *A. baumannii* in einer hydrophoben Tasche, so dass ein Kontakt mit dem Sauerstoff enthaltenen Medium nicht möglich ist. S. H. Kim *et al.* (2007) konnten mittels Kristallisierung der *p*-Hpa-MO von *Thermus thermophilus* HB8 einen Aminosäurerest (Arg₁₀₀) identifizieren, der das Flavin-C(4a)-Hydroperoxid so lange stabilisiert, bis das Substrat bindet.

Nach bisherigen Erkenntnissen ist die P2C-MO von *Arthrobacter spec.* Py1 in die Gruppe A der Flavin-abhängigen-MO einzuordnen. So konnte von Hormann & Andreesen (1994) ein Protein bis zur scheinbaren Homogenität gereinigt werden, das ein Molekulargewicht von 54 kDa besaß. Das Protein konnte durch seine NADH-abhängige Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität und dem NADH-, FAD- und P2C-abhängigen Sauerstoffverbrauch als Flavin-abhängige-MO charakterisiert werden. Es zeichnete sich weiterhin durch eine Gelbfärbung

aus, welche auf ein nicht kovalent gebundenes Flavin zurückzuführen war, das während der Reinigung des nativen Proteins dissoziierte. Die schwache Bindung wurde später durch Identifizierung und Sequenzierung der N-terminal codierenden DNA-Sequenz des Gens der P2C-MO *pycA* auf das Fehlen des Flavin-Bindemotivs GxGxxG zurückgeführt (Wolsch, 2001). Die bis zum Beginn dieser Arbeit bekannte abgeleitete Aminosäuresequenz der P2C-MO zeigte jedoch die höchsten Identitäten zu Vertretern der Mehr-Komponenten-MO, speziell zur Gruppe E (Tab. 1). Im Gegensatz dazu konnte die P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2 durch die biochemische Charakterisierung und abgeleitete Aminosäuresequenz der isolierten Gene (Becker *et al.*, 1997; B. Thiemer und K. Schmitz, unveröffentlichte Daten) in die Gruppe der TC-FDM-Familie eingeordnet werden.

Es stellte sich die Ausgangsfrage zu dieser Arbeit: Warum ist die P2C-MO von *Arthrobacter* spec. Py1 mit nur einer Komponente in der Lage, die gleiche Reaktion wie das entsprechende Enzym aus *R. koreensis* Sedi2 zu katalysieren? Auch das Fehlen des GxGxxG-Motifs der P2C-MO von *Arthrobacter* spec. Py1 warf Fragen auf. Stellt dieses Enzym eine Ausnahme dar, so dass dieses Motiv C-terminal lokalisiert ist? Könnte es sich bei der P2C-MO von *Arthrobacter* spec. Py1 um ein Fusionsprotein von MO und Reduktase handeln? Durch die vollständige Isolierung des *pycA*-Gens, dessen heterologe Expression in *E. coli* und die weitere Charakterisierung des entstehenden *Strep*-tag II-Fusionsproteins sollte es möglich sein, mehr Informationen über die MO von *Arthrobacter* spec. Py1 zu erhalten. Um diese Fragen zu klären war es auch wichtig, die in Nachbarschaft zu *pycA* liegenden Gene zu identifizieren.

1.2. Stress-induzierte Selenoproteine in anaeroben Bakterien

1.2.1. Selenoproteine

Selen wurde 1817 von Jöns Jakob Berzelius im Bleikammerschlamm entdeckt und stellt ein rotes amorphes Pulver dar. Es tritt jedoch ebenfalls schwarz glasig und grau metallisch in Erscheinung (Wiberg, 2007). Es wurde lange Zeit nur als Gift angesehen (Franke, 1934). Erst 1954 wurde von Pinsent (1954) die Bedeutung des Selens als Spurenelement beim Wachstum verschiedener Bakterien erkannt. 1973 waren drei Selenoproteine bekannt, zwei bakterielle: die Formiat-Dehydrogenase und die Glycin-Reduktase, sowie eine Glutathion-Peroxidase der Mammalia. In diesen Proteinen ist das Selen über ein Selenocystein integriert. Erstaunlich war, dass das Selenocystein als 21. Aminosäure durch das eigentliche Stop-Codon TGA codiert wird (Heider & Böck, 1992). Der Hauptunterschied zwischen Selenocystein und Cystein ist der niedrigere pK_a -Wert der Selenolgruppe ($pK_a=5,2$) im Gegensatz zur Thiolgruppe des Cysteins ($pK_a=8,3$; Huber & Criddle, 1967). So liegt die Selenolgruppe in Selenoproteinen unter physiologischen Bedingungen als Selenolat vor, wohingegen Cysteine in Proteinen nicht dissoziiert vorliegen. Weiterhin resultiert eine Differenz im Redoxpotential von Cystein-Cystein-Paaren (-233 mV gg. eine Normalwasserstoffelektrode) und Selenocystein-Selenocystein-Paaren (-488 mV gg. eine Normalwasserstoffelektrode) von ca. 250 mV im Falle des Thioredoxins Trx-1 von *E. coli* (Jacob *et al.*, 2003). Durch diese Eigenschaften resultieren eine Erhöhung der für die Reduktion in Frage kommenden Substraten sowie ein höherer pH-Bereich in dem dieses Protein aktiv ist (Gromer *et al.*, 2003).

Seit 1973 konnten weitere Selenoproteine identifiziert und zum Teil charakterisiert werden. In Tab. 2 sind eine Zusammenstellung bakterieller Selenoproteine und deren Funktion wiedergegeben. Auffällig ist, dass viele Proteine an Redox-Vorgängen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde in Betracht gezogen, dass es in Bakterien Proteine geben könnte, die selektiv unter Stressbedingungen induziert werden. In der oxidativen Stressantwort von *E. acidaminophilum* ist beispielsweise ein Selen-haltiges Peroxiredoxin beteiligt und im Falle der Mammalia vier verschiedene Selen-haltige Peroxidasen.

Tab. 2: Bakterielle Selenoproteine

Bakterium	Protein	Größe	Referenz
<i>C. sticklandii</i> <i>E. acidaminophilum</i>	GrdA, Selenoprotein der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase	17 kDa	Turner & Stadtman, 1973; Lübbers & Andreesen, 1993
<i>Moorella</i> <i>thermoaceticum</i>	Formiat-Dehydrogenase	96 kDa	Yamamoto <i>et al.</i> , 1983
<i>E. acidaminophilum</i>	PrpU, 10 kDa Selenoprotein unbekannter Funktion	10 kDa	Wagner, 1997
<i>Methanococcus</i> <i>thermoautotrophicum</i>	HdrA, Heterodisulfid-Reduktase	72 kDa	Wilting <i>et al.</i> , 1997
<i>Methanococcus</i> <i>voltae</i>	VhuD, VhuU, F ₄₂₀ -nicht reduzierende Hydrogenase	15 und 4 kDa	Wilting <i>et al.</i> , 1997
<i>Methanococcus</i> <i>voltae</i>	FruA, F ₄₂₀ -reduzierende Hydrogenase	44 kDa	Wilting <i>et al.</i> , 1997
<i>Methanopyrus</i> <i>kandleri</i>	FwuB, Formylmethanofuran- Dehydrogenase	49 kDa	Vorholt <i>et al.</i> , 1997
<i>E. acidaminophilum</i>	GrdF, Selenoprotein B der Sarcosin- Reduktase	47 kDa	Sonntag, 1998
<i>E. acidaminophilum</i>	GrdH, Selenoprotein B der Betain- Reduktase	45 kDa	Sonntag, 1998
<i>E. acidaminophilum</i>	PrpU, putatives redoxaktives Protein	11 kDa	Andreesen <i>et al.</i> , 1999
<i>Desulfovibrio</i> <i>baculatum</i>	HydV, große UE der NiFeSe- Hydrogenase	49 kDa	Garcin <i>et al.</i> , 1999
<i>C. sticklandii</i>	PrdB, Prolin-Reduktase	26 kDa	Kabisch <i>et al.</i> , 1999
<i>E. acidaminophilum</i>	GrdB, Selenoprotein B der Glycin- Reduktase	47 kDa	Wagner <i>et al.</i> , 1999
<i>E. acidaminophilum</i>	FdhA, Formiat-Dehydrogenase	96 kDa	Gräntzdörffer, 2000
<i>E. acidaminophilum</i>	SelD, Selenophosphat-Synthetase	40 kDa	Gursinsky <i>et al.</i> , 2000
<i>E. acidaminophilum</i>	PrxU, Peroxiredoxin	22 kDa	Söhling <i>et al.</i> , 2001
<i>Methanococcus</i> <i>jannaschii</i>	Formylmethanofuran-Dehydrogenase	29 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004
<i>Methanococcus</i> <i>jannaschii</i>	HesB-like Protein	11 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004
<i>Methanococcus</i> <i>jannaschii</i>	Heterodisulfid-Reduktase	72 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004
<i>Treponema denticola</i>	Thioredoxin	12 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004
<i>Treponema denticola</i>	Gluthathion-Peroxidase	18 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004
<i>Geobacter</i> <i>sulfurreducens</i>	Prx-like Thiol:Disulfid Oxidoreduktase	26 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004
<i>Campylobacter jejuni</i>	SelW-like Protein	10 kDa	Kryukov & Gladyshev, 2004

1.2.2. Oxidativer Stress

Die Hauptursache für oxidativen Stress in Bakterien sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxidanion, H_2O_2 und Hydroxylradikal. Die ROS spielen ebenfalls eine Hauptrolle bei der Immunabwehr, da sie beispielsweise in Phagozyten zur Bekämpfung phagozytierter Mikroorganismen sezerniert werden (Fang, 2004). Sie entstehen durch Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff wie in Abb. 4 dargestellt ist. Dabei ist festzustellen, dass alle Reaktionen thermodynamisch begünstigt sind, außer dem initialen Reaktionsschritt vom Sauerstoff zum Superoxidanion. Um diesen Schritt zu ermöglichen, bedarf es eines stärkeren Reduktionsmittels, wie z.B. ein reduziertes Flavin oder Hydrochinon (Ho *et al.*, 1995).

Zur Entgiftung der ROS besitzen Bakterien verschiedene Proteine, wie z.B. die Superoxid-Dismutase, Katalase und Peroxidasen, deren Reaktionen in Abb. 4 gezeigt sind (Ho *et al.*, 1995; Aguirre *et al.*, 2005). Einen Teil dieser Proteine konnten inzwischen ebenfalls bei anaerob lebenden Bakterien identifiziert und charakterisiert werden. So konnte schon 1974 eine Superoxid-Dismutase-Aktivität in *Clostridium thiosulfatophilum* und *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden (Hewitt & Morris, 1975). Da infolge der Superoxid-Dismutase und Katalase ebenfalls Sauerstoff entsteht, bergen diese Enzyme wiederum Risiken für die anaerob lebenden Bakterien. Dieses Problem tritt dagegen bei der Entgiftung von Superoxid durch die Superoxid-Reduktase nicht auf (Jenney *et al.*, 1999). Das Reaktionsschema ist in Abb. 5 kurz wiedergegeben. So wird von der Superoxid-Reduktase das Superoxid zu Wasserstoffperoxid reduziert, welches im Anschluss daran durch ein

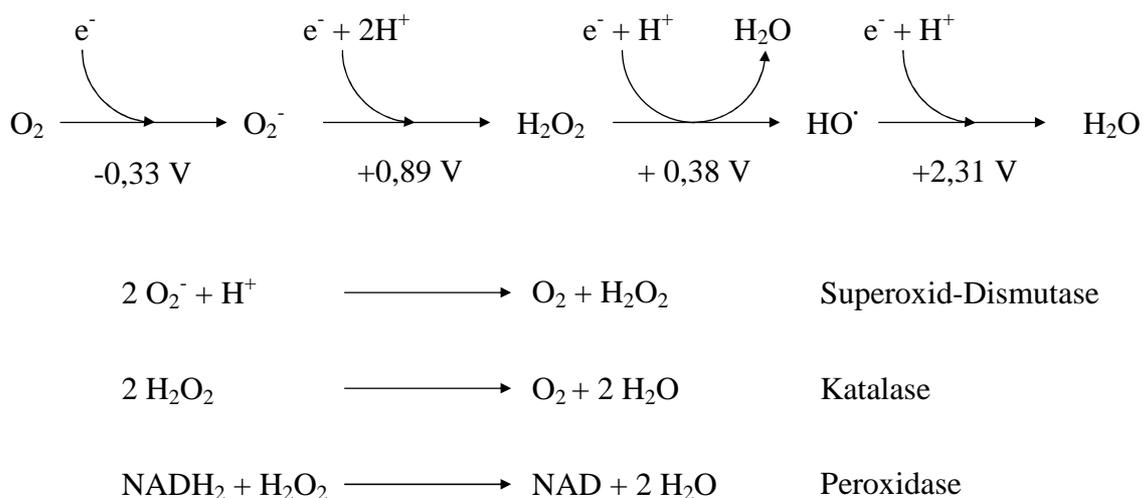


Abb. 4: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch die schrittweise Reduktion zu Wasser und deren Entgiftung

Unter den Pfeilen sind die Reduktionspotentiale nach Ho *et al.* (1995) der einzelnen Schritte gegen eine Normal-Wasserstoffelektrode aufgeführt.

Rubrerythrin zu Wasser umgesetzt wird. Die Elektronen werden von einem Rubredoxin bereitgestellt, welches wiederum durch die NADH-Rubredoxin-Oxidoreduktase reduziert wird (Weinberg *et al.*, 2004). Alternativ zum Rubredoxin kann die H_2O_2 -Reduktion von NADH-Peroxidasen katalysiert werden (Jenney *et al.*, 1999).

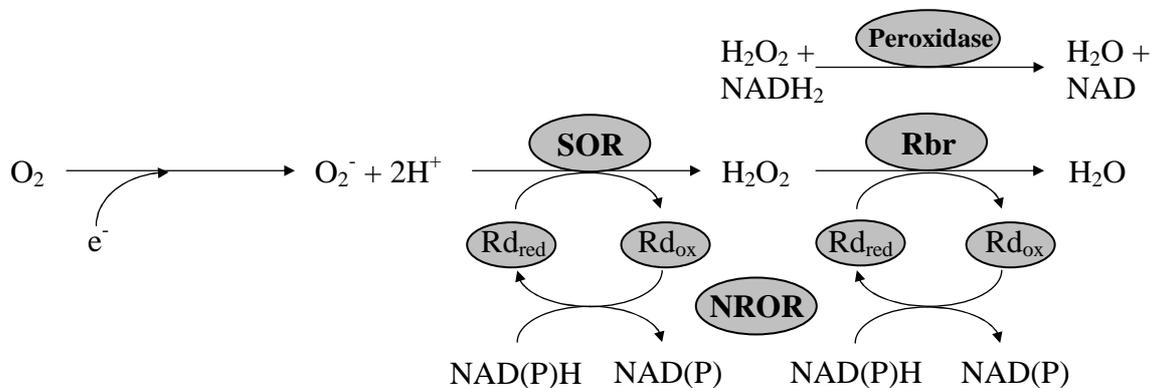


Abb. 5: Entgiftung des Superoxidanions durch das Superoxidanion-Reduktase-System in anaeroben Bakterien nach Weinberg *et al.* (2004)

Das Superoxidanion wird durch die Superoxidanion-Reduktase zu H_2O_2 reduziert, das anschließend durch ein Rubrerythrin bzw. eine NADH-Peroxidase zu Wasser umgesetzt wird. SOR, Superoxidanion-Reduktase; Rbr, Rubrerythrin; Rd_{red} , Rd_{ox} , reduziertes und oxidiertes Rubredoxin; NROR, NAD(P)H-Rubredoxin Oxidoreduktase

1.2.3. Stressinduktion durch reaktive Stickstoffspezies

Neben den ROS zählen die reaktiven Stickstoffspezies (RNS) zu den wichtigsten Abwehrmechanismen der ersten Immunantwort des Menschen gegen pathogene Invasoren. Sie werden, wie die ROS, in die Phagosomen der Phagozyten sezerniert (Fang, 2004). Aus diesem Grund sind die Resistenzmechanismen von pathogenen Mikroorganismen gegen RNS ebenfalls wichtige Virulenzfaktoren, deren Erforschung eine große Bedeutung in der Medizin zukommt. Die Entstehung der RNS innerhalb der Phagosomen wird vor allem durch die Aktivität der Stickoxid-Synthetase eingeleitet (Fang, 2004). Die Entstehung von NO^{\cdot} , Nitrit, Stickstoffdioxid und Nitrat erfolgt im Anschluss spontan durch den Stoffwechsel des Bakteriums. Weiterhin können in Anwesenheit des Superoxidanions hypochlorierte Säure (HOCl), Peroxynitrit (ONOO^{\cdot}), Distickstofftrioxid (N_2O_3) und Peroxosalpetrige Säure (HOONO) entstehen (Pacher *et al.*, 2007).

Eine wichtige Gruppe der RNS-induzierten Proteine der Stressantwort sind die Flavohämoglobine. Diese Enzyme setzen NO^{\cdot} anaerob zu N_2O und aerob zu NO_3^- um (Abb. 6). Die Flavohämoglobine werden in zwei Unterfamilien eingeteilt (R. K. Poole, 2005). Der

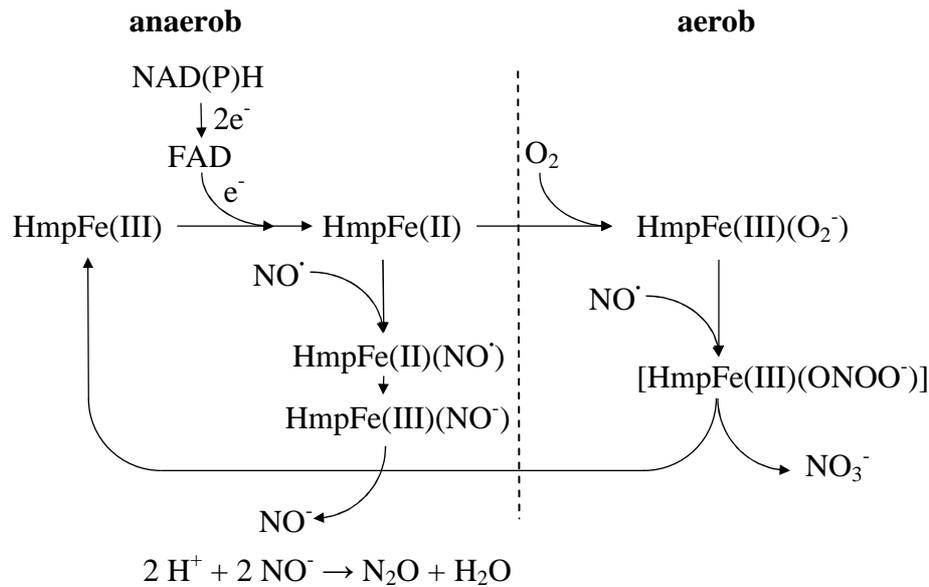


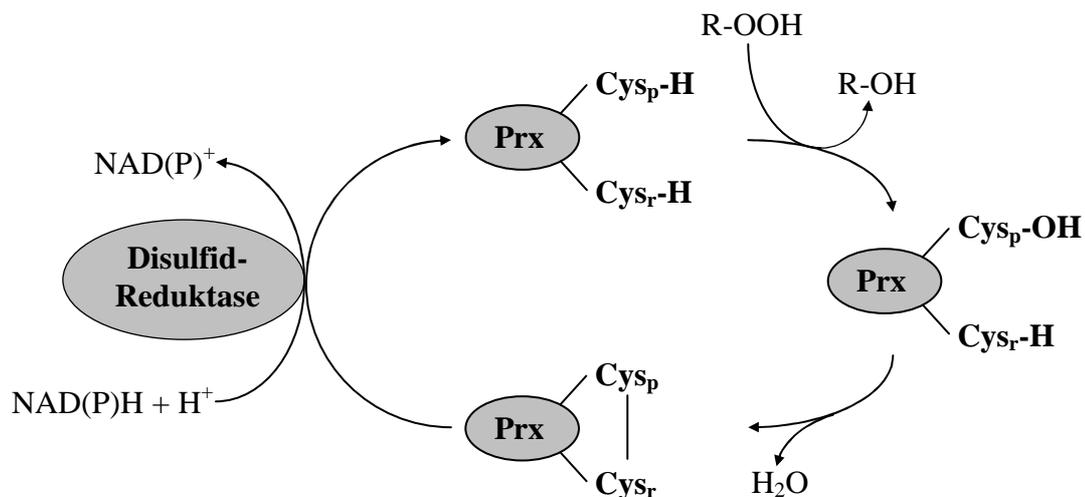
Abb. 6: Entgiftung des NO^\bullet durch Flavohämoglobine unter anaeroben und aeroben Bedingungen nach S. O. Kim *et al.*, 1999

Das HmpFe(III) wird durch NAD(P)H zu HmpFe(II) reduziert. Unter aeroben Bedingungen kommt es zur Bindung von Sauerstoff und NO^\bullet zur Ausbildung des $[\text{HmpFe(III)(ONOO}^\bullet)]$ -Intermediates woraus NO_3^- abgespalten wird. Unter anaeroben Bedingungen bindet NO^\bullet direkt an HmpFe(II) . Durch eine Elektronenübertragung vom Fe(II) kommt es zur Ausbildung von $\text{HmpFe(III)(NO}^\bullet)$, woraus NO^\bullet abgespalten wird. Zwei NO^\bullet und zwei H^+ reagieren im Anschluss spontan zu N_2O und H_2O .

Prototyp der ersten Unterfamilie stellt Vhb aus *Vitreoscilla* dar (Dikshit *et al.*, 1990). In diesem Proteinsystem sind die Reduktase- und die Hämoglobin-Funktion auf zwei Peptidketten lokalisiert. Aufgrund der Coelution bei der Reinigung der NADH-Methämoglobin-Reduktase mit dem homodimeren Hämoglobins, kann von einer Interaktion der beiden Untereinheiten ausgegangen werden (Gonzales-Prevatt & Webster, 1980; Webster, 1987). Die Proteine der zweiten Unterfamilie bestehen aus einer N-terminalen Häm-Domäne und einer C-terminalen Domäne, welche hohe Identitäten zu Ferredoxin-NADPH-Reduktasen aufweist. Ein gut untersuchtes Protein dieser Gruppe stellt das Flavohämoglobin Hmp von *E. coli* dar (Hausladen *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 2001). Dessen C-terminale Domäne besitzt eine NAD(P)H und eine FAD-Bindestelle. Die Elektronen des NAD(P)H werden auf das Flavin übertragen. Durch die Übertragung eines Elektrons auf den Hämoglobin-Cofaktor wird das Fe(III) zu Fe(II) reduziert. Unter aeroben Bedingungen reagiert Sauerstoff mit der Hämgruppe zum $\text{HmpFe(III)(O}_2^\bullet)$, welches im Anschluss mit NO^\bullet zu NO_3^- reagiert (Hausladen *et al.*, 1998, Hausladen *et al.*, 2001). Unter anaeroben Bedingungen wird NO^\bullet unter Ausbildung eines $\text{HmpFe(II)(NO}^\bullet)$ -Komplexes gebunden. Anschließend wird ein Elektron vom Fe(II) auf das NO^\bullet übertragen wodurch $\text{HmpFe(III)(NO}^\bullet)$ entsteht. NO^\bullet wird

daraufhin abgespalten. Im Anschluss reagieren spontan zwei NO^- mit zwei H^+ zu N_2O und H_2O (Hausladen *et al.*, 1998; S. O. Kim *et al.*, 1999).

Eine weitere wichtige Gruppe von Enzymen, welche an der Detoxifizierung von RNS und ROS wie z.B. H_2O_2 , organische Hydroperoxide und Peroxynitrit beteiligt sind, stellen die Peroxiredoxine dar (L. B. Poole, 2005). Das gut untersuchte Peroxiredoxin-System von *Salmonella typhimurium* besteht aus der Peroxidase AhpC und der Disulfid-Reduktase AhpF (Poole *et al.*, 2000). Das eigentliche Peroxiredoxin stellt ein Dimer dar. Jede der beiden Untereinheiten steuert einen Cystein-Rest zum redoxaktiven Zentrum bei, welches mit einem Peroxid reagiert (Abb. 7). Das peroxidative Cystein (Cys_p) wird dabei zur Sulfonsäure oxidiert und kondensiert im Anschluss mit dem *resolving* Cystein (Cys_r) der anderen Untereinheit. Das entstehende Disulfid wird anschließend von einer NAD(P)H-abhängigen, Flavin-haltigen Disulfid-Reduktase wie der AhpF wieder regeneriert (Wood *et al.*, 2003). In Bakterien, die kein homologes Protein zu AhpF besitzen kann die Regeneration der Peroxiredoxins durch das Thioredoxin-System erfolgen (L. B. Poole, 2005).



Poole, 2005

Abb. 7: Reaktionsschema des Peroxiredoxin-Systems

Das Peroxiredoxin ist durch Prx und das katalytisch aktive peroxidative Cystein als Cys_p und das *resolving* Cystein mit Cys_r dargestellt.

Es ist schon länger bekannt, dass anaerobe Bakterien trotz ihrer normalen anaeroben Lebensweise Mechanismen entwickelt haben, die sie vor der toxischen Wirkung des Sauerstoffs bewahren (Hewitt & Morris, 1974). Weiterhin konnten gerade in der Gruppe der Clostridien, zu denen *Clostridium difficile*, *Clostridium sticklandii* und *Eubacterium acidaminophilum* gehören (*Clostridium*-Cluster XI nach Collins *et al.*, 1994), zahlreiche Selenoproteine gefunden werden (Tab. 2). So bestand die Möglichkeit, im Proteom dieser

Organismen weitere Selen-haltige Proteine zu finden, welche an der Abwehr gegen verschiedene Stress-Faktoren beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es so unter anderem, die drei ausgewählten Stämme unter dem Einfluss von Nitrit, Diamid (einem starken Oxidationsmittel), Methylviologen und Luftsauerstoff anzuziehen und mittels 2D-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein neuer, durch Stress induzierte, Selenoproteine hin zu überprüfen. Durch Markierung der Proteine durch das radioaktive Isotop ^{75}Se ist es möglich, Selenoproteine relativ einfach von den „normalen“ Proteinen zu unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1. Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und Plasmide sind in den Tab. 3 und 4 zusammengefaßt.

Tab. 3: Übersicht über verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Arthrobacter</i> spec. Pyl	Wildtyp	Hormann & Andreesen, 1991
<i>Rhodococcus koreensis</i> . Sedi2	Wildtyp	Hormann & Andreesen, 1991
<i>Eubacterium acidaminophilum</i> A12	Wildtyp	Zindel <i>et al.</i> , 1988
<i>Clostridium sticklandii</i>	Wildtyp	Stadtman & McClung, 1957
<i>Clostridium difficile</i>	Wildtyp	Hall & O'Toole, 1935
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁻	$\Delta(mcrA)183 \quad \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 \quad endA1 \quad supE44 \quad thi-1 \quad recA1 \quad gyrA96 \quad relA1 \quad lac \quad [F^+ proAB lacI^q \Delta M15 \quad Tn10(Tet^r)]$	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (<i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>ileX</i> , <i>glyT</i> , <i>leuW</i> , <i>proL</i> , Cm ^R)	Stratagene

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Vektor	Merkmale	Referenz
pUC19	Amp ^r , lacPoz ⁻	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pGEM-T Easy	Amp ^r	Promega, Mannheim
pASK-IBA3	Amp ^r , tet-Repressorgen, Vektor zur Expression von Proteinen mit C-terminalem <i>Strep</i> -tag II-Peptid	IBA, Göttingen
pRARE	Cm ^R , <i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>ileX</i> , <i>glyT</i> , <i>leuW</i> , <i>proL</i>	Stratagene
pP2C2	pUC19-Derivat	diese Arbeit
pP2C7	pUC19-Derivat	diese Arbeit
pPycA _C	pASK-IBA3-Derivat; <i>pycA</i> (1470 bp)	diese Arbeit
pPycB _C	pASK-IBA3-Derivat; <i>pycB</i> (471 bp)	diese Arbeit
pPycD _C	pASK-IBA3-Derivat; <i>pycC</i> (681 bp)	diese Arbeit
pPycD _C	pASK-IBA3-Derivat; <i>pycD</i> (369 bp)	diese Arbeit

2.2. Anzucht von Bakterien

2.2.1. Nährmedien

2.2.1.1. Medium für die Anzucht von *Arthrobacter spec. Py1* (Hormann & Andreesen, 1991)

Das Mineralmedium, das zur Anzucht von *Arthrobacter spec. Py1* diente, war wie folgt zusammengesetzt:

Salzlösung nach Hormann & Andreesen (1994)	50	ml
Spurenelementlösung SL A	1	ml
Kaliumphosphat (KP)-Puffer (0,5 M, pH 7,2) ¹⁾ (2% Bactoagar bei Minimalmedium-Platten)	100	ml
Aqua dest. ad 1000 ml		

¹⁾KP-Puffer wurde dem Medium erst nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Salzlösung nach Hormann & Andreesen (1991):

		Endkonzentration im Medium in mM
MnSO ₄ x H ₂ O	0,2 g	0,06
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10,0 g	2,0
CaCl ₂	0,2 g	0,09
NH ₄ Cl	6,0 g	5,6
NaCl	1,0 g	0,85
Aqua dest. ad 1000 ml		

Spurenelementlösung SL A nach Hormann & Andreesen (modifiziert, 1989):

		Endkonzentration im Medium in mM
FeCl ₂ x 4 H ₂ O ¹⁾	2,0 g	1,0 x 10 ⁻²
MnCl x 4 H ₂ O	0,1 g	5,0 x 10 ⁻⁴
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g	8,0 x 10 ⁻⁴
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,003 g	2,0 x 10 ⁻⁵
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g	1,0 x 10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	0,006 g	1,0 x 10 ⁻⁵
ZnCl ₂	0,07 g	5,0 x 10 ⁻⁴
Na ₂ SeO ₃	0,173 g	1,0 x 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄	0,036 g	1,5 x 10 ⁻⁴
Na ₂ WO ₄	0,033 g	1,0 x 10 ⁻⁴
Na ₂ VO ₃	0,014 g	1,0 x 10 ⁻⁴
25% (v/v) HCl ¹⁾	10 ml	
Aqua dest. ad 1000 ml		

¹⁾ FeCl₂ x 4 H₂O wurde zunächst in HCl gelöst und anschließend der restlichen Lösung hinzugegeben.

Die Substrate Succinat und P2C wurden in 0,5 M KP-Puffer gelöst und anschließend getrennt vom restlichen Medium durch Autoklavieren sterilisiert. Die Endkonzentration der beiden Substrate im Medium betrug 10 mM.

2.2.1.2. Luria-Bertani-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) für *E. coli*

Das Luria Bertani (LB)-Medium war wie folgt zusammengesetzt:

NaCl	1,0% (w/v)
Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)

Im Fall von LB-Agar-Platten wurde dem Medium 2% Bactoagar hinzugegeben. Die Stammlösungen der in Tab. 5 aufgeführten Medienzusätze wurden sterilfiltriert, aliquotiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tab. 5: Medienzusätze für LB-Medium

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in Aqua dest.	125 µg/ml
Tetracyclin	25 mg/ml in 50% (v/v) Ethanol	12,5 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	35 µg/ml
Anhydrotetracyclin	20 mg/ml in Dimethylformamid	0,2 µg/ml
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid	20 mg/ml in Dimethylformamid	40 µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	40 mg/ml in Aqua dest.	40 µg/ml

2.2.1.3. Medium für die Anzucht von *E. acidaminophilum* nach Zindel *et al.* (1988, modifiziert)

Die Medien von *Eubacterium acidaminophilum*, *Clostridium difficile* und *Clostridium sticklandii* wurden für 20 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurden 9 ml unter Stickstoffbegasung in Hungate-Röhrchen abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden 500 µl 8,4%ige NaHCO₃-Lösung je Hungate-Röhrchen hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,2-7,5 eingestellt.

Das Medium war wie folgt zusammengesetzt:

		Endkonzentration im Medium in mM
KH ₂ PO ₄	0,2 g	1,15
NaCl	1,0 g	17
KCl	0,5 g	6,7
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g	2
NH ₄ Cl	0,25 g	5
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	0,1 ml	0,1
Glycin	3,76 g	50

Spurenelementlösung SL A (2.2.1.1.)	1,0 ml
Resazurin (0,1%ig)	1,0 ml
Biotin (2 mg/ml) ¹⁾	2 Tropfen
Aqua dest. ad 1000 ml	

¹⁾ Die Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren vor dem Beimpfen der Hungate-Röhrchen.

2.2.1.4. Medium für die Anzucht von *C. sticklandii* nach Uhde (1990, modifiziert)

Das Medium war wie folgt zusammengesetzt und wurde wie unter 2.2.1.3. beschrieben hergestellt:

		Endkonzentration im Medium in mM
Glycin	1,5 g	20
L-Prolin	5,75 g	50
L-Serin	2,1 g	20
L-Threonin	2,4 g	20
L-Arginin	3,5 g	20
L-Lysin	3,65 g	20
L-Histidin-HCl	0,47 g	3
L-Tyrosin	0,02 g	0,11
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g	1
NH ₄ Cl	0,5 g	9,35
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1%ig)	1 ml	0,07
KP-Puffer (1 M, pH 7,0)	10 ml	10
Spurenelementlösung SL A (2.2.1.1.)	1 ml	
Aminosäurestammlösung	20 ml	
Resazurin (0,1%ig)	1 ml	
NaS ₂ x H ₂ O (6%) ¹⁾	2 Tropfen	
Vitaminlösung ^{1,2)}	2 Tropfen	
Aqua dest. ad 1000 ml		

¹⁾ Die Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren.

²⁾ Die Zugabe erfolgte erst unmittelbar vor dem Beimpfen der Hungate-Röhrchen.

Vitaminlösung nach Genthner *et al.* (1981, modifiziert):

		Endkonzentration im Medium in μM
Pantothensäure	50 mg	207
Riboflavin	50 mg	133
Pyridoxamin-HCl	10 mg	39
Biotin	20 mg	82
Folsäure	20 mg	45
Nicotinsäure	25 mg	203
Nicotinamid	25 mg	204
Cyanocobalamin	50 mg	36
α -Liponsäure	60 mg	290
<i>p</i> -Aminobenzoessäure	50 mg	365
Thiamin-HCl	50 mg	148
Aqua dest. ad 1000 ml		

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Aminosäurestammlösung:

		Endkonzentration im Medium in mM
L-Cystein	3,03 g	25
L-Valin	2,23 g	19
L-Leucin	3,28 g	25
L-Isoleucin	3,28 g	25
L-Prolin	2,88 g	25
L-Methionin	3,73 g	25
L- β -Phenylalanin	4,13 g	25
L-Tryptophan	5,11 g	25

L-Glutamat	3,68 g	25
L-Glutamin	3,66 g	25
L-Asparagin	3,75 g	28
Aqua dest. ad 1000 ml		

Die Lösung wurde unter Stickstoffbegasung in Serumflaschen mit Butylstopfen abgefüllt und autoklaviert. Die Aminosäurestammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.1.5. Medium für die Anzucht von *C. difficile* nach Karasawa *et al.* (1995)

Das Medium war wie folgt zusammengesetzt und wurde wie unter 2.2.1.3. beschrieben hergestellt:

		Endkonzentration im Medium in mM
Glycin	0,75 g	10
L-Histidin-HCl	0,1 g	0,48
L-Tryptophan	0,1 g	0,5
L-Tyrosin	0,1 g	0,55
L-Arginin	0,20 g	1,15
L-Phenylalanin	0,2 g	1,21
L-Methionin	0,2 g	1,34
L-Threonin	1,19 g	10
L-Alanin	0,2 g	2,24
L-Lysin-HCl	0,3 g	1,64
L-Serin	0,3 g	2,85
L-Valin	0,3 g	2,56
L-Isoleucin	0,3 g	2,29
L-Aspartat	0,3 g	2,25
L-Leucin	0,4 g	3,05
L-Cystein	0,5 g	4,13

L-Prolin	1,15 g	10
L-Glutamat	0,9 g	6,12
K ₂ HPO ₄	0,3 g	1,72
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,5 g	8,5
NaCl	0,9 g	15,4
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,026 g	0,18
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g	0,1
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,01 g	0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,04 g	0,3
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,004 g	0,015
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,001 g	0,004
Glucose	2 g	11
NaHCO ₃ (8,4%) ¹⁾	50 ml	50
Spurenelementlösung SL A (2.2.1.1.)	1 ml	
Resazurin (0,1%ig)	1 ml	
NaS ₂ x H ₂ O (6%) ¹⁾	2 Tropfen	
Vitaminlösung (2.2.1.4.) ^{1,2)}	2 Tropfen	
Biotin (2 mg/ml) ^{1,2)}	2 Tropfen	
Aqua dest. ad 1000 ml		

¹⁾Die Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren.

²⁾Die Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren vor dem Beimpfen der Hungate-Röhrchen.

2.2.2. Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte nach dem Animpfen mit einer OD_{600nm} von ca. 0,1-0,2 aerob bei 37 °C auf einem Rundschtüttler bei 140-200 rpm. Die Anzucht von *Arthrobacter* Stamm Py1 erfolgte bei 30 °C. Das Wachstum wurde durch Messung der Absorption bei 600 nm gegen unbeimpftes Medium verfolgt.

Die anaeroben Bakterien *E. acidaminophilum*, *C. difficile* und *C. sticklandii* wurden anaerob in Hungate-Röhrchen bei 30 °C angezogen. Vor dem Animpfen wurden die Septen der Hungate-Röhrchen abgeflammt. Anschließend wurden nach Komplettierung der Medien mit einer Einwegspritze 1 ml Vorkultur in die Röhrchen injiziert. Das Wachstum wurde durch Messung der OD_{600nm} an einem Spekol 1200 (Analytik Jena, Jena) verfolgt.

2.2.3. Stammhaltung

Eine kurzfristige Lagerung von *E. coli*-Stämmen und *Arthrobacter* sp. Py1 erfolgte auf LB-Platten (2.2.1.2.) bzw. Mineralmedium-Platten (2.2.1.1.) bei 4 °C. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden zu 870 µl Bakterienkultur 130 µl Glycerin (99,5%) gegeben. Anschließend wurden die Glycerinkulturen von *E. coli* bei 37 °C und von *Arthrobacter* Stamm Py1 bei 30 °C eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Stämme bei -80 °C gelagert.

Die Kulturen von *Eubacterium acidaminophilum*, *Clostridium difficile* und *Clostridium sticklandii* wurden bei 4 °C gelagert und jeden Monat überimpft. Zur langfristigen Lagerung wurden bewachsenen Hungate-Röhrchen Glycerin (99,5%) injiziert, bis die Konzentration etwa 13% (v/v) entsprach. Nach einer weiteren Stunde Wachstum wurden die Kulturen bei -20 °C gelagert werden.

2.2.4. Wachstum von Bakterien mit ⁷⁵Se

Um Seleno-Proteine und Selen-modifizierte t-RNAs nachzuweisen, wurden die Bakterien in Hungate-Röhrchen anaerob mit ⁷⁵Se im Medium angezogen. Dabei wurde ⁷⁵Se dem Medium so zugegeben, dass die Radioaktivität 0,5 µCi/ml betrug. Da verschiedene Bakterien beim Wachstum Gase produzieren, mußte beim Arbeiten mit Hungate-Röhrchen darauf geachtet werden, dass keine radioaktiven Aerosole entstehen. Deshalb wurde mit Hilfe einer Einwegspritze erst ein Druckausgleich hergestellt, so dass sich entweichendes Gas in der Spritze sammelte.

Das radioaktive Medium wurde in dafür vorgesehene Bleifässchen entsorgt. Alle Abfälle, deren Aktivität unter 100 Schläge pro min lagen, wurden in den Müll für Langzeitstrahler entsorgt. Bei Arbeiten mit radioaktivem Selen wurde grundsätzlich eine Bleischürze getragen.

2.3. Molekularbiologische Standardmethoden

2.3.1. Vorbehandlung von Arbeitsmaterialien

Wenn möglich wurden alle Geräte und Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Geräte wurden mit 70%igem Ethanol kurz abgeflammt oder gewaschen.

Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mit Sterilfiltern (0,22 µm Rotilabo Spitzenfilter, Roth, Karlsruhe) filtriert.

Bei Arbeiten mit RNA wurden alle Materialien doppelt autoklaviert. Zur Inaktivierung von RNasen wurden alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Dazu wurde 0,1% (v/v) DEPC den Lösungen zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen autoklaviert.

2.3.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus *Arthrobacter spec. Py1*

Die Zellen einer 100 ml Kultur wurden durch Zentrifugation (15 min, 5000 g) geerntet und das Pellet in 5 ml TENS-Puffer resuspendiert. In einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß wurden 1,6 g Glaskugeln (0,25-0,5 µm, Roth, Karlsruhe) abgewogen. Je Eppendorfreaktionsgefäß wurden 800 µl Zellsuspension abgefüllt und in der Kugelmühle (Retsch, MM2, Haan) bei maximaler Geschwindigkeit 10 min geschüttelt. Zur Abtrennung der Glaskugeln und Zelltrümmer schloß sich eine Zentrifugation an (15 min, 14500 g, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde in 800 µl TENS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (15 min, 14500 g, 4 °C). Der Überstand wurde wiederum abgenommen und mit dem ersten vereinigt und anschließend mit einem Volumen Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0, Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach einer Zentrifugation (20 min, 14500 g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und mit 2,5 Volumen 96%igem Ethanol gemischt. Durch Inkubation über Nacht bei -20 °C wurde die DNA gefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 14500 g, 4 °C) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Es wurde in 1,5 ml 0,1 x Na-Citrat-NaCl (SSC) resuspendiert und anschließend 150 µl 1 x SSC und 2 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proteine mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.5.) abgetrennt. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA durch Ethanolfällung (2.3.5.) sedimentiert und anschließend mit jeweils 500 µl 90, 80 und 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in Aqua dest. aufgenommen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

TENS-Puffer :	100 mM	Tris/HCl
	40 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
	2% (w/v)	SDS

1 x SSC:	0,015 M	Na-Citrat
	0,15 M	NaCl

2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.3.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach Birnboim & Doly (1979)

Plasmide wurden aus 3 ml Übernachtskulturen von *E. coli*-Stämmen isoliert. Nach einer Zentrifugation (5 min, 5000 g, 4 °C) wurde das Zellpelett vollständig in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Zellyse wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 und vorsichtiges Mischen eingeleitet. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl eiskalte Lösung 3 zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 14500 g für 20 min bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurden die Proteine durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.5.) entfernt. Durch eine Ethanol-fällung (2.3.5.) wurde die Plasmid-DNA gefällt und anschließend in Aqua dest. aufgenommen.

Lösung 1:	25 mM	Tris/HCL
	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	pH 8,0	

Lösung 2:	0,2 N	NaOH
	1% (w/v)	SDS

Lösung 3:	3 M	K-Acetat
	2 M	Essigsäure

2.3.3.2. Plasmidisolierung mittels kommerzieller Kits

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurden der *E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I* (Peqlab, Erlangen) und der *Qiaprep Miniprep Kit* (Qiagen,

Hilden) verwendet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Plasmide wurden mit 50 µl Aqua dest. eluiert.

2.3.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arthrobacter spec. Py1*

2.3.4.1. RNA-Isolierung mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden)

Die RNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus Zellen einer 10 ml Kultur, welche in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurde. Zum vollständigen Zellaufschluß wurden jedoch nicht wie vom Hersteller vorgesehen 3 mg/ml TE-Puffer Lysozym sondern 10 mg/ml verwendet. Nach Inkubation der Zellsuspension für 30 min bei 37 °C wurde das Lysat zu Unterstützung der Zellyse mehrere Male mit einer sterilen Einwegspritze hoch und runter pipettiert. Die RNA wurde in 50 µl DEPC-behandeltem Aqua dest. (2.3.1.) von der Säule eluiert. Zur vollständigen Entfernung der chromosomalen DNA erfolgte ein Behandlung mit RNase-freier DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot). Der Verdau erfolgte 1 Stunde bei 37 °C. Durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und einer 10 minütigen Inkubation bei 65 °C wurde die DNase inaktiviert.

2.3.4.2. RNA-Isolierung durch *Tri Reagent RNA Solution Reagent* (Sigma-Aldrich, München)

Alternativ zum *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) wurde RNA mit Hilfe von *Tri Reagent RNA Solution Reagent* (Sigma-Aldrich, München) isoliert. Zur Lyse der Zellen wird bei dieser Methode Guanidinium-Thiocyanat und Phenol verwendet. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.3.4.3. Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA wurde vor dem Einsatz zu weiteren Versuchen durch eine denaturierende Gelelektrophorese (2.3.8.2.) auf Abbau durch RNasen überprüft. RNA-Proben, die nicht durch RNasen verdaut wurden, zeichnen sich bei Bakterien immer durch zwei scharfe rRNA-Banden (16S und 23S rRNA) aus. Weiterhin wurde die Kontamination durch DNA mittels *Polymerase chain reaction* (PCR, 2.3.7.) ausgeschlossen.

2.3.5. Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Abtrennung von Proteinen aus DNA-Lösungen wurde 1 Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches hinzugegeben. Nach gründlichem Schütteln schloss sich eine Zentrifugation (15 min bei 14500 g, Raumtemperatur) bis zur vollständigen Phasentrennung an. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 96%igen Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte für eine Stunde bei -20°C . Nach 20 minütiger Zentrifugation mit 14500 g wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals 5 min zentrifugiert und das Pellet getrocknet.

Phenol/Chloroform-Gemisch: 50% (v/v) TE-Puffer-gesättigtes Phenol (Roth, Karlsruhe)
50% (v/v) Chloroform

2.3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mittels Spektrophotometer Uvikon 930 (Kontron, München) durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ bei doppelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ bei RNA. Die Reinheit von isolierter DNA wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm überprüft. Dabei gilt eine Probe mit einem Quotienten von $\text{OD}_{260\text{nm}} : \text{OD}_{280\text{nm}} = 1,8-1,9$ als proteinfrei.

2.3.7. Polymerase chain reaction-Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis et al., 1987)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) wurde im Mastercycler Personal PCR-Gerät (Eppendorf, Hamburg) oder Hybaid Omn-E PCR-Gerät (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines 50 μl PCR-Ansatzes ist in Tab. 5 ersichtlich. Zur Amplifizierung von DNA Fragmenten, die in Expressionsvektoren ligiert werden sollten, wurde die *Pfu*-Polymerase (Peqlab, Erlangen) verwendet, bei allen anderen Versuchen wurde die *Taq*-Polymerase (Peqlab, Erlangen) verwendet.

Tab. 5: Zusammensetzung eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes

Substanz	Herkunft	Menge
DNA	Zellen, chromosomale DNA, Plasmid-DNA	variabel ¹⁾
Oligonukleotid	Life Technologies, Metabion (Martinsried)	10 pmol
dNTPs	Roche-Diagnostic (Mannheim)	200 µM
10 x Polymerase Puffer	Roche-Diagnostic (Mannheim)	5 µl
Taq-DNA- oder Pfu-DNA-Polymerase	Peqlab (Erlangen)	1 U

¹⁾0,2-50 µg

Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze betrug 50 µl. Zur PCR wurden die in Tab. 6 aufgeführten Bedingungen gewählt.

Tab. 6: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	20 s
Annealing	T _A ist abhängig von der Oligonukleotidsequenz ¹⁾	20 s
Extension	72 °C	Variabel ²⁾

¹⁾ $T_A = ((A+T)*2 + (G+C)*4) - 5$

²⁾ Es wurde davon ausgegangen, dass die Taq-Polymerase 1 kb/min amplifiziert. Für die Pfu-Polymerase (Peqlab, Erlangen) wurde 0,5 kb/min veranschlagt.

Es wurden jeweils 30 Zyklen durchlaufen. Im Falle von längeren PCR-Produkten wurde die Elongationszeit jedes Zykluses um 20 s verlängert, um dem Aktivitätsverlust der Taq-Polymerase (Peqlab, Erlangen) auszugleichen. Die verwendeten Oligonukleotide mit der entsprechenden Annealingtemperatur sind aus Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz ^{a)}	Position ^{c)}	T _A in °C
MO1	GTG GCC GCA GGA GCG AAC	4574-4556 ←	57
MO2	CCC CGC ACC CAG GAA GAG	4080-4098 →	57
MO3	GTT CGC TCC TGC CGC CAC	4556-4574 →	57
MO4	CTC TTC CTG GGT GCG GGG	4098-4080 ←	57
MO5	GAT ACA GTT CCC CGT CCA CC	3650-3631 ←	59
MO6	GTA TTT GAA GTC CCT GAA CG	3885-3904 →	53
MO7	CGT GGG ACC GTG TGT TCA TC	4652-4672 →	59
MO8	GAT GAA GAC ACG GTC CCA CG	4672-4652 ←	59
MO10	GTC TAA ACG GTG AGT GTG TCG	3151-3131 ←	59
MO11	CGG ACG CCC TGG TGG TGT TCG	4616-4636 →	67
MO14	CGT GGA ACT TGG TGG GCA TAG	2971-2991 →	61
MO15	GAC GGG GAA CTG TAT CAA GAG	3635-3655 →	59
MO17	CTG GTG GGA GGC GGC GTG CTG	5014-5034 →	69
MO18	TGA CCA GCC ACT ACG ACG AGC	4595-4615 →	59
MO19	AGG ACG GCA GAC TCA ACG GAC	4890-4869 ←	59
MO20	TCA ATG CTG CTG TCA ATG CTG	5304-5324 →	57
MO21	TCA ATG CTG CTG TCA ATG C	5324-5306 ←	41
MO22	AGC ATT GAC AGC AGC ATT G	5305-5323 →	41
MO23	CCA AGG TGA AGG TAG ACG CCA AG	2596-2574 ←	67
MO23-2	TTC AAG GCT CGT TCG TGG	5547-5565 →	51
MO24	GAC GCC AGG TTG TAG GAC	2162-2145 ←	53
MO25	TCC TGC CCG AAC TAT GGA G	2464-2482 →	55
MO26	GAA GCG GAG GTC GTA GCA	2805-2790 ←	53
MO27	CTA CCA GCA GGG CAG ACA ACC	1618-1598 ←	63
MO28	GGT TGT CTG CCC TGC TGG TAG	1598-1618 →	63
MO29	CAC CAC GTG CCG GGA CCG	6138-6155 →	59
MO30	CGG TCC CGG CAC GTG GTG	6155-6138 ←	59
MO31	CGG TTT CCA TCC TCG GCG	5942-5959 →	55
MO32	GTG CCG TAG AGG AAG AGG	1115-1098 ←	53
MO33	GGC AAA GTG TTC AGG AGG C	7162-7180 →	55
MO34	CTC GCA GCC TTC GCC GGC C	6896-6878 ←	63
MO36	GCA CCT CAC GAA CCC CCG	645-638 ←	57
MO37	CAC GCA CGG GGG TTC GTG	622-639 →	57
MO38	TGA GCT GAC CAT CGC GTA GG	6320-6301 ←	61
MO39	TTC GTT GCA CTA CAG ATC CG	6645-6654 →	55
MO40	ACG GCT TTG ACG CCG ATC	279-296 →	53
MO41	AGG CAA CAG AAG CAC TCC AGC	1024-1044 →	63
MO42	GGC GCC GAA CTG ATC GTC	2448-2465 →	55
MO43	ACC AGG ACC GGC GAG GGC C	5902-5919 →	63
C1	ATG CAG GTC TCT AAT GAG AAC CGG TAA GCA G		49
C2	ATG CAG GTC TCA GCG CTA TGC TGC TGT CAA TGC TG		49
Red-C1	ATG CAC GGT CTC AAA TGA TGA GCC TGG CAC CAG CC		55
Red-C2	ATG CAC GGT CTC AGC GCT GAA CAT CCA GGG AAT CTT		47
OrfA-C1	ATG GTA GAA GAC AAA ATG GAA ACA ACA AGG CAA GTC CCA CT		47
OrfA-C2	ATG GTA GAA GAC AAG CGC TTC GAA GTG AGC CTT TCT TGA TTT TG		47

Fortsetzung Tab. 7

OrfB-C1	ATG GTA GAA GAC AAA ATG GAC AAG CCC GAA TTC GAG TTC AC	47
OrfB-C2	ATG GTA GAA GAC AAG CGC TGT TGC TCC GCC CAG TTT GTA CC	47
Mem97Fam ^{b)}	ACC GTA GAG GAA GAA GTC GTA	1113-1093 ← 61
NitFam ^{b)}	CCA TAG TTC GGG CAG GAC G	2470-2462 ← 57
MO18Fam ^{b)}	GGT TCA GGG ACT TCA AAT AC	3904-3885 ← 55
MO138Fam ^{b)}	CGT TGG CGG GGT CGG CTG CG	4024-4005 ← 65
Red76Fam ^{b)}	AGG GAT GGT GAA GGC TGG TGC	5745-5725 ← 63

^{a)} In den Oligonukleotidsequenzen für die heterologe Expression sind fett die BsaI- bzw. BpiI-Schnittstellen markiert. Unterstrichen sind die Bereiche, die nicht an der Hybridisierung beteiligt sind.

^{b)} Diese Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende eine FAM (5'-Carboxyfluorescein)-Markierung.

^{c)} Die erste Zahl gibt die erste Position des Oligonukleotides in der Gesamt-Sequenz des Anhangs A an und der Pfeil die Ausrichtung.

2.3.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die Reaktion fand im Mastercycler Personal PCR-Gerät (Eppendorf, Hamburg) oder Hybaid Omn-E (MWG-Biotech, Middlesex, Großbritannien) unter Verwendung des *ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) statt. Ein Sequenzieransatz hatte ein Volumen von 10 µl und enthielt 2 µl *Big Dye Mix*, 10 pmol des Oligonukleotids und 0,2-1 µg DNA. Bei Abschnitten, die schwierig zu sequenzieren waren (z.B. durch Sekundärstrukturen), wurde das Ansatzvolumen auf 20 µl erhöht und dem Ansatz 1 µl Taq-Polymerase sowie 1 µl DMSO hinzugefügt. Das Programm für die Sequenzierung ist der Tab. 6 zu entnehmen. Die Extensionszeit betrug hier immer 2 min. Nach einer Ethanol-fällung wurde die DNA getrocknet und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Die Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte durch Frau Ute Lindenstrauss mit Hilfe des ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Die Daten wurden mittels der Sequencer-Software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programmen *Dnasis*, *Oligo*, *Clone*, *Phyllip*, *BLASTX* und *BLASTN* bearbeitet und ausgewertet.

2.3.9. Analyse von Nukleinsäuren

2.3.9.1. Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde in 0,7-1,5%igen Agarosegelen (Peqlab Biotechnologies, Erlangen) mittels horizontaler Elektrophorese (Peqlab Biotechnology, Erlangen) bei 80-100 V aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 0,5 x TAE-Puffer durch Kochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde der Agaroselösung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt oder das Gel für 15-20 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in H₂O) inkubiert. Als Laufpuffer diente 0,5 x TAE-Puffer. Die Proben wurden mit Stopplösung beschwert. Die Gele wurden mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems (TFX-20.M, MWG-Biotech, Ebersberg) ausgewertet und fotografiert.

1 x TAE-Puffer:	40 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA
	20 mM	Acetat
		pH 8,0
Stopplösung:	0,2% (w/v)	Bromphenolblau
	50% (w/v)	Glycerin
	0,2 M	EDTA

2.3.9.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Gesamt-RNA (2.3.4.) wurde in 1,5%igen denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt. Die Gelkammer wurde mit Rotisol gesäubert und anschließend mit DEPC behandeltem Aqua dest. gespült. Für das denaturierende Agarosegel wurden 0,75 g Agarose, 5 ml 10 x MOPS-Puffer und 43,5 ml DEPC behandeltes Aqua dest. gemischt und anschließend bis zur Lösung der Agarose gekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde der Agaroselösung 1,5 ml Formaldehyd zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung in einen RNase-freien Gelschlitten gegossen. Zur Probenvorbereitung wurden 6 µl RNA, 12,5 µl Formamid, 2,5 µl 10 x MOPS-Puffer und 4 µl Formaldehyd in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und anschließend für 15 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und mit 1,5 µl (2 mg/ml) Ethidiumbromid und 3 µl RNA-Probenpuffer versetzt, gemischt und auf das Gel

aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer. Die RNA wurde bei 80-100 V aufgetrennt und analog zu DNA Gelen dokumentiert.

10 x MOPS-Puffer:	0,2 M	MOPS
	0,05 M	Na-Acetat
	0,01 M	EDTA
		pH 7,0
RNA-Probenpuffer:	100 mM	EDTA
	50% (v/v)	Glycerin
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau

2.3.10. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden nach dem Auftrennen im Agarosegel (2.4.10.1.) mit Hilfe des *E.Z.N.A. Gel Extraction Kits* (Peqlab, Erlangen) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

2.3.11. Verdau von DNA durch Endonukleasen

Die Restriktion der DNA durch verschiedene Endonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Fermentas, St. Leon-Rot).

2.3.12. Dephosphorylierung von Vektoren

Um Selbstligationen von linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wurden die Enden dephosphoryliert. Dazu wurde der Plasmidsuspension bei einem Gesamt-Volumen von 50 µl 1 U Alkalische Phosphatase (Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 µl 10 x Alkalische Phosphatase-Puffer hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit dem *E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit* (Peqlab, Erlangen) von Salzen und Proteinen befreit. Die DNA wurde mit 50 µl Aqua dest. eluiert.

2.3.13. Ligation in pUC19 und pASK-IBA3

Zur Ligation wurden die DNA-Fragmente zum linearisierten und dephosphorylierten Vektor im Verhältnis 5:1 eingesetzt. Der Ansatz wurde anschließend mit Aqua dest. auf 17 μ l aufgefüllt. Um die kohäsiven Enden freizulegen, wurde die Lösung für 5 min bei 45 °C inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 2 μ l 10 x Reaktionspuffer und 1 μ l (1 U) T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugefügt und bei 16 °C über Nacht inkubiert.

2.3.14. Ligation in pGEM-T-Easy (Promega, Mannheim)

Der Vektor pGem-T-Easy (Promega, Mannheim) wurde für die Ligation von Taq-PCR-Produkten konstruiert. Er besitzt am 3'-Ende ein überhängendes Thymin, dadurch ist eine Selbstligation nicht möglich. Da Taq-Polymerasen bei der PCR-Reaktion am 3'-Ende ein Template-unabhängiges Desoxyadenosin an das amplifizierte Fragment anhängen, ist dieser Vektor optimal zur Klonierung von PCR-Produkten geeignet.

Der Reaktionsansatz für Ligationen mit diesem Vektor enthielt:

1 μ l	10 x T4-Ligase-Puffer
1 μ l (50 ng)	pGEM-T-Easy-Vektor
7 μ l	PCR-Produkt
1 μ l (1 U)	T4-Ligase

Die Ligation erfolgte bei einer Temperatur von 16 °C über Nacht.

2.3.15. Mikrodialyse von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Salzen wurden Nukleinsäuren einer Mikrodialyse unterzogen. Dazu wurde Aqua dest. in eine Petrischale gegeben und eine Mikrodialysemembran (0,025 μ m Milipore, Milipore Corporation, Bedford) auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Nun wurde die DNA-Probe aufgetropft und nach ca. 20 min wieder abgenommen.

2.3.16. Transformation von *E. coli*-Zellen

2.3.16.1. Herstellung elektrokompeter Zellen

200 ml LB-Medium wurde mit einer 20 ml LB-Vorkultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes mit einer OD_{600nm} von 0,1 angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von ca. 0,8 erfolgte nach einer 15 minütigen Kühlung auf Eis die Ernte der Zellen durch Zentrifugation (5000 g, 15 min, 4 °C). Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C mit vorgekühlten Lösungen und Geräten. Das Zellpellet wurde zweimal in 200 ml sterilem Aqua dest. und einmal in 30 ml steriler 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils abzentrifugiert (5000 g, 15 min, 4 °C). Zum Schluss wurden die Zellen in 0,7 ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen, zu je 40 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.16.2. Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

(Dower *et al.*, 1988)

Die Elektroporation erfolgte durch einen Gene Pulser (Bio-Rad, München). Dabei wurden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 3-6 µl dialysiertem Ligationsansatz (2.3.13. und 14.) versetzt. Das Gemisch wurde dann in eine Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand (ECU-102, Peqlab Biotechnologie, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wobei eine Zeitkonstante zwischen 4,5 und 4,8 erreicht werden sollte. Nach dem Impuls wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.34.17. Northern-Hybridisierung

2.3.17.1. Markierung von DNA-Fragmenten mittels des *DIG-High Prime Kits* (Roche-Diagnostics, Mannheim)

DNA-Fragmente, die als Sonden zur Hybridisierung eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe des *DIG-High Prime Kits* (Roche-Diagnostics, Mannheim) markiert. Dazu wurden 16 µl

des gereinigten PCR-Produkts 10 min gekocht, auf Eis abgekühlt und anschließend mit 4 µl *DIG-High Prime* bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 65 °C abgebrochen. Die hergestellten Sonden wurden anhand eines Dot Blots getestet. Dazu wurden 0,5 µl der markierten Sonde auf eine Nylonmembran aufgetropft und durch 2 minütige Bestrahlung durch UV-Licht fixiert. Der Chemilumineszenz-Nachweis der Sonde erfolgte mit Hilfe des *DIG-Luminescent Detection Kits* (Roche-Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Im Nachweisverfahren wurde als Substrat für die Alkalische Phosphatase *CDP-Star* (Roche-Diagnostics, Mannheim) eingesetzt.

2.3.17.2. Hybridisierung mit DIG markierten DNA-Sonden

Die Gesamt-RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel (2.3.8.2.) aufgetrennt und anschließend für 30 min in 20 x SSC (2.3.2.) äquilibriert. Die Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey-Nagel, Düren) wurde gleichzeitig vorbereitet, indem sie 20 min in Aqua bidest. und anschließend 10 min in 20 x SSC inkubiert wurde. Die Übertragung der RNA erfolgte mit Hilfe eines Vakuumblotgerätes (Appligene-Oncor, Heidelberg) für 3 h bei 60 mbar. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch 2 minütige Bestrahlung mit UV-Licht. Zur Hybridisierung wurde High-SDS-Hybridisierungspuffer verwendet. Die Membran wurde mit 20 ml des High-SDS-Hybridisierungspuffers für 2 Stunden bei 50 °C prähybridisiert. Nach 10 minütigem Kochen der DIG-markierten Sonde wurde sie auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde die Sonde zu 20 ml High-SDS-Hybridisierungspuffer gegeben und die Membran über Nacht bei 50 °C hybridisiert. Die Membran wurde zweimal 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung 1 und anschließend zweimal 15 min bei 68 °C in Waschlösung 2 geschwenkt. Der Chemilumineszenz-Nachweis der Sonde erfolgte mit Hilfe des *DIG-Luminescent Detection Kits* (Roche-Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde im Nachweisverfahren *CDP-star* (Roche-Diagnostics, Mannheim) eingesetzt.

High-SDS-Hybridisierungspuffer: 7% (w/v) SDS
50% (v/v) Formamid
0,1% (w/v) N-Laurylsarcosin
2% (w/v) Blocking-Reagent (Roche-Diagnostics,
Mannheim)

	50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 7,0
	5 x	SSC
Waschlösung 1:	2 x	SSC
	0,1% (w/v)	SDS
Waschlösung 2:	0,5 x	SSC
	0,1% (w/v)	SDS

2.3.18. Reverse Transkription (RT)

Für die Synthese der cDNA von mRNA-Fragmenten wurde der *RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) nach den Herstellerangaben verwendet. Als Template wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Als Oligonukleotide wurden die mitgelieferten *random*-Hexamer-Oligonukleotide verwendet. Anschließend wurden die synthetisierten cDNAs durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen (2.3.7.).

2.3.19. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *primer extension*

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde der *RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet. Als Oligonukleotid wurden 5'-FAM-markierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 10 pmol eingesetzt (Tab. 7). Als Template dienten 2-3,5 µg Gesamt-RNA. Die erhaltenen FAM markierten DNA Fragmente wurde mit dem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) analysiert. Die Länge der DNA Fragmente wurde durch einen internen Standard (ROX Gene-Scan, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der *GENESCAN 2.1*-Software (PE Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) ausgewertet.

2.4. Proteinchemische Methoden

2.4.1. Heterologe Expression von Proteinen mit *Strep*-tag II

1.4.1.1. Zellanzucht und Herstellung von Rohextrakten

Für die heterologe Expression von in pASK-IBA3 klonierten Genen (2.3.13.) durch *E. coli* Rosetta (DE3) wurden 100 ml LB-Kulturen mit Chloramphenicol und Ampicillin verwendet. Die beiden Antibiotika waren nötig, um auf die beiden Plasmide pRARE und pASK-IBA3 zu selektieren. Die 100 ml LB-Kulturen wurden aus einer 20 ml über Nacht gewachsenen LB-Vorkultur angeimpft. Die Anfangs-OD_{600nm} wurde auf 0,1 eingestellt und die Kultur anschließend bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von 10 µl Anhydrotetracyclin (2 mg/ml) induziert. Anschließend wurde die Kultur für drei weitere Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 5000 g geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Zellen wurden nach dem Auftauen in 3 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels drei Passagen durch eine French-Press bei 900 psi (Mini-Zelle, SLM Instruments, Rochester/NY, USA). Dem Extrakt wurden 25 µg/ml Avidin (Gerbu, Gaiberg) hinzugegeben, um das *E. coli* eigene Biotin zu maskieren, welches sonst irreversibel an das *Strep*-Tactin-Säulenmaterial (IBA, Göttingen) bindet. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Zelllysat für 30 min zentrifugiert (10500 g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Aufreinigung der Proteine mittels *Strep*-tag-Affinitätschromatographie auf Eis gelagert.

2.4.1.2. Reinigung von *Strep*-tag II-Fusionsproteinen

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte bei 4 °C. Die *Strep*-Tactin-Sepharosesäule (IBA, Göttingen) wurde nach den Angaben des Herstellers äquilibriert. Es wurde statt des Puffer W 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) zum Waschen der Säule und Reinigung der Proteine verwendet. Die Proteinsuspension einer 100 ml Kultur wurde durch Pipettieren auf die Säule gegeben. Nachdem die Probe vollständig in die Matrix eingedrungen war, wurde die Säule mit 5 x 1 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) gewaschen und die Fraktionen einzeln aufgefangen. Die Proteine wurden mit 6 x 0,5 ml Puffer 1 mit 2,5 mM Desthiobiotin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) von

der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden einzeln aufgefangen und später in einer SDS-PAGE (2.4.4.) analysiert. Zur Regeneration des *Strep-Tactin*-Materials (IBA, Göttingen) wurde die Säule nacheinander mit mit 1 mM 4-Hydroxyazobenzen-2-carboxylat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und anschließend mit 3 x 5 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Die Säule wurde bei 4 °C gelagert.

2.4.2. Reinigung der nativen P2C-MO aus *Arthrobacter spec. Py1*

Die Reinigung der nativen P2C-MO aus *Arthrobacter spec. Py1* erfolgte nach Hormann & Andreesen (1994).

2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Zu 20 µl Probe wurde in Plastikkuvetten 1 ml Bradfordreagenz hinzugegeben und gut durchmischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Blindwert mit Aqua dest. gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

Bradfordreagenz:

Serva blue G250	50 mg
Ethanol	50 ml
H ₃ PO ₄ (85%)	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Lagerung des Bradfordreagenz erfolgte im Dunkeln.

2.4.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-PAGE verwendet. Die Gelkonzentration richtete sich dabei nach der Proteingröße. Die Zusammensetzung des Trenngels ist der Tab. 8 zu entnehmen. Die Gelplatten wurden gesäubert, getrocknet und anschließend der Abstandhalter zwischen die Platten gebracht. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die beiden vorbereiteten Gelplatten gegossen und anschließend mit Aqua dest. überschichtet. Nach

Polymerisation des Trenngels wurde das Aqua dest. entfernt, das Sammelgel gegossen und anschließend der Kamm zwischen die Gelplatten gesteckt. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Polymerisation in feuchtes Zellstoffpapier gewickelt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Tab. 8: Zusammensetzung des Trenngels

Acrylamidkonzentration in %	10	12,5	15	17,5
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (37,5:1, Roth, Karlsruhe) in ml	2	2,5	3	3,5
1,88 M Tris/HCl pH 8,8 in ml	1,2	1,2	1,2	1,2
0,5% (w/v) SDS in ml	1,2	1,2	1,2	1,2
Aqua dest. in ml	1,6	1,1	0,6	0,1
TEMED in μ l	5	5	5	5
10%ige (w/v) APS-Lösung ¹⁾	30	30	30	30

¹⁾ Die Polymerisation wurde mit frisch hergestellter 10%iger (w/v) APS-Lösung gestartet.

Sammelgel:

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (37,5:1, Roth, Karlsruhe)	0,33 ml
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,4 ml
0,5% (w/v) SDS	0,4 ml
Aqua dest.	0,87 ml
TEMED	2 μ l
10% (w/v) APS-Lösung ¹⁾	10 μ l

¹⁾ Die Polymerisation wurde mit frisch hergestellter 10%iger (w/v) APS-Lösung gestartet.

2.4.5. Proteintransfer auf Membranen

Der Proteintransfer auf Membranen erfolgte mit Hilfe des Biometra-Fast-Blot (Biometra, Göttingen). Dazu wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine das Gel 10 min in Transferpuffer inkubiert. Eine auf Gelgröße zugeschnittene Polyvenylidendifluorid (PVDF)-Membran (Pierce, Rockford/IL, USA) wurde nacheinander je eine Minute in Methanol, Wasser und Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurden drei Lagen Transferpuffer-getränktes Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel), die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel sowie drei Lagen Transferpuffer-getränktes Gel-Blotting-

Papier luftblasenfrei auf die Anode gestapelt. Der Proteintransfer erfolgte für 60 min mit 1,2 mA pro cm² Membranfläche. Zur Kontrolle des Transfers und zur Markierung der Markerproteine wurde die Membran für 5 min in Ponceau S-Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Aqua dest. wieder entfärbt.

Transferpuffer:	50 mM	Na-Borat
	10% (v/v)	Methanol
		pH 9,0
Ponceau S-Färbelösung:	0,2% (w/v)	Ponceau S
	3% (w/v)	Trichloressigsäure
	3% (w/v)	Sulfosalicylsäure

2.4.6. Nachweis von *Strep*-tag II-Fusionsproteinen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine und der Übertragung auf eine PVDF-Membran wurde diese zur Abschwächung unspezifischer Bindungen für 60 min in PBS-Puffer mit 1% (w/v) BSA und 0,5% (v/v) Tween 20 inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei mal 5 min mit PBS-Puffer mit 0,1% (v/v) Tween 20 gewaschen. Zur Maskierung des Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Proteins von *E. coli* wurde die Membran 10 min in 10 ml PBS-Puffer mit 0,1% Tween 20 und 2 µg/ml Avidin inkubiert. Anschließend wurde der Lösung 2,5 µl *Strep*-Tactin-horseradish-peroxidase-Konjugat (IBA, Göttingen) zugegeben und für 60 min inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-Tween und zweimal 10 min mit PBS gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch den *GST Western Blotting Kit* (Roche-Diagnostic, Mannheim). Dabei wird ein Chemilumineszenz-Substrat durch eine am Konjugat gebundene Peroxidase unter Lichtemission umgesetzt. Durch die Schwärzung eines Röntgenfilmes (Roche-Diagnostic, Mannheim) wurde die Lichtreaktion dokumentiert. Der Nachweis erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

PBS-Puffer:	4 mM	KH ₂ PO ₄
	16 mM	Na ₂ HPO ₄
	115 mM	NaCl

2.4.7. Coomassie Färbung

Nach der SDS-PAGE bzw. 2D-Gelelektrophorese wurden die Gele auf einer Laborwippe für 30 min bzw. 2 h in einer entsprechenden Menge Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel kurz in Aqua dest. geschwenkt und dann in Entfärber inkubiert bis klare Proteinbanden bzw. -spots zu erkennen waren.

Coomassie-Färbelösung:	0,20% (w/v)	SERVA blue R250
	0,05% (w/v)	SERVA blue G250
	42,5% (v/v)	Ethanol
	5,0% (v/v)	Methanol
	10,0% (v/v)	Essigsäure
	Aqua dest. ad 500 ml	
Entfärber:	7% (v/v)	Essigsäure
	40% (v/v)	Ethanol

2.4.8. Silber-Färbung nach Blum *et al.* (1987, modifiziert)

Nach der Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden die Proteingele nacheinander in den unten aufgeführten Lösungen für die angegebene Dauer inkubiert.

Fixierung ¹⁾	4:1:5	Ethanol:Essigsäure:Wasser	ü. N.
Waschen	30% (v/v)	Ethanol	2 x 20 min
Waschen		Aqua dest.	20 min
Vorbehandlung ²⁾	0,2 g/l	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	1 min
Spülen		Aqua dest.	3 x 20 s
Imprägnieren ²⁾	2 g/l	AgNO ₃	20 min
Spülen		Aqua dest.	3 x 20 s
Entwickeln ²⁾	30 g/l	Na ₂ CO ₃	
	500 µl/l	37% (v/v) Formaldehyd	
	4 mg/l	Na ₂ S ₂ O ₃ x H ₂ O	ca. 30 min

Stoppen ¹⁾	25% (v/v)	Ethanol	10 min
	10% (v/v)	Essigsäure	
Waschen	Aqua dest.		3 x 5 min

¹⁾ Die Lösungen wurden nach 14 Tagen frisch hergestellt.

²⁾ Diese Lösungen wurden immer frisch hergestellt.

2.4.9. Aktivitätsfärbung mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

Zur Visualisierung von enzymatisch aktiven Proteinbanden in nativen Gelen wurde eine NBT-Aktivitätsfärbung durchgeführt. Dabei färben sich Proteine violett, die in der Lage sind, NBT als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden. Das Proteingel wurde in 10 ml Reaktionspuffer bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert bis eine Färbung der Banden zu erkennen war. Die anschließende Fixierung der Proteine erfolgte durch 7% (v/v) Essigsäure.

Reaktionspuffer:

KP-Puffer, pH 7,5	50 mM	9,4 ml
FAD	10 mM	0,1 ml
NADH	50 mM	0,1 ml
NBT	0,4% (w/v)	0,4 ml

2.4.10. Trocknung von Polyacrylamid-Gelen

Vor dem Trocknen der Gele wurden diese zunächst in Aqua dest. äquilibriert, um die Essigsäure vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Gele für 30 min in 3% (v/v) Glycerin inkubiert und in Cellophanfolie (Biometra, Göttingen), die ebenfalls mit 3% (v/v) Glycerin befeuchtet wurde, luftblasenfrei eingeschlagen. Dann wurden die eingeschlagenen Gele über eine Glasplatte gespannt. Die Gele wurden so 2 Tage unter einem Abzug getrocknet.

2.5. 2D-Gelelektrophorese

2.5.1. Zellernte und Proteinaufarbeitung

Zur Proteinisolation wurden die Kulturen in einem Volumen von 30 bis 50 ml angezogen und bei einer OD_{600nm} von 0,8 bis 0,9 geerntet. Dazu wurden die Kulturen in ein 50 ml Greiner-

Röhrchen überführt und bei 4 °C für 10 min mit 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl Lysispuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis durch Ultraschallbehandlung bis zum Aufklaren der Zellsuspension. Es schloss sich eine 30 minütige Ultrazentrifugation bei 50000 g bei 4 °C an. 10 µl des Überstandes wurden für die Proteinquantifizierung abgenommen und der Rest mit 2,5 Volumen eiskaltem Aceton versetzt. Es schloss sich eine Fällung bei -20 °C für mindestens 2 Stunden bzw. ü. N. an. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation mit 5000 g bei 4 °C für 5 min sedimentiert und anschließend luftgetrocknet bis das Pellet glasig wurde. Zur Resuspension wurde den Zellen eine entsprechende Menge Lysispuffer hinzugegeben. Die Proteinendkonzentration entsprach bei Gelen, die Silber-gefärbt (2.4.8.) werden sollten 100 µg/100 µl und bei Coomassie (2.4.7.) zu färbenden Gelen 400 µg/100 µl. Das Lösen des Pellets erfolgte unter Schütteln bei 20 °C im Thermoblock. Bei schwierig zu resuspendierenden Pellets erwies es sich als hilfreich, die Probe einzufrieren und wieder aufzutauen.

Lysispuffer:

8	M	Harnstoff (<i>ultra pure</i> , Amersham Biosciences, Freiburg)
0,5%	(v/v)	<i>immobilized pH gradient</i> (IPG)-Puffer (Amersham Biosciences, Freiburg) ¹⁺³⁾
1%	(w/v)	CHAPS (Amersham Bioscience, Freiburg) ¹⁾
12	µl/ml	DeStreak (Amersham Bioscience, Freiburg) ¹⁺²⁾
0,005%	(w/v)	Bromphenolblau

¹⁾ Diese Substanzen wurden immer frisch hinzugegeben.

²⁾ DeStreak Reagent konnte auch durch 10 mg/ml DTT ersetzt werden.

³⁾ Der Puffer mußte den gleichen pH-Bereich wie der anschließende IPG-Streifen (Amersham Biosciences, Freiburg) besitzen.

Der Puffer wurde nie über 30 °C erwärmt, da es sonst zur Zersetzung des Harnstoffes kommt und anschließend zu Proteinmodifizierung durch Alkylierungen. Der Puffer wurde zu je 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.2. Isoelektrische Fokussierung

2.5.2.1. Rehydrierung der IPG-Streifen

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in erster Linie das *cup loading*-Verfahren verwendet. Dazu wurden IPG-Streifen (pH 3-10 bzw. pH 4-7, 24 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Es handelt sich hierbei um Plastikstreifen, auf denen ein linearer pH-Gradient in einem getrockneten Acrylamidgel immobilisiert ist. Für die Auftrennung der Proteine muss das Gel erst wieder rehydriert werden.

Zur Rehydrierung wurden 450 µl Lysispuffer (2.5.1.) in einer Rinne des Immobiline DryStrip Reswelling Tray (Amersham Biosciences, Freiburg) gleichmäßig verteilt. Ein IPG-Streifen wurde anschließend luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten in die Rinne herabgelassen und dann mit Mineralöl (USB Corporation, Cleveland, USA) überschichtet. Die Rehydrierung erfolgte für mindestens 12 Stunden.

Alternativ zum *cup loading*-Verfahren wurde das *in gel*-Rehydrierungsverfahren verwendet. Hierbei können die Proteine nach der Acetonfällung sofort in Rehydrierungslösung resuspendiert werden. Die Rehydrierung erfolgt hier im *stripholder*, indem der Rehydrierungspuffer im *stripholder* gleichmäßig verteilt wird. Anschließend wird der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei in den *stripholder* gelegt. Nach Rehydrierung sind die Proteine über den ganzen IPG-Streifen gleichmäßig verteilt und das Programm (2.5.2.2.) der IEF kann durch die IPGPhore II (Amersham Biosciences, Freiburg) automatisch gestartet werden.

2.5.2.2. Isoelektrische Fokussierung

Nach der Rehydrierung wurde der Streifen mit einer Pinzette aus dem Immobiline DryStrip Reswelling Tray genommen, kurz mit Aqua bidest. abgespült und mit einem Papiertaschentuch vorsichtig abgetupft. Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach oben in einen *stripholder* gelegt. Danach wurden in Aqua bidest. getränkte, kleine Wattepad auf die Gelenken gelegt und anschließend die Kontakte aufgebracht. Das *cup* wurde an der dafür vorgesehenen Stelle auf das Gel gebracht. Anschließend wurde der Streifen vollständig mit Mineralöl überschichtet. So kann auch überprüft werden, ob das *cup* so auf dem IPG-Streifen sitzt, dass die Probe nicht auslaufen kann. Die aufzutrennende Probe wurde nun in das *cup* gegeben und anschließend mit Mineralöl überschichtet. Anschließend wurde an der IPGphor

Isoelectric Focusing Unit (Amersham Biosciences, Freiburg) das folgende Programm gestartet.

Programm für die IEF:

(50 V	12 h	<i>step n' hold</i>) ¹⁾
500 V	1 h	<i>step n' hold</i>
1000 V	5 h	Gradient
8000 V	3 h	Gradient
8000 V	6 h	<i>step n' hold</i>

¹⁾ Dieser Schritt ist nur bei *in gel*-Rehydrierung notwendig.

Mit diesem Programm wurde die Fokussierung der Proteine auf dem IPG-Streifen mit ca. 60000 Vh (1V für eine Stunde entspricht 1 Vh) erreicht. Falls die Proteine nicht vollständig fokussiert waren, führte eine Verlängerung der Fokussierungszeit, etwa durch Erhöhung der erreichten Vh, nicht zu einem besseren Ergebnis sondern zur „Überfokussierung“ von Proteinen und somit zur Bildung von horizontalen Streifen im Gel.

2.5.2.3. Äquilibrierung der IPG-Streifen

Nach der IEF wurden die IPG-Streifen mit einer Pinzette aus dem *stripholder* genommen und das Öl vorsichtig abgetupft. Nach anschließendem kurzen Spülen mit Aqua bidest. wurde der Streifen in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und jeweils 15 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer I und II inkubiert. Äquilibrierungspuffer I enthielt 10 mg/ml DTT und Äquilibrierungspuffer II 25 mg/ml Jodacetamid. 10 ml der Äquilibrierungspuffer waren ausreichend für 2 IPG-Streifen.

Äquilibrierungspuffer¹⁾:

Harnstoff ²⁾	8	M
SDS	4	% (w/v)
Glycerin	30	% (v/v)
Bromphenolblau	0,005	% (w/v)
Tris/HCl	0,5	M pH 6,8

¹⁾ Die Substanzen wurden unter Rühren gelöst (nicht erwärmen) zu 10 ml aliquotiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

²⁾ Bei Variation der Harnstoffkonzentration im Rehydrierungspuffer muß auch hier die entsprechende Konzentration eingesetzt werden, da es sonst zu vertikalen Proteinstreifen im Gel kommen kann.

2.5.3. Zweite Dimension mittels SDS-PAGE

Für die zweite Dimension wurde die Ettan DALTsix Electrophoresis Unit 230V/50 Hz, (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die sauberen Glasplatten (21,5 cm x 27,5 cm) wurden mit Paketklebeband sorgfältig abgeklebt und anschließend mit Klammern zusammengedrückt. Für ein Gel wurden 66 ml 12% SDS-Polyacrylamid Gelmix benötigt. Nach dem Gießen des Gels wurde es mit Aqua bidest. vorsichtig überschichtet. Alternativ dazu wurde der Ettan DALTsix gel caster zum Gießen der Gele verwendet. Nach der Äquilibrierung des Streifens wurde er mit einer Pinzette aus dem Hybridisierungsröhrchen entnommen, kurz in Laufpuffer getaucht und anschließend luftblasenfrei auf ein vorbereitetes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Der Streifen wurde mit 0,5%iger Agaroselösung (in Laufpuffer mit 0,005% [w/v] Bromphenolblau) überschichtet. Dabei wurde eine Kavität für den Proteinmarker ausgespart. Der Proteinmarker wurde auf ein kleines Stück Zellstoff aufgetragen und in die Kavität geschoben. In die Elektrophoresekammer wurden ca. 4,5 l Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurde die Gelkassette in die Kammer gehoben und bis zur Markierung mit Laufpuffer gefüllt. Die Füllhöhe des Laufpuffers muss in der oberen und unteren Kammer übereinstimmen. Der Laufpuffer wurde mit Hilfe eines Thermostaten auf 15 °C gekühlt. Anschließend wurde das folgende Programm am Stromversorgungsgerät gestartet.

Programm für die SDS-PAGE:

Spannung	Stromstärke	Leistung/Gel	Dauer
600 V	175 mA	4 W	45 min
600 V	350 mA	15 W	ca. 6 h

Der Gellauf wurde gestopt als die Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreichte. In der Regel dauerte eine Elektrophorese unter den oben genannten Bedingungen ca. 7 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten abgelöst und anschließend gefärbt (2.4.7. und 2.4.8.).

Zusammensetzung eines 12%igen SDS-Polyacrylamid Gels:

30% Polyacrylamidlösung	
(Rotiphorese Gel 30 [37,5:1], Roth, Karlsruhe)	26,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	16,5 ml
10% (w/v) SDS-Lösung	660 µl
10% (w/v) APS-Lösung ¹⁾	660 µl
Aqua bidest.	21,5 ml
TEMED	24 µl

¹⁾ Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von frisch hergestellter 10%iger APS eingeleitet.

Laufpuffer:	3	g	Tris/HCl
	14,4	g	Glycin
	0,1%	(w/v)	SDS
	ad 1000 ml Aqua bidest.		

2.6. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.6.1. Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität an der Sauerstoffelektrode

Der Sauerstoffverbrauch der P2C-MO wurde an einer Clark-Elektrode (Rank Brothers, Bottisham, England) bestimmt. Dabei wurde auf die Anode und Kathode 1 ml 3 M KCl-Lösung aufgetragen. Auf die Oberfläche der Flüssigkeit wurde luftblasenfrei ein Stück Elektrodennpapier gelegt, in dessen Mitte zuvor ein ca. 1 mm großes Loch geschnitten wurde. Darüber wurde eine semipermeable Teflonmembran aufgebracht. Anschließend konnte die Messkammer auf den Sockel geschraubt werden. Zur Eichung des Schreibers wurde luftgesättigter 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) und mit Natriumdithionit reduzierter Puffer verwendet die die selbe Temperatur besaßen die auch für die Messungen verwendet wurden. Die entsprechende Differenz des Schreiberausschlages diente zur Berechnung der spezifischen Aktivität des Proteins (Gleichung 1). Wegen der Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeiten wurde der Reaktionsraum und der Reaktionspuffer durch ein Wasserbad bei 35 °C temperiert. Unter diesen Bedingungen enthält 1 l H₂O bei Normaldruck 6,95 mg O₂, was einem Sauerstoffgehalt von 220 µM entspricht. Die Bestimmung der Respirationsrate R erfolgte nach Gleichung 1. Um die spezifische Aktivität

(U/mg) zu berechnen, wurde der Proteingehalt der Probe (mg/ml) berücksichtigt. Die einzelnen Komponenten des unten aufgeführten Messansatzes wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Messkammer injiziert. Die Messung wurde durch Zugabe von NADH bzw. P2C gestartet.

$$\frac{\Delta P \cdot O_2}{S} = R \text{ (}\mu\text{mol O}_2\text{/min)} \quad (1)$$

ΔP = Änderung des Schreiberausschlages in $\text{cm}/\text{min}^{-1}$

O_2 = O_2 -Konzentration im luftgesättigten Ansatz in μmol

S = Schreiberausschlag zwischen 0% und 100% O_2 in cm

Testansatz:

	μl Zugabe	Endkonzentration in mM
FAD	30	0,1
P2C	6	0,2
NADH	12	0,2
Probe	variabel	
KP-Puffer (pH 7,5)	ad 3 ml	50

2.6.2. P2C-Bestimmung durch *reverse phase-high performance liquid chromatography* (RP-HPLC)

Der P2C-Abbau wurde durch RP-HPLC bestimmt. Die Komponenten des Messansatzes welche im einzelnen weiter unten aufgeführt sind, sowie die zu messenden Proteine wurden auf Eis in ein Eppendorfreaktiongefäß pipettiert und anschließend mit 1 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) gemischt. Anschließend wurden die Ansätze bis zum Abstoppen der Reaktion bei 35 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestopt, indem die Proben durch 10 kDa Microcon-Säulen (Millipore, Bedford, USA) filtriert wurden. Aufgrund der hohen NADH-Oxygenase Reaktion von PycB musste den Ansätzen ein NADH regenerierendes System beigelegt werden (Becker *et al.*, 1997). Dazu wurde Glucose-Dehydrogenase (Glucose-DH) aus *Thermoplasma acidophilum* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Weiterhin wurde dem Messansatz Katalase hinzugesetzt, um entstehendes Wasserstoffperoxyd wieder zu O_2 zu oxidieren.

Der P2C-Abbau wurde durch RP-HPLC an einer HPLC 320 verfolgt, welche aus Pumpe 325, Detektor 325, DAD 440, Autosampler 460 und Säulenofen K4 (Techlab, Erkerode) bestand. Als Säule wurde eine Lichrospher 100 RP 18 (Merk, Darmstadt) verwendet. Die Säule wurde mit 10 mM KP-Puffer (pH 6,0, 5% Methanol) mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 30 °C äquilibriert. Von den gewonnenen Proben wurden 20 µl injiziert und anschließend mit 10 mM KP-Puffer (pH 6,0, 5% Methanol) mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 30 °C eluiert. Das Elutionsprofil wurde bei einer Wellenlänge von 255 nm, dem Absorptionsmaximum von P2C, detektiert.

Messansatz zum Nachweis des enzymatischen P2C-Abbaues:

FAD	50	µM
NADH	1	mM
Glucose	50	mM
P2C	0,25 bzw. 0,5	mM
Katalase	130	U
Glucose-DH	0,5	U
Probe	variabel	
ad 1 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5)		

2.6.3. Bestimmung der Reduktaseaktivität

Zur photometrischen Bestimmung der Reduktaseaktivität wurden Plastikkuvetten mit 1 cm Lichtweg und das Uvikon 810 (Kontron, Eching) verwendet. Die einzelnen Komponenten des Messansatzes wurden einzeln in die Messküvette gegeben und anschließend durch Zugabe von 1 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5, 35 °C) gemischt. Die Enzymaktivitäten wurden im linearen Abhängigkeitsbereich von Reaktionsgeschwindigkeit zur Proteinmenge gemessen. Um die spezifische Aktivität (U/mg) zu berechnen, wurde die Gleichung 2 unter Berücksichtigung des Proteingehalts der Probe (mg/ml) verwendet.

$$\frac{\Delta E/\text{min} \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} = U/\text{ml} (\mu\text{mol Substrat}/\text{min}) \quad (2)$$

$\Delta E/\text{min}$	Extinktionsänderung pro min (min^{-1})
V	Gesamtvolumen (ml)
ε	spezifischer Extinktionskoeffizient des Elektronenakzeptors ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d	Küvetten-Lichtweg (cm)
v	Probenvolumen (ml)

Testansatz für die Messung der Reduktaseaktivität:

	μl Zugabe	Endkonzentration in μM
FAD	10	100
NADH	4	200
Elektronenakzeptor ¹⁾	variabel	variabel
Probe	variabel	variabel
KP-Puffer (pH 7,5)	ad 1 ml	50

¹⁾ Die Menge und die Endkonzentrationen sind der Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9: Eigenschaften der verwendeten Elektronenakzeptoren

Elektronenakzeptor	Konzentration in μM	λ in nm	ε in $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Cytochrome c	40	550	21,1
DCPIP	20	522	8,6
NBT/Triton X-100	20	535	18,3
Ferricyanid	20	420	1

2.6.4. Bestimmung von H_2O_2

Die Entstehung von H_2O_2 wurde an der Sauerstoffelektrode (2.6.1.) bestimmt. Dazu wurde dem zu vermessenden Messansatz Katalase zugegeben. Die freiwerdende Sauerstoffmenge entspricht dabei der Hälfte an vorher vorhandenem H_2O_2 .

Eine weitere Methode H_2O_2 nachzuweisen ist die Oxidation von Dianisidin zu messen. Dabei werden 250 μM Dianisidin und 25 U *horseradish-peroxidase* in die zu vermessende Probe gegeben. Die Farbreaktion kann man anschließend photometrisch bei 436 nm verfolgen.

Eine weitere Methode, die H_2O_2 -Menge zu bestimmen ist der „Boehringer-Mannheim Test“. Bei ihm entsteht durch die Umsetzung von H_2O_2 durch die *horseradish-peroxidase* aus 7 mM 4-Aminoantipyrin und 2 mM 2,4-Dichlorphenolsulfonsäure der Farbstoff 4-(*p*-Benzochinonmonoimino)-phenazon, welcher bei der Wellenlänge von 546 nm verfolgt werden kann.

2.6.5. Bestimmung der Flavin-Reduktion

Die Reduktion des Flavins wurde durch Messung des Absorptionsmaximums bei 450 nm durchgeführt. Dazu wurden 50 μM Flavin, 1 mM NADH mit den zu vermessenden Enzymkomponenten in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C inkubiert.

2.6.6 Fluoreszenzmessung

Die Messungen der Proteinfluoreszenz wurde an einem Kontron SFM 25 Spectralfluorometer (Kontron, München) bei 25 °C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 330 nm detektiert.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1*

3.1.1. Ausgangssituation

In vorangegangenen Arbeiten konnten die Komponenten der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* und *Rhodococcus koreensis Sedi2* aufgereinigt, charakterisiert und Peptide mittels Edmann-Abbau sequenziert werden (Hormann & Andreesen, 1994; Becker *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* nur eine MO-Komponente für ihre Aktivität benötigte. Demnach wurde das Enzym den bis dahin bekannten Ein-Komponenten-MO zugeordnet dessen bekanntester Vertreter *p*-Hydroxybenzoat Hydroxylase von *P. putida* darstellt (Hosokawa & Stanier, 1966; Hesp *et al.*, 1969). Die MO-Aktivität des Stammes *Rhodococcus koreensis Sedi2* erforderte zusätzlich zu einer MO-Komponente eine Reduktase-Komponente, was sie als Vertreter der Zwei-Komponenten-MO auszeichnet. Zur Identifizierung der jeweils kodierenden Gene wurden aus den bekannten Peptiden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, die zum Durchsuchen der zuvor erstellten vollständigen Sau3A-Genbanken mittels PCR eingesetzt wurden.

Die Klonierung der Gene für die P2C-MO von *Rhodococcus koreensis Sedi2* wurden in vorangegangenen Arbeiten von K. Schmitz und B. Thiemer durchgeführt (unveröffentlichte Daten). Das vollständige Gen der MO-Komponente dieser P2C-MO wurde in einer Sau3A-Genbank identifiziert und das klonierte DNA-Fragment als Plasmid pOx1 benannt. Die Identifizierung des vollständigen Gens der Reduktase-Komponente *pyrB* erfolgte in einer partiellen EcoRI-Genbank. Das Plasmid wurde als pRed1 bezeichnet. Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *pyrA* und *pyrB* ergaben, dass beide Komponenten von *Rhodococcus koreensis Sedi2* die höchsten Identitäten zu Vertretern der TC-FDM aufweisen. Im Falle von *Arthrobacter spec. Py1* konnte zunächst ein DNA-Fragment kloniert werden, welches jedoch nur eine Teilsequenz des P2C-MO-Gens *pycA* trägt, die den N-terminalen Bereich des Proteins kodiert. Das klonierte DNA-Fragment wurde als Plasmid pP2C2 bezeichnet (Abb. 8; Wolsch, 2001). Interessanterweise wies die partielle Aminosäuresequenz von *PycA* ebenfalls die höchsten Identitäten zu Vertretern von Zwei-Komponenten Systemen auf, obwohl sie eigentlich als Ein-Komponenten-MO charakterisiert worden war (Hormann & Andreesen, 1994; Wolsch, 2001). Somit stellte sich die Frage, warum die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* für die Katalyse der P2C-Hydroxylierung, im Gegensatz zum

entsprechenden Protein von *Rhodococcus koreensis* Sedi2, nur eine Protein-Komponente benötigt, jedoch beide MO-Komponenten hohe Identitäten zu Vertretern der TC-FDM-Familie besitzen.

3.1.2. Identifizierung und Sequenzierung des fehlenden Genbereichs von *pycA*

Zur Identifizierung der vollständigen Gen-Sequenzen von *pycA* wurde mittels PCR die bestehende Sau3A-Genbank von *Arthrobacter spec. Py1* (Wolsch, 2001) nach einem Klon, dessen Plasmid den gesuchten Genbereich trägt, durchsucht. Dazu wurden aus der bekannten DNA-Sequenz die Oligonukleotide MO3 und MO8 abgeleitet und in einer PCR eingesetzt (Abb. 8, Tab. 7, Anhang A). Aus dem Plasmidpool 2.7. der Sau3A-Genbank konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, dessen Größe (150 bp) mit der übereinstimmt, die sich aus der Lage der Oligonukleotide im Gen ergibt (Abb. 8). Auf diese Weise wurden 480 Transformanten mittels PCR geprüft, ob sich das MO3/MO8-Fragment amplifizieren ließ. Es konnte ein Klon isoliert werden, dessen Plasmidinsert den fehlenden Genbereich von *pycA* trug. Das Plasmid des identifizierten Klons wurde pP2C7 genannt und mittels *primer walking* vollständig sequenziert (Abb. 8; AnhangA).

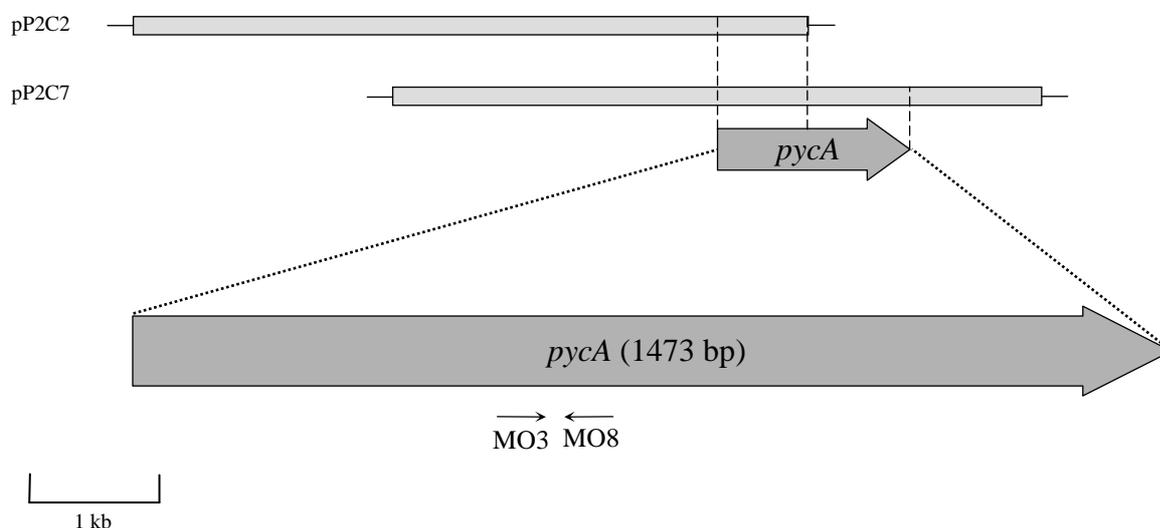


Abb. 8: Übersicht über die Lage der Oligonukleotide MO3, MO8 und des *pycA*-Gens und die aus der Sau3A-Genbank von *Arthrobacter spec. Py1* isolierten Plasmide pP2C2 und pP2C7

In der Abbildung stellen pP2C2 und pP2C7 die isolierten Plasmide dar. MO3 und MO8 stellen die Oligonukleotide dar, deren Lage bezüglich des *pycA*-Gens schematisch dargestellt ist.

3.1.3. Analyse der erhaltenen Gesamt-Sequenz von *Arthrobacter spec. Py1*

Nach der vollständigen, doppelsträngigen Sequenzierung der Plasmidinserts von pP2C2 und pP2C7 und der anschließenden Verknüpfung der DNA-Sequenzen konnte eine 7225 bp Sequenz von *Arthrobacter spec. Py1* erhalten werden (Anhang A). Der GC-Gehalt dieser DNA-Sequenz beträgt 61,8 mol % und entspricht somit dem für *Arthrobacter spec. Py1* bestimmten Wert von 61 mol% (Hormann & Andreesen, 1994). Durch den Einsatz des Tools „*Open reading frame finder*“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf) und den Vergleich der ableitbaren Aminosäuresequenzen mit verschiedenen Datenbanken konnten acht Gene *reg*, *mem*, *nit*, *pycC*, *pycA*, *pycD*, *pycB* und *abm* in der angegebenen Reihenfolge identifiziert werden (Abb. 9). Die Gene kodieren für ein Regulatorprotein, ein Membranprotein, eine Amidase bzw. Nitrilase, ein unbekanntes Protein, die P2C-MO, ein unbekanntes Protein, eine Flavin-Reduktase und eine Antibiotika-Biosynthese-MO (ABMO). Die höchsten Identitäten zu anderen Proteinen sind in Tab. 10 aufgeführt.

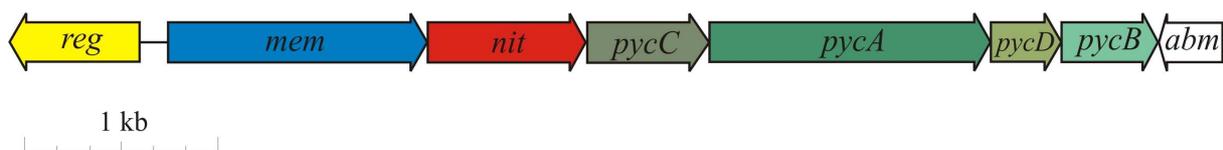


Abb. 9: Anordnung der identifizierten Gene in *Arthrobacter spec. Py1* in der erhaltenen Gesamtsequenz

Die Lage der identifizierten Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung an.

Als Erstes werden hier die Gene analysiert, deren Transkriptionsrichtung mit der der P2C-MO identisch ist. *Mem* besteht aus 1359 Nukleotiden und besitzt fünf Basen vor dem Transkriptionsstartpunkt eine mögliche Ribosomenbindestelle (AGGATCC). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *mem* zeigt die höchsten Identitäten zu verschiedenen Transportproteinen, wie z.B. zur Phthalat-spezifischen Permease MobB von *Burkholderia cepacia* und dem Prolin/Betain Transporter ProP von *E. coli*. *Mem* besitzt einen isoelektrischen Punkt von 9,3 und ein theoretisches Molekulargewicht von 48,5 kDa. Mit dem Programm „*TMpred - prediction of transmembrane regions and orientation*“ (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html, Hofmann & Stoffel, 1993) konnten zehn Transmembranhelices in der abgeleiteten Aminosäuresequenz identifiziert werden (Anhang C). Das sich anschließende Gen *nit* mit 795 Nukleotiden besitzt vier Basen vor dem Startcodon eine putative Ribosomenbindestelle (AGGAACA). Die abgeleitete

Tab. 10: Eigenschaften der aus den identifizierten Genen abgeleiteten Proteine

Gen	kDa	IEP	Homologes Protein (Identität, Ähnlichkeit)	Organismus
<i>reg</i>	25,5	6,23	- verschiedene putative Regulatorproteine der GntR-Familie (93%, 98%) ¹⁾	- z.B. <i>Arthrobacter aureescens</i> , <i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216
<i>mem</i>	48,5	9,3	- Phthalat-spezifische Permease, MopB ²⁾ (33%, 59%) - Prolin/Betain Transporter, ProP ³⁾ (28%, 54%)	- <i>Burkholderia cepacia</i> Pc701 - <i>E. coli</i>
<i>nit</i>	28,5	4,86	- verschiedene putative Amidasen, Nitrilasen und C-N Hydrolasen (94%, 96%) ¹⁾	- z.B. <i>Arthrobacter aureescens</i> , <i>Arthrobacter nicotinovorans</i>
<i>pycA</i>	54,1	5,12	- PyrA (71%, 84%) - Phenol-MO-Komponente A ⁴⁾ (31%, 53%; AAF66546) - <i>p</i> -Hpa-MO, HpaA ⁴⁾ (30%, 53%, CAA12320) - Pyoverdin Biosyntheseprotein, PvcC ⁶⁾ (28%, 49%; AAC21673)	- <i>R. koreensis</i> Sedi2 - <i>G. thermoglucosidasius</i> A7 - <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>pycB</i>	18,8	4,97	- PyrB (57%, 74%) - 4-Nitrophenol-MO Komponente B ⁷⁾ (30%, 54%, BAB86379) - Phenol-MO-Komponente B ⁸⁾ (28%, 51%; AAF66547)	- <i>R. koreensis</i> Sedi2 - <i>Rhodococcus</i> spec. PN1 - <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> A7
<i>pycC</i>	25,1	4,65	- PyrC (25%, 41%) - Orfs unbekannter Funktion (94%, 96%) ¹⁾	- <i>R. koreensis</i> Sedi2 - <i>Rhodococcus</i> spec. RHA1, <i>Nocardia farcinica</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424
<i>pycD</i>	13,8	4,63	- PyrD (35%, 52%) - Orfs unbekannter Funktion (94%, 95%) ¹⁾	- <i>R. koreensis</i> Sedi2 - <i>Arthrobacter aureescens</i> , <i>Nocardia farcinica</i> IFM10152, <i>Rhodococcus</i> spec. RHA1
<i>abm</i>	12,2	4,51	- putative ABMO (95 %, 99 %) ¹⁾	- <i>Arthrobacter aureescens</i> , <i>Arthrobacter</i> spec. FB24, <i>Brevibacterium linens</i> B

¹⁾ bei mehreren putativen Proteinen ist nur die Identität und Ähnlichkeit des ähnlichsten Vertreters angegeben²⁾ Saint & Romas, 1996; ³⁾ Culham *et al.*, 1993; ⁴⁾ Duffner *et al.*, 2000; ⁵⁾ Prieto & Garcia, 1994; ⁶⁾ Stintzi *et al.*, 1996; ⁷⁾ Takeo *et al.*, 2003; ⁸⁾ Duffner *et al.*, 2000

Aminosäuresequenz weist die höchsten Identitäten zu verschiedenen Nitrilasen und aliphatischen Amidasen auf. Für *Nit* wurde ein isoelektrischer Punkt von 4,86 und ein theoretisches Molekulargewicht von 28,5 kDa bestimmt. Das Startcodon von *nit* überlappt mit dem Stopcodon von *mem*, was auf eine gemeinsame Transkription hindeutet. Stromabwärts von *nit* befindet sich, getrennt durch 35 Nukleotide *pycC*. Direkt im Anschluss befindet sich *pycA*, wobei das Startcodon von *pycC* mit dem Startcodon von *pycA* überlappt. Getrennt durch zwei Nukleotide folgt *pycD*. Die DNA-Sequenzen von *pycC* und *pycD* bestehen aus 687 bzw. 372 Nukleotiden. Der Orf *pycC*, besitzt drei Basen vor dem Anfang des Gens, eine putative Ribosomenbindestelle (AAGGGAC). Bei *pycD* liegt die Ribosomenbindestelle zwölf Basen vor dem Startcodon (AATCGGA). Für die abgeleitete Aminosäuresequenz der beiden Gene konnten keine Identitäten zu bekannten Proteinen gefunden werden. Jedoch besitzen sie signifikante Ähnlichkeit zu Orfs, die ebenfalls die Gene von putativen Flavin-abhängigen-MO flankieren, wie z.B. in *Arthrobacter aurescens* TC1, *R. koreensis* Sedi2, *Nocardia farcinica* IFM10152, *Rhodococcus* spec. RHA1 und *B. cenocepacia* HI2424. Die isoelektrischen Punkte von PycC und PycD betragen 4,65 und 4,63 und die theoretischen Molekulargewichte 25,1 und 12,1 kDa. Flankiert von *pycD* und *pycC* befindet sich *pycA*. Es besteht aus 1473 Nukleotiden. *PycA* besitzt acht Basen vor dem Startcodon eine potentielle Ribosomenbindestelle (GAAAGGC). Das Gen *pycA* codiert für die von Hormann & Andreesen (1994) beschriebene P2C-MO, da die abgeleitete N-terminale Aminosäuresequenz mit der mittels Edman-Abbau bestimmten, MRTGKQYLKSLNDGRTVILDGEVVG (V)LxH-Aminosäuren umfassenden N-terminalen Sequenz 100%ig identisch ist. Die Aminosäuresequenz von PycA weist die höchsten Identitäten zu verschiedenen MO-Komponenten der TC-FDM-Familie und PyrA von *R. koreensis* Sedi2 auf und enthält keinerlei Flavin- bzw. NAD(P)H-Bindemotiv. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,12 und das theoretische Molekulargewicht beträgt 54,1 kDa. Stromabwärts von *pycD* liegt *pycB*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz die höchsten Identitäten zu Reduktase-Komponenten von verschiedenen Vertretern der TC-FDM-Familie und zur Reduktase PyrB von *R. koreensis* Sedi2 besitzt. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,97 und das theoretische Molekulargewicht beträgt 18,8 kDa. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der P2C-MO von *Arthrobacter* spec. Py1, trotz der damaligen Charakterisierung als Ein-Komponenten-MO von Hormann & Andreesen (1994), um eine Zwei-Komponenten-MO der TC-FDM-Familie handelt.

Stromauf- und stromabwärts der bisher beschriebenen Gene befinden sich die Gene *reg* und *abm*. Diese sind, bezüglich der schon besprochenen Gene, in entgegengesetzter Richtung

orientiert (Abb. 9). Das Gen *reg* besteht aus 681 Nukleotiden und besitzt fünf Basen vor dem Startcodon eine putative Ribosomenbindestelle (GAAAGGC). Die abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt die höchsten Identitäten zu verschiedenen Regulatoren der GntR-Transkriptionsregulator-Familie. Aus der Aminosäuresequenz ergibt sich ein isoelektrischer Punkt von 6,23 und ein theoretisches Molekulargewicht von 25,5 kDa. Für dieses Protein konnten stromaufwärts von *mem* fünf putative DNA-Bindestellen mit dem Programm „Meme“ (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) identifiziert werden, welche die Konsensussequenz von A-x₁₁-T besitzen (Abb. 10). Eine Bindestelle ist auf dem *reg*-codogenen Strang in 3'-5'-Richtung orientiert und die anderen vier auf dem nichtcodogenen Strang in 5'-3'-Richtung. Das Gen *abm* besteht aus 321 Nukleotiden. Es besitzt fünf Basen vor dem Startcodon eine mögliche Ribosomenbindestelle (AGGCAGC). Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist die höchsten Identitäten zu Metall- und Cofaktor-freien ABMO auf. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,51 und das theoretische Molekulargewicht beträgt 12,4 kDa.

Mit dem Programm „Neural network promoter prediction“ (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) konnten innerhalb der Gesamtsequenz drei putative Promotorstrukturen gefunden werden (Abb. 10, Anhang A). Das Programm identifiziert jedoch nicht die Shine-dalgarno-Sequenz und die -35 und -10 Region. Stromaufwärts von

```

A) 898  AGTGACTTGTGTT 885
     905  AGTGCGTAGCCTT 918
     949  ACTGAGTTGTCTT 962
     998  ACTGGCTAAACTT 1011
    1021  ACTCCGTTGTCTT 1034

B) 851  CAAATATAGACAGGTTGTATACAACCCGTCTACAGTTGTGTTCAGTGACT
     P1  =====>
     P2  <=====
     901  CCGCTCACGCATCGGAAATACCCCAAATTTTCCTGGGAGCCAGCCGTTTG
                                                mem→
     951  ACTCAACAGAAGCTCCGCGGTCTCCCACTCGTAAAGGATCCCCACAATGA
    1001  CCGATTTGAAGAAAGCAGAACTGAAGGCAACAGAAGCACTCCAGCCTGCC

```

Abb. 10: Sequenzvergleich der putativen DNA-Bindestellen von Reg (A) und deren Lokalisierung stromaufwärts von *mem* (B)

Die konservierten Basen, die für eine Bindung von Reg an die DNA essentiell sein könnten, sind weiß auf schwarzem Grund hervorgehoben. Die DNA-Bindestellen in der Gesamtsequenz sind rot und das Startcodon von *mem* unterstrichen hervorgehoben. Die beiden putativen Promotoren P1 und P2 sind durch Pfeile unter der Sequenz dargestellt. Die Pfeilrichtung gibt dabei die Transkriptionsrichtung an und die Pfeilspitze markiert den möglichen Transkriptionsstartpunkt.

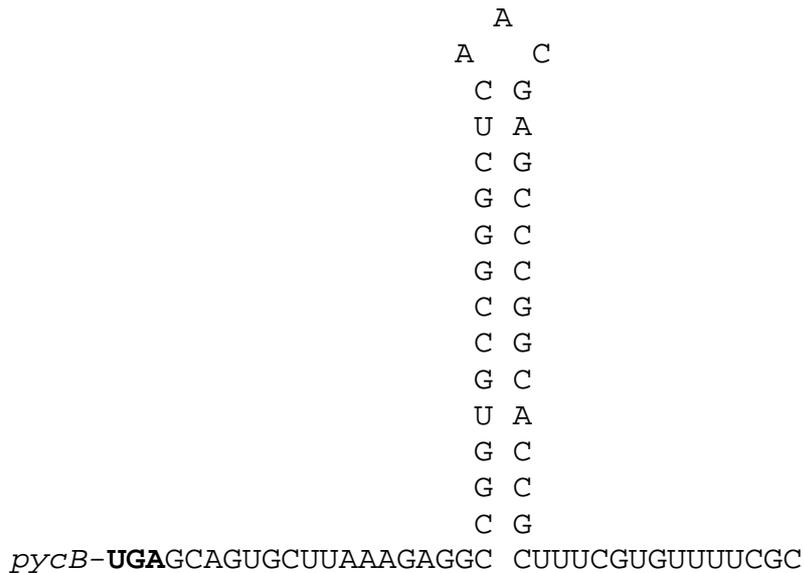


Abb. 11: Putative Terminatorstruktur des *pycB*-Transkriptes

Die mit dem Programm „*mfold*“ vorhergesagte Terminatorstruktur besitzt bei 30 °C eine freie Enthalpie ΔG von -36.9 kcal/mol. Das Stopcodon von *pycB* ist fett und die Uracil-reiche Sequenz unterstrichen hervorgehoben.

mem befinden sich die Promotoren P1 und P2. P1 könnte die Transkription der Gene *mem*, *nit*, *pycC*, *pycA*, *pycD* und *pycB* initiieren und P2 die von *reg*. Ein weiterer putativer Promotor P3 konnte stromaufwärts von *pycA* gefunden werden. Er ist wahrscheinlich für die Transkriptionsinitiation von *pycA*, *pycD* und *pycB* verantwortlich (Anhang A).

Stromabwärts von *pycB* konnte durch das Programm „*Mfold*“ (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>, Zuker *et al.*, 1999) eine DNA-Sequenz identifiziert werden, welche beim Ablesen durch die RNA-Polymerase eine Rho-unabhängige Terminatorstruktur bilden könnte (Abb. 11). Diese *hair pin*-Struktur ist 13 bp lang und würde bei 30 °C, der optimalen Wachstumstemperatur des Stammes *Arthrobacter spec. Py1*, eine freie Enthalpie von -36,9 kcal/mol besitzen. Darauf folgt eine, für Rho-unabhängige Terminatorstrukturen charakteristische Uracil-reiche Sequenz.

3.1.4. Nachweis der Transkripte des *pyc*-Genclusters

Mittels Transkriptionsanalysen sollte untersucht werden, ob die identifizierten Gene (ausgenommen *abm*) am P2C-Abbau beteiligt sind. Dazu sollte die Expression der Transkripte in Succinat- und P2C-gewachsenen Zellen untersucht werden. Es wurde zunächst die Methode der *northern blot*-Analyse eingesetzt. Diese erwies sich jedoch als wenig geeignet, da sich der Zellaufschluss bei *Arthrobacter spec. Py1* als Gram-positiver Organismus sehr schwierig erwies. So war die Isolierung einer für *northern*-Hybridisierungen

ausreichenden Menge von Gesamt-RNA (20-30 µg) trotz Verwendung verschiedener Methoden nicht möglich. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Methode der RT-PCR eingesetzt. Der Vorteil der RT-PCR gegenüber einer *northern blot*-Analyse liegt in der Sensitivität, da theoretisch ein synthetisierter cDNA-Strang ausreicht, um diesen mittels PCR nachzuweisen. Durch den Einsatz der RT-PCR kann jedoch keine Aussage über die Gesamtlänge der Transkripte getroffen werden, die durch *northern*-Hybridisierungen möglich gewesen wäre. Aus der Gesamt-RNA von Succinat- und P2C-gewachsenen Zellen des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* wurde mittels *random*-Hexamer-Oligonukleotide cDNA amplifiziert. Anschließend wurden unter Einsatz spezifischer Oligonukleotide die einzelnen Gene mittels PCR nachgewiesen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 12 gezeigt. Eine Transkription von *mem* und *nit* konnte nur in P2C-gewachsenen Zellen von *Arthrobacter spec. Py1* nachgewiesen werden, nicht aber in Succinat gewachsenen Zellen (Abb. 12, PCR1, PCR2, PCR5). Aufgrund der Sequenzidentitäten von Mem zu verschiedenen Transportern und der P2C-abhängigen Induktion des *mem*-Transkripts könnte es sich bei dem Genprodukt um einen P2C-Transporter handeln. Weiterhin wurde *nit* mit *pycC* und *pycA* polycistronisch, P2C-induziert transkribiert (Abb. 12, PCR6), was darauf hinweist, dass auch die Genprodukte von *nit* und *pycC* am P2C-Abbau beteiligt sein könnten. Die Gene *pycA* und *pycB* wurden

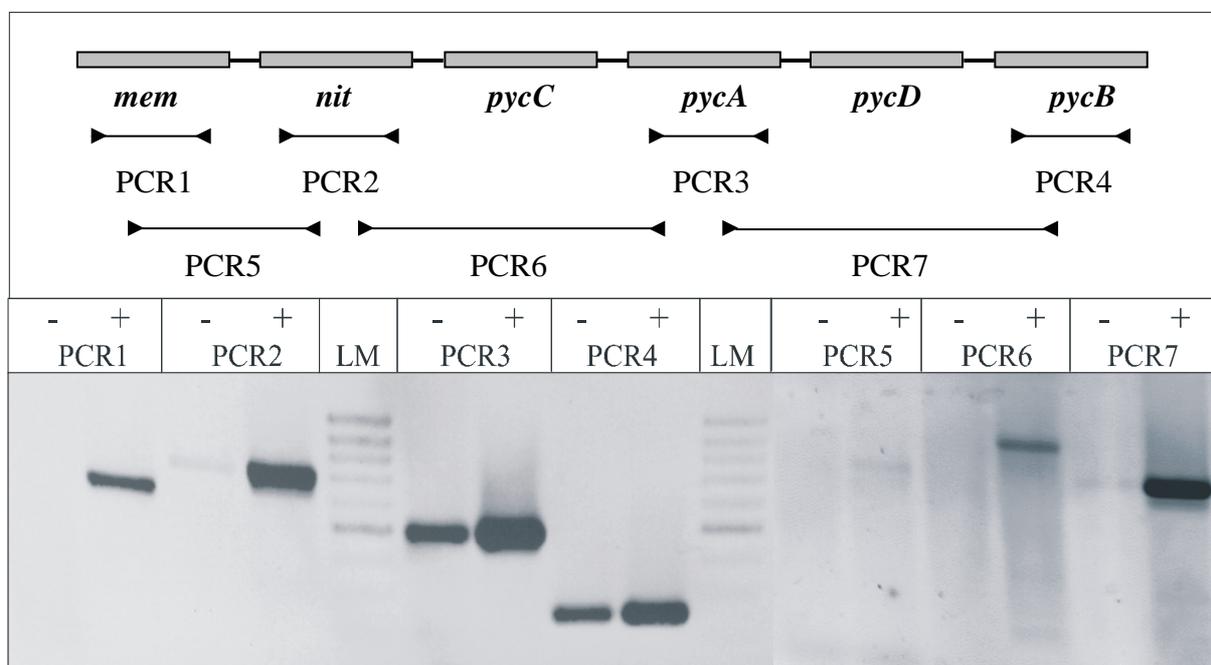


Abb. 12: PCR-Nachweis der RT-PCR-Produkte

Als Template für die cDNA-Synthese wurden gleiche Mengen von Gesamt-RNA aus Succinat (-) und P2C-gewachsenen (+) Zellen des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* eingesetzt. Die PCR-Produkte und Gene sind im oberen Teil schemastisch dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte sichtbar. LM (Marker)

dagegen konstitutiv transkribiert (Abb. 12, PCR3 und PCR4). Es ist jedoch festzustellen, dass beide Gene nach Wachstum mit P2C als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energie-Quelle stärker induziert wurden als bei Wachstum auf Succinat. Ein gemeinsames Transkript von *pycA*, *pycD* und *pycB* konnte im Fall von Succinat- und P2C- gewachsenen *Arthrobacter spec. Py1* Zellen nachgewiesen werden (Abb. 12, PCR7), wobei nur ein schwaches Signal in Succinat-gewachsenen Zellen detektierbar war. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es zwei Transkripte gab, ein Transkript, bei dem alle sechs Gene P2C-induziert transkribiert wurden und ein konstitutives, bei dem nur die Gene *pycA*, *pycB* und *pycD* transkribiert wurden. Da diese sechs Gene offensichtlich alle am P2C-Abbau beteiligt waren, werden sie im Folgenden als *pyc*-Gencluster bezeichnet. Für *reg* konnte weder nach Wachstum mit Succinat noch mit P2C ein Transkript nachgewiesen werden.

Durch *primer extension*-Reaktionen sollte der Transkriptionsstartpunkt der identifizierten Gene durch Verwendung FAM-markierter Oligonukleotide ermittelt werden. Die Auswertung der durchgeführten *primer extension*-Reaktionen zeigten zahlreiche Strangabbrüche, so dass mit dieser Methode keine Aussagen über den Transkription-Startpunkt getroffen werden konnten.

3.1.5. Heterologe Expression von *pycA*, *pycB*, *pycC* und *pycD* in *E. coli*

Nachdem mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte, dass *pycA* mit *pycB*, *pycC* und *pycD* bei Anwesenheit von P2C im Medium polycistronisch transkribiert werden (3.1.4.), sollten in enzymatischen Tests *Strep*-tag II-Fusionsproteine eingesetzt werden, um zu klären, ob PycB, PycC und PycD einen Einfluss auf die MO-Aktivität von PycA besitzen. Um dies zu untersuchen, wurden *pycA*, *pycB*, *pycC* und *pycD* heterolog in *E. coli* exprimiert. Dafür wurden die Gene in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert. Mit Hilfe dieses Vektors ist es möglich, die Proteine als C-terminale *Strep*-tag II-Fusionsproteine zu exprimieren und anschließend über eine *Strep*-Tactin-Sepharosesäule zu reinigen.

Mit dem Programm „Clone“ wurden zunächst die Restriktionsschnittstellen der Gene geprüft und mit den Enzymen der *multiple cloning site* des Vektors pASK-IBA3 verglichen. So erwiesen sich für die Gene *pycA* und *pycB* das Restriktionsenzym BsaI und für *pycC* und *pycD* das Restriktionsenzym BpiI für die Klonierung als geeignet. Zum Ableiten der entsprechenden Oligonukleotide (Tab. 7) wurde das Programm „IBA primer d'signer“ verwendet. Nach Amplifizierung der Gene wurden die Fragmente einem BsaI- bzw. BpiI-Restriktionsverdau unterzogen und anschließend in die entsprechend vorbereiteten Vektoren

ligiert. Die Konstrukte wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert und die Plasmidinserts durch Sequenzierung auf Korrektheit geprüft. Die erhaltenen Konstrukte wurden pPycA, pPycB, pPycC und pPycD benannt. Die Plasmide wurden anschließend in *E. coli* Rosetta(DE3) transformiert. Dieser Stamm besitzt ein zusätzliches Plasmid pRARE, auf dem t-RNAs (*argU*, *argW*, *ileX*, *glyT*, *leuW*, *proL*) kodiert sind deren Codone im Genom von *E. coli* selten zu finden sind. Anschließend wurden die Proteine PycA, PycB, PycC und PycD als C-terminale *Strep*-tag II-Fusionsproteine exprimiert. Zur Reinigung der Proteine über eine *Strep*-Tactin-Sepharosesäule wurde jeweils Zellmaterial einer 100 ml LB-Kultur verwendet, die wie unter 2.4.1.1. beschrieben angezogen und geerntet wurde. Die Zellen wurden durch eine French-Pressse bzw. Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Im Falle von PycA wurde den Reinigungspuffern 20 μ M FAD, 2 mM DTT und 10% (w/v) Saccharose zugegeben, da diese Substanzen im Falle der Reinigung der nativen P2C-MO aus *Arthrobacter spec.* Py1 zur Stabilisierung der Aktivität führte (Hormann & Andreesen, 1994). Alle vier Proteine konnten in *E. coli* löslich exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 13). Die heterolog exprimierten C-terminalen *Strep*-tag II-Fusionsproteine werden im Folgenden als PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C bezeichnet. So konnten aus einer 100 ml LB-Kultur ca. je 250 μ g PycA_C und PycC_C und ca. je 90 μ g PycB_C und PycD_C gewonnen werden. Interessant war, dass heterolog exprimiertes PycA_C nach Reinigung über eine *Strep*-Tactin-Säule ein typisches Spektrum eines Flavoproteins mit Absorptionsmaxima bei 358 und 445 nm aufwies (Spektrum nicht gezeigt). Das Flavinspektrum war ebenfalls detektierbar, wenn in den Reinigungspuffern kein zusätzliches FAD hinzugegeben wurde.

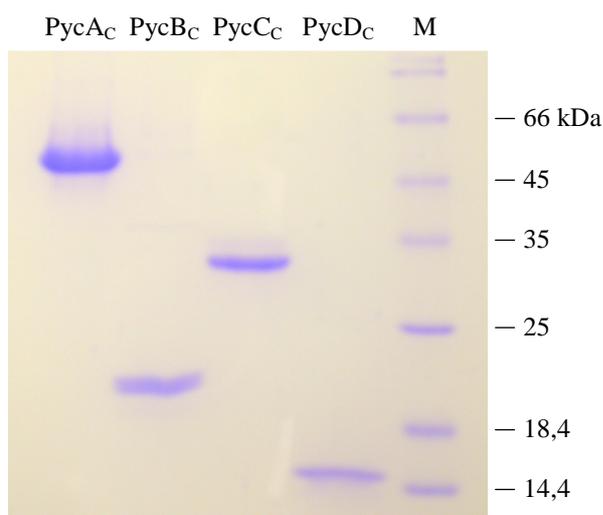


Abb. 13: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der heterolog exprimierten Proteine PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C

Die Proteine wurden über eine *Strep*-Tactin-Sepharosesäule gereinigt und anschließend 10 μ l der dritten Elutionsfraktion von PycA_C und PycC_C sowie 20 μ l von PycB_C und PycD_C aufgetragen. (M, Marker)

3.1.6. Nachweis des P2C-induzierten Sauerstoffverbrauches durch PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C

Nach der heterologen Expression von PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C in *E. coli* sollte durch Messung des substratabhängigen Sauerstoffverbrauches die Aktivität von PycA_C und der eventuelle Einfluss der drei putativen Komponenten PycB_C, PycC_C und PycD_C bestimmt werden. Bei der nativ gereinigten P2C-MO von *Arthrobacter spec. Pyl* konnten Hormann & Andreesen (1994) einen P2C-abhängigen Sauerstoffverbrauch mittels Sauerstoffelektrode nachweisen. Die von ihnen etablierte Messmethode wurde auch in dieser Arbeit verwendet (2.6.1.). Für PycA_C konnte jedoch weder ein P2C-, FAD- noch ein NADH-abhängiger Sauerstoffverbrauch an der Clark-Elektrode gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigte PycB_C einen Verbrauch von molekularem Sauerstoff. Dieser war sowohl NADH- als auch FAD- abhängig. Es wurde somit vermutet, dass PycB_C nur die Reduktion des FAD katalysiert, welches anschließend nicht-enzymatisch mit molekularem Sauerstoff zu H₂O₂ reagiert. Die Entstehung von H₂O₂ konnte durch Zugabe von Katalase nachgewiesen werden. Der Nachweis der FAD-Reduktion konnte spektroskopisch erbracht werden. FAD besitzt bei 450 nm ein Absorptionsmaximum, welches nach vollständiger Reduktion nicht mehr nachweisbar ist (Massey & Palmer, 1966). Nach Zugabe von 1 mM NADH wurden bei Anwesenheit von 50 µM FAD Spektren von 400 nm bis 500 nm nach 0, 3, 6, 9, 12 und 15 min aufgenommen (Abb. 14). Es konnte beobachtet werden, dass das Absorptionsmaximum bei 450 nm kontinuierlich abnahm. Nach ca. 9 min kam es zur Reoxidation des FAD, da wahrscheinlich das eingesetzte NADH vollständig verbraucht war, worauf die Zunahme der Absorption bei 450 nm beruht. Eine zeitliche Messung des NADH-Verbrauches bei 340 nm war bei diesem Experiment nicht möglich, da sich das Spektrum des Flavins auch bei dieser Wellenlänge ändert und so die Messung bei 340 nm beeinflusst wird. Die Abnahme des Sauerstoffs in der Messkammer der Sauerstoffelektrode ist somit auf die Flavin-Reduktion durch PycB_C und die folgende Reaktion des reduzierten FAD mit molekularem Sauerstoff zu H₂O₂ und oxidiertem FAD zurückzuführen. Die Zugabe von PycA_C zu diesem Reaktionsansatz hatte keine Steigerung des Sauerstoffverbrauches zur Folge. Auch die Zugabe von unterschiedlichen Mengen PycC_C und/oder PycD_C hatte keinen nachweisbaren Effekt auf den Sauerstoffverbrauch von PycB_C. Diese Ergebnisse zeigen, dass *pycB* in *E. coli* mittels pASK-IBA3 heterolog exprimiert werden konnte und das das Genprodukt PycB_C eine NADH-abhängige Flavin-Reduktase darstellt.

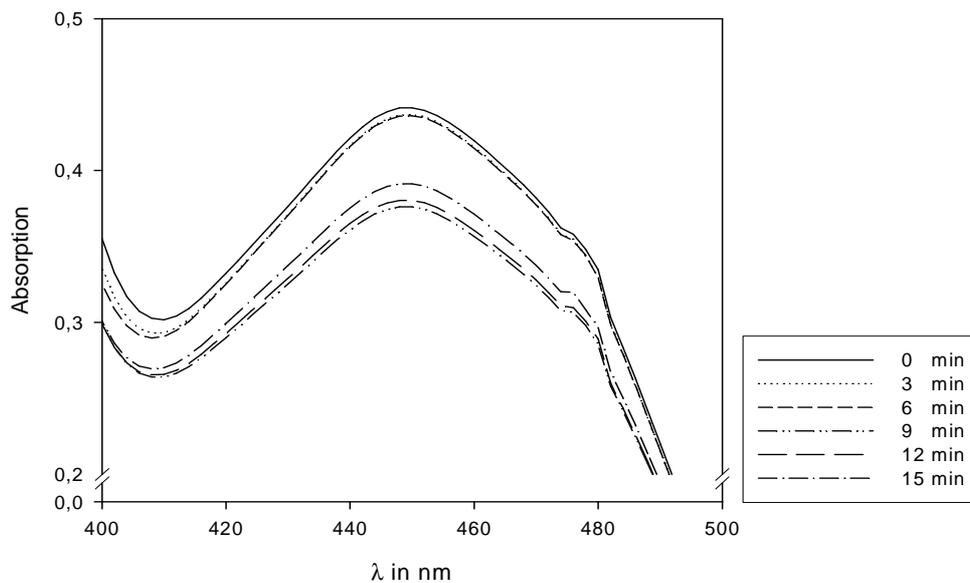


Abb. 14: Absorptionsspektren des FAD bei Reduktion durch PycB_C

Im Ansatz waren 1 mM NADH, 50 μM FAD sowie 14,7 nM PycB_C enthalten. Die Messungen wurden in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 25 °C unter aeroben Bedingungen vorgenommen.

3.1.7. Nachweis einer Cytochrom c-Reduktase-Aktivität für PycA_C und PycB_C

Um die Cytochrom c-Reduktase-Aktivität von PycA_C bzw. PycB_C zu bestimmen, wurden die durch Hormann etablierten Messbedingungen angewendet (Hormann, 1991; 2.6.3.). Er zeigte, dass die P2C-MO von *Arthrobacter spec.* Py1 eine NADH- und FAD-abhängige Elektronenübertragung auf verschiedene Elektronenakzeptoren katalysiert. In dieser Arbeit konnte für PycA_C jedoch keine Reduktion von verschiedenen Elektronenakzeptoren beobachtet werden. Dagegen reduzierte PycB_C das eingesetzte Cytochrom c mit einer spezifischen Aktivität von 27,8 U/mg. Diese Reaktion war sowohl NADH- als auch FAD-abhängig. PycA_C, PycC_C und PycD_C hatten auf die Cytochrom c-Reduktion durch PycB_C keinen messbaren Einfluss.

3.1.8. Nachweis des P2C-Abbaus durch PycA_C mittels RP-HPLC

Da mit Hilfe der Sauerstoffelektrode kein PycA_C-abhängiger Sauerstoffverbrauch gemessen werden konnte, wurde versucht den P2C-Abbau mittels RP-HPLC nachzuweisen. Zur Messung der P2C-Konzentration im Reaktionsansatz wurde die von Becker *et al.* (1997) etablierte Methode verwendet. Durch die Vermessung von reinen Substanzen wurden die

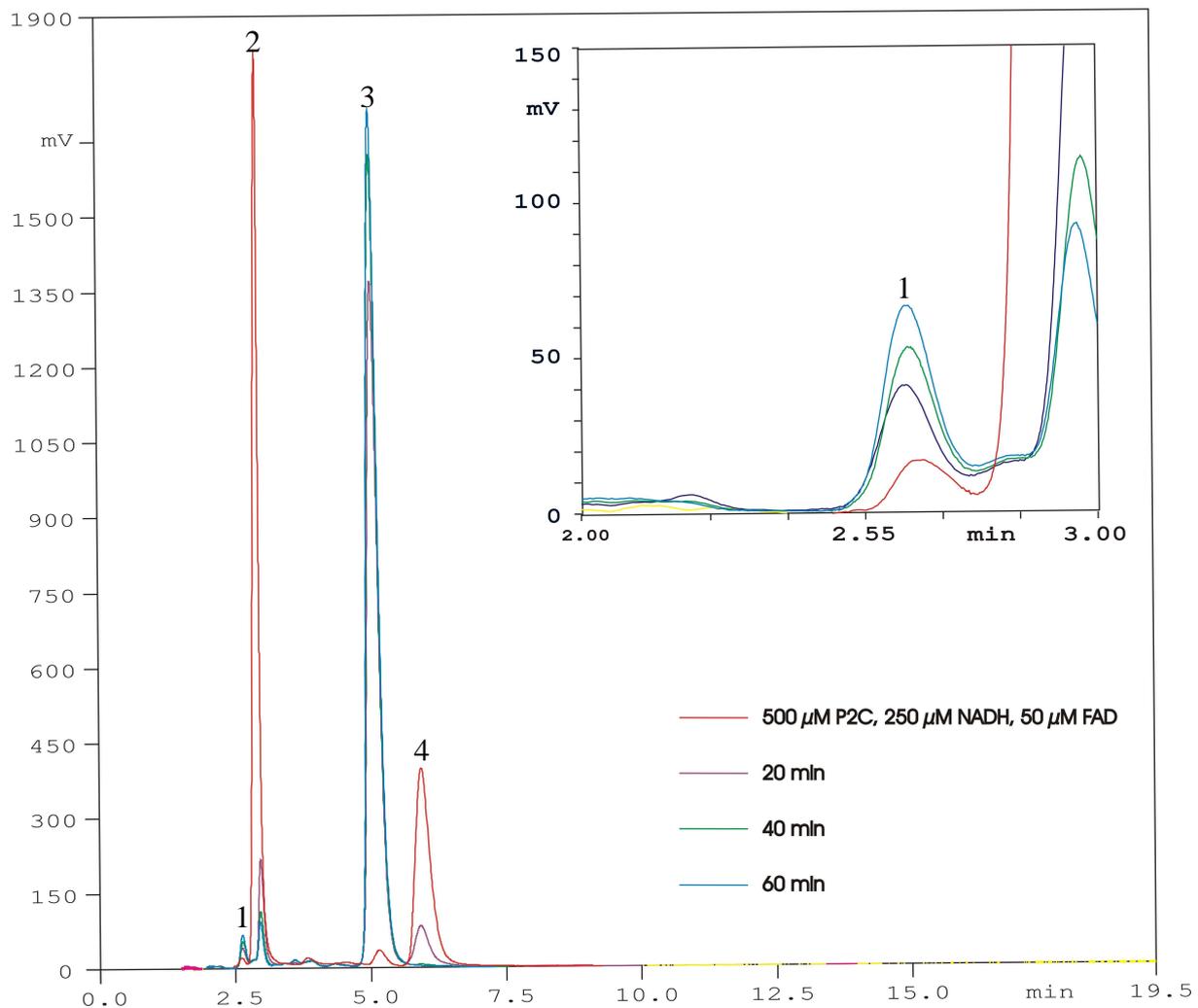


Abb. 15: HPLC-Chromatogramme der Produkte einer P2C Abbaureaktion an einer LiChrospher RP-18 Säule nach 20, 40 und 60 min

In den Ansätzen waren 250 μM P2C, 1 mM NADH, 50 μM FAD, 50 mM Glucose, 0,5 U Glucose-DH, 100 U Katalase, 80 nM PycB_C sowie 320 nM PycA_C enthalten. Zum Vergleich ist das Chromatogramm von 500 μM P2C, 250 μM NADH sowie 50 μM FAD dargestellt. Die gekennzeichneten Peaks stehen für 5-OHP (1), P2C (2), NAD (3) und NADH (4). Im *Inset* ist der Peak von 5-OHP vergrößert dargestellt.

Elutionszeiten von P2C, NADH und NAD bestimmt. P2C eluierte unter den gewählten Bedingungen bei ca. 3 min, NADH nach ca. 5 min und NAD nach ca. 6 min (Abb. 15).

Der Reaktionsansatz wurde, wie unter 2.6.2. aufgeführt, mit 250 μM P2C angesetzt. Es zeigte sich, dass kein P2C-Abbau durch PycA_C oder PycB_C allein erfolgte (Tab. 11, Messungen 5 und 6). Waren jedoch beide Komponenten im Ansatz enthalten, konnte ein P2C-Abbau von 204 μmol bestimmt werden. In Abb. 15 sind vier erhaltene Chromatogramme gegenübergestellt, die nach 20, 40 und 60 min Inkubation des Reaktionsansatzes bei 35 °C aufgenommen wurden. Zum Vergleich wird ein Chromatogramm gezeigt, welches nur P2C und NADH enthält (Abb. 15). Es ist ersichtlich, dass eine deutliche Abnahme des P2C-Peaks zu verzeichnen war. Dies zeigte erstens, dass für die P2C-MO-Aktivität PycA_C und PycB_C

Tab. 11: Messung¹⁾ des P2C-Abbaues durch PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C mittels HPLC

	NADH (mM)	FAD (μM)	PycA _C (nM)	PycB _C (nM)	PycC _C (nM)	PycD _C (nM)	P2C-Abbau in μmol
1	1	-	80	80	80	80	148
2	-	50	80	80	80	80	49
3	1	50	-	-	80	-	16
4	1	50	-	-	-	80	33
5	1	50	80	-	-	-	20
6	1	50	-	80	-	-	32
7	-	-	-	-	-	-	0
8	1	-	-	-	-	-	3
9	-	50	-	-	-	-	37
10	1	50	-	-	-	-	16
11	1	50	-	-	80	80	39
12	1	50	80	80	-	-	204
13	1	50	80	-	-	80	29
14	1	50	-	80	80	-	1
15	1	50	-	80	-	80	9
16	1	50	80	-	80	-	46
17	1	50	80	-	80	80	21
18	1	50	80	80	-	80	240
19	1	50	80	80	80	-	306
20	1	50	-	80	80	80	27
21	1	50	80	80	80	80	317

¹⁾ Die Messansätze 1-21 enthielten 500 μM P2C, 50 mM Glucose und 0,5 U Glucose-DH zur NADH-Regeneration, 100 U Katalase sowie die in der Tabelle aufgeführten Bestandteile. Alle Bestandteile wurden auf Eis in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert, durch Zugabe von 1 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) gemischt und anschließend für eine Stunde bei 35 °C inkubiert. Im rechten Teil ist der resultierende P2C-Abbau in μmol im Messansatz nach einer Stunde graphisch dargestellt.

essentiell sind und zweitens, dass heterolog exprimiertes PycA_C ebenfalls enzymatisch aktiv war. Das erhaltene HPLC-Chromatogramm der P2C-Abbaureaktion ist dem von Becker (1997) ähnlich. Die Substanzen P2C, NADH und NAD eluierten in derselben Reihenfolge, jedoch unterscheiden sich die Elutionszeiten deutlich, was auf die verschiedenen Methanolkonzentrationen im Elutionspuffer der beiden Ansätze zurückzuführen ist. Ein Unterschied gibt es weiterhin bezüglich der Peakzuordnung des postulierten Reaktionsproduktes 5-OHP. Von Becker wurde dem postulierten Reaktionsprodukt ein Peak zugeordnet der nach ca. 14,75 min eluierte (Becker *et al.*, 1997). Ein solcher Peak konnte in dieser Arbeit nicht detektiert werden. Jedoch wurde ein kleiner Peak detektiert, der kurz vor dem des P2C eluierte (Abb. 15, Peak 1). Da dieser mit wachsender Reaktionszeit größer wurde, lag die Vermutung nahe,

dass er dem postulierten Reaktionsprodukt zuzuordnen war. Desweiteren spricht für diese Peakzuordnung, dass P2C nach der Hydroxylierung hydrophiler wird und deshalb eher von der Säulenmatrix eluieren müsste (U. Lechner, persönliche Mitteilung). Die Tatsache, dass der Peak des Produktes nicht in einem stöchiometrischen Verhältnis zu dem des P2C vorliegt, ist möglicherweise auf die Instabilität von 5-OHP, welches sich rasch zu α -Iminoglutarat umlagern könnte oder auf eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der entstehenden Substanz, zurückzuführen (Hormann & Andreesen, 1994).

In weiteren Versuchen sollte nun ein möglicher Einfluss der bislang nicht bekannten Proteine PycC_C und PycD_C auf den P2C-Abbau durch PycA_C und PycB_C untersucht werden. Die Ergebnisse dieser RP-HPLC-Messungen sind in Tab. 11 zusammengefasst. In Anwesenheit von PycA_C, PycB_C, NADH und FAD konnte ein P2C-Abbau von 204 μ mol beobachtet werden (Tab. 11, Messung 12), wohingegen PycC_C und PycD_C allein nicht in der Lage waren P2C umzusetzen (Tab.11, Messung 3 und 4). Nach Zugabe von PycC_C bzw. PycD_C konnte jedoch eine Steigerung des P2C-Abbaus auf 306 μ mol bzw. 240 μ mol gemessen werden (Tab. 11, Messungen 18 und 19). Wurden dem Reaktionsansatz sowohl PycC_C als auch PycD_C zugegeben, stieg der Abbau auf 317 μ M (Tab. 11, Messung 21). Dies zeigt, dass PycC_C und PycD_C zwar nicht essentiell für den P2C-Abbau sind, ihnen jedoch eine Helferfunktion zukommt. Aus dem Vergleich der Messungen 2 und 21 wird deutlich, dass der P2C-Abbau NADH-abhängig ist, da ohne Zugabe von NADH nur eine geringe Änderung der P2C-Konzentration detektierbar war. Der P2C-Abbau im Messung 1 ist auf PycA_C-gebundenes FAD und das im Reinigungspuffer enthaltene FAD zurückzuführen, welches für die Stabilisierung der P2C-MO-Aktivität von PycA_C notwendig ist (Hormann & Andreesen, 1994).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle vier Komponenten PycA, PycB, PycC und PycD am P2C-Abbau beteiligt sind, wobei PycA und PycB die essentiellen Komponenten darstellen, dagegen PycC und PycD eine unbekannte Helferfunktion besitzen. Die P2C-MO aus *Arthrobacter spec. Py1* ist somit eine Flavin-abhängige Multi-Komponenten-MO. Bei ganz genauer Betrachtung der Abb. der gereinigten P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* von Hormann & Andreesen (1994) erkennt man tatsächlich eine schwache Proteinbande auf der Höhe von ca. 19 kDa, so dass frühere Präparationen sichtlich auch eine Zwei-Komponenten-MO darstellten.

3.1.9. Bestimmung des optimalen Verhältnisses von PycA_C zu PycB_C

Da mittels RP-HPLC gezeigt werden konnte, dass PycA_C und PycB_C nur gemeinsam den P2C-Abbau katalysieren, sollte in weiteren Versuchen das optimale Verhältnis dieser beiden Komponenten ermittelt werden. Dazu wurden 250 μ M P2C, 80 nM PycB_C sowie jeweils 80, 160, 240, 320 und 400 nM PycA_C eingesetzt. Nach jeweils 20 und 40 Minuten wurden den Ansätzen 300 μ l entnommen. Die Proteine wurden durch YM-50 Microcon-Säulen abgetrennt und der Durchfluss mittels einer RP-HPLC analysiert. Die graphische Darstellung zeigt, dass mit steigender molarer Menge an PycA_C, bezüglich der festgesetzten Konzentration von 80 nM PycB_C die Menge an P2C ab- und die des Produktes zunimmt (Abb. 16). Die Erhöhung von 320 auf 400 nM PycA hatte nur noch eine geringe Steigerung des P2C-Abbaus zur Folge. Somit kann für die P2C-Hydroxylierung ein molares Verhältnis von 1:5 von PycB_C zu PycA_C als optimal angesehen werden.

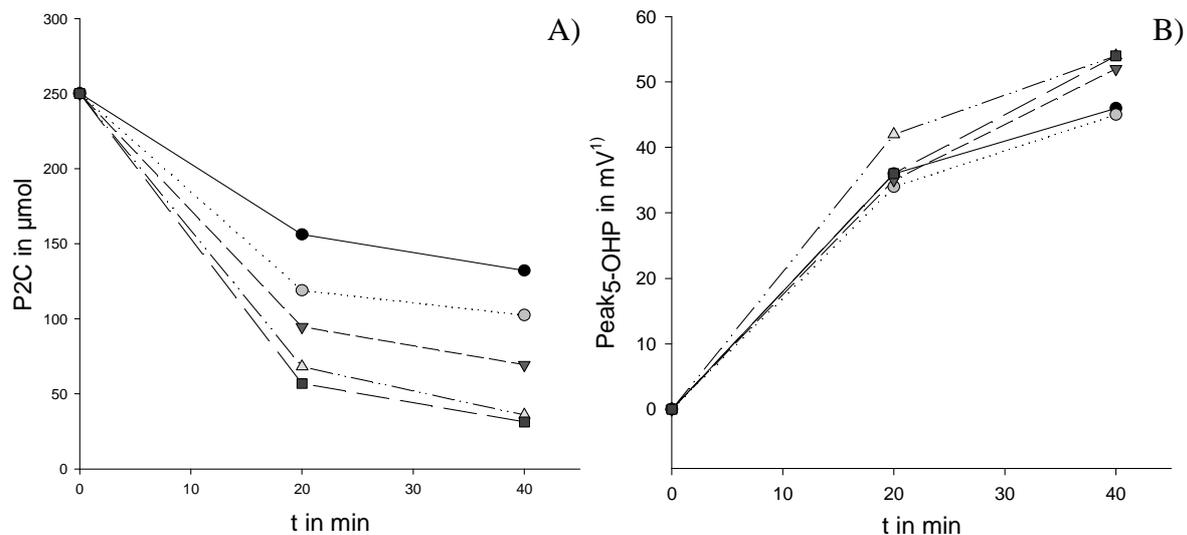


Abb. 16: Abhängigkeit des P2C-Abbaues vom molaren Verhältnis von PycA_C zu PycB_C. A) P2C-Abbau in μ mol, B) 5-OHP in mV

Die Messansätze enthielten 250 μ M P2C, 1 mM NADH, 50 μ M FAD, 50 mM Glucose, 0,5 U Glucose-DH, 100 U Katalase, 80 nM PycB_C sowie 80 nM (●), 160 nM (○), 240 nM (▼), 320 nM (△), 400 nM (■) von PycA_C. Alle Bestandteile wurden auf Eis in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und durch Zugabe 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) auf 1 ml gemischt. Nach 20 bzw. 40 minütiger Inkubation bei 35 °C wurden Proben entnommen und mittels HPLC analysiert. (¹ da 5-OHP aufgrund seiner Instabilität nicht kommerziell erhältlich ist, kann an dieser Stelle nur die Höhe des Peaks in mV angegeben werden)

3.1.10. Charakterisierung von PycB_C

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *pycB* zeigte die höchsten Identitäten zu Flavin-Reduktase-Komponenten von Vertretern der TC-FDM-Familie und vor allem zu PyrB von *R. koreensis* Sedi2. Nach erfolgreicher heterologer Expression des Gens in *E. coli* sollte PycB_C näher charakterisiert werden.

3.1.10.1. Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums

Das Temperaturoptimum von PycB_C wurde wie unter 2.6.3. beschrieben bei Temperaturen zwischen 20 und 50 °C ermittelt. Als terminaler Elektronenakzeptor wurde Cytochrom c verwendet. PycB_C wurde zuvor 5 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und anschließend dessen Aktivität photometrisch bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität von PycB_C bei einer Temperatur von 35 °C am höchsten ist (Abb. 17). Dieses Temperaturoptimum stimmt mit dem für die P2C-MO von *Arthrobacter* sp. Py1 bestimmten überein (Hormann & Andreesen, 1994).

Die Bestimmung des pH-Optimums von PycB_C erfolgte in verschiedenen Puffersystemen bei 35 °C (Abb. 17). Die höchsten spezifischen Aktivitäten konnten zum einen bei Verwendung von Acetat-Puffer, pH 4, sowie von Tricin-NaOH-Puffer, pH 7,6, gemessen werden. Die

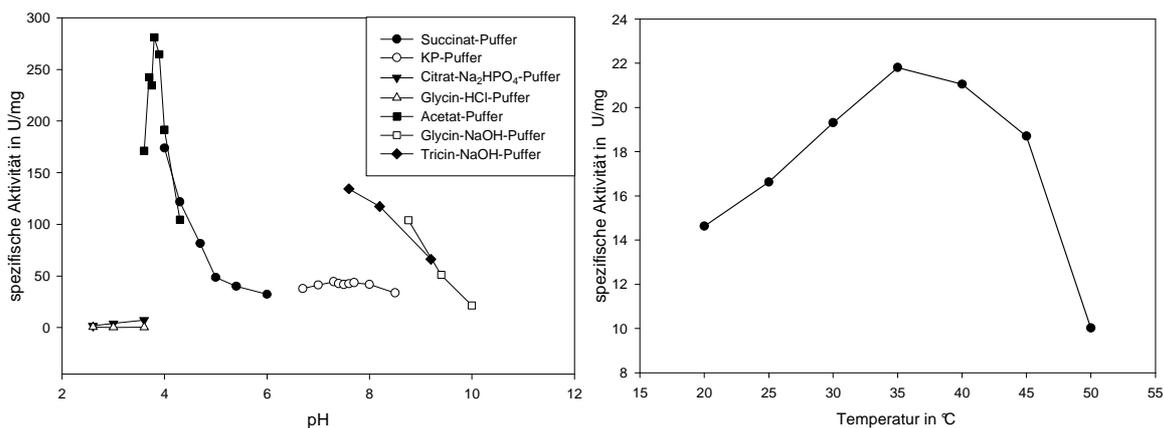


Abb. 17: Bestimmung der NADH-abhängigen Cytochrom c-Reduktion durch PycB_C in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert

Zur Bestimmung der Aktivitäten wurden 200 µM NADH, 50 µM FAD, 40 µM Cytochrom c sowie 26 nM PycB_C eingesetzt und mit dem auf 35 °C temperierten Puffer gemischt. Die Reduktion von Cytochrom c wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt. Zur Bestimmung des Temperaturoptimums von PycB_C wurde das Protein erst 5 min bei der entsprechenden Temperatur in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) inkubiert. Die Pufferkonzentrationen betragen 50 mM

ungewöhnlich hohe Aktivität bei pH 4 konnte durch entsprechende Kontrollmessungen auf die Aktivität von PycB_C zurückgeführt werden. Es zeigte sich, dass die Aktivität von PycB_C bei pH 4 von der Zugabe von FAD, NADH und Cytochrom c abhängig war. Bei dem Fehlen einer der Zusätze konnte keine Aktivität detektiert werden. Weiterhin halbierte sich die Cytochrom c-Reduktase-Aktivität bei Halbierung der eingesetzten Enzymmenge. Für weitere Untersuchungen wurde trotz der niedrigeren Aktivität von PycB_C der 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) verwendet, da unter Verwendung dieses Puffersystems die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* die höchste spezifische Aktivität aufwies (Hormann & Andreesen, 1994).

3.1.10.2. Nutzung verschiedener Elektronendonatoren und Flavin-Substrate durch PycB_C

In der Nutzung von Elektronendonatoren und Flavin-Substraten gibt es bei Flavin-Reduktasen signifikante Unterschiede. So liefern NADH und/oder NADPH die Elektronen für die Reduktion der Substrate FAD, FMN und Riboflavin (Fieschi *et al.*, 1995; Louie *et al.*, 2003). Um die Verwendung der einzelnen Elektronendonatoren und Flavin-Substrate durch PycB_C zu testen, wurde Cytochrom c als terminaler Elektronenakzeptor bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) verwendet. In den einzelnen Testansätzen wurden nur die zu testenden Elektronendonatoren bzw. Cofaktoren variiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefasst. So konnte für PycB_C NADH als Elektronendonator ermittelt werden. Mit NADPH konnte keine Cytochrom c-Reduktase-Aktivität gemessen werden und somit auch keine Elektronenübertragung auf FAD. Im Gegensatz zu PyrB von *R. koreensis* Sedi2 kann PycB_C neben FAD auch FMN und Riboflavin als Substrat nutzen, wenn auch mit geringerer Effizienz.

Tab. 12: Cytochrom c -Reduktion bei Nutzung verschiedener Elektronendonatoren und Flavin-Substrate durch PycB_C

Elektronendonator	Flavin	Elektronenakzeptor	Aktivität in U/mg ¹⁾
0,2 mM NADH	0,1 mM FAD	40 µM Cytochrom c	27,8
0,2 mM NADH	0,1 mM FMN	40 µM Cytochrom c	15,3
0,2 mM NADH	0,1 mM Riboflavin	40 µM Cytochrom c	1,4
0,2 mM NADPH	0,1 mM FAD	40 µM Cytochrom c	0

¹⁾ Die Messungen wurden in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C durchgeführt.

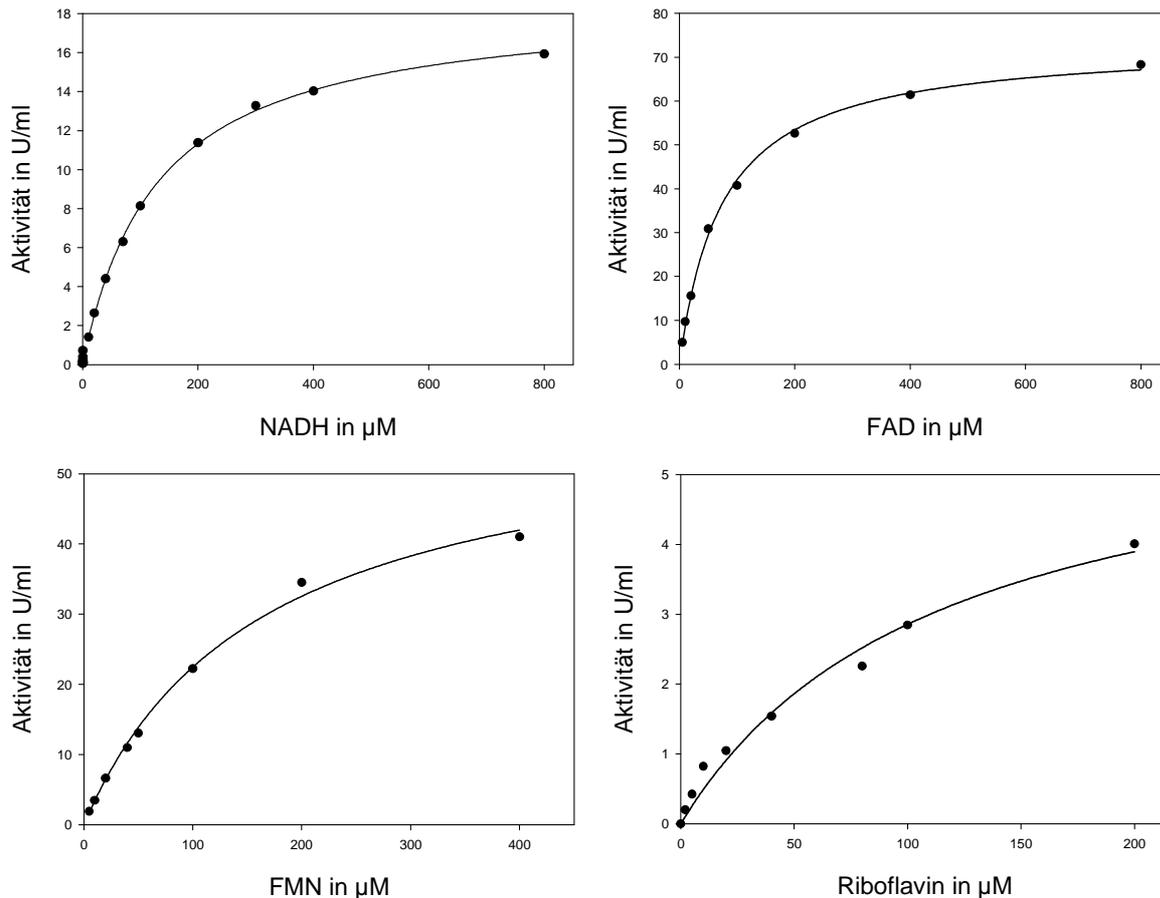


Abb. 18: NADH-, FAD-, FMN- und Riboflavin Substratsättigungskurven von PycB_C
Die Messungen wurden in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C vorgenommen. Als Elektronenakzeptor diente 40 μM Cytochrom c. PycB_C wurde mit 6,6 nM eingesetzt.

Tab. 13: k_{cat} - und apparente K_{m} -Werte von NADH, FAD, FMN, und Riboflavin für PycB_C

	$V_{\text{max}}^{1)}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	$K_{\text{m}}^{1)}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
NADH	310	129	47	0,365
FAD	1220	74	185	2,49
FMN	985	163	150	0,918
Riboflavin	102	115	16	0,135

¹⁾ Die Messungen wurden in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C mit 6,6 nM PycB_C vorgenommen.

Zur weiteren Charakterisierung von PycB_C wurden von dem Elektronendonator NADH und den Substraten FAD, FMN und Riboflavin Sättigungskurven bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Die ermittelten Aktivitäten wurden als Funktion gegen die Substratkonzentration aufgetragen und nach Michaelis-Menten analysiert (Abb. 18). V_{max} und die apparenten K_{m} -Werte wurden anschließend nach Lineweaver-Burk kalkuliert. Die Werte für k_{cat} , K_{m} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ sind in der Tab. 13 gegenübergestellt. So konnten für PycB_C bezüglich NADH, FAD, FMN und Riboflavin K_{m} -Werte von 129, 74, 163 und 115 μM ermittelt werden. PycB_C weist somit die höchste Affinität zu FAD auf.

3.1.10.3. Elektronenübertragung auf verschiedene terminale Elektronenakzeptoren

Reduktasen von Flavin-abhängigen Zwei-Komponenten-MO übertragen die Elektronen von NAD(P)H auf ein Flavin. Die Elektronen des reduzierten Flavins werden von der MO-Komponente anschließend für die Substrathydroxylierung verwendet. Im enzymatischen Test kann der proteinunabhängige Transfer vom reduzierten FAD auf artifizielle Elektronenakzeptoren verfolgt werden.

Im Test wurden Ferricyanid (FeCN), 2,6-Dichlorophenol-indophenol (DCPIP), Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) sowie 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (TTC) eingesetzt. Die Elektronenübertragung wurde photometrisch bei den in Tab. 13 angegebenen Wellenlängen verfolgt. Die spezifischen Aktivitäten wurden mit Hilfe der spezifischen Extinktionskoeffizienten nach der Gleichung 2 (2.6.3.) unter Einbeziehung der eingesetzten Enzymmenge berechnet und in Tab. 14 zusammengefasst. Die höchste spezifische Aktivität von 51,4 U/mg wurde bei Verwendung von FeCN gemessen. Weiterhin konnten bei Einsatz von DCPIP und NBT spezifische Aktivitäten von 22 bzw. 13 U/mg gemessen werden. Im Fall von TTC konnte keine Elektronenübertragung detektiert werden. Die Übertragung der Elektronen von NADH auf FAD durch PycB_C konnte somit durch den nachfolgenden Transfer auf die artifiziellen Elektronenakzeptoren FeCN, DCPIP und NBT nachgewiesen werden.

Tab. 14: Vergleich der Aktivitäten bei der Reduktion von alternativen Elektronenakzeptoren durch PycB_C

Elektronenakzeptor	Konzentration im Testansatz	Wellenlänge in nm	spezifischer Extinktionskoeffizient in mM ⁻¹ ·cm ⁻¹	Spezifische Aktivität in U/mg ¹⁾
Cytochrom c	40 μM	550	21,1	27,8
FeCN	300 μM	420	1	51,4
DCPIP	250 μM	522	8,6	22
NBT/Triton X-100	15 μM/5%	535	18,3	13

¹⁾ Im Ansatz waren 50 μM FAD, 200 μM NADH enthalten. Die Messungen wurden in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C vorgenommen.

3.1.10.4. Einfluss verschiedener Metallionen auf die Flavin-Reduktase-Aktivität von PycB_C

Zur weiteren Charakterisierung von PycB_C wurde der Einfluss verschiedener Metallionen auf die Flavin-Reduktase-Aktivität getestet. Als terminaler Elektronenakzeptor wurde Cytochrom c verwendet. Die Ergebnisse für PycB_C sind in Tab. 15 zusammengefasst und den Werten der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* (Hormann & Andreesen, 1994) und denen der Reduktase-Komponente der P2C-MO von *R. koreensis Sedi2* (Becker, 1997) gegenübergestellt. Nach Zugabe von Cu²⁺-Ionen sank die Cytochrom c-Reduktion auf 10% und bei Mn²⁺-Ionen auf 35% der Ausgangsaktivität. Im Fall der weiterhin getesteten Ionen, sank die Aktivität auf ca. 75% des Ausgangswertes.

Tab. 15: Übersicht über den Einfluss verschiedener Metallionen auf die Aktivität von PycB_C, der P2C-MO (Hormann & Andreesen, 1994) und der Reduktase-Komponente der P2C-MO von *Rhodococcus koreensis Sedi2*

Salz ¹⁺²⁾	Aktivität von PycB in % ³⁾	Aktivität der P2C-MO von <i>Arthrobacter spec. Py1</i> in % ⁴⁾	Aktivität der FAD-Reduktase von <i>R. koreensis Sedi2</i> in % ⁵⁾
kein Zusatz	100	100	100
MnCl ₂	35	100	38
ZnCl ₂	74	100	56
CaCl ₂	75	100	93
MgCl ₂	59	98	92
NH ₄ Cl	64	92	nicht getestet
NiCl ₂	76	78	0
CuCl ₂	10	18	0

¹⁾ Die Salzkonzentrationen im Test von PycB_C und der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* betragen mit Ausnahme von CuCl₂ 1 mM. CuCl₂ wurde mit 0,2 mM eingesetzt.

²⁾ Die Konzentration der Salze im Testansatz der FAD-Reduktase von *R. koreensis Sedi2* betrug 2 mM (Becker *et al.*, 1997).

³⁾ Die Aktivitäten wurden bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) ermittelt. 100% entsprechen 28 U/mg.

⁴⁾ Die Aktivitäten wurden bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) ermittelt. 100% entsprechen dem P2C-abhängigen Sauerstoffverbrauch von 0,48 U/mg

⁵⁾ Die Aktivitäten wurden bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) ermittelt. 100% der Aktivität entsprechen 23,2 U/mg Protein.

3.1.10.5. Untersuchungen zur Interaktion von PycA_C und PycB_C

Da PycA_C und PycB_C gemeinsam den P2C-Abbau katalysieren, sollte *in vitro* getestet werden, ob die beiden Komponenten miteinander interagieren. Dazu wurden PycA_C und PycB_C in gleichen molaren Mengen ohne weitere Zusätze bzw. mit 50 µM FAD und 25 µM P2C 10 min bei 4 °C inkubiert. Die beiden Ansätze sowie PycA_C und PycB_C als reines Protein wurden anschließend durch eine native PAGE aufgetrennt und das Gel einer NBT-abhängigen Aktivitätsfärbung unterworfen. Mit dieser Methode färbte sich nur PycB_C an (nicht gezeigt). Da sich unter diesen Bedingungen das Laufverhalten von PycA_C und PycB_C nach Inkubation

sowohl mit als auch ohne FAD und P2C nicht geändert hatte, konnte man davon ausgehen, dass unter den gewählten Bedingungen keine Interaktion der Proteine stattfand.

Alternativ dazu sollte eine Affinitätschromatographie Aufschluss über eine eventuelle Interaktion von nativem PycA aus Rohextrakt von P2C-gewachsenen Zellen des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* mit PycB_C geben. Dazu wurde PycB_C wie unter 2.10.7.2. beschrieben an eine *Strep*-Tactin Sepharosesäule gebunden. Alle verwendeten Lösungen sowie der Rohextrakt, wurden mit 20 µM FAD und 200 µM P2C versetzt. Der Rohextrakt wurde auf eine *Strep*-Tactin-Sepharosesäule gegeben und anschließend mit 5 ml 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurde das Protein eluiert. Nach Auftrennung der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung des Gels wurde festgestellt, dass kein Protein mit PycB_C coeluierte. Dies deutet an, dass PycA_C und PycB_C *in vitro* nicht miteinander interagieren.

3.1.11. P2C-MO-Aktivität von nativ gereinigtem PycA

Da die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* von Hormann & Andreesen (1994) nach der Reinigung als Ein- und nicht als Mehr-Komponenten-MO charakterisiert wurde, stellte sich die Frage, wieso diese P2C-MO ihrerzeit als „Ein-Komponenten-MO“ enzymatisch aktiv war, jedoch nicht die heterolog exprimierte Komponente PycA_C der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1*. Ein P2C-Abbau war damals ebenfalls beobachtet worden. Eine Erklärung für diesen Widerspruch könnte sein, dass nach dem letzten Reinigungsschritt der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* noch Spuren der Reduktase-Komponente vorhanden waren und so *in vivo* eine Interaktion der zwei nativen Komponenten bestand.

Betrachtet man nun die von Hormann & Andreesen (1994) veröffentlichte Abbildung des Gels nach SDS-PAGE des gereinigten Proteins, kann man in der Fraktion der Q-Sepharose auf einer Höhe von ca. 18 kDa eine schwache Proteinbande ausmachen, die der Reduktase-Komponente entsprechen könnte. Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich bei diesem Protein um PycB handeln könnte, wurde PycA aus *Arthrobacter spec. Py1* erneut nach der Methode von Hormann & Andreesen (1994) gereinigt. Nach dem dritten Reinigungsschritt über eine Blue-Sepharosesäule wurde von der Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität 10 µl bzw. 20 µl mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Das erhaltene SDS-Polyacrylamidgel ist in Abb. 19 gezeigt. Auf der Höhe von 54 kDa, 18 kDa und 12 kDa sind deutliche Proteinbanden zu erkennen, welche der Größe von PycA, PycB und PycD entsprechen. Die beiden kleineren Banden wurden ausgeschnitten, einem Trypsinverdau unterworfen und die erhaltenen internen Peptide mittels

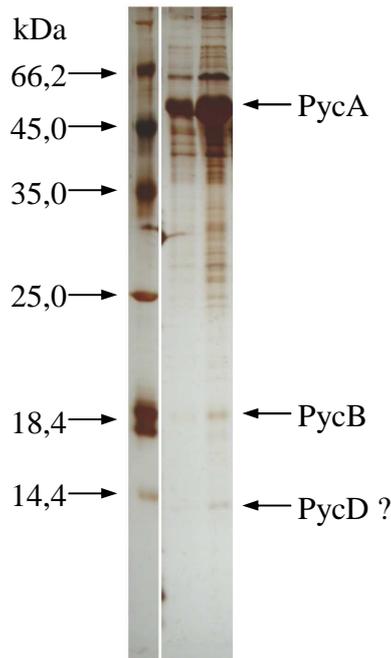


Abb. 19: Silber gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Fraktion 33 der Blue-Sepharosesäule

Die Pfeile markieren die potenziellen Banden der Proteine PycA, PycB und PycD. Es wurden 10 und 20 μ l der Fraktion 33 auf die PAGE aufgetragen und anschließend mit Silber angefärbt.

Massenspektroskopie analysiert (Dr. A. Schierhorn, Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung). Von der 18 kDa-Bande konnten die Sequenzen dreier Peptide bestimmt und eindeutig der Aminosäuresequenz von PycB zugeordnet werden (Abb. 20). Die sequenzierten Peptide des 12 kDa großen Proteins konnten keinem Protein des *pyc*-Genclusters zugeordnet werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in diesem Reinigungsverfahren natives PycA von *Arthrobacter spec.* Py1 nach einer Reinigung durch eine Q-Sepharosesäule noch mit nativem PycB eluiert. Die nach der Reinigung von nativem PycA messbare Cytochrom c-Reduktase-Aktivität und der Sauerstoffverbrauch an der Sauerstoff-Elektrode sollten somit auf der Anwesenheit von PycB beruhen.

```
MSLAPAFITIPDAMGMRRAMGRFLTGVAVVTTQHEDEQYGMTISSLTSSISLEPPILM
ISLNFGRTRTGEALMESGKFAVSILGAKQESVARRFAVRGGDRFGDGDFFDVTDNGLP
VIKCALAQADCSVVQQYDVGDHQVFFGQVTTCRDRDGEVLAFLKAGRFGSFSDFGHA
EIPWMF
```

Abb. 20: Proteinsequenz von PycB.

Die massenspektroskopisch identifizierten internen Peptide der 18 kDa Bande sind rot hervorgehoben.

3.1.12. Untersuchungen zur Funktion von PycC und PycD beim P2C-Abbau

Da sich in Anwesenheit von PycC_C und PycD_C die von PycA_C und PycB_C katalysierte P2C-Abbaurrate erhöhte, die beiden Proteine jedoch für die Hydroxylierung nicht essentiell waren (Tab. 11, Messung 12), wurde postuliert, dass diese Proteine eine Helferrfunktion besitzen könnten, um der Entkopplung der Flavinreduktion entgegenzuwirken. Mit den folgenden Versuchen sollte die Rolle von PycC_C und/oder PycD_C beim P2C-Abbau aufgeklärt werden. Eine Funktion dieser beiden Proteine könnte es sein, die Reduktion des Flavins durch PycB_C in Anwesenheit von P2C und die damit verbundene H₂O₂-Bildung zu verhindern. Dazu wurde FAD-Reduktion durch PycB_C und NADH in Anwesenheit von PycC_C oder PycD_C allein und anschließend als Doppel getestet. Die FAD-Reduktion wurde durch die photometrische Messung des terminalen Elektronenakzeptors Cytochrom c verfolgt. Eine Hemmung der PycB_C-Reduktase-Aktivität durch PycC_C und/oder PycD_C konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch die Tatsache, dass die NADH-Umsetzung zu NAD in Anwesenheit von PycC_C und/oder PycD_C wie in Abwesenheit dieser beiden Komponenten verläuft (Tab. 11, Chromatogramme nicht gezeigt), spricht ebenfalls gegen eine Bindung von PycC_C und PycD_C an PycB_C.

Eine andere Möglichkeit, die Entkopplung der Flavin-Reduktion zu verhindern bzw. zu reduzieren, wäre es, das reduzierte Flavin durch Bindung an PycC und/oder PycD zu maskieren und so der Reoxidation des reduzierten Flavins entgegenzuwirken. In diesem Fall sollte man eine Verringerung der entstehenden H₂O₂-Menge messen können. Dazu wurde die H₂O₂-Konzentration durch eine Endpunktbestimmung mittels Katalase an der Sauerstoffelektrode ermittelt. Diese Versuche führten jedoch zu keinen Ergebnissen, da die Platin-Elektrode H₂O₂ autokatalytisch in O₂ und H₂O spaltet. Auch die unter 2.6.4. beschriebene photometrische Verfolgung durch Dianisidin erwies sich als nicht geeignet, da das Reaktionsprodukt bei derselben Wellenlänge absorbierte wie das verwendete Flavin. Weiterhin wurde zur Bestimmung der H₂O₂-Konzentration der „Boehringer-Mannheim Test“ angewendet. Das dabei entstehende Produkt 4-(*p*-Benzochinon-monoimino)-phenazon erwies sich als nicht stabil, da es zu keiner Akkumulation kam. Wahrscheinlich reagierte es mit dem reduzierten FAD, so dass auch hier keine direkte Messung der H₂O₂-Konzentration möglich war.

Wie schon erwähnt, besitzt das Spektrum von FAD ein Absorptionsmaximum bei 450 nm, welches nach Reduktion nicht mehr detektierbar ist. Nachdem eine direkte Bestimmung der H₂O₂-Konzentration nicht möglich war, sollte die photometrische Messung des reduzierten

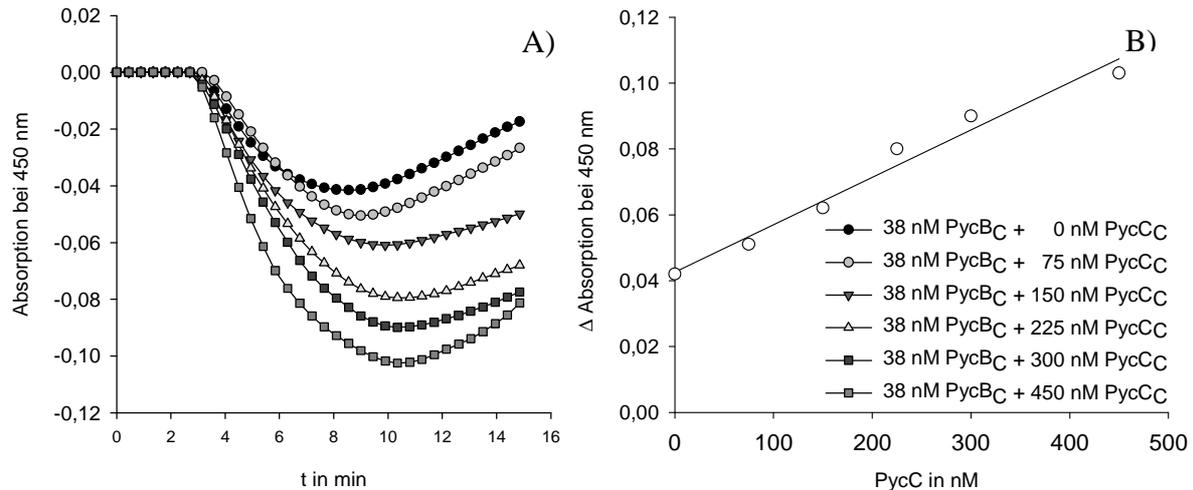


Abb. 21: Stabilisierung des reduzierten FAD durch PycC

A) Die Reduktion des FAD in Gegenwart von PycB_C wurde in aeroben Küvetten über 15 min bei seinem Absorptionsmaximum bei 450 nm verfolgt. In den Messansätzen waren 50 μ M FAD, 1 mM NADH, 38 nM PycB_C sowie 0-450 nM PycC_C enthalten. B) In diesem Diagramm wurde die maximale Absorptionsänderung bei 450 nm von A) gegen die eingesetzte PycC_C-Konzentration aufgetragen.

FAD einen Hinweis auf die Funktion von PycC_C und PycD_C geben. Im Reaktionsansatz wurden 38 nM PycB_C und verschiedene Konzentrationen an PycC_C (0, 75, 150, 225, 300 und 450 nM) eingesetzt und anschließend die Reduktion von 50 μ M FAD photometrisch bei 450 nm verfolgt (Abb. 21). Es wurde deutlich, dass die Absorption bei 450 nm mit steigender Konzentration an PycC_C stetig abnahm, was darauf hinweist, dass mehr FAD im reduzierten als im oxidiertem Zustand vorlag. Abb. 21 (B) zeigt, dass die Zunahme der maximalen

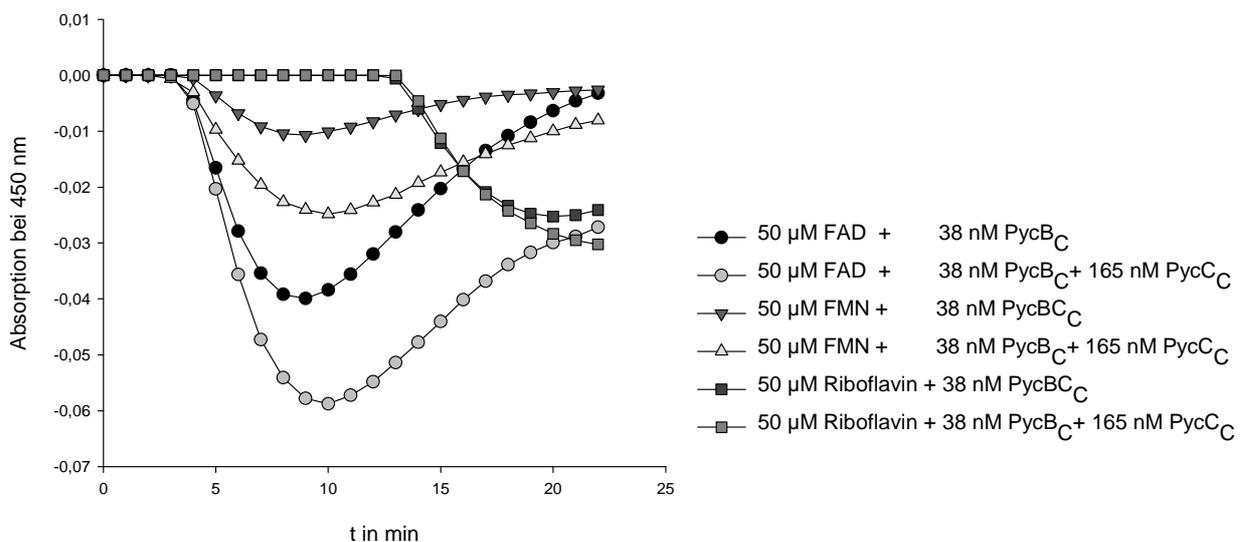


Abb. 22: Einfluss von PycC auf reduziertes FAD, FMN und Riboflavin

In den Messansätzen waren 38 nM PycB_C und 1 mM NADH enthalten. Die Reaktion wurde in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C durchgeführt. Die in den Ansätzen enthaltenen FAD-, FMN-, Riboflavin- und PycC_C-Konzentrationen sind der Legende zu

Absorptionsänderung bei 450 nm in einer Beziehung zur eingesetzten PycC_C-Konzentration stand. Als Kontrolle wurde zum Messansatz, statt PycC_C, 400 nM Lysozym hinzugegeben, das keinen Einfluss auf die Stabilisierung des reduzierten Flavins hatte. Gab man dagegen 400 nM BSA zum Enzymtest, konnte man einen ähnlichen Effekt wie nach Zugabe von PycC_C beobachten. Dies kann jedoch mit der Fähigkeit von BSA erklärt werden, FAD, FMN und Riboflavin binden zu können und es somit ebenfalls vor der Reoxidierung zu bewahren (Sawada *et al.*, 2001).

Da PycB_C auch in der Lage ist, neben FAD, auch FMN und Riboflavin zu reduzieren, wurde ebenfalls getestet, ob PycC_C diese Flavine in reduzierter Form vor der Oxidation durch molekularen Sauerstoff schützt. 50 µM der verschiedenen Flavine wurden mit 38 nM PycB_C und 165 nM PycC_C, wie unter 2.6.5. beschrieben, vermessen. In Abb. 22 sind jeweils die erhaltenen Kurven mit und ohne Zugabe von 165 nM PycC_C gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass bei allen drei getesteten Flavinen von PycB_C die Absorptionsänderung bei 450 nm mit dem Zusatz von PycC_C stärker ausfällt als bei dem Ansatz ohne PycC_C. Die verstärkte Abnahme der Absorption nach der Zugabe von PycC_C deutet darauf hin, dass PycC_C, neben reduziertem FAD, auch reduziertes FMN und Riboflavin vor der Oxidation durch molekularen Sauerstoff schützt. Durch die unterschiedliche Effizienz, mit der FAD, FMN und Riboflavin von PycB_C reduziert werden, stehen PycC_C unterschiedliche Konzentrationen des zu stabilisierenden Flavins zur Verfügung. Aus diesem Grund lässt sich aus dem Versuch nicht ableiten, ob PycC_C effizienter reduziertes FAD, FMN oder Riboflavin stabilisiert, sondern nur, dass PycC_C in der Lage ist, die Oxidation aller drei Flavine zu verzögern. Der verstärkte P2C-Abbau, welcher nach Zugabe von PycC_C zu PycA_C und PycB_C zu beobachten war (Tab. 11, Messung 19), lässt sich nach diesen Ergebnissen mit der längeren Verfügbarkeit von reduziertem FAD erklären, welches von PycA_C für die Substrathydroxylierung verwendet werden kann.

Durch Fluoreszenzlöschungsexperimente wurde anschließend untersucht, ob PycC_C FAD bindet und es dadurch zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt. Die Zugabe von FAD zu PycC_C bewirkte zwar eine Fluoreszenzlöschung. Diese Änderung nahm jedoch linear zu und führte nicht zu einer Sättigung. Daher wurde angenommen, dass diese Fluoreszenzlöschung unspezifisch war. Reduziertes FAD konnte nicht eingesetzt werden, da es nicht in einer klar definierten Konzentration hergestellt werden konnte.

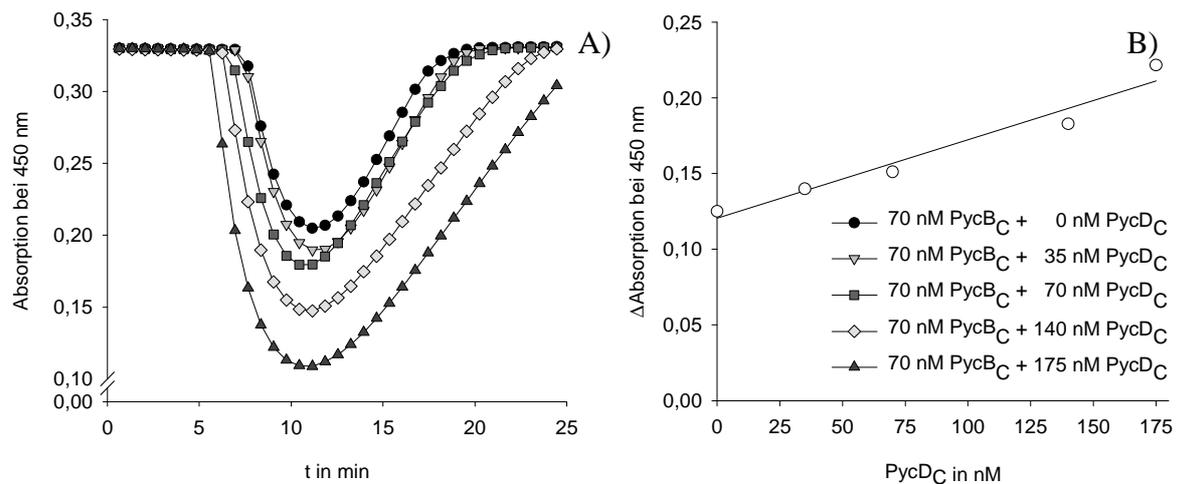


Abb. 23: Stabilisierung des reduzierten FAD durch PycD_C

A) Die Reduktion des FAD durch PycB_C wurde über 15 min bei seinem Absorptionsmaximum bei 450 nm verfolgt. In den Messansätzen waren 50 μM FAD, 1 mM NADH, 70 nM PycB_C sowie verschiedene Konzentrationen PycD_C (0-175 nM) enthalten. Die Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt. B) Hier ist die maximale Absorptionsänderung bei 450 nm gegen die eingesetzte PycD_C-Konzentration aufgetragen.

Analog zu den Versuchen zu PycC_C wurden Experimente zur Klärung der Funktion von PycD_C durchgeführt. Für PycD_C wurde ebenfalls eine Helferfunktion postuliert, da nach Zugabe von PycD_C zu PycA_C und PycB_C die P2C-Abbaurrate ebenfalls anstieg (Tab. 11, Messung 18). Wie unter 2.6.5. beschrieben, wurde die Reduktion und die sich anschließende Reoxidation von FAD durch 70 nM PycB_C nach Zugabe von 0, 35, 70, 140 und 175 nM PycD_C photometrisch verfolgt (Abb. 23). Es zeichnete sich ein ähnliches Bild ab, wie für PycC_C (Abb. 22). So führte die Zugabe von steigenden PycD_C-Konzentrationen ebenfalls zu einer zunehmenden Stabilisierung des reduzierten FAD. Weiterhin war auch PycD_C in der Lage, reduziertes FMN und Riboflavin vor der Oxidation durch molekularen Sauerstoff zu schützen (Abb. 24). Auch bei PycD_C konnte keine spezifische Löschung der Fluoreszenz nach Zugabe von verschiedenen FAD-Konzentrationen beobachtet werden, was entweder auf eine nicht erfolgende Bindung des Flavins oder ein Ausbleiben einer Konformationsänderung nach der Bindung von FAD schließen lässt.

Nach diesen Ergebnissen ist festzustellen, dass die Proteine PycC und PycD die beiden essentiellen MO-Komponenten PycA und PycB bei der P2C-Hydroxylierung unterstützen, in dem sie die Reaktion des reduzierten Flavins mit molekularem Sauerstoff verhindern bzw. verzögern. Demnach besteht die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* aus vier Komponenten.

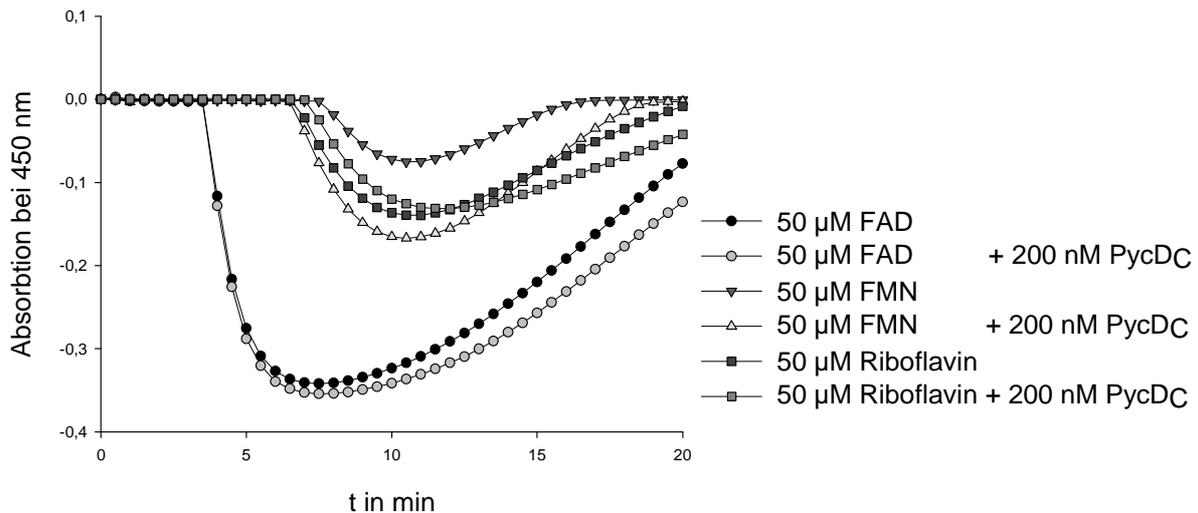


Abb. 24: Einfluss von PycD_C auf die Reduktion von FAD, FMN und Riboflavin durch PycB_C

In den Messansätzen waren 100 nM PycB_C, 1 mM NADH enthalten. Die Reaktion wurde in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C durchgeführt. Die in den Ansätzen enthaltenen Mengen von FAD, FMN, Riboflavin und PycD_C sind der Legende zu entnehmen.

3.1.12. Einfluss von P2C auf die FAD-Reduktion durch PycB_C

Da aus Literaturangaben bekannt ist, dass das Substrat der MO-Komponente die Reduktase-Komponente aktivieren kann (Chaiyen *et al.*, 2001; Sacharitakul *et al.*, 2005), sollte im Folgenden der Einfluss von P2C auf die Flavin-Reduktion durch PycB_C untersucht werden. In vorangegangenen Untersuchungen konnte nach Zugabe von P2C an der Sauerstoffelektrode keine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob P2C ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die FAD-Reduktase-Aktivität von PycB_C besitzt, wurde die Reduktion von FAD in An- und Abwesenheit von 500 µM P2C bei 450 nm und 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) verfolgt. Die Reaktionsansätze enthielten 50 µM FAD, 1 mM NADH und 100 nM PycB_C. In Abb. 25 (A) sind die erhaltenen Kurven gezeigt. Es ist ersichtlich, dass P2C einen stimulierenden Effekt auf die FAD-Reduktase-Aktivität von PycB_C ausübt, da sich die Absorption des FAD bei 450 nm annähernd doppelt so stark verringert wie ohne Zugabe von 500 µM P2C. So könnte es sein, dass P2C an PycB_C bindet und durch eine Konformationsänderung des Proteins dessen Aktivität erhöht wird. Weiterhin wurde getestet, ob in Anwesenheit von P2C die Stabilisierung des reduzierten Flavins durch PycC_C und PycD_C beeinflusst wird und welchen Effekt die Zugabe von PycA_C hat. So wurden die oben beschriebenen Messungen in Anwesenheit der Proteine PycA_C (Abb. 25, B), PycC_C (Abb. 25, C), PycD_C (Abb. 25, D), PycC_C und PycD_C (Abb. 25, E) sowie PycA_C, PycC_C und PycD_C (Abb. 25, F) durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach der Kombination von PycB_C mit PycC_C bzw. PycD_C auch in

Anwesenheit von P2C eine Stabilisierung des reduzierten Flavins erfolgte (Abb. 25, C und D). Auch die Anwesenheit von PycA_C führte zu einer Erhöhung des Anteiles an reduziertem Flavin im Messansatz, welcher sich nach Zugabe von P2C noch steigern ließ (Abb. 25, B). Die Vermessung der FAD-Reduktion in Anwesenheit der Komponenten PycB_C, PycC_C und PycD_C zeigte eine weitere Verringerung des Absorptionsmaximums von FAD (Abb. 25, E). Waren alle vier Komponenten im Messansatz enthalten, war die Absorptionsänderung bei 450 nm am größten und die Oxidationsgeschwindigkeit am geringsten, so dass nach 25 min immer noch reduziertes FAD für PycA_C zur Verfügung stand.

Diese Ergebnisse zeigen erstens, dass sich die FAD-Reduktase-Aktivität von PycB_C nach Zugabe von P2C erhöht und zweitens, dass in Anwesenheit aller vier Komponenten der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* die Stabilisierung des reduzierten Flavins am effektivsten ist.

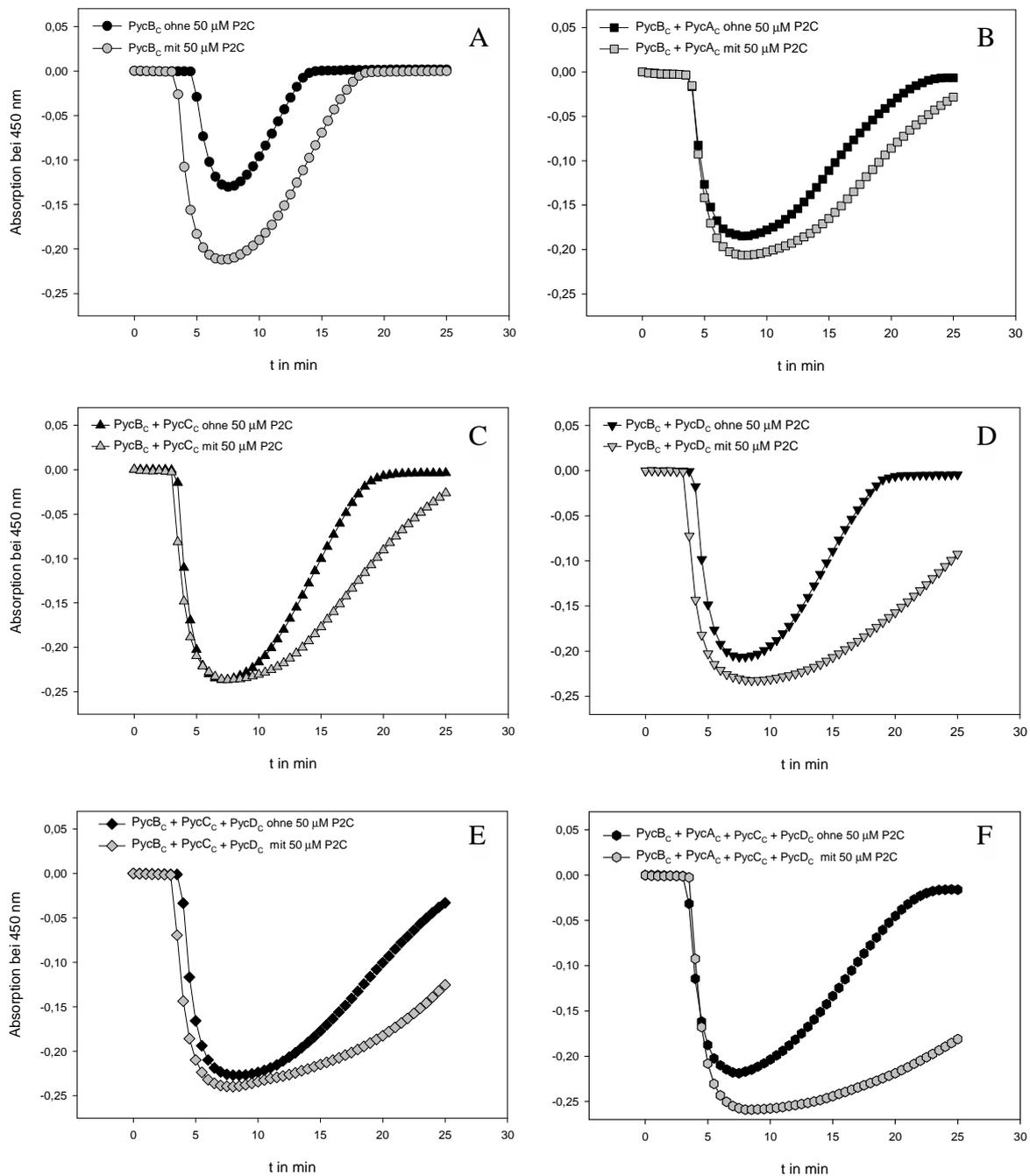


Abb. 25: Einfluss von P2C auf die FAD-Reduktion in Anwesenheit der einzelnen Proteinkomponenten PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C

Die Reduktion von FAD wurde bei 450 nm bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) verfolgt. Die Reaktionsansätze enthielten 50 μM FAD, 1 mM NADH und 100 nM PycB_C. Die Komponenten PycA_C, PycC_C und PycD_C wurden mit einer Endkonzentration von 400 nM hinzugegeben.

3.2. Nachweis von induzierten Selenoproteinen in *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* unter oxidativen- und Nitrit-Stressbedingungen

Viele Organismen besitzen gegen verschiedene Arten von Stress effiziente Abwehrstrategien. Es sollte an dieser Stelle untersucht werden, ob durch oxidativen- und Nitrit-Stress im Falle von *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* infolge der Stressantwort bisher unbekannte Selenoproteine gebildet werden. Zur Stressinduktion wurden Diamid (Azodicarboxylsäure-bis[dimethylamid]), KNO_2 , Methylviologen (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridyliumsalz, Paraquat) und Sauerstoff verwendet.

Diamid oxidiert im Cytoplasma Thiole von Proteinen, wodurch nicht native Disulfidbindungen entstehen können (Dosanjh *et al.*, 2005). Dieser Stress wird als Disulfid-Stress bezeichnet und kann ebenfalls infolge von oxidativem Stress auftreten.

Methylviologen kann im Cytoplasma durch die Übertragung eines Elektrons Radikale bilden. Durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff können dadurch Superoxidmoleküle entstehen.

Durch die Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff können sich, wie in der Einleitung bereits dargestellt wurde ROS entstehen. ROS sind starke Oxidationsmittel und können mit Lipiden, Proteinen und DNA reagieren und sie dadurch zerstören bzw. schädigen (Lesser, 2006).

Nitrit kann durch Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , welches für biologische Systeme nicht zugänglich ist, Eisenmangel hervorrufen (He *et al.*, 2006). Weiterhin können aus Nitrit andere RNS hervorgehen wie z.B. N_2O_3 , NO^\cdot und NO^+ . RNS können die Sulfhydrylgruppe des Cysteins, Häm-Gruppen und Eisen-Schwefel-Cluster zerstören (St John *et al.*, 2001).

Es wurden zuerst die Toleranzschwellen von *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* gegenüber Diamid, Methylviologen, Sauerstoff und Nitrit bestimmt. Es wurde eine Konzentration der jeweiligen Substanz als geeignet angesehen, die zu Einschränkung bzw. Verlangsamung des Wachstums der Bakterienzellen, jedoch nicht zum Absterben führte. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden die Bakterien im jeweiligen Mineralmedium mit einem Aminosäuregemisch angezogen. Von jeder Konzentration der zu testenden Stress-induzierenden Substanzen wurden drei Hungate-Röhrchen mitgeführt. Der Stress wurde beim Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 0,5 induziert. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Stressantwort des Organismus schnell nach der Induktion zu

beobachten ist, da es sonst zur Schädigung bzw. zum Absterben des Bakteriums kommen würde. Deshalb wurde das Wachstum nur einige Stunden nach der Induktion verfolgt.

Um Stress-induzierte Selenoproteine nachzuweisen, wurde den Medien bei der Anzucht der Bakterien zusätzlich radioaktives Selen hinzugegeben, so dass Selenoproteine radioaktiv markiert waren. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine konnten die markierten Proteine mittels Autoradiographie detektiert werden.

Zur Gewinnung der Proteinextrakte wurden fünf gleichzeitig angesetzte Hungate-Röhrchen angeimpft und 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{75}Se dem entsprechendem Mineralmedium zugegeben. Nachdem eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 0,6-0,8 erreicht war, wurde den Kulturen die entsprechende Menge Diamid, Nitrit, Methylviologen bzw. Luftsauerstoff hinzugegeben. Als Negativkontrolle dienten jeweils ungestresste Kulturen. Nach einer Stunde Inkubation wurden die fünf gleichartigen Kulturen vereinigt und durch Zentrifugation geerntet.

3.2.1. Stressinduktion bei *E. acidaminophilum*

Diamid-Stress

Zur Induktion von Stress durch Diamid wurden dem Mineralmedium mit Glycin als Substrat die Konzentrationen 0, 1, 2, 5 und 10 mM zugegeben. Hauptproblem bei der Messung der $\text{OD}_{600\text{nm}}$ war eine zunehmende Gelbfärbung einhergehend mit einer Trübung des Mediums, welche die Aufnahme einer Wachstumskurve unmöglich machte. Da keine optimale Konzentration zur Stressinduktion bestimmt werden konnte, musste hier auf Literaturangaben zurückgegriffen werden. Bei Experimenten mit *B. subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* verwendeten Leichert *et al.* (2003) und Babiyhuk *et al.* (1995) eine Konzentration von 1 mM Diamid zur Induktion von Stress.

Nitrit-Stress

Für die Induktion von Stress durch Zugabe von Nitrit wurden die Konzentrationen 0, 10, 20, 30, und 40 mM getestet. Aus den in Abb. 26 gezeigten Wachstumskurven geht hervor, dass *E. acidaminophilum* in den darauf folgenden Stunden nach der Induktion des Stresses das Wachstum einstellte. Jedoch erreichten die Kulturen nach 76 Stunden, in Gegenwart der Nitrit-Konzentrationen von 0, 10, 20, 30 und 40 mM eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,23, 0,46, 0,61, 0,68 bzw. 0,89. Diese Ergebnisse zeigen, dass *E. acidaminophilum* bei den verwendeten

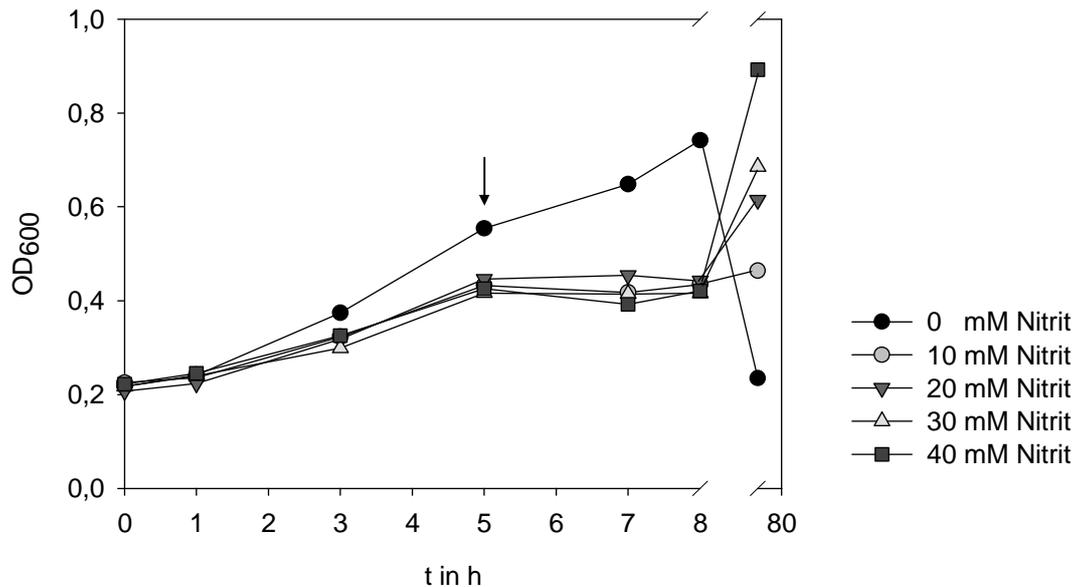


Abb. 26: Wachstum des Stammes *E. acidaminophilum* in Mineralmedium. Als Substrat diente Glycin

Die Zugabe von 0, 10, 20, 30 bzw. 40 mM Nitrit erfolgte nach fünf Stunden. Sie ist durch einen Pfeil markiert.

Konzentrationen nicht vollständig abstarb. Die geringen OD_{600nm} bei den Nitrit-Konzentrationen von 0, 10 und 20 mM sind darauf zurückzuführen, dass die *E. acidaminophilum*-Kulturen die stationäre Phase hinter sich gelassen hatten und bereits lysierten. Somit wurde als Stressinduktor eine Konzentration von 10 mM Nitrit im Medium gewählt, da hier das Wachstum zeitweise eingestellt, jedoch im Anschluss daran eine hohe OD_{600nm} erreicht wurde.

Methylviologen-Stress

Beim Einsatz von 0, 0,5, 1, 1,75 und 2,5 mM Methylviologen und 0,5 ml Luft ($105 \mu\text{M O}_2$ in der Gasphase) kam es zu einer starken Blaufärbung des Mediums, durch die Reduktion des Methylviologens. Bei Versuchen in Anwesenheit von Sauerstoff wurde grundsätzlich auf die Zugabe von Resazurin verzichtet, so dass die Verfärbung nicht auf den Redoxindikator zurückzuführen ist. Die Verfärbung des Mediums machte eine photometrische Verfolgung des Wachstums unmöglich. Für die Stressinduktion durch Methylviologen musste somit auf Literaturangaben zurückgegriffen werden. Babiychuk *et al.* (1995) verwendeten bei Versuchen mit *Sa. cerevisiae* $50 \mu\text{M}$. Diese Konzentration wurde auch für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Sauerstoff-Stress

Der Schwellenwert für O₂ wurde schon in einer vorangegangenen Arbeit (Rudolph, 2000) mit 1 ml Luft (entspricht 210 µM Sauerstoff in der Gasphase) bestimmt.

So wurden für die Stress-Induktion im Fall von *E. acidaminophilum* 1 mM Diamid, 10 mM Nitrit, 50 µM Methylviologen (+ 0,5 ml Luft) und 1 ml Luft (210 µM Sauerstoff in der Gasphase) verwendet.

E. acidaminophilum wurde in Mineralmedium mit Glycin als Substrat angezogen, die Zellen wurden geerntet und anschließend der Rohextrakt in einer SDS-PAGE analysiert. In Abb. 27 ist einem Silber-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (A) das entsprechende Autoradiogramm (B) gegenübergestellt. Das diffuse Bandenmuster des Autoradiogramms ist auf zahlreiche Risse zurückzuführen, die beim Trocknen der Gele entstanden. Jedoch konnten trotz der Risse zehn ⁷⁵Se-markierte Banden detektiert werden. Bei den detektierten Banden könnte es sich aufgrund der Größe um GrdB (47 kDa), das Peroxiredoxin (22 kDa), GrdA (17 kDa) sowie PrpU (11 kDa) handeln. Es sei jedoch angemerkt, dass die Größenzuordnung aufgrund des Fehlens eines radioaktiven Markers schwierig war. Weiterhin konnten mehrere schwache,

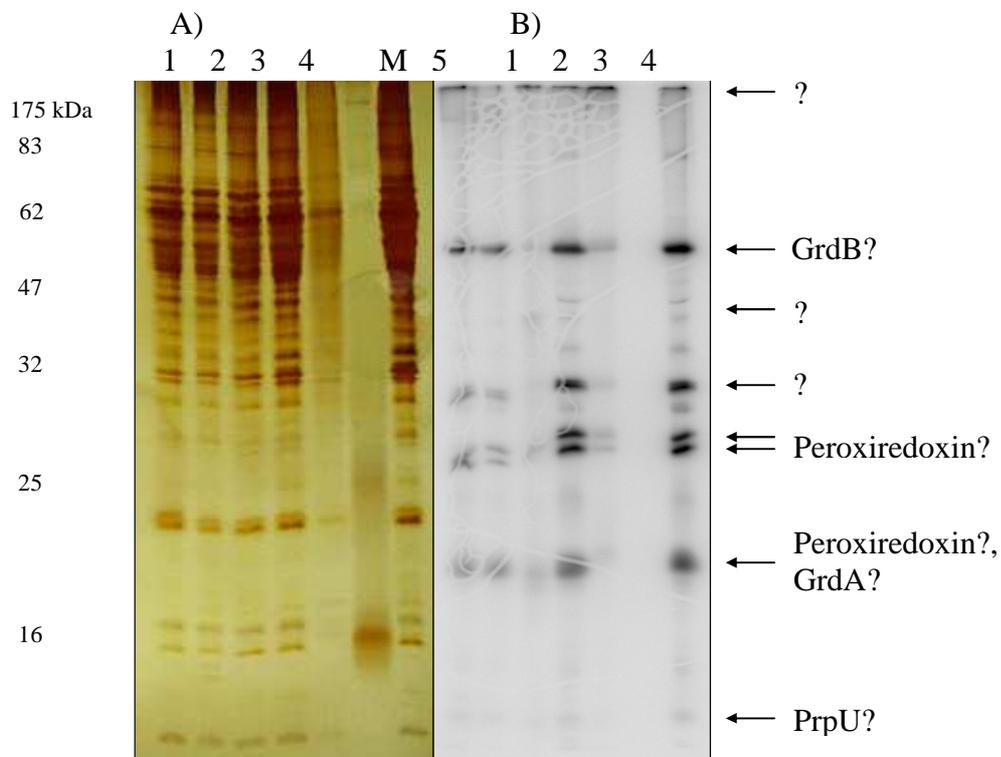


Abb. 27: Silber-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (A) und erhaltenes Autoradiogramm (B) von Rohextrakten des Stammes *E. acidaminophilum*

Es wurden 20 µl Rohextrakt nach Stressinduktion durch O₂ (1), KNO₂ (2), Methylviologen (3), Diamid (4) und ohne Stressinduktion (5) aufgetragen. Marker (M)

nicht näher zuzuordnende Proteinbanden detektiert werden, bei denen es sich um Abbauprodukte der Hauptbanden handeln könnte. Ein zusätzlich durch Stress induziertes Selenoprotein konnte unter den verwendeten Bedingungen im Fall von *E. acidaminophilum* nicht detektiert werden.

3.2.2. Stressinduktion bei *C. difficile*

Diamid-Stress

Bei *C. difficile* führten Diamid-Konzentrationen ab 2,5 mM zur sofortigen Lyse der Zellen, was am Aufklaren des Mediums zu erkennen war. So wurde Diamid in den Konzentrationen 0, 0,1, 0,25, 0,5 und 1 mM zur Stressinduktion eingesetzt. Wie bei den Versuchen mit *E. acidaminophilum* kam es in Folge des Wachstums zu einer Gelbfärbung einhergehend mit einer Trübung des Mediums, welche die Messung der OD_{600nm} unmöglich machte. Bei der Verwendung des aus der Literatur entnommenen Wertes von 1 mM Diamid konnte im Anschluss daran eine für weitere Untersuchungen ausreichende Menge an Zellmaterial geerntet werden (Babiychuk *et al.* 1995, Leichert *et al.*, 2003).

Nitrit-Stress

In Wachstumsversuchen mit *C. difficile* kamen Nitrit-Konzentrationen von 0, 10, 20, 30, und 40 mM zum Einsatz. Die erhaltenen Wachstumskurven sind in Abb. 28 wiedergegeben. Nach der Zugabe kam es bei den getesteten Nitrit-Konzentrationen nach zwei stündiger Inkubation zur vollständigen Lyse der Zellen. Auch der Versuch die Nitrit-Konzentration auf 5 mM abzusenken führte zur vollständigen Lyse der *C. difficile*-Zellen (Werte nicht gezeigt).

Die Verfolgung des Wachstums durch die Messung der OD_{600nm} gestaltete sich problematisch, da es nach der Zugabe von Nitrit zu einer zunehmenden Rosafärbung des Mediums kam, worauf der hohe OD_{600nm}-Wert bei *C. difficile* nach sieben stündiger Inkubation mit 40 mM Nitrit zurückzuführen ist. Aufgrund der Lyse der Zellen des Stammes *C. difficile* wurde davon ausgegangen, dass er keine effizienten Abwehrmechanismen gegen Nitrit besitzt und somit wohl auch keine zusätzlichen Selenoproteine induziert werden. Aus diesem Grund wurde hier auf eine Stressinduktion durch Nitrit verzichtet.

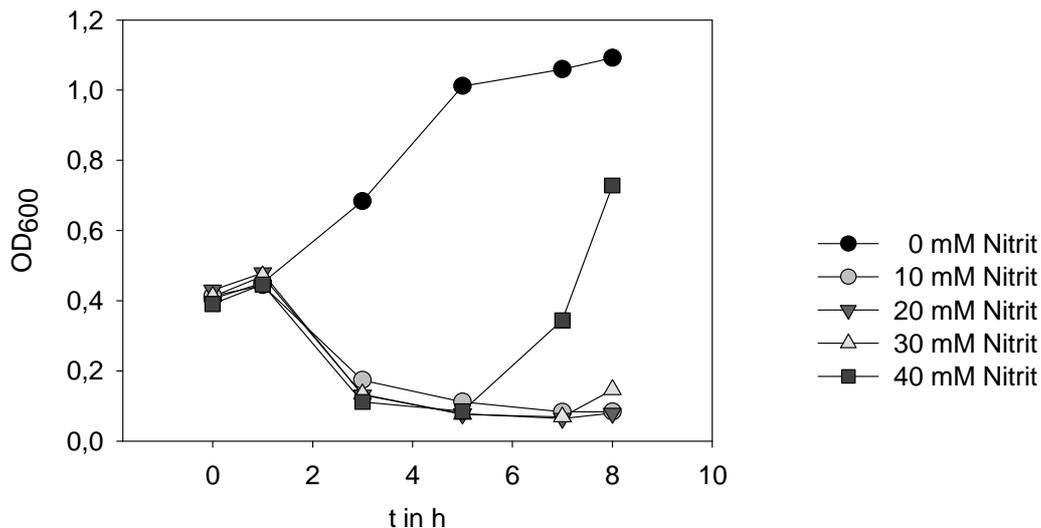


Abb. 28: Wachstum des Stammes *C. difficile* in Mineralmedium. Als Substrat wurde ein Aminosäuregemisch eingesetzt

Die Zugabe von 0, 10, 20, 30 bzw. 40 mM Nitrit erfolgte nach fünf Stunden. Sie ist durch einen Pfeil markiert.

Methylviologen-Stress

Beim Einsatz von 0, 0,5, 1, 1,75 und 2,5 mM Methylviologen und 0,5 ml Luft (105 μM O_2 in der Gasphase) kam es wie bei *E. acidaminophilum* ebenfalls zu einer Blaufärbung des Mediums, welche die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ -Bestimmung unmöglich machte. Auch hier wurde auf die von Babychuk *et al.* (1995) verwendete Konzentration von 50 μM Methylviologen zurückgegriffen.

Sauerstoff-Stress

Der Wert für die Stressinduktion durch Sauerstoff wurde von Rudolph (2000) mit 2,5 ml Luft (entspricht 525 μM Sauerstoff in der Gasphase) übernommen.

C. difficile wurde in Anwesenheit von ^{75}Se auf Mineralmedium mit einem Aminosäuregemisch als Substrat angezogen, wobei zur Stressinduktion 1 mM Diamid, 50 μM Methylviologen mit 0,5 ml Luft (105 μM Sauerstoff in der Gasphase) sowie 2,5 ml Luft (525 μM Sauerstoff in der Gasphase) verwendet wurden. 20 μl der jeweiligen Rohextrakte der geernteten Zellen wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, das resultierende SDS-Polyacrylamidgel wurde getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen (Abb. 29). Durch den Vergleich des erhaltenen Bandenmusters konnten bei allen Wachstumsbedingungen acht Banden radioaktiv markierter Proteine detektiert werden. Im Autoradiogramm ist ersichtlich

das unter den verwendeten Stressbedingungen kein zusätzliches Selenoprotein detektiert werden konnte. Kryukov & Gladyshev (2004) konnten durch Genomanalysen in *C. difficile* fünf offene Leserahmen identifizieren, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen ein Selenocystein enthalten. Kryukov & Gladyshev (2004) konnten so die Formiat-Dehydrogenase, GrdA und GrdB der Glycin-Reduktase, Selenophosphat-Synthetase (SelD) und die Prolin Reduktase (PrdB) im Genom feststellen. Die Sequenzen der Proteine gaben die Autoren jedoch nicht an. Um die Größen dieser Proteine bestimmen und anschließend den detektierten Proteinbanden zuordnen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit homologe Sequenzen der Proteine Formiat-Dehydrogenase, GrdA und GrdB, SelD und PrdB anderer Bakterien mit den *shotgun*-Sequenzen von *C. difficile* verglichen. Bis auf das Gen der Formiat-Dehydrogenase konnten so Gene dieser Proteine im Genom von *C. difficile* identifiziert werden. Durch die nun bekannte Aminosäuresequenz konnten ebenfalls die theoretischen molekularen Massen der Proteine bestimmt und den Banden des Autoradiogramms zugeordnet werden (Abb. 29). Für die Komponenten der Glycin-Reduktase GrdA und GrdB konnte ein theoretisches Molekulargewicht von 16,7 und 46,6 kDa und für

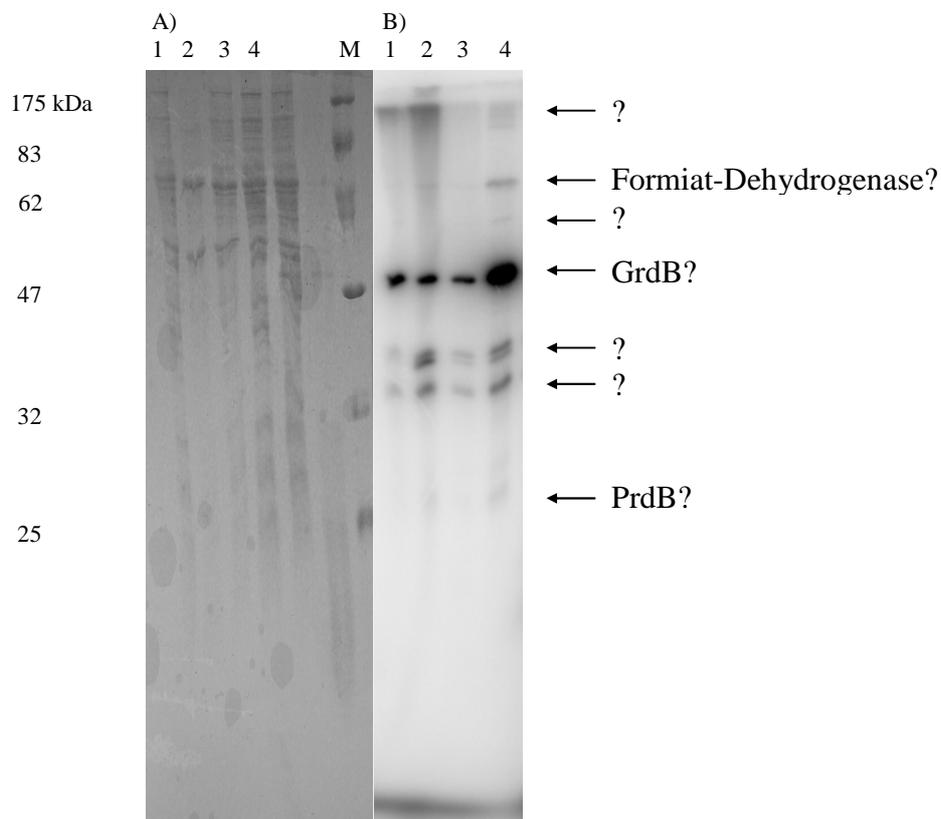


Abb. 29: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (A) und das entsprechende Autoradiogramm (B) von Rohextrakten des Stammes *C. difficile*

Es wurden 20 μ l Rohextrakt nach Stress-Induktion durch O₂ (1), Methylviologen + 0,5 ml Luft (2), Diamid (3) und ohne Stressinduktion (4) aufgetragen. Marker (M)

die SeID und PrdB 37,1 und 25,7 kDa ermittelt werden. Im Fall von *C. difficile* konnten nach Induktion verschiedener Arten von Stress keine zusätzlich induzierten Selenoproteine identifiziert werden.

3.2.3. Stressinduktion bei *C. sticklandii*

Diamid-Stress

Bei Wachstumsversuchen mit den Diamid-Konzentrationen 0, 0,1, 0,25, 0,5 und 1 mM kam es auch bei *C. sticklandii*, wie bei den beiden anderen verwendeten Stämmen, zu einer Gelbfärbung einhergehend mit einer Trübung des Mediums, die die Verfolgung des Wachstums unmöglich machte. Zur Stressinduktion wurde ebenfalls der aus der Literatur entnommene Wert 1 mM verwendet (Babiychuk *et al.*, 1995; Leichert *et al.*, 2003).

Nitrit-Stress

Zur Induktion von Nitrit-Stress wurden 0, 10, 20, 30, und 40 mM eingesetzt. Die erhaltenen Wachstumskurven sind in Abb. 30 dargestellt. Es zeigte sich, dass *C. sticklandii* mit steigender Nitrit-Konzentration im Wachstum gehemmt wurde. Bei der Konzentration von 40 mM kam das Wachstum nahezu zum Erliegen. Auch bei diesen Versuchen zeigte mit dem Wachstum der Zellen eine Rosafärbung des Mediums.

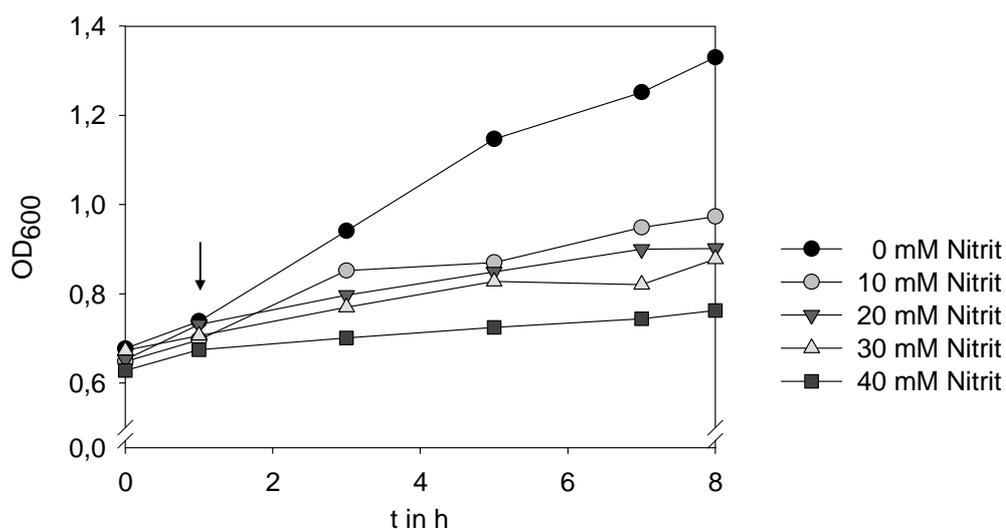


Abb. 30: Wachstum des Stammes *C. sticklandii* in Mineralmedium. Als Substrat diente ein Aminosäuregemisch

Nach einer Stunde wurde dem Medium 0, 10, 20, 30 bzw. 40 mM Nitrit zugegeben. Die Zugabe ist durch einen Pfeil markiert.

Methylviologen-Stress

Auch bei den Wachstumsversuchen mit *C. sticklandii* kam es nach Stressinduktion mit 0, 0,5, 1, 1,75 und 2,5 mM Methylviologen und 0,5 ml Luft (105 μM O_2 in der Gasphase) zu einer starken Blaufärbung des Mediums, welche die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ -Messung unmöglich machte. Zur Stress-Induktion wurde die von Babiychuk *et al.* (1995) verwendete Konzentration von 50 μM Methylviologen zuzüglich 0,5 ml Luft verwendet.

Sauerstoff-Stress

Zur Induktion von Sauerstoffstress wurde der durch Rudolf (2000) bestimmte Wert von 2,5 ml Luft (525 μM Sauerstoff in der Gasphase) verwendet.

Somit kamen im Fall von *C. sticklandii* zur Induktion von Stress 1 mM Diamid, 10 mM KNO_2 , 50 μM Methylviologen mit 0,5 ml Luft (105 μM Sauerstoff in der Gasphase) sowie 2,5 ml Luft (525 μM Sauerstoff in der Gasphase) zur Anwendung. In Abb. 31 sind das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel (A) und das entsprechende Autoradiogramm (B) von Proteinextrakten in Mineralmedium gewachsener *C. sticklandii*-Zellen (Abb. 31; Spur 5) sowie durch O_2 , Nitrit, Methylviologen, Diamid (Abb. 31; Spur 1-4) gestressten Zellen gegenübergestellt. Es konnten zahlreiche ^{75}Se -markierte Proteinbanden detektiert werden, wobei die meisten wohl auf Abbauprodukte der detektierten Hauptbanden zurückzuführen sind. Bei der Bande etwas über 47 kDa könnte es sich um ein GrdB-Homolog und bei der 25 kDa Bande um ein PrdB-Homolog handeln. Die starke Bande bei ca. 10 kDa könnte ein PrpU-Homolog darstellen, jedoch konnte ein Gen eines solchen Proteins mittels DNA-Hybridisierung nach Southern (1975) in *C. sticklandii* nicht gefunden werden (A. Pöhlein, persönliche Mitteilung). Auffällig ist die zusätzliche Bande eines radioaktiv markierten Proteins, das nur nach Stress mit 1 mM Diamid detektierbar war. Es besitzt eine molekulare Masse von ca. 10 kDa. Um dieses Protein näher zu charakterisieren, sollte der Rohextrakt der Diamid gestressten Zellen von *C. sticklandii* mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt werden, der Protein-Spot identifiziert, ausgeschnitten und anschließend N-terminal sequenziert werden. Dazu wurde *C. sticklandii* in zehn Hungaterörchen mit 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{75}Se im Medium angezogen. Bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 0,6 wurde dem Medium von fünf der beimpften Hungate-Röhrchen 1 mM im Medium Diamid zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C wurden die Kulturen vereinigt und die Zellen durch Zentrifugation

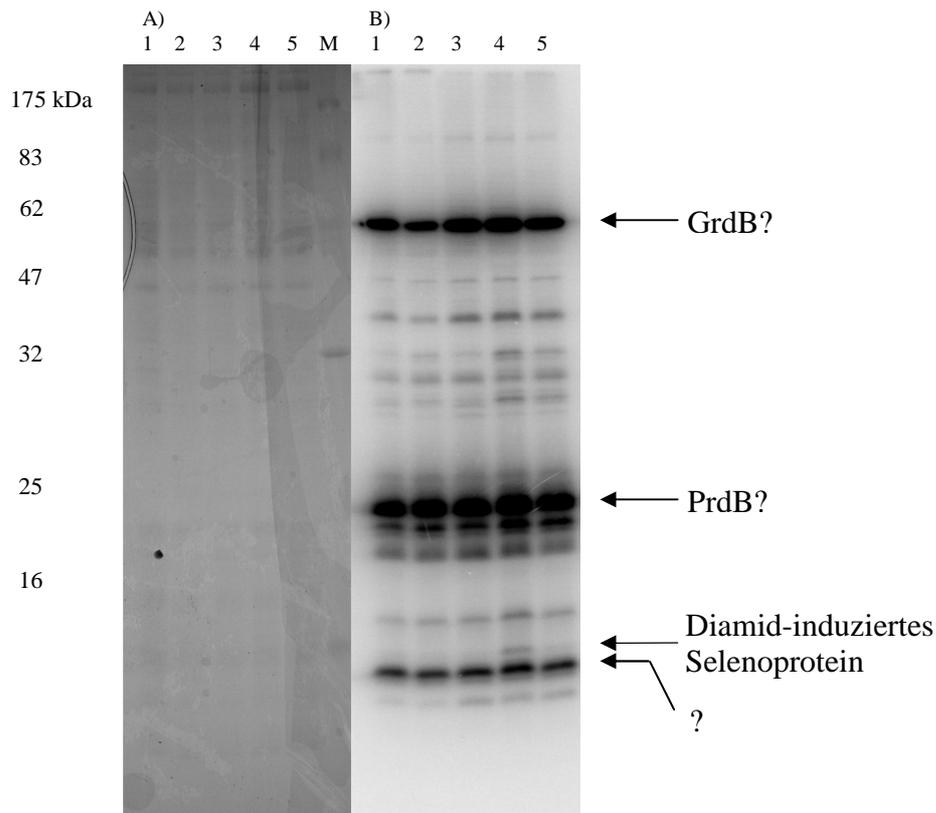


Abb. 31: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (A) und erhaltenes Autoradiogramm (B) von Rohextrakten des Stammes *C. sticklandii*

Es wurden 20 μ l RE nach Stressinduktion durch O₂ (1), Nitrit (2), Methylviologen + 0,5 ml Luft (3), Diamid (4) und ohne Stressinduktion (5) aufgetragen. Marker (M)

geerntet. Die beiden Zellpellets wurden wie in 2.5.1. beschrieben aufgearbeitet. Jeweils 100 μ g der erhaltenen Proteinextrakte wurden einer Isoelektrischen Fokussierung unterzogen bei der IPG-Streifens mit einem pH-Bereich von 3-10 zum Einsatz kamen. Die sich anschließende zweite Dimension wurde mit einem 12 %igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Gele wurden mit Silberlösung gefärbt und dann getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend durch Autoradiographie detektiert. Vergleicht man die radioaktiv markierten Spots, die in den Proteinextrakten von ungestressten (Abb. 32, C) und Diamid-gestressten Zellen (Abb. 32, D) detektiert werden konnten miteinander, so ist auf dem Autoradiogrammen zu erkennen, dass ein zusätzlicher Proteinspot bei ca. 10 kDa und einem isoelektrischen Punkt von ca. 4,3 detektierbar war. Dieses Protein sollte im Anschluss aus dem 2D-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die N-terminale Sequenz bestimmt werden. Dazu musste das Protein auf einem Coomassie gefärbt 2D-Polyacrylamidgel identifiziert werden, da zu diesem Zeitpunkt nur unfixierte Proteine N-terminal sequenziert werden konnten (Schierhorn, persönliche Mitteilung). Nach Färbung des Gels musste jedoch festgestellt werden, dass dieses Protein in einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel trotz mehrmaligen Versuchen nicht visualisiert werden konnte.

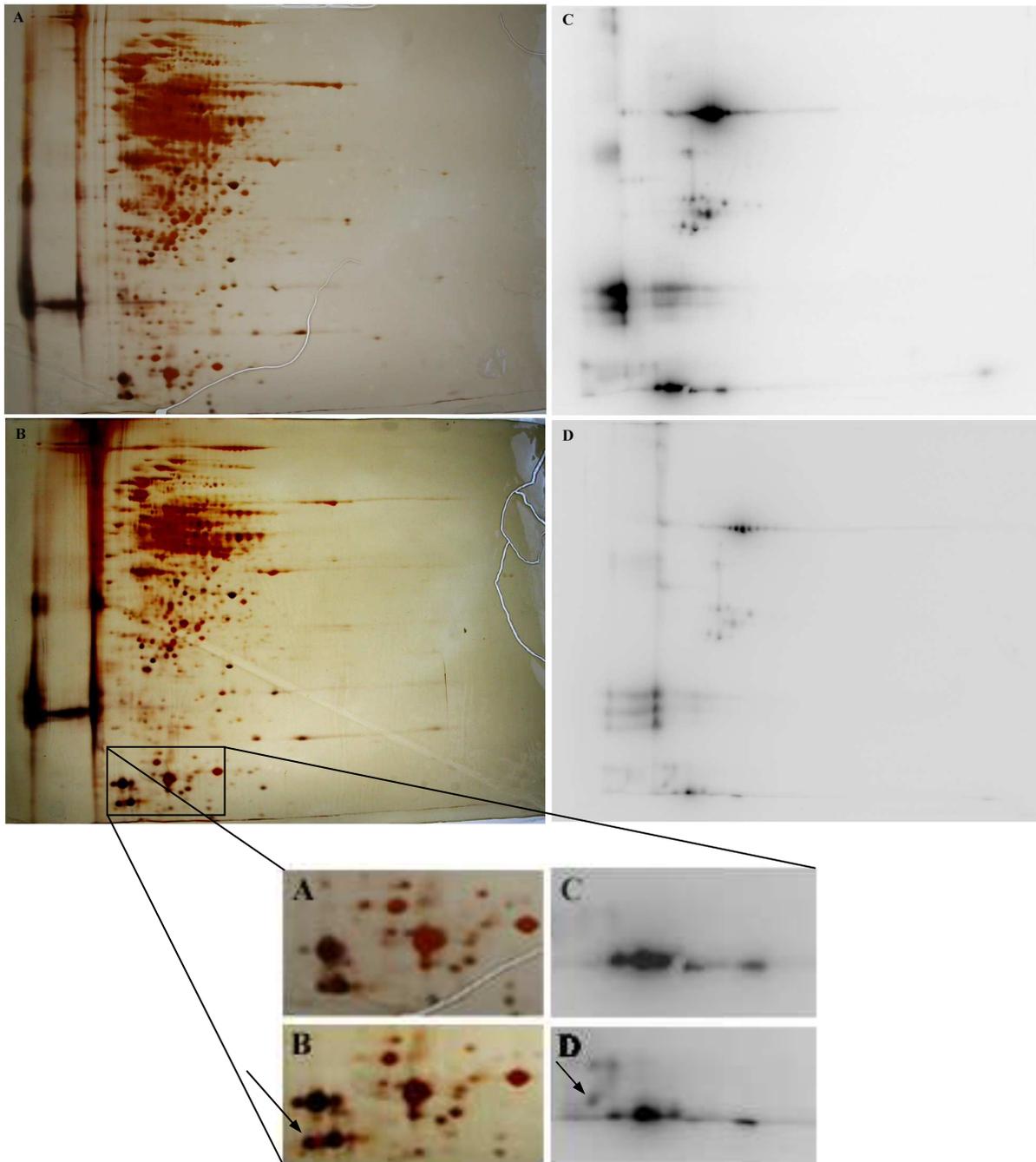


Abb. 32: Identifizierung des durch Diamidstress induzierten Proteins durch 2D-Polyacrylamidgel (pH 3-10, IPG-Streifen, *cuploading*-Verfahren)

Es wurden 100 μg Proteinextrakt je Gel von *C. sticklandii*-Zellen ohne (A, C) und nach Stressinduktion durch Diamid (B, D) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Silber-gefärbten Gele sind mit A und B markiert und die dazugehörigen Autoradiogramme mit C und D. Der Bereich in dem sich das gesuchte Protein befindet, wurde vergrößert und das Protein mit Pfeilen markiert.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* als eine Flavin abhängige Vier-Komponenten-MO

4.1.1. Das *pyc*-Gencluster von *Arthrobacter spec. Py1*

Durch die Isolierung der beiden Plasmide pP2C2 und pP2C7 aus einer Sau3A-Genbank und der Sequenzierung deren Inserts konnte eine DNA-Sequenz von 7225 bp erhalten werden. Der GC-Gehalt der erhaltenen Gesamtsequenz entspricht dem von Hormann & Andreesen (1994) bestimmten Wert von 61% für *Arthrobacter spec. Py1*. Ein horizontaler Gentransfer dieser Gene ist somit unwahrscheinlich. Die Möglichkeit, dass der Donor der Gene ebenfalls ein Bakterium mit hohem GC-Gehalt war, besteht jedoch. In der erhaltenen Sequenz von *Arthrobacter spec. Py1* konnten acht Gene identifiziert werden. Die Proteine mit den höchsten Identitäten zu den abgeleiteten Aminosäuren sind in Tab. 10 aufgeführt. So konnten durch den Vergleich mit verschiedenen Datenbanken Homologe der identifizierten Gene in der Genomsequenz von *Arthrobacter aureescens* TC1 (Mongodin *et al.*, 2006), *Nocardia farcinica* IFM1015 (Ishikawa *et al.*, 2004) *R. koreensis* Sedi2, *Rhodococcus* RHA1 (McLeod *et al.*, 2006), *Sphingomonas spec.* SKA58, *Burkholderia cenocepacia* HI2424, *Ralstonia eutropha* JMP134, *Arthrobacter spec.* FB24 und *Kineococcus radiotolerans* (Phillips *et al.*, 2002) identifiziert werden (Abb. 33). Eine Übersicht über die phylogenetische Verwandtschaft wird in Abb. 34 gegeben. *R. eutropha* JMP 134, *B. cenocepacia* HI2424 und *Sphingomonas spec.* SKA58 sind den Ordnungen Burkholderiales bzw. Sphingomonadales zuzuordnen, die beide zu den Proteobakterien zählen. Alle anderen genannten Stämme zählen zur Ordnung der Actinomycetales, eine Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Wert (Stackebrandt & Schumann, 2006; Abb. 34). Es ist zu erwarten, dass innerhalb dieser Gruppe von Bakterien weitere Vertreter ähnliche Gencluster besitzen.

Aufgrund ihrer Sequenz-Identitäten lassen sich die Gencluster in zwei Gruppen einteilen (Abb. 33). Zur Gruppe I gehören die Gencluster der Bakterien *A. aureescens* TC1, *N. farcinica* IFM10152, *R. koreensis* Sedi2 und *Rhodococcus spec.* RHA1. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *pycA*-Homologen der Gruppe I besitzen eine Identität von über 70 % zu der Aminosäuresequenz von *PycA*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der übrigen Gene weisen zu deren Homologen noch eine Identität von mindestens 47 % auf. Das Gencluster von *R. koreensis* Sedi2 ist mit dem von *Arthrobacter spec. Py1* nur bedingt vergleichbar. Im

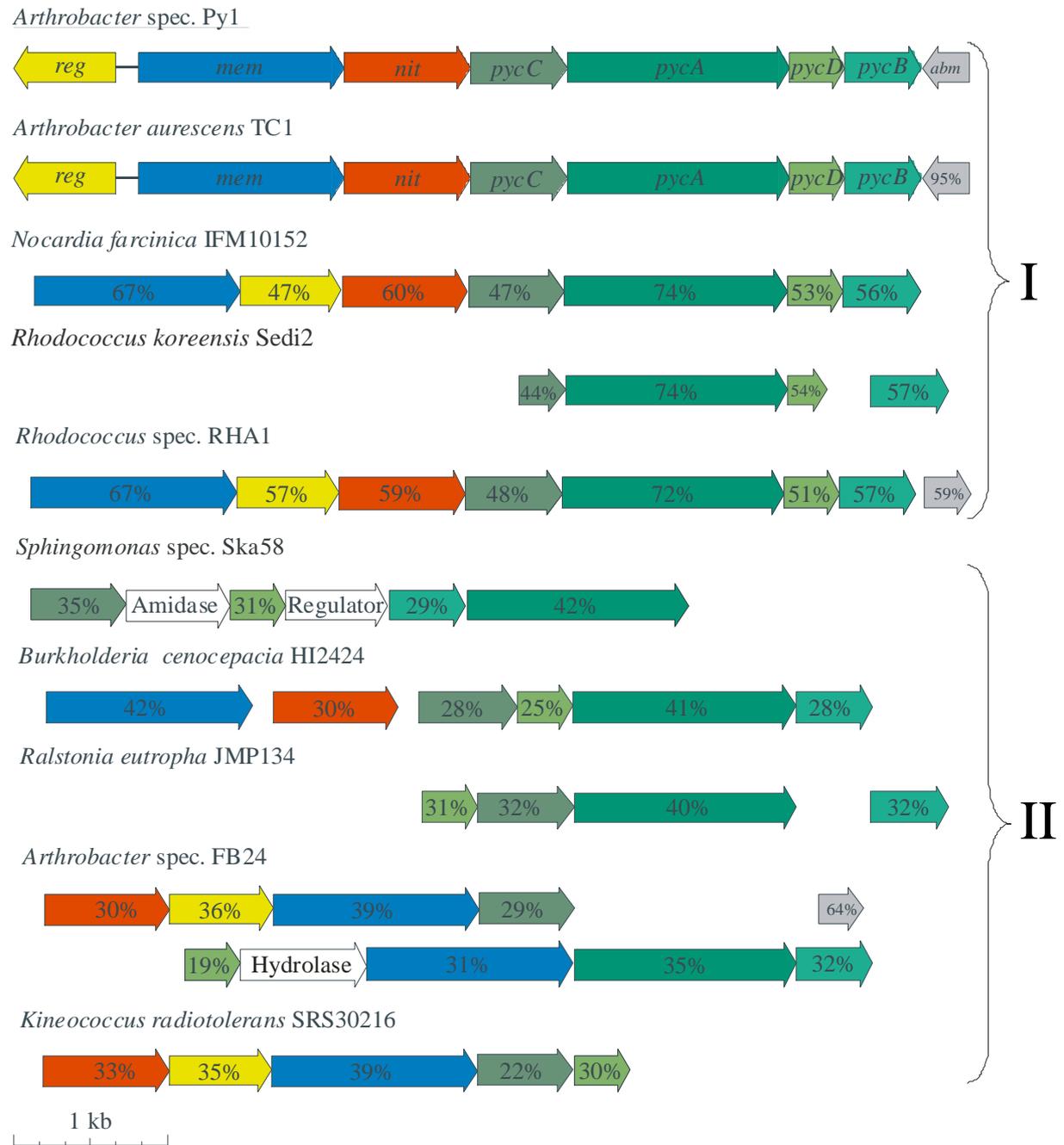


Abb. 33: Vergleich der Gencluster von *Arthrobacter spec. Py1*, *A. aureescens TC1*, *N. farcinica IFM1015*, *R. koreensis Sedi2*, *Rhodococcus spec. RHA1*, *Sphingomonas spec. Ska58*, *B. cenocepacia HI2424*, *R. eutropha JMP134*, *Arthrobacter spec. FB24* und *K. radiotolerans SRS30216*

Die Reihenfolge der dargestellten Gencluster ergibt sich aus der Höhe der Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Monooxygenase-homologen Gens zu *pycA*. Die Identitäten sind jeweils in Prozent angegeben. Die offenen Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz die höchsten Identitäten zueinander besitzen, sind in derselben Farbe dargestellt. Falls Orfs nicht in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, sind sie abgerückt dargestellt. Die römischen Ziffern symbolisieren die Gruppen in die die Gencluster eingeordnet wurden. (gelb, Regulatorprotein bzw. *orfE* [*reg*]; blau, Membranprotein bzw. *orfF* [*mem*]; rot, Nitrilase bzw. *orfG* [*nit*]; verschiedene Grüntöne, Komponenten der P2C-MO [*pycABCD*] bzw. die Homologen *orfABCD* der verschiedenen Stämme)

Genom dieses Stammes kam es offensichtlich zu einem Rekombinationsereignis. Aus diesem Grund sind Reduktase- und MO-Komponente nicht in einem Operon organisiert, sondern sind durch einen nicht näher charakterisierbaren Abstand voneinander getrennt. Weiterhin konnte ein *reg*-, *mem*-, und *nit*-Homolog weder in der Nachbarschaft von *pyrA* noch von *pyrB* identifiziert werden. Im Zuge des Rekombinationsereignisses kam es zur Zerstörung der *pycC*- und *pycD*-homologen Gene. Es wurden in diesem Fall nur der C-terminal kodierende Teil des *pycC* homologen Gens sowie der N-terminal kodierende Teil des *pycD* homologen Gens gefunden. Da in *A. aureescens* TC1 die Struktur des Genclusters mit dem von *Arthrobacter* spec. Py1 übereinstimmt und die Anordnung der Gene des Stammes *N. farcinica* IFM1015 sich nur durch die vertauschte Lage des *reg*-Homologen hinsichtlich *mem* unterscheidet, ist anzunehmen, dass diese Gene in diesen Organismen für Proteine kodieren, die ähnliche Funktionen besitzen. Weiterhin weisen die Gene und resultierend daraus auch deren Genprodukte ähnliche Größen auf. Im Falle von *A. aureescens* TC1, *N. farcinica* IFM1015 und *Rhodococcus* spec. RHA1 ist aufgrund der hohen Protein-Identitäten und der phylogenetischen Verwandtschaft zu *Arthrobacter* spec. Py1 anzunehmen (Abb. 34), dass diese Stämme ebenfalls P2C als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle nutzen

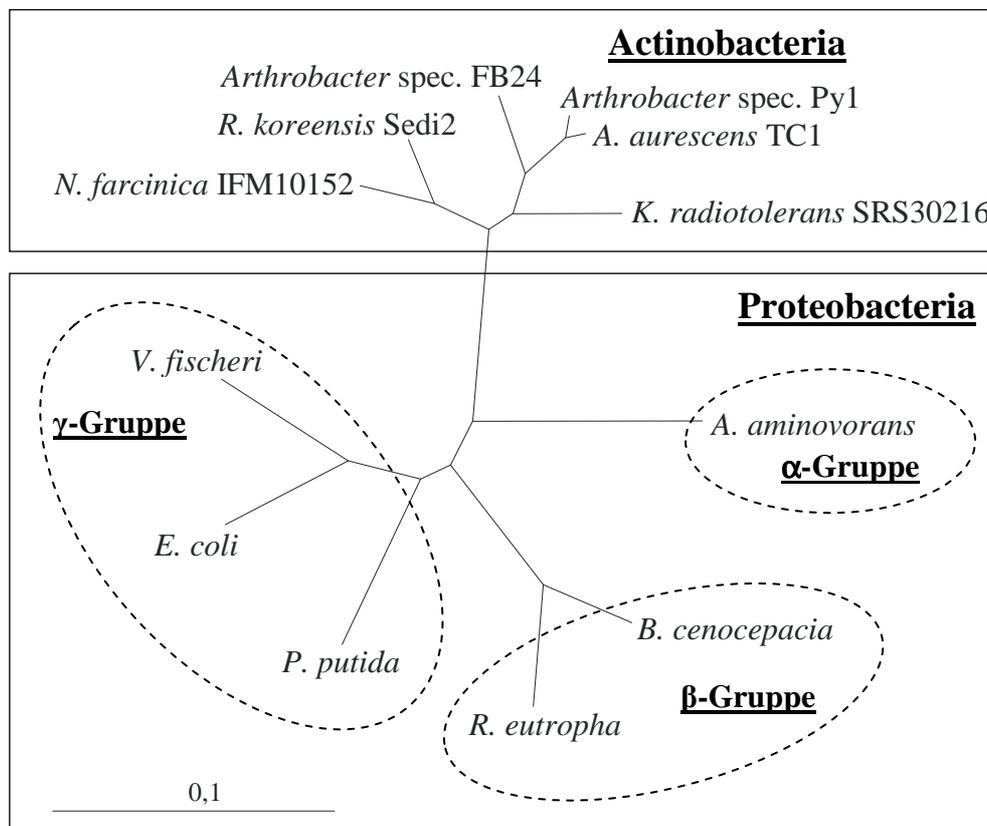


Abb. 34: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S rRNA der Bakterien in denen homologe Gene des *pyc*-Genclusters gefunden wurden und ausgewählter Bakterien die Zwei-Komponenten-MO besitzen

können. Es ist wahrscheinlich, dass es sich im Fall der PycA-homologen Proteine (Abb. 33, OrfA) dieser Stämme um P2C-MO Komponenten handeln könnte. Die PycB-homologen Proteine (Abb. 33, OrfB) würden dann die korrespondierenden Reduktase-Komponenten darstellen.

Gencluster deren abgeleitete Aminosäuresequenz der MO-Gene unter 42 % betragen, wurden in der Gruppe II zusammengefasst. Die Identität der Aminosäuresequenz der übrigen Orfs (falls vorhanden) zu den Sequenzen des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* betragen in diesen Fällen weniger als 43 %. Die Gencluster der Gruppe II sind in ihrem Aufbau sehr unterschiedlich, so ist anzunehmen, dass die *pycA*-Homologen ebenfalls Flavin-abhängige-MO darstellen, jedoch nicht P2C als Substrat umsetzen können. Denkbar wären beispielsweise Substratanaloga wie z.B. Thiophen-2-carboxylat und Furan-3-carboxylat, deren Abbau ebenfalls auf eine MO zurückgeführt wurde (Koenig & Andreesen, 1989; Alam & Clark, 1991).

Durch den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der identifizierten Gene mit verschiedenen Datenbanken und der bisher publizierten Literatur konnte ihnen eine mögliche Funktion zugeordnet werden. Die Aminosäuresequenz des Gens *reg* besitzt die höchsten Identitäten zu Regulatoren der GntR-Familie (Haydon & Guest, 1991), welche aufgrund der Proteinsequenz und der Sekundärstrukturen ihrer Vertreter in vier Unterfamilien eingeteilt wurde (Rigali *et al.*, 2002). Aufgrund der Sekundärstruktur von Reg ($\alpha_{1-3}\beta\alpha_{4-10}$) kann es der FadR-Unterfamilie zugeordnet werden. FadR ist ein dimeres Acyl-CoA bindendes Protein, das die Gene der Fettsäure-Biosynthese und die des -Abbaus reguliert (van Aalten *et al.*, 2000, 2001). Durch die Kristallstruktur von FadR ist bekannt, dass Vertreter dieser Unterfamilie mit einer N-terminalen *helix-turn-helix*-Struktur die DNA binden. Die zweite α -Helix des Proteins stellt den Kontakt zum DNA-Rückgrat her, die dritte α -Helix ist für die Interaktion mit der großen Rinne der DNA verantwortlich. Der C-terminale Bereich von FadR ist in die Dimerisierung des Proteins und die Bindung eines proteinspezifischen Effektormoleküls involviert (Rigali *et al.*, 2002; Tropel & van der Meer, 2004). Ein weiterer charakterisierter Vertreter der GntR-Familie ist BphS von *Alcaligenes eutrophus* (Ohtsubo *et al.*, 2001). BphS reguliert die Expression des *bph*-Operons, dessen Genprodukte am Abbau von polychloriertem Biphenyl beteiligt sind. Nachdem 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-diensäure, einem Intermediat des polychloriertem Biphenyl-Abbauweges, an BphS bindet, lässt die Bindungsaffinität zum Promotor nach und es kommt zur Expression des *bph*-Operons. Erstaunlich ist hier, dass das oben erwähnt Zwischenprodukt und nicht Biphenyl die

Expression des Operons durch Bindung an den Repressor induziert. Weiterhin konnte für die am Abbau involvierten Gene der beiden aromatische Verbindungen Vanillat und Phenyllessigsäure von Morawski *et al.* (2000) und Ferrandez *et al.* (1998) gezeigt werden, dass die Expression durch Vertreter der GntR-Familie reguliert wird. Normalerweise weisen die Vertreter der GntR-Proteinfamilie im C-terminalen Teil, eventuell bedingt durch die Bindung unterschiedlicher Substrate, keine hohen Identitäten auf. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Regulatorproteine der Stämme *Arthrobacter spec.* Py1, *A. aurescens* TC1, *N. farcinica* Stamm IFM10152 und *Rhodococcus spec.* Stamm RHA1 weisen jedoch signifikante Ähnlichkeiten über die gesamte Proteinsequenz auf. Das könnte darauf beruhen, dass an diese Vertreter P2C bzw. ähnliche Substanzen an die substratspezifische C-terminale Domäne binden. So könnte Reg den Regulator der am P2C-Abbau beteiligten Gene darstellen und die homologen Proteine aus der Gencluster-Gruppe I könnte diese ebenfalls regulieren. Von Ohtsubo *et al.* wurden für BphS durch *footprint*-Analysen vier DNA-Bindestellen identifiziert, welche eine Consensus-Sequenz von A-x₁₂-T besitzen. Durch das Programm „Meme“ (Timothy *et al.*, 1994) konnten in der Nukleotidsequenz von *Arthrobacter spec.* Py1 stromabwärts von *mem* eine putative Reg-Bindestelle auf dem 5`-3`-Strang und vier auf dem 3`-5`-Strang identifiziert werden (Abb. 10). Diese fünf Motive besitzen mit der Consensus-Sequenz A-x₁₁-T eine ähnliche Consensus-Sequenz wie BphS (A-x₁₂-T). Die möglichen Bindestellen liegen in der Region von zwei putativen Promotoren P1 und P2, welche die Expression der Gene des *pyc*-Genclusters initiieren könnten. Es ist noch anzumerken, dass sich die Bindemotive dieser Regulatorfamilie stark unterscheiden und sich aus den bisher bekannten Sequenzen keine Gemeinsamkeiten ableiten lassen. Reg könnte demnach an der Regulation des *pyc*-Operons beteiligt sein. Ein Modell der Regulation des *pyc*-Operons wird an späterer Stelle diskutiert.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des sich an *reg* anschließenden Gens *mem* besitzt die höchsten Identitäten zu Transportern der *major facilitator superfamily* (MFS), die ebenfalls als *uniporter-symporter-antiporter family* bezeichnet wird. Diese Superfamilie wurde von Pao *et al.* (1998) aufgrund von Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz in 17 Unterfamilien eingeteilt. Die MFS transportieren kleine Moleküle gegen einen chemiosmotischen Ionengradienten. Mem konnte aufgrund des Vorhandenseins der Sequenzmotive P-(LIV)-G-(GAS)-x-(LIVF)-(LIVFM)-G-x₃-D-(RK)-x-G-R und G-x₃-(DE)-(RK)-x-G-(RK)-(RK) in die Metabolite:H⁺-Symporter-(MHS)-Unterfamilie eingeordnet werden (Anhang C). Im Alignment mit Proteinen, die die höchsten Identitäten zu Mem besitzen, sind diese Motive ebenfalls

konserviert. Diese konservierten Reste sind im dargestellten Alignment grau unterlegt. Es wird deutlich, dass das erste Motiv, welches sich immer zwischen der zweiten und dritten Transmembran-Domäne befindet, zu 100% mit der Konsensussequenz des Motivs übereinstimmt. Im zweiten Motiv ersetzt nur ein Alaninrest den ersten Glycinrest. Das letztgenannte Motiv ist jedoch auch bei anderen Vertreter der Unterfamilie nicht zu 100% konserviert (Pao *et al.*, 1998). Eine Funktion wurde diesen Motiven bisher nicht zugeordnet. Es wird aber vermutet, dass die Aminosäuren dieser Motive an der Konformationsänderung des Proteins während des Transports involviert sind. Die transportierten Substrate der bisher charakterisierten Vertreter der MHS-Unterfamilie besitzen, wie P2C, alle eine Carboxylgruppe z.B. Prolin, Betain, Citrat, α -Ketoglutarat und 4-Methylphthalat. Für die 4-Methylphthalat spezifische Permease von *Burkholderia cepacia* Pc701 wurde beschrieben, dass zwei Carboxylgruppen in *ortho*-Stellung für den Transport essentiell sind (Saint & Romas, 1996). Die α -Ketoglutarat Permease PhoA von *E. coli* besitzt laut Seol & Shatkin (1991, 1992a,b) 12 Transmembranhelices, Mem hingegen nur 10. Da die Voraussage nur auf der Berechnung des Programmes „TMPred“ beruht (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), ist es möglich, dass Mem ebenfalls wie alle anderen Vertreter der MHS-Familie 12 Transmembrandomänen besitzt. Bei *mem* könnte es sich demnach um das Gen einer P2C-Permease handeln, welche für den Transport von P2C in die Bakterienzelle verantwortlich ist.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des stromabwärts von *mem* liegenden Gens *nit* zeigte die höchsten Identitäten zu verschiedenen putativen Amidasen, Nitrilasen und Cyanid-Hydratasen welche miteinander eng verwandt sind (Tab. 10, Anhang D). Die Katalyse von R-CN zur korrespondierenden Säure und NH₃ kann in einem Reaktionsschritt im Falle der Nitrilasen (R-CN \rightarrow R-COOH) oder in zwei Schritten über ein Amid-Intermediat erfolgen, katalysiert von Amidasen und Cyanid-Hydratasen (R-CN \rightarrow R-CONH₂ \rightarrow R-COOH; O'Reilly & Turner, 2003). Von Bork & Koonin (1994) und Novo *et al.* (1995) sind verschiedene Sequenzmotive beschrieben worden, die in Nitrilasen und Cyanid-Hydratasen konserviert sind. Angaben über deren Funktion wurden jedoch nicht gemacht. Durch gerichtete Mutagenese konnte jedoch gezeigt werden, dass das Cys₁₇₀ der Nitrilase von *Rhodococcus rhodochrous* K22 und das Cys₁₆₅ der Nitrilase des Stammes *Rhodococcus rhodochrous* J1 für die Katalyse essentiell sind (Kobayashi *et al.*, 1991a,b). Es ist weiterhin bekannt, dass in verschiedenen Amidasen eine Dreiergruppe aus Glu-Lys-Cys die katalytisch aktiven Aminosäurereste des Proteins darstellen, wobei der Cysteinrest dem von Kobayashi *et al.* entsprechen könnte (1992a,b;

Novo *et al.*, 2002). Die genaue Position dieser drei Reste sind innerhalb der Nitrilasen und Cyanid-Hydratasen variabel, jedoch im selben Bereich der Proteine zu finden. Im Fall von Nit kann postuliert werden, dass die Reste Glu₃₀₍₅₇₎-Lys₁₁₂-Cys₁₄₇ die katalytische Triade bilden könnten (Anhang D), da sie ebenfalls in den Sequenzen der Proteine mit den höchsten Identitäten zu finden sind und in den entsprechenden Domänen des Proteins zu finden sind, die von Kobayashi *et al.* (1992a,b) und Novo *et al.* (2002) angegeben wurden. Weiterhin konnten die konservierten Motive hxxxxhPEhxxxGh und hhhtPDG in der Aminosäuresequenz der Proteine mit den höchsten Identitäten gefunden werden (Anhang D). Diese Motive wurden von Bork & Koonin (1994) durch das Programm „*multiple alignment construction and analysis workbench*“ (Schuler *et al.*, 1991) identifiziert, ohne ihnen eine Funktion zuzuordnen. Es wurde jedoch vermutet, dass der Glutaminsäurerest des ersten Motivs an der Spaltungsreaktion beteiligt ist. Dass am Abbau von P2C ebenfalls eine Nitrilase bzw. eine Amidohydratase beteiligt sein könnte, wurde schon von Hormann & Andreesen (1994) postuliert. So war es nicht überraschend, dass in der Nähe von *pycA* ein solches Gen gefunden wurde. Von Jandhyala *et al.* (2005) wurde ein Reaktionsschema für Cyanidhydratasen postuliert welches ebenfalls für die von Nit katalysierte Reaktion gelten könnte (Abb. 36). So könnte der Glutamatrest₃₀₍₅₇₎ der katalytischen Triade als Base fungieren und den Cysteinrest₁₄₇ aktivieren, der daraufhin das Amin nukleophil angreift (Abb. 36, I.). Daraufhin aktiviert der Lysienrest₁₁₂ ein Wassermolekül, woraufhin es zur Hydrolyse des entstandenen Imins kommt (Abb. 36, II.). Im Anschluss daran kommt es zur Ammoniakabspaltung (Abb. 36, III.). Der Glutamatrest₃₀ leitet daraufhin eine zweite Hydrolyse ein, wodurch α -Ketoglutarat entsteht (Abb. 36, IV.). Das abgespaltene NH₃ steht dem Stamm *Arthrobacter spec. Py1* anschließend als Stickstoffquelle zur Verfügung. Das Strukturanaloga von P2C 5-Oxoprolin wird durch die Anlagerung von zwei Wassermolekülen in L-Glutamat gespalten. In dieser Mg²⁺-abhängigen Reaktion hydrolysiert die 5-Oxo-L-prolinase jedoch ein ATP und spaltet 5-Oxoprolin zwischen C₅-N₁ (Seddon *et al.*, 1984; Li *et al.*, 1989). Die 5-Oxo-L-prolinase besteht aus zwei Komponenten, A und B, deren molekulare Massen 112 und 82 kDa betragen. Wie 5-Oxoprolin wird N-Methylhydantoin, in einer ähnlichen Reaktion, von einer N-Methylhydantoin-Amidohydrolase zu N-Carbamylsarcosine hydrolysiert (Hermann *et al.*, 1992). Die sich anschließende Hydrolyse zu Sarkosin, NH₃ und CO₂ wird von einer N-Carbamylsarcosine-Amidohydrolase katalysiert, deren molekulare Masse 34 kDa beträgt. Von N-Methylhydantoin-Amidohydrolasen gibt es ATP abhängige (J. M. Kim *et al.*, 1987) und ATP unabhängige Enzyme (Hermann *et al.*, 1992). Nit wies jedoch

keine Ähnlichkeiten zu Proteinen auf, die am Abbau von 5-Oxoprolin oder N-Methylhydantoin beteiligt sind. Weiterhin unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Molekülmasse.

An *nit* schließen sich die Gene *pycC*, *pycA*, *pycD* und *pycB* in der angegebenen Reihenfolge an. Das Gen *pycA* stellt das gesuchte Gen der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* dar. Schon in einer vergangenen Arbeit konnte der N-terminal kodierende Teil von *pycA* kloniert und sequenziert werden (Wolsch, 2001). Damals wurde festgestellt, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz des N-terminal kodierenden Teil von *pycA* die höchsten Identitäten zu Zwei-Komponenten-MO zeigt. Die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* wurde jedoch von Hormann & Andreesen (1994) als Ein-Komponenten-MO charakterisiert, da für die Katalyse der Reduktion des Flavins und der Hydroxylierung des P2C nur eine Protein-Komponente benötigt wurde. Bis zum damaligen Zeitpunkt waren ausschließlich Sequenzdaten von Ein-Komponenten-Flavin-abhängigen-MO bekannt. Somit gaben die von Hormann & Andreesen (1994) ermittelten N-terminalen Aminosäuren der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* keinen Anlass zu glauben, es könnte sich nicht um eine Ein-Komponenten-MO handeln. So wurde in der Annahme es müsse sich um eine Ein-Komponenten-MO handeln postuliert (Wolsch, 2001), dass der damals noch unbekannt C-terminale Teil der P2C-MO aufgrund einer Genfusion signifikante Ähnlichkeiten mit Flavin-Reduktasen bzw. Ein-Komponenten-MO haben könnte. Auch Notomista *et al.* (2003) postulierten, dass MO in der Vergangenheit durch genetische Rearrangements neue Domänen erlangt haben könnten. Nachdem nun die vollständige Sequenz der P2C-MO bekannt ist, kann diese Annahme nicht mehr gehalten werden. Der C-terminale Teil des Proteins besitzt weder Ähnlichkeiten zu Flavin-Reduktasen noch zu Ein-Komponenten-MO. Vielmehr wird aus dem in Anhang E dargestellten Alignment deutlich, dass die gesamte Aminosäuresequenz von PycA die höchsten Identitäten zu putativen Vertretern der TC-FDM-Familie und Vertretern, die als solche schon charakterisiert wurden, aufweist (Abb. 33, Tab. 10). Es konnten, wie es für Proteine der TC-FDM typisch ist, weder Flavin noch NAD(P)H-bindende Sequenzmotive in der Aminosäuresequenz von PycA gefunden werden.

Stromabwärts, getrennt durch *pycD*, konnte das Gen *pycB* identifiziert werden (Abb. 33). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *pycB* zeigt die höchsten Identitäten zu den korrespondierenden Flavin-Reduktasen verschiedener Vertreter der TC-FDM-Familie (Tab. 10, Anhang F), wie der P2C-MO von *R. koreensis Sedi2*, der 4-Nitrophenol-MO von

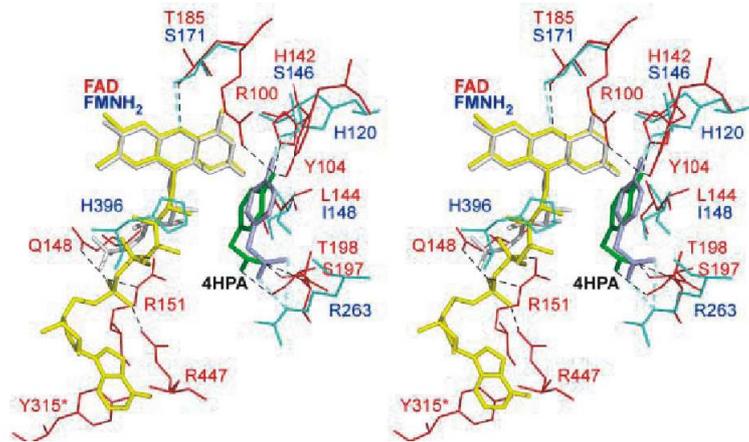


Abb. 36: Vergleich der katalytischen Zentren von *p*-Hpa-MO von *Thermus thermophilus* HB8 und C₂ von *Acinetobacter baumannii* nach Kim *et al.*, 2007

Die Aminosäurereste, FAD und *p*-Hpa des *p*-Hpa-MO von *Thermus thermophilus* HB8 sind in rot, gelb und grün dargestellt. Die Aminosäurereste, FMNH₂ und *p*-Hpa des C₂-Modells sind in blau, weiß und grau dargestellt.

Rhodococcus spec. PN1 (Takeo *et al.*, 2003) und der Phenol-MO von *G. thermoglucosidasius* A7 (Duffner *et al.*, 2000) sowie zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *pycB*-Homologen, welche in den Genclustern gefunden werden konnten, die große Ähnlichkeiten mit dem *pyc*-Gencluster zeigen (Abb. 33; Anhang F). Wie im Fall von *PycA* konnten auch bei *PycB* weder Flavin- noch NAD(P)H-bindenden Motive identifiziert werden. Galan *et al.* (2000) postulierte, dass die Vertreter der TC-FDM-Familie im Gegensatz zu den Ein-Komponenten-MO keine konservierte Flavinbindemotive besitzen. Durch die Kristallstrukturen der *p*-Hpa-MO C₂ von *Acinetobacter baumannii* (Alfieri *et al.*, 2007) und der *p*-Hpa-MO von *Thermus thermophilus* HB8 (S. H. Kim *et al.*, 2007) wurde deutlich, dass die Flavinbindung im Falle dieser Proteine in einer hydrophoben Furche erfolgt. Obwohl beide Proteine das gleiche Substrat abbauen sind die Aminosäuren, welche für die Koordination des Flavins und des *p*-Hpa innerhalb der Proteine verantwortlich sind, nicht konserviert (Abb. 36). Auch der Vergleich der Strukturen der Flavin-Reduktasen der *p*-Hpa von *T. thermophilus* HB8 (HpaC_{Tt}, Kim *et al.*, 2007) und der Phenol-MO von *G. thermoglucosidasius* A7 (PheA2; van den Heuvel *et al.*, 2004) in Abb. 36 zeigte eine ähnliche Bindung des Flavins. Die Fixierung des Flavins ist jedoch auch hier, abgesehen von den Resten Ala₃₄, Met₃₀ und Phe₈₁ (HpaC-Nummerierung), nicht durch konservierte Aminosäuren realisiert, sondern durch unterschiedliche Aminosäurereste. Ebenfalls findet sich der Grund, warum C₂ von *A. baumannii* neben FMN auch FAD und Riboflavin nutzen kann, in der Flavinkoordination. Im Gegensatz zu HpaB_{Tt} von *T. thermophilus* HB8 bei dem der Ribityldiphosphoadenine-Rest des FAD durch die Aminosäuren Gln₁₄₈, Arg₁₅₁ und Tyr₃₁₅

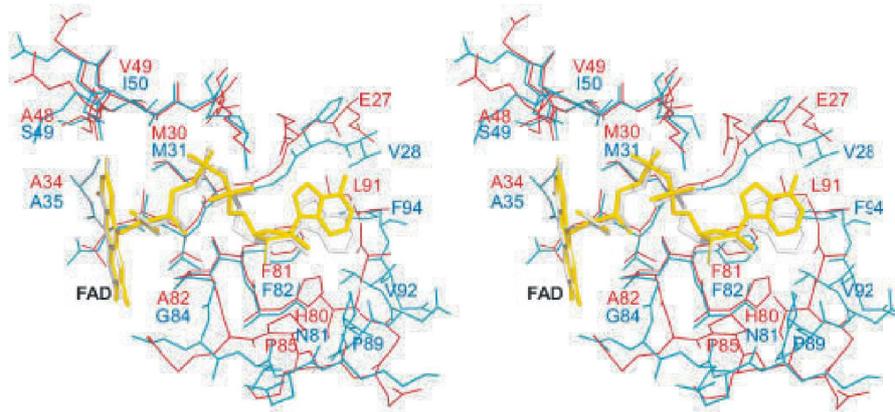


Abb. 37: Vergleich der katalytischen Zentren von HpaC_{Tt} von *Thermus thermophilus* HB8 und PheA2 von *G. thermoglucosidasius* A7 nach Kim *et al.*, 2007

Die Aminosäurereste und das FAD des HpaC_{Tt}-Modells sind rot und gelb dargestellt. Die Aminosäurereste und das FAD des PheA2-Modells sind blau und grau dargestellt.

fixiert wird, bindet in C₂ nur His₃₉₆ an die Ribitylphosphat-Kette (Abb. 37). Die restlichen, an der Flavinbindung beteiligten Aminosäurereste, binden an das Isoalloxazinringsystem. Wie in der Einleitung schon angesprochen, stellt PheA2 von *G. thermoglucosidasius* A7 eine Ausnahme bezüglich des Flavins dar (van den Heuvel *et al.*, 2004). PheA2 besitzt im Gegensatz zu allen anderen Vertretern der TC-FDM-Familie einen FAD-Cofaktor. Dafür ist der Loop 7 verantwortlich, der es PheA2 ermöglicht das FAD so fest zu binden, dass ein Verlust schwer möglich ist. Die Länge und die Aminosäuresequenz dieses Loops ist in allen verwandten Reduktasen, so auch in PycB sehr unterschiedlich, so dass darauf die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu den Flavin-Substraten zurückzuführen sind (van den Heuvel *et al.*, 2004). Wenn dieses Prinzip auch auf andere Proteine der TC-FDM-Familie übertragen werden kann, dann wird das Flavin, anders als bei den Ein-Komponenten-MO, nicht durch streng konservierte Motive, sondern durch Aminosäurereste, die über das gesamte Protein verteilt sind, koordiniert. Dies könnte der Grund sein, warum bisher keine Sequenzmotive innerhalb dieser Protein-Familie gefunden wurden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von PycB (Anhang F), kann angenommen werden, dass die Flavin-Bindung durch ähnliche Proteinbereiche wie im Fall von PheA2 und HpaC_{Tt} erfolgt, die Aminosäuren jedoch nicht konserviert sind.

Eine weitere Eigenschaft der TC-FDM-Familie ist es, dass die MO- und die Flavin-Reduktase Komponente durch ein eigenes Gen kodiert werden, die im Regelfall in unmittelbarer Nachbarschaft liegen. Aus Abb. 33 geht hervor, dass dies ebenfalls auf die meisten der MO- und deren korrespondierenden Reduktase-Gene der Genkluster der Gruppe I zutrifft. Es befindet sich nur *pycD* bzw. dessen Homologe zwischen dem Reduktase und MO-Gen. Im

Falle von *R. koreensis* Sedi2 kam es wohl, wie oben schon postuliert, zu einem genetischen Rekombinationsereignis, wodurch Reduktase- und MO-Gen separiert wurden.

Durch diese Eigenschaften können die Proteine PycA und PycB als Komponenten einer MO der TC-FDM-Familie angesehen werden. Aufgrund der von Becker *et al.* (1997) festgestellten Eigenschaften und der Sequenzübereinstimmungen der Proteine (Anhang E und F) ist das P2C-abbauende Enzymsystem von *R. koreensis* Sedi2, welches aus PyrA und PyrB besteht, ebenfalls in die TC-FDM-Familie einzuordnen, obwohl die Gene der Reduktase und MO, vermutlich aufgrund eines Rekombinationsereignisses, durch einen nicht näher charakterisierten Bereich voneinander getrennt sind.

Beim Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *pycC* und *pycD* mit Datenbanken konnten keine Identitäten zu bereits charakterisierten Proteinen gefunden werden. Jedoch zeigten die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Orfs der Bakterien *A. aureescens* TC1, *N. farcinica* IFM1015, *R. koreensis* Sedi2, *Rhodococcus* spec. RHA1, *Sphingomonas* spec. Ska58, *B. cenocepacia*, *R. eutropha* JMP134, *Arthrobacter* spec. FB24 und *K. radiotolerans* SRS30216 hohe Identitäten zu PycC und PycD (Abb. 33; Anhang G und H). Auffällig ist, dass die beiden Gene und ihre Homologen in der Nachbarschaft von Genen lokalisiert sind, deren abgeleitete Aminosäuresequenz die höchsten Identitäten zu Vertretern der TC-FDM-Familie besitzen (Abb. 33). Es ist bekannt, dass Gene, die für Proteine kodieren, die am Abbau aromatischer Verbindungen beteiligt sind, oft in Operonstrukturen organisiert sind (Díaz *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2004; Louie *et al.*, 2002; Beltrametti *et al.*, 1997). So bestand zum einen die Möglichkeit, dass diese Gene Proteine codieren, die Schritte des Abbauweges katalysieren, in den auch die TC-FDM des entsprechenden Genclusters involviert ist. Andererseits könnte es sein, dass sie weitere Komponenten der MO darstellen bzw. sie in irgendeiner Weise beeinflussen. Ein Hinweis auf die Funktion von PycC und PycD konnte aus der Proteinsequenz nicht abgeleitet werden.

Abm ist zu den zuvor besprochenen Genen entgegengesetzt orientiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *abm* besitzt die höchsten Identitäten zu Proteinen, welche den ABMO zuzuordnen sind (Anhang I). Die Vertreter dieser MO-Familie sind an der Biosynthese von aromatischen und makroliden Polyketiden, die vor allem als Antibiotika fungieren, beteiligt und besitzen weder einen organischen Cofaktor noch ein Metallion, um den Sauerstoff zu aktivieren (Fetzner, 2002). Trotzdem katalysieren die ABMO die Übertragung von einem Molekül des molekularen Sauerstoffs auf das Substrat, wohingegen

das andere Sauerstoffmolekül, wie bei anderen MO, zu Wasser reduziert wird. Es wird vermutet, dass es sich hier um einen Radikalmechanismus handelt (Fetzner, 2007). Die bisher identifizierten und charakterisierten ABMO zeigen untereinander kaum Sequenzidentitäten, jedoch weisen sie eine ähnliche Sekundärstruktur auf (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Die in Anhang I dargestellte Sekundärstruktur ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta$) von Abm unterscheidet sich von der ActVA-Orf6-MO ($\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta$), welche die Hydroxylierung von 6-Deoxydihydrokalafungin zu Dihydrokalafungin katalysiert, nur durch das Fehlen der α_2 -Helix (Sciara *et al.*, 2003). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass die α_1 -Helix von Abm unterbrochen ist und sich so zwischen dem β_1 - und β_2 -Faltblatt doch zwei Helices befinden. Die Tetracenomycin F1-MO (TcmH) von *Streptomyces glaucescens* besitzt zu Abm eine Identität von 15 % und eine Ähnlichkeit von 35 %. In ihrem Fall wurde ebenfalls postuliert, dass es sich bei dem Reaktionsintermediat um ein Radikal handeln könnte (Shen & Hutchinson, 1993). Durch Einsatz von DEPC, einem Reagenz welches Histidin blockiert, kam es zur vollständigen Hemmung von TcmH. So wurde angenommen, dass ein Histidin-Rest maßgeblich an der Katalyse beteiligt ist, ohne jedoch weitere Studien dazu durchzuführen. Im Fall der ActVA-Orf6-MO, die zur hier beschriebenen Abm eine 19 %ige Identität und 37 %ige Ähnlichkeit aufweist, wurde der His₅₂-Rest mutiert. Dieser ist sowohl im Fall von TcmH als auch bei ActVA-Orf6-MO von *Streptomyces coelicolor* konserviert. Die His₅₂Gln-Mutante von ActVA-Orf6-MO zeigte nur noch eine Aktivität von weniger als 5 % (Kendrew *et al.*, 1997; Kendrew *et al.*, 2000). Im Alignment von Abm konnten ebenfalls zwei konservierte Histidinreste identifiziert werden (His₆₄ und His₆₉; Anhang I). Durch die Struktur der ActVA-Orf6-MO wurde jedoch klar, dass His₅₂ und Tyr₆₃ für die Dimerisierung verantwortlich sind, welche im Fall der His₅₂Glu-Mutante von ActVA-Orf6-MO wahrscheinlich nicht mehr erfolgte, was zur Deaktivierung des Proteins führte (Sciara *et al.*, 2003). Weiterhin fanden die Autoren, dass die Aminosäurereste Tyr₅₁, Asn₆₂, Trp₆₆ und Tyr₇₂ für die Bindung des Substrates (6-Deoxydihydrokalafungin) und/oder die Katalyse verantwortlich sind. In der Aminosäuresequenz von Abm ist jedoch keiner dieser Aminosäurereste konserviert. Dies könnte jedoch daran liegen, dass sich die Struktur des Substrates von Abm deutlich von 6-Deoxydihydrokalafungin unterscheidet. Durch Sequenzvergleiche wurde ein konserviertes Motiv PGF(V/R)(R/W)H in den Proteinen ActVA-Orf6-MO, TcmH und dem TcmH homologen Protein aus *Streptomyces olivaceus* identifiziert (Fetzner, 2002), welches sich ebenfalls in Abm finden lässt (Anh. I). Eine Funktion wurde jedoch nicht postuliert. Interessant ist, dass sich stromaufwärts in den Genclustern von *tcmH* und dem homologen Gen von *Streptomyces olivaceus* das Gen einer Flavin-abhängigen Ein-Komponenten-MO befindet (Rafanan *et al.*, 2001). In den in Abb. 33

dargestellten Genclustern konnte nur im Falle von *Arthrobacter* spec. Py1 und *A. aureescens* TC1 ein ABMO-Gen in direkter Nachbarschaft gefunden werden. Jedoch besitzen die Stämme *Arthrobacter* spec. FB24, *Rhodococcus* spec. RHA1, *R. eutropha* JMP134 und *B. cenocepacia* HI2424 ebenfalls Gene, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Identitäten zu ABMO aufweisen. Diese Gene liegen jedoch nicht in der unmittelbaren Nachbarschaft der in Abb. 33 verglichenen Gencluster. Es kann postuliert werden, dass Abm an der Synthese eines Antibiotikums oder Farbstoffes beteiligt ist. Hier sei angemerkt, dass *Arthrobacter* spec. Py1 bei Wachstum unter Lichteinwirkung ein gelbes Pigment bildet (Hormann, 1991; eigene Beobachtungen).

4.1.2. Transkription und Regulation des *pyc*-Genclusters

Um zu klären, ob die identifizierten Gene am P2C-Abbau beteiligt sind, wurde deren Transkription im Fall von *Arthrobacter* spec. Py1 mittels *northern blot*-, *primer extension*- und RT-PCR-Analysen bei Anwesenheit von Succinat bzw. P2C als Wachstumssubstrat im Medium untersucht. Durch die *northern blot*- und *primer extension*-Versuche konnten keine Erkenntnisse über die Expression der untersuchten Gene gewonnen werden. Dies kann vor allem auf die geringen Mengen an RNA zurückgeführt werden, die sich in Folge des schwierigen Zellaufschlusses des Stammes *Arthrobacter* spec. Py1 isolieren ließen. So reichten die eingesetzten RNA-Mengen nicht aus, um mittels *northern blot*-Hybridisierungen Transkripte zu detektieren. In den *primer extension*-Experimenten traten sehr viele, unspezifische Strangabbrüche auf, so dass diese nicht auswertbar waren. Die Abbrüche könnten auf Sekundärstrukturen zurückgeführt werden.

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Gene *pycA*, *pycD* und *pycB* konstitutiv und polycistronisch exprimiert werden. Es konnte jedoch in der cDNA P2C-gewachsener Zellen des Stammes *Arthrobacter* spec. Py1 eine größere Menge an cDNA der Gene *pycA*, *pycD* und *pycB* nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Gene durch P2C zusätzlich induziert werden. Das die P2C-MO des Stammes *Arthrobacter* spec. Py1 offenbar nicht P2C induziert, sondern vielmehr konstitutiv exprimiert wird, stellte schon Hormann durch *western blot*-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die MO-Komponente fest (Hormann, 1991). Er konnte die P2C-MO von *Arthrobacter* spec. Py1 im Rohextrakt von Glukose-, 5-Oxoprolin-, Prolin- und P2C-gewachsenen Zellen nachweisen. Aus welchem Grund die oben angesprochenen Gene konstitutiv exprimiert werden, kann nur spekuliert werden. Es ist denkbar, dass die P2C-MO von *Arthrobacter* spec. Py1 eine zweite Funktion

im Sekundärstoffwechsel besitzt, beispielsweise bei der Synthese eines Antibiotikums, eines Farbstoffes oder eines Siderophors. Die Synthese eines gelben Farbstoffes unter Lichteinfluss wurde schon angemerkt. Die Beteiligung an der Synthese eines Siderophors macht die 28%ige Identität mit PvcC von *P. aeruginosa* denkbar (Tab. 10). PvcC stellt eine MO dar, die an der Synthese des Eisen-Chromophors Pyoverdin beteiligt ist (Stintzi *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass in den beiden Stämmen *A. aurescens* TC1 und *Arthrobacter spec.* Py1 das Gen einer ABMO in der direkten Nachbarschaft zum *pyc*- bzw. *pyc*-homologen Gencluster lokalisiert ist, macht eine Beteiligung an einer Antibiotikumsynthese von PycA und PycB ebenfalls wahrscheinlich. Die vollständige Genomsequenz des Stammes *A. aurescens* ist in diesem Zusammenhang wenig hilfreich, denn stromabwärts des *abm*-homologen Gens liegen drei Gene, die für eine ABC-Permease kodieren, und im Anschluss daran Orfs mit unbekannter Funktion. Da es mittels *primer extension*-Untersuchungen nicht gelang, mögliche Transkriptionsstartpunkte zu identifizieren, kann über die tatsächliche Expression der Gene nur spekuliert werden. Der mögliche Transkriptionsstartpunkt eines putativen Promotors P3 (Anhang A), der für die Initiation des konstitutiv exprimierten Transkripts verantwortlich sein könnte, befindet sich vermutlich 34 bp vor dem Startcodon von *pycA*. Dieser Promotor könnte für die Expression der Gene *pycC*, *pycA* und *pycB* verantwortlich sein. In der Nukleotidsequenz von *A. aurescens* TC1 konnte mit dem Programm „*neural network promoter prediction*“ an dieser Stelle kein Promotor identifiziert werden (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Die Autoren des Programmes merken jedoch an, dass nicht alle möglichen Promotoren erkannt werden.

Weiterhin kann ein Transkript postuliert werden, mit dem die Gene *mem*, *nit*, *pycC*, *pycA*, *pycD* und *pycB* polycistronisch, P2C-induziert abgelesen werden. Durch dieses Transkript würden die Gene *pycA*, *pycD* und *pycB* verstärkt abgelesen, was die höhere Menge an synthetisierter cDNA dieser Gene erklären würde. Als Regulationseinheit dieses Transkripts könnte der putative Promotor P1 (Abb. 10) angesehen werden. Der mögliche Transkriptionsstartpunkt dieses Promotors befindet sich 108 bp vor *mem*. Ca. 200 bp stromaufwärts von diesem Gen befindet sich das Gen des putativen Regulators Reg. Ein putativer Promotor P2, der mit dem möglichen Promotor P1 überlappt, könnte die Transkriptionsinitiation von *reg* regulieren. Durch die putative Reg-Bindestelle, die sich in diesem Promotorbereich befindet, könnte Reg die Expression des eigenen Transkripts reprimieren (Abb. 10). Eine vollständige Reprimierung der Genexpression des *pyc*-Operons sollte durch die vier putativen Reg-Bindestellen stromabwärts der beiden Promotoren möglich

sein. Solche Arrangements in Regulatorregionen konnten ebenfalls bei anderen Genclustern gefunden werden, deren Genprodukte am Abbau von aromatischen Verbindungen beteiligt sind (Tropel & van der Meer, 2004). So nannten van der Meer *et al.* (1992) in diesem Zusammenhang unter anderen die Gene CatR (Rothmel *et al.*, 1990), TcbR (Leveau *et al.*, 1994) und CatM (Neidle *et al.*, 1989) als Regulatoren der GntR-Familie. CatR und CatM stellen die Regulatoren der Operons, welche am Abbau von Catechol in *P. putida* und *Acinetobacter calcoaceticus* beteiligt sind, dar. TcbR wurde im Zusammenhang mit Chlorcatechol bei *Pseudomonas spec.* P51 genannt. Bis auf CatM stellen diese Proteine Aktivatoren dar, welche nach Bindung des Effektormoleküls die Transkription aktivieren. Die Lage der Gene dieser Regulatoren ist der von *reg* jeweils ähnlich. Die Transkriptionsrichtung ist entgegengesetzt zu der der zu regulierenden Gene wobei der Abstand der Gene ca. 200 bp beträgt. Im *pyc*-Gencluster befinden sich zwischen dem Startcodon von *reg* und dem von *mem* 221 Nukleotide (Anhang A). Bezüglich der Lokalisation des Gens solcher Regulatorproteine gibt es jedoch auch Ausnahmen. So konnten Kasak *et al.* (1993) zeigen, dass sich *catR* auf dem Chromosom von *P. putida* PaW85 befindet, wohingegen das zu regulierende *pheBA*-Operon, welches für die Gene einer Catechol-1,2-Dioxygenase (PheB) und Phenol-MO (PheA) kodiert, auf einem Plasmid lokalisiert ist. Mit dem Programm „*Mfold*“ konnte nur stromabwärts von *pycB* eine *hair pin*-Struktur identifiziert werden, welche die Termination der Transkription der beiden putativen Transkripte des *pyc*-Genclusters einleiten könnte (Abb. 11). Hoon *et al.* (2005) analysierten 425 Rho-unabhängige Terminatoren von *Bacillus subtilis*, dabei lag der Durchschnitt der freien Enthalpie ΔG bei 25 °C bei -16 kcal/mol. Für *E. coli* ermittelten sie im Durchschnitt einen Wert von -14 kcal/mol. Der Wert des 13 bp langen *hair pin* des Terminators des *pyc*-Genclusters wurde von „*Mfold*“ bei einer Temperatur von 30 °C mit -36,9 kcal/mol bestimmt. Im Vergleich zu *B. subtilis* und *E. coli*, deren *hair pin*-Länge durchschnittlich bei 9 und 7 bp liegt, ist der *hair pin* der Terminatorstruktur des *pyc*-Genclusters ungewöhnlich lang. Ein weiteres Merkmal eines Rho-unabhängigen Terminators ist eine Thymin-reiche Sequenz nach dem *hair pin*. Diese ist zwar im Fall von *Arthrobacter spec.* Py1 durch ein Cytosin- und zwei Guanosinreste unterbrochen, jedoch eindeutig vorhanden. In *B. subtilis* und *E. coli* besitzen die meisten Terminatoren 9-10 Thymin-Basen (Hoon *et al.*, 2005). Es kann also postuliert werden, dass die Termination der Transkription des *pyc*-Genclusters durch die identifizierte *hair pin*-Struktur Rho-unabhängig erfolgt.

Aus diesen Ergebnissen kann man ein Modell für die Regulation des *pyc*-Genclusters ableiten (Abb. 38). Die Gene *pycA*, *pycD* und *pycB* werden konstitutiv transkribiert. Da sich im

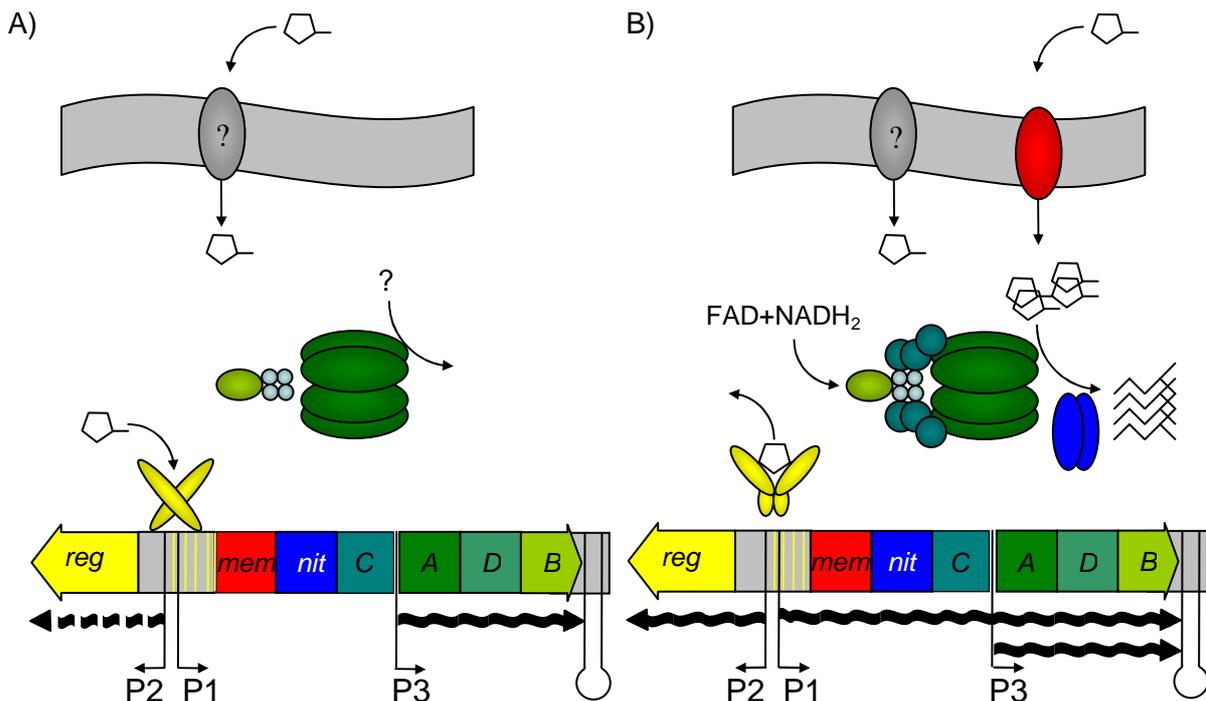


Abb. 23: Modell der Regulation des *pyc*-Genclusters.

Dargestellt ist das *pyc*-Gencluster bei Abwesenheit (A) und Anwesenheit von P2C in der Zelle (B). Das Fünfeck symbolisiert P2C und die Zickzackstruktur das Abbauprodukt α -Ketoglutarat. Die Transkripte der Gene sind als schwarze Pfeile dargestellt, dessen Richtung die der Transkription angibt. Die Gene sowie deren Genprodukte sind in der selben Farbe dargestellt (gelb, Regulator; blau, Nitrilase; rot, Transporter; unterschiedliche Grüntöne, Komponenten der P2C-MO; grau, unbekannter Transporter). Die putativen Reg-Bindestellen sind als gelbe Striche markiert. Die putativen Promotoren sind mit P1, P2 und P3 markiert und der Rho-unabhängige Terminator als *hair pin*-Struktur dargestellt. Die Darstellung der Gen- und Proteingrößen ist nicht maßstabsgetreu.

Bereich des *reg*-Promotors P2 nur eine putative Bindestelle für Reg befindet, könnte es zu einer geringen Transkription von *reg* kommen. Durch Bindung von Reg an die vier, sich Promotor P1 anschließenden, möglichen Bindestellen könnte es zur Repression des *pyc*-Genclusters kommen. P2C gelangt durch einen unbekanntem Transporter in das Cytoplasma von *Arthrobacter spec.* Py1 (Abb. 38, A), da das Gen des putativen P2C-Transporters *Mem* noch nicht transkribiert wird. Der Transport von P2C könnte beispielsweise durch einen Prolin-Transporter übernommen werden. So konnte beispielsweise für eine Prolin-Permease von *E. coli* gezeigt werden, dass sie nicht durch P2C gehemmt wird (Rowland & Tristram, 1975), wie durch andere Strukturana loga von Prolin z.B. L-Prolin, L-Prolinmethylester und L-Prolinamid. Stattdessen könnte P2C wenn auch mit geringerer Effizienz ins Zellinnere transportiert werden. Wurde P2C in die Zelle aufgenommen, bindet P2C an den C-terminalen Teil von Reg, wodurch im N-terminalen, DNA-bindenden Teil des Proteins eine Konformationsänderung induziert wird. Daraufhin nimmt die Affinität zu den Bindestellen ab

und Reg dissoziiert von der DNA (Tropel & van der Meer, 2004). Nun sind die beiden Promotoren P1 und P2 nicht mehr blockiert und es kommt zur Expression des gesamten *pyc*-Genclusters und *reg* (Abb. 38, B). Durch die Genprodukte wird der Abbau von P2C zu α -Ketoglutarat katalysiert. Durch die Abnahme der P2C-Konzentration in der Zelle kommt es vermehrt zu P2C freien Reg-Molekülen, denen es dadurch wieder möglich wird, an den möglichen Bindestellen im P1-P2-Promotorbereich zu binden und dadurch die Expression des *pyc*-Genclusters zu reprimieren.

4.1.3. PycB, eine Flavin-Reduktase

PycB wurde im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* mittels des Vektors pASK-IBA3 exprimiert und als C-terminales *Strep*-tag II-Fusionsprotein anschließend charakterisiert. Es besitzt eine molekulare Masse von 18,8 kDa. Durch die Fähigkeit die Elektronenübertragung von NADH auf Flavine katalysieren zu können, wurde PycB_C die Funktion einer Flavin-Reduktase zugeordnet. Dies konnte direkt, über die Veränderung des Flavinspektrums und indirekt über die Reduktion von terminalen Elektronenakzeptoren wie Cytochrom c und Sauerstoff nachgewiesen werden. Flavin-Reduktasen können aufgrund des Vorhandenseins oder des Fehlens eines gebundenen Flavincofaktors in Klasse I- und Klasse II-Reduktasen eingeteilt werden (Tanner *et al.*, 1996, Niviere *et al.*, 1998). Klasse I-Enzyme besitzen durch einen fest gebundenen Flavincofaktor ein typisches Flavinspektrum. Klasse II-Enzyme weisen kein solches Spektrum auf. Dieser Klassifikation folgend, muss PycB der Klasse II-Reduktase zugeordnet werden, da nach der Reinigung des Proteins kein Flavin-Spektrum detektiert werden konnte. Weiterhin wurde PycB aufgrund von Sequenz-Identitäten im Rahmen dieser Arbeit in die Familie der TC-FDM eingeordnet.

Die höchste NADH-abhängige Cytochrome c-Reduktion durch PycB_C erfolgte bei einer Temperatur von 35 °C und den pH-Werten von 4 und 7,6. Die optimale Temperatur ist mit der der gemessenen P2C-MO-Reaktion von *Arthrobacter* sp. Py1 identisch (Hormann & Andreesen, 1994). Auch das pH-Optimum bei 7,6 deckt sich mit dem für die P2C-MO ermittelten Wert. Ungewöhnlich ist der zweite Peak bei pH 4. Ein solches pH-Profil mit Peaks bei 5,2 und 8,5 wurde ebenfalls bei der Flavin-Reduktase der Nitrilotriacetat-MO NmoB von *A. aminovorans* (syn. *Chelatobacter heintzii*) gefunden, ohne dass die Autoren nähere Angaben dazu machten (Russell *et al.*, 2004). Im Fall von PycB_C kann der Peak bei pH 4 eventuell auf die Eigenschaften des als terminalen Elektronenakzeptors verwendeten

Cytochrom c zurückgeführt werden. Die Elektronen werden, von PycB_C katalysiert, vom NADH auf das eingesetzte Flavin übertragen. Anschließend reagiert das reduzierte Flavin in einer PycB_C unabhängigen Reaktion mit Cytochrom c. Da Cytochrom c ebenfalls ein Protein darstellt, unterliegt es ebenfalls den Auswirkungen der pH-Wert-Änderung. So könnte sich auch die Fähigkeit von Cytochrom c ändern, Elektronen aufzunehmen, was die hohe detektierte Aktivität bei dessen Verwendung erklären würde.

Interessant war, dass es in Anwesenheit von P2C zu einer stärkeren Flavin-Reduktion kam als ohne Zugabe. Eine solche Beobachtung machten auch Chaiyen *et al.* (2001) im Falle von C₁, der korrespondierenden Reduktase der *p*-Hpa-MO C₂ von *A. baumannii*. Ihre Größe entspricht 32 kDa (Tab.18). Diese Größe ist sehr ungewöhnlich für eine Flavin-Reduktase deren molekulare Masse sich meist zwischen 18 und 21 kDa bewegen. Im N-terminalen Bereich beträgt die Identität von C₁ zu den „normalen“ Reduktasen PheA2 von *G. thermoglucosidasius* A7 (Duffner *et al.*, 2000, van den Heuvel *et al.*, 2004) und PycB 39 % und 28 %, die Ähnlichkeit 62 % und 47 %. Für den C-terminalen Teil von C₁, welcher den „normalen“ Flavin-Reduktasen fehlt, wurde postuliert, dass er *p*-Hpa bindet, wodurch C₁ aktiviert wird. Die Flavin-Reduktion erhöhte sich so um den Faktor 30 (Sucharitakul *et al.*, 2005). Für eine Interaktion von *p*-Hpa mit dem C-terminalen Teil von C₁ liegen jedoch noch keine Daten vor. Durch die Kristallisation von C₁ mit gebundenem *p*-Hpa könnte man Näheres über die Substrat-Protein-Interaktion erfahren. NmoB, die Flavin-Reduktase der Nitrilotriacetate-MO (Tab. 18) von *A. aminovorans* besitzt eine mit C₁ vergleichbare Größe von 35 kDa (Uetz *et al.*, 1992). Für dieses Protein wurde ebenfalls eine Aktivierung der Reduktase-Komponente durch das Substrat der MO beschrieben (Knobel *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 2004). Diese Eigenschaft scheint auf alle Flavin-Reduktasen dieser Größe zuzutreffen. Da PycB eine solche C-terminale Domäne nicht besitzt, muss die Bindung von P2C von anderen Teilen des Proteins erfolgen.

Hinsichtlich ihres Substratspektrums gibt es im Fall der Flavin-Reduktasen große Unterschiede. So besitzen viele Vertreter die Fähigkeit neben FAD ebenfalls FMN und Riboflavin als Substrat zu nutzen (Tab. 16 und 18) wie z.B. C₁ von *A. baumannii* (Klasse I-Reduktase) und PheA2 (Klasse II-Reduktase), *G. thermoglucosidasius* A7 (Duffner *et al.*, 2000; Chaiyen *et al.*, 2001) und PycB_C. Andere sind in ihrem Substratspektrum eingeschränkter. So kann SsuE (Klasse II-Reduktase) von *E. coli* ausschließlich FMN und das Flavoprotein der *p*-Hpa-MO von *P. putida* FAD reduzieren. Man könnte hier vermuten, dass

die Reduktasen nur Flavine reduzieren können, die die korrespondierenden MO auch nutzen können. Das bewahrheitet sich jedoch nur teilweise. So kann man aus Tab. 18 entnehmen, dass C₂ und PheA1 nur reduziertes FAD für die Substrathydroxylierung nutzen können. Jedoch ist die Affinität der Reduktase zu dem von der MO verwendeten Flavin höher, so dass dieses bevorzugt reduziert wird. Im Fall von PycB_C konnten für die Substrate FAD, FMN, Riboflavin und NADH apparente K_m-Werte von 74, 163, 115 und 129 µM ermittelt werden. Im Vergleich zu anderen Flavin-Reduktasen sind diese Werte sehr hoch (Tab. 16), was eventuell auf den am C-Terminus befindlichen *Strep*-tag II zurückzuführen ist. Jedoch wurden die Aktivitäten der dort verglichenen Werte, im Gegensatz zu denen von PycB und PyrB, durch die direkte Messung der NAD(P)H-Abnahme ermittelt. Aufgrund der hohen eingesetzten Flavin-Konzentration war eine Messung der NADH-Konzentration im Fall von PycB_C jedoch nicht möglich. So absorbieren Flavine ebenfalls bei der Wellenlänge 340 nm, dem Absorptionsmaximum von NADH. So wurde statt dessen die Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors Cytochrom c photometrisch verfolgt. Die ermittelten K_m-Werte sind so ebenfalls abhängig von der Reaktion des reduzierten Flavins mit Cytochrom c, woran PycB_C nicht mehr beteiligt ist. Weiterhin ist zu beachten, dass das reduzierte Flavin nicht nur mit dem Cytochrom c reagiert, sondern ebenfalls mit einem weiteren, im Messansatz enthaltenen, terminalen Elektronenakzeptor, dem Sauerstoff. Diese Reaktion findet jedoch sehr langsam statt, so dass sie vernachlässigt werden konnte. Weiterhin sind die K_m-Werte ebenfalls von der Temperatur, dem pH-Wert und, wie man am Beispiel der Flavin-Reduktasen FRP_H und FRG_F sehen kann, in einem hohen Maß von der Anwesenheit weiterer Proteinkomponenten abhängig. Es ist also festzustellen, dass die ermittelten apparenten K_m-Werte nur bedingt direkt mit anderen Werten vergleichbar sind, was auf die oben geschilderten Probleme bei der

Tab. 16: K_m-Werte verschiedener Flavin-Reduktasen in µM

Protein	Organismus	FAD	FMN	Riboflavin	NADH	NAD(P)H
PycB ¹⁾	<i>Arthrobacter</i> sp. Py1	74	163	115	129 _{FAD}	
PyrB ²⁾	<i>R. koreensis</i> Sedi2				147 _{FAD}	
ActVB ³⁾	<i>S. coelicolor</i>		1		6,6	
Fre ⁴⁾	<i>E. coli</i>	1,6			301	
HpaC _{Ec} ⁵⁾	<i>E. coli</i>	3			76	
TftC ⁵⁾	<i>B. cepacia</i> AC1100	4,4			51	
C ₁ ⁶⁾	<i>A. baumannii</i>	28 _{NADH}	12 _{NADH}			
NmoB ⁵⁾	<i>A. aminovorans</i>	40			185	
FRG _F ⁷⁾	<i>V. fischeri</i>		220/0,05 _{Lu}		120/3,8 _{Lu}	
FRP _H ⁸⁾	<i>V. harveyi</i>		8/0,3 _{Lu}			20/0,02 _{Lu}

¹⁾ diese Arbeit, ²⁾ Becker *et al.* 1997, ³⁾ Filisetti *et al.*, 2005, ⁴⁾ Niviere *et al.*, 1997, ⁵⁾ Hübner *et al.*, 1998 ⁶⁾ Chaiyen *et al.*, 2001, ⁷⁾ Tu *et al.*, 1979; Jeffers & Tu, 2001, ⁸⁾ Lei & Tu, 1998; Jeffers & Tu, 2001
FAD, NADH, Lu, Messungen wurden in Anwesenheit von FAD, NADH bzw. Luciferase durchgeführt

Ermittlung zurückzuführen ist.

Weiterhin wurde getestet ob die Aktivität von PycB_C durch das Vorhandensein verschiedener Ionen im Messansatz beeinflusst wird. Es ist von den Flavin-abhängigen-MO bekannt, dass monovalenter Anionen die Bindung des Flavins beeinflussen und sich somit auch die Proteinaktivität verringert (Neujahr, 1983; Detmer & Massey, 1984). So war es denkbar, dass sich die Anwesenheit solcher Ionen ebenfalls auf die Aktivität von PycB_C auswirkt. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass verschiedene MO durch die Anwesenheit bestimmter Ionen aktiviert werden. So steigt z.B. die Aktivität der *p*-Hydroxybenzoate-MO von *Corynebacterium cyclohexanicum* nach der Zugabe von Mg²⁺ (Fujii & Kaneda, 1985). NmoB die Reduktase der NTA-MO von *A. aminovorans* ist nur aktiv, wenn im Messansatz Mn²⁺, Co²⁺ oder Mg²⁺ vorhanden sind, wobei die Enzymaktivitäten in der genannten Reihenfolge zunehmen. Auf welchen Effekt diese Aktivierung beruht, wurde noch nicht geklärt. Eine Aktivierung von PycB_C konnte in dieser Arbeit für keins der eingesetzten Ionen gezeigt werden, jedoch wurde eine Deaktivierung des Enzyms vor allem durch MnCl₂ und CuCl₂ festgestellt. Kupfer-Ionen wirkten sich ebenfalls negativ auf die Aktivität der nativ gereinigten P2C-MO aus (Hormann & Andreesen, 1994). Für MnCl₂ ist ebenfalls ein negativer Einfluss auf die P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2 festgestellt worden (Becker *et al.*, 1997). Vermutlich beeinflusst vor allem Cu²⁺ durch unspezifische Bindung an PycB_C und die daraufhin erfolgende Konformationsänderung des Proteins die Proteinaktivität. Weiterhin können durch Kupfer-Ionen infolge einer Fenton-Reaktion Hydroxylradikale entstehen, die im Anschluss daran beispielsweise mit den Cysteinen, Tryptophan und Tyrosin von PycB_C reagieren könnten, wodurch es zu Veränderungen in der Sekundärstruktur kommt (Davies & Delsignore, 1987). Da es infolge der Flavin-Reduktion und deren Entkopplung zur H₂O₂-Bildung kommt, ist dieses Szenario sehr wahrscheinlich.

4.1.4. P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1*, der Prototyp einer neuen Unterfamilie der Flavin-abhängigen Mehrkomponenten-MO

Nachdem durch Expressionsanalysen klar wurde, dass die Transkription der Gene *pycA*, *pycB*, *pycC* und *pycD* u.a. auch P2C-induziert polycistronisch erfolgt und PycB_C als Flavin-Reduktase charakterisiert werden konnte, stellte sich die Frage: warum es in Anwesenheit der Proteine PycC_C und PycD_C zu einer Erhöhung der von PycA_C und PycB_C katalysierten P2C-Hydroxylierungsrate kommt? So wurden neben *pycB* auch *pycA*, *pycC* und *pycD* heterolog

mittels pASK-IBA3 in *E. coli* exprimiert und anschließend als *Strep*-tag II-Fusionsproteine durch eine Ein-Schritt *Strep*-tag-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend konnten sie gemeinsam mit PycB_C in enzymatischen Testansätzen eingesetzt werden. Im Gegensatz zur P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2, welche nach der Reinigung kein typisches Spektrum eines Flavoproteins aufweist (Becker *et al.*, 1997), konnte im Falle von PycA_C nach Reinigung über eine *Strep*-Tactin-Sepharosesäule in An- und Abwesenheit von 20 µM FAD in den Reinigungspuffern ein solches Flavin-Spektrum detektiert werden. Nach Hormann & Andreesen (1994) geht jedoch das an die MO gebundene Flavin bei der Reinigung der nativen P2C-MO verloren. Eine Dissoziation des Flavins konnte ebenfalls bei anderen MO beobachtet werden, beispielsweise bei der *p*-Hpa-MO von *Flavobacterium spec.* (van Berkel & van Den Tweel, 1991) und der Phenol-MO von *Acinetobacter spec.* (Beadle & Smith, 1982). Der Verlust des Flavins könnte auf die hohen Salzkonzentrationen in den Elutionspuffern zurückzuführen sein, da Neujahr (1983) im Falle der Ein-Komponenten Phenol-MO von *T. cutaneum* nach Zugabe von 1 M KCl einen Übergang von Enzym-gebundenem zu freiem Flavin beobachten konnte, was zur Inaktivierung des Proteins führte. Von Detmer & Massey (1984) wird diese Tatsache zwar nicht bestritten, jedoch wiesen sie ebenfalls nach, dass monovalente Anionen die Dehydrierung des Flavin-C(4a)-hydroxide der Phenol-MO erschweren. So kann die oxidierte Form des Enzyms nicht wieder hergestellt werden und ein erneuter Katalysezyklus ist nicht möglich. Um die P2C-MO von *Arthrobacter spec.* Py1 nativ bis zur Homogenität zu reinigen sind drei Reinigungsschritte nötig, wobei zur Elution des Proteins bis zu 1 M KCl eingesetzt werden. Im Fall einer Ein-Schritt *Strep*-tag-Affinitätschromatographie sind solche hohen Salzkonzentrationen nicht nötig, dadurch bleibt das Flavin an der MO gebunden, auch wenn kein zusätzliches Flavin in den Chromatographiepuffern enthalten ist. Dies bedeutet jedoch auch, dass PycA_C mit einem gebundenen Flavin in *E. coli* und so wahrscheinlich auch in *Arthrobacter spec.* Py1 vorliegt. Fest gebundene Flavin-Cofaktoren sind bisher nur von Ein-Komponenten-MO bekannt wie z.B. der *p*-Hydroxybenzoat-MO von *P. fluorescens* bzw. der Flavin-Reduktase des Zwei-Komponenten-Systems der Phenol-MO von *G. thermoglucosidasius* A7 (Wierenga *et al.*, 1979; Schreuder *et al.*, 1989; Kirchner *et al.*, 2003). Das fest an PycA gebundene Flavin würde somit einen echten Flavin-Cofaktor darstellen und nicht wie bei den TC-FDM-Familie üblich ein diffundierendes Coenzym. In Anlehnung an die Ergebnisse von Sucharitakul *et al.* (2006) kann man ein Reaktionsschema für die Reduktion des PycA-gebundenen FADs postulieren (Abb. 39). Im Fall der *p*-Hydroxybenzoat-MO von *P. fluorescens* konnte

festgestellt werden, dass erst das zu hydroxylierende Substrat *p*-Hpa an der MO binden muss, um die Reduktion des Enzym-gebundenen Flavins zu induzieren (Palfey *et al.*, 1999). Dies würde dem Reaktionsschema A bzw. B₁ entsprechen. Im Fall von B₁ bindet jedoch erst FADH₂ und erst nach erfolgter Substratbindung findet die Elektronenübertragung auf das Enzym-gebundene FAD statt. Aufgrund der Zuordnung von PycA zu den TC-FDM ist jedoch auch das Schema B₂ möglich, in dem es erst zur Elektronenübertragung vom FADH₂ auf das PycA-gebundene FAD kommt und anschließend, analog zu C₂ von *A. baumannii* (Sucharitakul *et al.*, 2006), zur Reaktion mit molekularem Sauerstoff zum PycA-C(4a)-Flavinhydroperoxi-Komplex der bis zur Substratbindung stabilisiert wird.

Im Gegensatz zu PycA_C konnte in den Spektren von PycB_C, PycC_C und PycD_C weder ein Flavin noch ein FeS-Zentrum nachgewiesen werden.

Durch Hormann & Andreesen (1994) und Becker *et al.* (1997) konnte für die P2C-MO von *Arthrobacter spec.* Py1 und *R. koreensis* Sedi2 ein NADH-, FAD- und P2C-abhängiger Sauerstoffverbrauch mittels Sauerstoffelektrode und eine NADH- und FAD-abhängige Cytochrom c-Reduktion nachgewiesen werden. Die P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2 benötigte für die P2C-Hydroxylierung neben der MO-Komponente PyrA noch eine zusätzliche Reduktase-Komponente PyrB. PyrB wurde von Becker (1997) als Flavin-Reduktase charakterisiert, welche die Übertragung von Elektronen von NADH auf FAD katalysiert. Für PycA_C konnte in Anwesenheit von NADH und FAD weder ein P2C-induzierter Sauerstoffverbrauch noch die Reduktion des eingesetzten Cytochrom c festgestellt werden. Dies legte die Vermutung nah, dass PycA_C zwar löslich aber inaktiv in *E. coli* vorlag. Da die P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2 als Zwei-Komponenten-MO charakterisiert wurde, und die abgeleitete Aminosäuresequenz der Gene die höchsten Identitäten zu Vertretern der TC-FDM-Familie besitzen, bestand aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten der Proteine die Möglichkeit, dass es sich bei der P2C-MO von *Arthrobacter spec.* Py1 ebenfalls um eine Zwei-Komponenten-MO handelt. Unterstützt wurde diese These von den Tatsachen, dass *pycB* in dieser Arbeit als Gen einer Flavin-Reduktase identifiziert werden konnte und vor allem dadurch, dass *pycA* und *pycB* gemeinsam transkribiert wurden. Um nachzuweisen, dass PycA_C doch enzymatisch aktiv in *E. coli* vorlag, wurde der P2C-Abbau mittels RP-HPLC verfolgt. Durch diese Methode konnten schon Hormann (1991) und Becker *et al.* (1997) den P2C-Abbau nachweisen. Jedoch unterschieden sich die Elutionsprofile untereinander aufgrund der verwendeten Laufmittel. Hormann (1991) nutzte in seinen Versuchen KP-Puffer (pH 6) und ab 15 min einen Gradienten von 0-10% Acetonitril als Laufmittel, um den P2C-

Abbau und deren Reaktionsprodukt nachzuweisen. Es wurde bei 200 nm detektiert. Becker *et al.* (1997) verwendeten in den ersten 9 min ebenfalls KP-Puffer (pH 6), dann jedoch 20% Methanol und detektierten bei 255 nm. In dieser Arbeit wurden 5% Methanol verwendet, da eine Gradientenbildung aus technischen Gründen nicht möglich war. Nach ca. 2,6 min eluierte kurz vor P2C eine Substanz, die dem postulierten Zwischenprodukt 5-OHP des P2C-Abbaus zugeordnet wurde. Becker *et al.* (1997) ordnete dem Hydroxylierungsprodukt von P2C einen Peak zu, welcher nach 14,75 min eluierte, bei Hormann (1991) nach ca. 20 min. Die Substanz erwies sich in allen drei Fällen als instabil, so dass eine genaue Identifizierung nicht möglich war. 5-OHP sollte gegenüber dem P2C aufgrund der zusätzlichen OH-Gruppe hydrophiler sein und somit bei Verwendung eines polaren Lösungsmittels eher eluieren (U. Lechner, persönliche Mitteilung). Auch das Reaktionsprodukt 3,4-Dihydroxyphenylacetat der *p*-Hpa MO von *A. baumannii* (Chaiyen *et al.*, 2001) eluierte vor dem Substrat *p*-HPA. Ebenfalls konnten Prieto *et al.* (1993) im Fall ihrer Untersuchungen bezüglich einer Phenol-MO von *E. coli* mit breitem Substratspektrum zeigen, dass die Produkte der Phenolhydroxylierung: Hydrochinon, Resorcinol und Catechol in der angegebenen Reihenfolge vor Phenol eluieren. Weiterhin war zu beobachten, dass der Peak des Reaktionsproduktes im Zuge des P2C-Abbaus stetig zunahm. Das Verhältnis war zwar nicht stöchiometrisch, jedoch ist es möglich, dass das entstehende Zwischenprodukt ein anderes Absorptionsspektrum aufweist (eine simultane Messung bei zwei Wellenlängen war aus technischen Gründen nicht möglich). Becker (1997) ermittelte für die instabile Substanz ein Absorptionsmaximum von 280 nm.

Mittels HPLC konnte nachgewiesen werden, dass keines der Proteine PycA_C, PycB_C, PycC_C und PycD_C in der Lage ist, die Hydroxylierung von P2C allein zu katalysieren. In Anwesenheit von PycA_C und PycB_C konnte jedoch ein P2C-Abbau gemessen werden. Das optimale Verhältnis von PycA_C und PycB_C lag, wie im Fall der P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2, bei 5:1 (Becker *et al.*, 1997). Bezüglich der Verhältnisse von MO zu Reduktase gibt es in der TC-FDM-Familie große Unterschiede: so liegt im Fall der Phenol-MO von *G. thermoglucosidasius* A7 und der *p*-Hpa-MO von *A. baumannii* ein Verhältnis der Oxygenase-Komponente zur korrespondierenden Reduktasen von 200:1 vor (Kirchner *et al.*, 2003; Chaiyen *et al.*, 2001). Bei der Styren-MO betrug es 1:1 von *Pseudomonas* spec. VLB120 (Otto *et al.*, 2004). Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Aktivitäten der Reduktase- und MO-Komponenten zurückzuführen. Ist das Verhältnis nicht optimal, kommt es zu einer Erhöhung der Menge an reduziertem Flavin im Ansatz, was zu einer Begünstigung der H₂O₂-Bildung führt. Die Entkopplung der Flavinreduktion führt im

Anschluss zu einer geringeren Substrathydroxylierung im Vergleich zur eingesetzten NADH-Menge. Uetz *et al.* (1992) konnten im Falle der Nta-MO von *A. aminovorans*, deren optimales Verhältnis von MO zu Reduktase bei 5:1 liegt, zeigen, dass sich die beobachtete Entkopplung ebenfalls durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration im Reaktionsansatz zurückdrängen ließ. Im Zuge der Konzentrationserhöhung kommt zu einer Verkürzung der Strecke, die das reduzierte Flavin von der Reduktase zur MO zurücklegen muss. Dadurch verringert sich ebenfalls die Zeit, in der es oxidiert werden kann. Dieser Effekt ist jedoch nur zu beobachten, wenn es tatsächlich zur Diffusion des reduzierten Flavins von der Reduktase- zur MO-Komponente kommt.

Die gemeinsam von PycA_C und PycB_C katalysierte P2C-Abbaurrate ließ sich jedoch nicht nur durch die Optimierung des Verhältnisses von PycB_C zu PycA_C steigern, sondern ebenfalls durch die Zugabe von PycC_C und/oder PycD_C. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können die Komponenten PycA und PycB gemeinsam als Vertreter der TC-FDM-Familie angesehen werden. Da *pycC* und *pycD* jedoch ebenfalls P2C-induziert exprimiert wurden und sich mit *pycA* und *pycB* auf einem Transkript befinden, könnte es sich bei PycC und PycD um weitere MO-Komponenten handeln. So besteht die Möglichkeit, dass die P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1* ein Vier-Komponenten System darstellt. Es stellte sich die Frage: welche Funktion besitzen PycC (25 kDa) und PycD (14 kDa)? Anhand der Aminosäuresequenz konnten weder Cofaktoren, Fe-S-Zentren noch andere Hinweise auf die Funktion von PycC und PycD gefunden werden. Cofaktor-freie Proteine, die MO bei der Hydroxylierung von Substraten unterstützen, findet man bei:

- 1) bakteriellen Multi-Komponenten-MO (BMM) wie z.B. der Tetrahydrofuran-MO von *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxidans* K1 (Thiemer *et al.*, 2003), der Phenol-MO von *Pseudomonas spec. CF600* (Nordlund *et al.*, 1990; Powlowski & Shingler, 1990) und der Methan-MO von *Methylococcus capsulatus* (Coufal *et al.*, 2000)
- 2) der *p*-Hpa-MO von *P. putida* (Arunachalam *et al.*, 1992; Arunachalam *et al.*, 1994).

Aus diesem Grund wurde zuerst eine funktionelle Verwandtschaft zu diesen Proteinen vermutet. Dass es Verbindungen von Flavin-abhängigen-MO zu BMM gibt, konnte durch Nukleotidsequenzvergleiche von Notomista *et al.* (2003) gezeigt werden. Demnach kam es zwischen einem Vorfahren einer Flavin-abhängigen-MO von *Pseudomonas pickettii* PKO1 und einem Vorfahr einer BMM von *P. putida* JS150 zu einem Rekombinationsereignis. Die

Autoren vermuten, dass durch die Neuordnung und *frameshift*-Mutationen diese BMM neue Untereinheiten (UE) erhielt und so die Fünf-Komponenten-BMM Toluol-Benzol-2-MO von *P. putida* JS150 und die Flavin-abhängige Ein-Komponenten-MO Phenol-Cresol-Hydroxylase von *P. pickettii* PKO1 (Kukor & Olsen, 1992; Johnson & Olsen, 1995) entstanden sind. Es wird vermutet, dass die Flavin-abhängige-MO dadurch erst befähigt war, Phenol und/oder Cresol abzubauen. Solche Rearrangements sind vermutlich an der Entstehung der Vielfalt der Abbauwege von aromatischen und anderen Verbindungen maßgeblich beteiligt gewesen, was ebenfalls durch die zahlreichen, auf Plasmiden mobilisierten Gencluster zum Ausdruck kommt (Prieto *et al.*, 1996; Leahy *et al.* 2003, Díaz *et al.*, 2001, Thiemer *et al.*, 2003). Aus diesen Gründen war es nicht abwegig, bei den BMM nach ähnlichen Proteinen zu suchen. Direkte Sequenzvergleiche der Aminosäuresequenzen von PycC und PycD lieferten zwar keinen Hinweis auf eine Ähnlichkeit zu einer Komponente der BMM, jedoch wurden Ähnlichkeiten in der ausgeübten Funktion vermutet. BMM sind seit längerer Zeit bekannt und charakterisiert. Sie sind u.a. am Abbau von Phenol, Toluol, Benzol,

Tab. 17: Cofaktorfreie Proteine bei BMM

Protein	Enzym	Organismus	Eigenschaften/Funktion
MmoB (16 kDa) ¹⁾	Methan-MO	<i>M. capsulatus</i> Bath	- essentiell für die Hydroxylierung, aber nicht am Elektronentransport beteiligt - Induktion einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums der α -Untereinheit
Phi (10 kDa) ²⁾	Phenol-MO	<i>A. radioresistens</i> S13	- essentiell für die Hydroxylierung, aber nicht am Elektronentransport beteiligt - Ausrichtung von $\alpha\beta\gamma$ zur Reduktase* - Hemmung der $\alpha\beta\gamma$ bei mehr als 1:1
DmpM (10 kDa) ³⁾	Phenol-MO	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	- bindet Phenol, woraufhin es mit dem Hydroxylase-Komplex interagiert - ist nur als Monomer aktiv und bildet bei höheren Konzentration inaktive Dimere
AamD (11 kDa) ⁴⁾	Alken-MO	<i>Xanthobacter</i> Pyl	- essentiell für die Hydroxylierung, aber nicht am Elektronentransport beteiligt
TouD (12 kDa) ⁵⁾	Xylene-MO	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	- essentiell für die Hydroxylierung, aber nicht am Elektronentransport beteiligt
kleine Komponente (11 kDa) ⁶⁾	Toluol-2-MO	<i>Burkholderia cepacia</i>	- unterstützt die Hydroxylierung, aber nicht am Elektronentransport beteiligt
T4MOD (12 kDa) ⁷⁾	Toluol-2-MO	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	- unterstützt die Hydroxylierung, aber nicht am Elektronentransport beteiligt
DmpK (10 kDa) ⁸⁾	Phenol-MO	<i>Pseudomonas</i> spec. CF600	- Eiseneinbau in die $\alpha\beta$ -UE - bei höheren Konzentrationen Hemmung des Hydroxylase-Komplexes
MmoD (OrfY, 12 kDa) ⁹⁾	Methan-MO	<i>M. capsulatus</i> Bath	- Eiseneinbau in die $\alpha\beta$ -UE*, ist nur als Monomer aktiv und bildet bei höheren Konz. Dimere - nicht essentiell für den Hydroxylase-Komplex

*postulierte Funktion

¹⁾ Green & Dalton, (1985); Pulver *et al.*, (1997); ²⁾ Griva *et al.*, 2003; ³⁾ Qian *et al.*, (1997); Cadieux and Justin Powlowski (1999); ⁴⁾ Powlowski, J., Sealy, J., Shingler, V., and Cadieux, E. (1997), ⁵⁾ Bertoni *et al.*, 1998; ⁶⁾ Kazlauskaitė *et al.* (1996); ⁷⁾ Pikus, 1996; Hemmi *et al.*, 2001; ⁸⁾ Powlowski *et al.* (1995); ⁹⁾ Coufal *et al.*, 2000; Merx & Lippard (2002)

Methan und Tetrahydrofuran beteiligt und bestehen aus 4 bis 6 Proteinen, deren Gene meist in einem Operon organisiert sind (Merkx *et al.*, 2001; Notomista *et al.*, 2003, Thiemer *et al.*, 2003). Bezüglich ihrer Operon-Zusammensetzung wurden sie in 6 Gruppen eingeteilt (Notomista *et al.*, 2003). Allen gemein sind eine Reduktase- und eine regulatorische Untereinheit (UE). Der N-terminale Teil der Reduktase-UE besteht aus einer Ferredoxin-Domäne und der C-terminale aus einer NAD(P)H-abhängigen Reduktase-Domäne. Sie katalysiert die Elektronenübertragung vom NAD(P)H über ein Flavin zum N-terminalen binuklearen FeS-Zentrum. In seltenen Fällen ist das Flavin kovalent an die Reduktase gebunden, wie z.B. bei im Fall der Tetrahydrofuran-MO von *P. tetrahydrofuranoxidans* K1 (Thiemer *et al.*, 2001; Kämpfer *et al.*, 2006). Die regulatorische UE beeinflusst den Elektronenübergang vom FeS-Zentrum der Reduktase zum sogenannten Hydroxylase-Komplex der die eigentliche Hydroxylierungsreaktion katalysiert. Er besteht aus jeweils zwei UE, α und β . Es wird vermutet, dass diese beiden UE durch eine Genduplikation entstanden sind, jedoch betragen die Identitäten hinsichtlich der Aminosäuren nur ca. 20 %. Der Hydroxylase-Komplex wird im Fall von einigen BMM durch zwei γ -UE stabilisiert. Neben diesen UE gibt es bei verschiedenen BMM weitere Proteine, deren Funktion noch ungenügend bekannt ist (Tab. 17). Es handelt sich um kleine Proteine von ca. 12 kDa, also einer Größe die etwa PycD entspricht. DmpK ist eine der insgesamt sechs Komponenten der Phenol-Hydroxylase von *Pseudomonas spec.* CF600 und besitzt keinerlei Cofaktoren und Redoxzentren. DmpK spielt eine Rolle beim Eiseneinbau in den Hydroxylase-Komplex, wobei es zur Interaktion von DmpK und dem Hydroxylase-Komplex kommt (Powlowski *et al.*, 1996). Bei höheren Konzentrationen von DmpK kommt es durch die Bindung von weiteren DmpK-UE an den Hydroxylase-Komplex zur Inhibierung desselben. Eine solche Funktion kann jedoch für PycC und PycD ausgeschlossen werden, da die P2C-MO keinerlei Eisen-Schwefel-Zentren besitzt und nie eine Hemmung der Enzymaktivitäten von PycA_C bzw PycB_C in Anwesenheit von PycC_C und PycD_C beobachtet werden konnte, sondern genau das Gegenteil.

Ein weiteres Protein ist MmoD, dessen Gen und dessen Homolog (*orfY*) z.B. in den Genclustern der Methan-MO (MMO) von *M. capsulatus* Bath und *M. trichosporium* gefunden wurde (Tab. 17, Cardy *et al.*, 1991, Coufal *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenzen zeigte keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Die Funktion der beiden Proteine ist noch unbekannt, auch konnte es noch nicht nativ gereinigt werden. Nach heterologer Expression in *E. coli* konnte jedoch für MmoD von *M. capsulatus* (Bath) gezeigt werden,

dass es durch Bindung an den Hydroxylase-Komplex diesen hemmt (West *et al.*, 1992). Durch Antikörper wurde nachgewiesen, dass das von *orfY* kodierte Protein auch in *M. capsulatus* Bath exprimiert wird (Merkx *et al.*, 2001), also eine funktionale Rolle spielt. Merckx *et al.* (2001) vermuten eine ähnliche Funktion wie DmpK. Dadurch würde auch die Funktion dieses Proteins für PycC oder PycD ausschließen.

Eine weitere Komponente der BMM wird von den Autoren als Effektor- bzw. Kopplungsprotein bezeichnet (Froland *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1999; Cadieux & Powlowski, 1999). So resultiert aus der Zugabe des Kopplungsproteins MmoB zum Reaktionsansatz zu den restlichen Komponenten der MMO von *M. capsulatus* Bath eine Änderung der Reaktionsrate und der Regioselektivität der Hydroxylierungsreaktion (Froland *et al.*, 1992). Die Regioselektivität kommt erst bei längerkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen zum Tragen, die ebenfalls durch die MMO hydroxyliert werden können. Für solche Effektorproteine wurde mehrfach publiziert, dass sie direkt mit dem Fe-S-Zentrum des Hydrogenase-Komplexes interagieren, jedoch nicht an der Elektronenübertragung von der Reduktase beteiligt sind (Tab. 17). Meist spielen diese Proteine nur eine unterstützende Rolle wie im Fall der Toluol-MO von *B. cepacia* und *P. mendocina* KR1 (Kazlauskaitė *et al.*, 1996; Pikus *et al.*, 1996). Das Effektorprotein der Phenol-MO von *Acinetobacter radioresistens* ist jedoch für die MO-Aktivität essentiell (Griva *et al.*, 2003). Diese Effektorproteine interagieren direkt mit dem Fe-S-Zentrum des Hydroxylase-Komplexes, deshalb können PycC und/oder PycD nicht die Funktion eines solchen Effektorproteins übernehmen, da die P2C-MO, wie bereits angesprochen, kein solches Zentrum besitzt. Auch konnte bisher nie eine Interaktion von PycC und PycD mit PycA und PycB beobachtet werden. Ein Zeichen für eine eventuelle Interaktion verschiedener Proteinkomponenten der P2C-MO, ist die gemeinsame Elution von PycA und PycB nach drei Reinigungsschritten. Dies könnte jedoch ebenfalls Zufall sein, da PyrA und PyrB nach mehreren Reinigungsschritten separiert vorliegen (Becker *et al.*, 1997).

Im Falle der Flavin-abhängigen-MO im engeren Sinne, wozu die Ein- und Zwei-Komponenten-MO gehören, wurden bisher keine akzessorischen Proteine beschrieben (Tab. 1, Tab. 18). Die Ein-Komponenten-MO bestehen aus einer Komponente, welche die Reduktion des protein-gebundenen Flavins und die Hydroxylierung des Substrates katalysiert. Die am besten untersuchten Beispiele stellen die p-Hydroxybenzoat-MO von *P. fluorescens*

Tab. 18: Übersicht über charakterisierte Flavin-abhängige Mehr-Komponenten-MO

Gr.	Enzym	Komponenten	Organismus	Riboflavin					Bemerkungen
				NADH	NADPH	FAD	FMN	FAD	
I	P2C-MO ¹⁾	PycA (MO, 54 kDa)	<i>Arthrobacter</i> sp. Py1	X	X	X	X	X	Vier-Komponenten-System, Reduktase-Aktivierung durch P2C aktiviert
		PycB (Red, 19 kDa)		X	X	X	X		
		PycC (25 kDa)		X	X	X	X		
		PycD (14 kDa)		X	X	X	X		
I	P2C-MO ²⁾	PyrA (MO, 54 kDa)	<i>R. koreensis</i> Sedi2	X	X	X	X	ursprünglich wohl ebenfalls ein Vier-Komponenten-System, jedoch wurde durch ein Rekombinations-Ereignis <i>pycD</i> und <i>pyrD</i> zerstört	
		PyrB (Red19 kDa) (PyrC + PycD)		X	X	?	?		
II	Phenol-MO ³⁾	PheA1 (MO, 57 kDa)	<i>G. thermoglucosidasius</i> A7	X	X	X	X		
		PheA2 (Red, 18 kDa)		X	X	X	X		
II	<i>p</i> -Hpa-MO ⁴⁾	HpaB _{Ec} (MO, 59 kDa)	<i>E. coli</i>	X	X	X	X		
		HpaC _{Ec} (Red, 19 kDa)		X	X	X	X		
II	Styren-MO ⁵⁾	SsuD (MO 42 kDa)	<i>E. coli</i>		X	X	X		
		SsuE (Red 21 kDa)			X	X	X		
III	Nitriolo-triacetat-MO ⁶⁾	NmoA (MO, 47 kDa)	<i>A. aminovorans</i>	X	X	X	X	Reduktase-Aktivierung durch Nta u. Mg ²⁺	
		NmoB (Red, 36 kDa)		X	X	X	X		
III	<i>p</i> -Hpa-MO ⁷⁾	C2 (MO, 50 kDa)	<i>A. baumannii</i>	X	X	X	X	Reduktase-Aktivierung durch <i>p</i> -Hpa, hohe <i>p</i> -Hpa-Konz. hemmen die Hydroxylierung	
		C1 (Red, 32 kDa)		X	X	X	X		
III	<i>p</i> -Hpa-MO ⁸⁾	Kopplungsprotein (MO, 40 kDa)	<i>P. putida</i>	X	X	X	X	Reduktase-Aktivierung durch <i>p</i> -Hpa, hohe <i>p</i> -Hpa-Konz. hemmen die Hydroxylierung	
		Flavoprotein (Red, 31 kDa)		X	X	X	X		

*) Reduktase-Komponente besitzt nach der Reinigung ein gebundenes Flavin

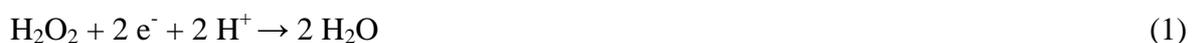
¹⁾ Hormann & Andreesen, 1994; ²⁾ Becker *et al.*, 1997; ³⁾ Duffner *et al.*, 2000; ⁴⁾ Prieto & Garcia, 1994; Galan *et al.*, 2000; Louie *et al.*, 2003; ⁵⁾ Gao & Ellis, 2007

⁶⁾ Uetz *et al.*, 1992; Knobel *et al.*, 1996 ⁷⁾ Chaiyen *et al.*, 2001; Thotsaporn *et al.*, 2004; Sucharitakul *et al.*, 2006; Alfieri *et al.*, 2007; ⁸⁾ Arunachalam *et al.*, 1992; Arunachalam *et al.*, 1994; Arunachalam & Massey, 1994

und *P. aeruginosa* dar (Entsch & van Berkel, 1995; Entsch *et al.*, 2005). Beide Proteine unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren. Die Flavin-Reduktion wird im Fall der Zwei-Komponenten-MO, wie der P2C-MO von *R. koreensis* Sedi2, durch eine separate Flavin-Reduktase übernommen (Becker *et al.*, 1997). Das reduzierte Flavin diffundiert entweder zur MO-Komponente, wie es für die TC-FDM-Familie angenommen wird (Galan *et al.*, 2000), oder bleibt an die Reduktase gebunden wie im Fall der Alkansulfonat-MO von *E. coli*, bis diese direkt mit der MO-Komponente interagiert (Abdurachim & Ellis, 2006). Eine Ausnahme stellte hier ein Protein dar, welches von Arunachalam *et al.* (1992, Tab. 18) im Zuge der Charakterisierung der *p*-Hpa-MO von *P. putida* beschrieben wurde. In Anlehnung an verschiedene Komponenten der BMM wurde es wohl als Kopplungsprotein bezeichnet und besitzt eine molekulare Masse von 39 kDa. Die dazugehörige *p*-Hpa-MO stellt ein 30 kDa großes Flavoprotein dar, das ein typisches Flavinspektrum aufweist. Das Flavoprotein ist in der Lage, die Elektronen von NADH auf das gebundene Flavin zu übertragen. In Anwesenheit von *p*-Hpa wird diese Reaktion um den Faktor 12 gesteigert. Nach der Flavin-Reduktion kam es in Anwesenheit des Kopplungsproteins zur Hydroxylierung von *p*-Hpa zu 3,4-Dihydroxyphenylacetat. War das Kopplungsprotein nicht anwesend, kam es zur Entkopplung der Flavin-Reduktion. Leider existieren für beide Komponenten keine Aminosäuresequenzen. Eine *p*-Hpa-MO konnte ebenfalls von *A. baumannii* bis zur Homogenität gereinigt und charakterisiert werden (Chaiyen *et al.*, 2001; Thotsaporn *et al.*, 2004, Tab. 18). Die *p*-Hpa-MO von *A. baumannii* besteht aus einer 32 kDa großen Reduktase C₁, welche die durch *p*-Hpa stimulierte Elektronenübertragung von NADH auf FMN katalysiert. Es weist nach der Reinigung ein typisches Flavin-Spektrum auf. C₂ ist eine 50 kDa große Flavin-abhängige-MO, die als einzige bekannte Flavin-abhängige-MO reduziertes FMN, FAD und Riboflavin für die Substrathydroxylierung nutzen kann. Zwischen beiden *p*-Hpa-MO gibt es Parallelen bezüglich des Reaktionsschemas. So reduziert C₁ („Flavoprotein“ von *P. putida*) von *A. baumannii* das Flavin, welches anschließend an C₂ („Kopplungsprotein“ von *P. putida*) bindet, woraufhin ein Flavin-C(4a)-hydroxyflavin ausgebildet und stabilisiert wird. Erst dann kommt es zur Bindung und anschließenden Hydroxylierung von *p*-Hpa durch C₂ („Kopplungsprotein“ von *P. putida*) (Sucharitakul *et al.*, 2006; Arunachalam *et al.*, 1992; Arunachalam & Massey, 1994; Arunachalam *et al.*, 1994). Nach der Charakterisierung von C₁ und C₂ stellten Sucharitakul *et al.* (2006) die Vermutung an, dass es sich bei dem Flavoprotein von *P. putida* um eine Reduktase handelt, und das „Kopplungsprotein“ die korrespondierende MO darstellt. Die Genomsequenz von *P. putida* ist inzwischen vollständig bekannt, so dass, im Rahmen dieser Arbeit, mit Hilfe der

Proteinsequenzen von C₁ und C₂ zwei benachbarte Orfs identifiziert werden konnten, dessen Genprodukte das „Flavo-“, und das „Kopplungsprotein“ mit den abgeleiteten Größen von 34 und 42 kDa darstellen könnten (Anhang J). Sie weisen Identitäten von 78 und 71 % zu C₁ und C₂ auf. So kann mit hoher Wahrscheinlichkeit festgestellt werden, dass es bisher keine bekannten akzessorischen Proteine bei Flavin-abhängigen-MO neben den Flavin-Reduktase gibt.

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei PycC und PycD um bereits bekannte Proteine handelt, wurde vermutet, dass es sich hier um ein neues System handeln könnte, das die Entkopplung der Flavin-Reduktion bzw. unerwünschte Nebenreaktionen verhindert. So wäre es denkbar gewesen, dass PycD in Abwesenheit von P2C an die Reduktase bindet und sie dadurch deaktiviert. Jedoch wäre diese Möglichkeit nur im Fall von PycD möglich, da PycC aufgrund der RT-PCR-Ergebnisse nur P2C-induziert vorliegt. Eine solche Deaktivierung von PycB_C konnte nicht beobachtet werden. Eine weitere Möglichkeit, einer Flavin-Oxidation entgegenzuwirken, wäre die Maskierung des reduzierten Flavins durch Bindung an PycC und/oder PycD. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde der Einfluss von PycC_C und/oder PycD_C auf die Flavin-Reduktion durch PycB_C und die sich anschließende Bildung von H₂O₂ mittels Sauerstoffelektrode gemessen. Dazu wurden Endpunktbestimmungen vorgenommen, indem nach vollständiger NADH-Oxidation dem Messansatz Katalase zugefügt wurde. Wenn PycC_C und/oder PycD_C in der Lage sein sollten reduziertes Flavin zu binden und zu stabilisieren, dann müsste in Anwesenheit von PycC und/oder PycD weniger H₂O₂ messbar sein als bei Abwesenheit. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Platinelektrode H₂O₂ autokatalytisch nach dem Reaktionsschema (1) umsetzt (Beechey & Ribbons, 1972) und somit eine Endpunktbestimmung durch diese Methode nicht möglich war.



H₂O₂ kann aber kolorimetrisch durch Dianisidin und Meerrettich-Peroxidase bei der Wellenlänge 436 nm nachgewiesen werden. Leider stört das anwesende FAD die Messung, da sich dessen Absorptionsmaximum bei 450 nm befindet. Eine weitere Methode die H₂O₂-Menge zu bestimmen, ist der „Boehringer-Mannheim Test“, bei dem der Farbstoff 4-(*p*-Benzochinon-monoimino)-phenazon entsteht, welcher photometrisch verfolgt werden kann. Eine Akkumulation des Farbstoffes blieb bei diesem Test jedoch aus, vielmehr wurde der

Farbstoff, vermutlich durch Reaktion mit reduziertem Flavin, wieder abgebaut. Bei einer Kontrolle in der nur H_2O_2 , Meerrettich-Peroxidase, 4-Aminoantipyrin und 2,4-Dichlorphenolsulfonsäure eingesetzt wurden blieb die Färbung erhalten. Aus diesen Gründen konnte ein Einfluss von PycC_C und/oder PycD_C auf die Flavin-Reduktion nicht durch die H_2O_2 -Entstehung verfolgt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Reduktion des Flavins zu untersuchen, ist die Messung des Absorptionsmaximums bei 450 nm. Durch die Reduktion des Flavins kommt es zur vollständigen Löschung dieses Maximums. So wurde die Reduktion von 50 μM FAD durch PycB_C in Anwesenheit von 1 mM NADH und verschiedener Konzentrationen von PycC_C und/oder PycD_C untersucht (Abb. 22 und 24). Weiterhin war im 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) bei 35 °C ca. 250 μM O_2 enthalten. Es war nach einem anfänglichen Plateau eine rapide Absorptionsabnahme bei 450 nm, je nach Qualität der Protein Präparation und eingesetzter Menge von PycB_C, nach 3 bis 6 min zu beobachten, welche sich dann wieder dem Ausgangspunkt annäherte. Der Reaktionsverlauf lässt sich in 3 Phasen einteilen, die sehr vereinfacht durch das Reaktionsschema 2 dargestellten Reaktionen R₁ und R₂ geprägt sind.



Ein Modell dieser Reaktion und der Verlauf der Konzentrationen von NADH, FAD und Sauerstoff sind in Abb. 40 skizziert. Phase I ist dadurch gekennzeichnet, dass die Geschwindigkeit von R₁ langsamer als R₂ ist, was dadurch deutlich wird, dass zwar Sauerstoff verbraucht wird (Ergebnisse nicht gezeigt), jedoch scheinbar kein reduziertes FAD

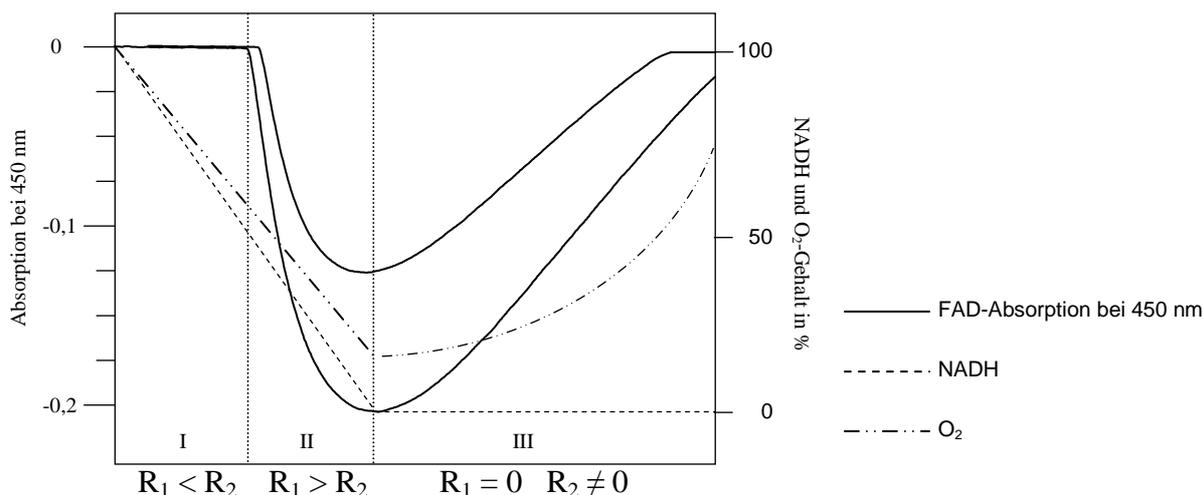


Abb. 40: Modell der Konzentrationsänderungen von NADH und O_2 in % sowie die Absorptionsänderung von FAD durch die PycB_C katalysierte Reduktion bei 450 nm ohne (obere Kurve) und mit Zugabe von PycC_C und PycD_C (untere Kurve)

Im unteren Teil sind die Reaktionen $\text{NADH} + \text{FAD} \rightarrow \text{NAD} + \text{FADH}_2$ (R₁) und $\text{FADH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{FAD} + \text{H}_2\text{O}_2$ (R₂) der beiden ablaufenden Reaktionen zueinander ins Verhältnis gesetzt. I, II und III markieren die verschiedenen Phasen des Reaktionsablaufs.

gebildet wird. In Phase II ist die Geschwindigkeit R_2 , aufgrund der geringen O_2 -Konzentration, geringer als die von R_1 , was sich vor allem an der Zunahme der Menge des reduzierten FAD zeigt. Zum Ende von Phase II schwächt sich R_1 aufgrund der abnehmenden NADH-Konzentration ab bis sie, nachdem NADH vollständig oxidiert ist, zum Erliegen kommt. In Phase III nimmt die Menge an O_2 durch Diffusion in die Messküvette wieder zu, und es kommt zur vollständigen Oxidierung des reduzierten Flavins. Diese Phase würde unter Luftabschluss ausbleiben. Die Ergebnisse der Messungen, in denen NADH, FAD und PycB_C in Ab- und Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen von PycC_C bzw. PycD_C inkubiert wurden, zeigten eine deutliche Zunahme an reduziertem FAD, FMN bzw. Riboflavin bei Anwesenheit der beiden letztgenannten Proteine. So kann postuliert werden, dass PycC_C und PycD_C in der Lage sind, reduzierte Flavine eventuell zu binden und damit vor der Reoxidation zu bewahren. Interessant war, dass sich nach Zugabe von einer vergleichbaren Menge Serumalbumin BSA zum Messansatz, ein ähnlicher Effekt beobachten ließ wie im Falle von PycC_C und PycD_C. Nach Zugabe von Lysozym blieb dieser Effekt aus. Von Sawada *et al.* (2001) wurde festgestellt, dass BSA Flavine binden kann, was die Ergebnisse erklären würde. Durch die Bindung von BSA an FAD und FMN könnte es möglich sein, dass die Oxidation des reduzierten Flavins verhindert, indem der reduzierte Isoalloxazin-Rest des Flavins nicht in den Kontakt mit dem umgebenen aeroben Medium gelangt. In welcher Weise PycC und PycD das reduzierte Flavin bindet oder schützt, bleibt ungeklärt. Zu vermuten ist, dass der Isoalloxazinring von beiden Proteinen sandwichartig gebunden wird, ein Protein auf der *re*- und das andere auf der *si*-Seite des Flavins. Dies würde ebenfalls die erhöhte Effizienz erklären, mit der beide Proteine zusammen das reduzierte Flavin vor der Oxidation bewahren (Abb. 25).

Mit jeder der Komponenten der P2C-MO von *Arthrobacter* sp. Pyl1 nimmt die Menge an reduziertem Flavin weiter zu (Abb. 41), so dass angenommen werden kann, dass die Enzyme einen Komplex ausbilden. *In vitro* konnten für die gereinigten PycA_C- und PycB_C-Proteine keine Interaktion mit den verwendeten Methoden festgestellt werden, jedoch eluieren die nativ gereinigten Proteine PycA und PycB aus *Arthrobacter* spec. Pyl1 nach zwei Reinigungsschritten noch in den selben Fraktionen, was auf eine Interaktion der nativen Proteine hindeuten könnte. Es kann vermutet werden, dass der *Strep*-tag II die Interaktion von PycA_C und PycB_C stört. Denkbar ist weiterhin, dass erst der Flavin_{red}-PycC-PycD-Komplex mit PycA interagiert. Nach diesen Ergebnissen, kann hier ein neuer Mechanismus zur Minimierung der Entkopplung der Flavin-Reduktion postuliert werden. In der Literatur sind diesbezüglich schon einige Möglichkeiten publiziert worden. Im Fall von C₂ der *p*-Hpa-MO

von *A. baumannii* konnte gezeigt werden, dass reduziertes Flavin in Form eines C(4a)-Hydroperoxi-FMN-Enzymkomplexes stabilisiert wird. Hier wird das C(4a)-Hydroperoxi-FMN in einer hydrophoben Tasche des Proteins vor dem Kontakt mit dem Lösungsmittel bewahrt bis *p*-Hpa an das Protein bindet, woraufhin es zur Hydroxylierung des Substrates kommt (Alfieri *et al.*, 2007). Auch für den Flavin_{red}-PycC-PycD-Komplex ist eine hydrophobe Tasche denkbar. Die Änderung der Absorption in Anwesenheit von PycA_C (Abb. 41) könnte man ebenfalls auf die Ausbildung eines PycA_C-C(4a)-Hydroperoxi-FAD-Komplexes zurückführen. Im Fall der Ein- und Zwei-Komponenten-MO konnte einem solchen Komplex ein Absorptionsmaximum bei 380 nm zugeordnet werden (Chaiyen *et al.*, 1997a; Chaiyen *et al.*, 1997b; Entsch *et al.*, 2005; Sucharitakul *et al.*, 2006). Im Fall der Ein-Komponenten-MO wie z.B. der *p*-Hydroxybenzoat-MO von *P. fluorescens* wird die Entkopplung der Flavin-Reduktion dadurch verhindert, dass das Flavin erst reduziert wird, wenn sich ein Enzym-Flavin_{ox}-Substrat-Komplex ausgebildet hat (Entsch & van Berkel, 1995; Ballou *et al.* 2005). Dieser von Palfey *et al.* (1999) als „Passwort“-Schutz bezeichneter Mechanismus versagt jedoch bei Bindung eines Substratanaloga. Obwohl das Analoga nicht hydroxyliert werden kann, kommt es zu Flavin-Reduktion, woraufhin es anschließend mit molekularem Sauerstoff zu H₂O₂ reagiert (White-Stevens & Kamin, 1970). Im Fall der Vertreter der TC-FDM-Familie, wie z.B. der *p*-Hpa-MO von *A. baumannii* konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Gefahr der Flavin-Oxidation vor allem bei dem Transfer des reduzierten Flavins von der Reduktase zur MO besteht. Für die *p*-Hpa-MO von *A. baumannii*

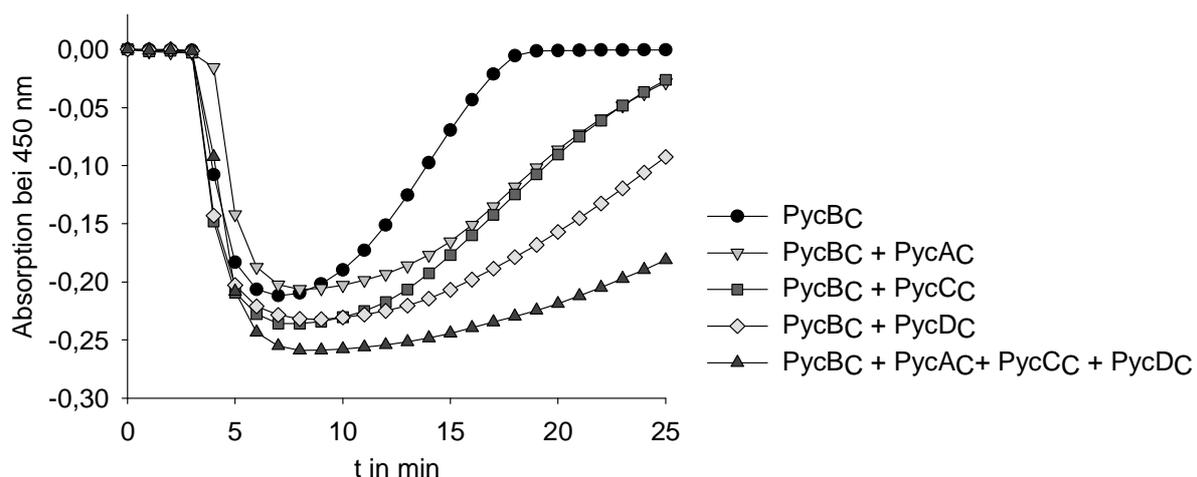


Abb. 41: Stabilisierung des reduzierten FAD durch die Komponenten der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1*

Die Reduktion von FAD wurde bei 450 nm bei 35 °C in 50 mM KP-Puffer (pH 7,5) verfolgt. Die Reaktionsansätze enthielten 50 µM FAD, 1 mM NADH, 50µM P2C und 100 nM PycB_C. Die Komponenten PycA_C, PycC_C und PycD_C wurden mit einer Endkonzentration von 400 nM hinzugegeben.

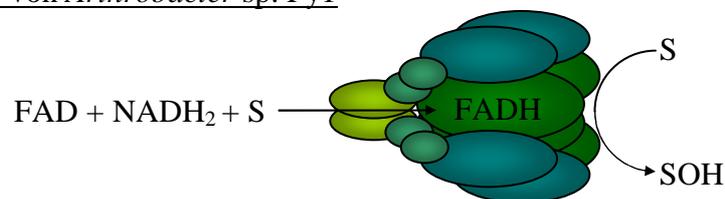
konnten keine Hinweise auf eine Interaktion von Reduktase- und MO-Komponente gefunden werden (Sucharitakul *et al.*, 2007), vielmehr besitzt die Reduktase C₁ eine viel höhere Affinität zu FMN_{ox} ($K_{d/FMN_{ox}} = 1,2 \mu\text{M}$, $K_{d/FMN_{red}} = 250 \mu\text{M}$) als die MO C₂ und umgekehrt C₂ eine höhere zu reduziertem FMN. Durch die verschiedenen Affinitäten kommt es zu einem äußerst effizienten Transfer des reduzierten Flavins durch Diffusion, wobei nur sehr geringe Mengen mit molekularem Sauerstoff reagierten. Eine solche Regulation der Bindung von oxidiertem und reduziertem Flavin wurde ebenfalls bei dem ActVA/ActVB-System ($K_{d/FMN_{ox}} = 26 \mu\text{M}$, $K_{d/FMN_{red}} = 0,4 \mu\text{M}$ für die MO ActVA) von *S. coelicolor* und der *p*-Hpa-MO ($K_{d/FMN_{ox}} = 70 \text{ nM}$, $K_{d/FMN_{red}} = 6 \mu\text{M}$ für die Reduktase HpaB) von *E. coli* beobachtet (Louie *et al.*, 2003; Valton *et al.*, 2005, Tab. 17). Im Fall der *p*-Hpa-MO von *E. coli* konnten Galan *et al.* (2000) weiterhin zeigen, dass es trotz einer Trennung der Reduktase- von der MO-Komponente durch eine Protein-undurchlässige Membran zur Hydroxylierungsreaktion kam. Dies schließt eine direkte Interaktion beider Komponenten aus. Payne *et al.* (2000) merkten dazu an, dass die Reduktasen vieler Zwei-Komponenten-MO austauschbar sind, und aus diesem Grund eine direkte Interaktion unwahrscheinlich ist. Jedoch konnte durch *cross linking*-Experimente gezeigt werden, dass die Alkansulfonate-MO (SsuD) von *E. coli* mit der korrespondierenden Reduktase (SsuE) interagiert (Abdurachim & Ellis, 2006). Bei der Styren-MO von *P. putida*, welche nach van Berkel *et al.* (2006) zur Gruppe C der Flavin-abhängigen-MO zählt, wird postuliert, dass der AMP-Rest des FAD durch MO-Komponente SmoA gebunden wird und gleichzeitig der Isoalloxazin-Rest durch die Reduktase-Komponente SmoB reduziert wird. Daraufhin erfolgt der Transfer des reduzierten Isoalloxazin-Restes in die Nähe des aktiven Zentrums der MO woraufhin die Substrathydroxylierung erfolgt (Kantz *et al.*, 2005). Für die sehr gut untersuchten Luciferasesysteme von *V. harveyi* und *V. fischeri*, welche bisher nicht als TC-FDM-Familie klassifiziert wurden, jedoch im Reaktionsmechanismus Ähnlichkeiten zu der *p*-Hpa von *A. baumannii* aufweisen, konnte festgestellt werden, dass die Reduktase-Komponenten in Anwesenheit der Luciferase ihr Reaktionsschema ändern (Lei & Tu, 1998; Jeffers & Tu, 2001). Die Reduktase-Komponenten beider *Vibrio*-Arten gehen in Anwesenheit der Luciferase von einem Ping-Pong- zu einem sequentiellen Reaktionsmechanismus über. Das bedeutet, dass bei Abwesenheit der Luciferasen der Reduktase-gebundene Flavin-Cofaktor mittels NADH reduziert wird. Anschließend bindet ein weiteres Flavin an die Reduktase, auf das die Reduktionsäquivalente dann übertragen werden. Das reduzierte Flavin dissoziiert von der Reduktase und wird in der so genannten Dunkelreaktion oxidiert (Entkopplung). In Anwesenheit der Luciferase hingegen, wird der reduzierte Flavincofaktor der Reduktase

direkt auf die Luciferase übertragen. Dabei interagieren beide Komponenten miteinander, worauf ebenfalls die K_m -Wert-Änderungen der Reduktase-Komponente für FMN und NADH zurückzuführen sind (Tab. 16). Die Interaktion erfolgt bei *V. harveyi* zwischen der Luciferase und der monomeren Reduktase (Jeffers *et al.*, 2003). Dies ist verwunderlich, wurde die Reduktase doch als Dimer kristallisiert (Tanner *et al.*, 1996). Jedoch lag das Verhältnis von Reduktase zur Luciferase *in vivo* bei 3 μM : 172 μM . Bei einer K_d für das Monomer-Dimer Gleichgewicht der Reduktase von 1,8 μM und dem Komplex aus monomerer Reduktase und Luciferase von 11 μM ist es so möglich, dass die größte Menge der Reduktase als Monomer vorliegt.

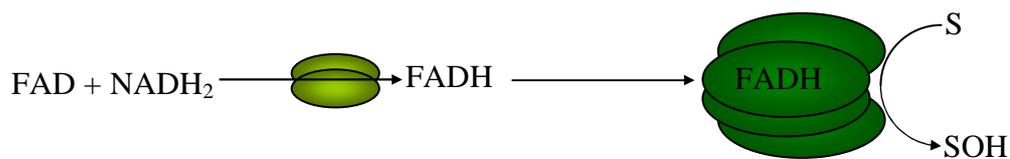
Nach den vorhandenen Daten können die bisher charakterisierten Vertreter der TC-FDM-Familie bezüglich ihrer Eigenschaften und Molekulargrößen in drei Gruppen eingeteilt werden (Tab. 18, Abb. 42). Ihnen allen ist gemein, dass sie eine Reduktase- und MO-Komponente besitzen. Beide besitzen keine konservierten Sequenzmotive zur Bindung des Flavins bzw. NAD(P)H. Wie von Becker *et al.* (1997) und dann formal von Galan *et al.* (2000) beschrieben, reduziert die Reduktase-Komponente das Flavin, welches im Anschluss zur MO-Komponente diffundiert, die es für die Substrathydroxylierung nutzt. Gruppe I mit dem einzigen bisher biochemisch untersuchten Vertreter, der P2C-MO von *Arthrobacter spec. Py1*, wird dadurch charakterisiert, dass sie aus vier Komponenten besteht. Neben der Reduktase- und MO-Komponente besitzt dieses System zwei Helferproteine-PycC und PycD, die der Oxidation des reduzierten Flavins und somit der Entkopplung des Elektronenflusses entgegenwirken. Wie dieser Mechanismus genau funktioniert muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Es kann jedoch vermutet werden, dass die beiden Helferproteine PycC und PycD eine hydrophobe Tasche ausbilden, in der das reduzierte Flavin vor dem Einfluss des molekularen Sauerstoffs bewahrt wird. Fehlt eines der beiden Proteine, kommt es trotzdem zu einer gewissen Interaktion. Da die Tasche jedoch nicht vollständig ausgebildet werden kann, kommt es schneller zur Oxidation des reduzierten Flavins, aber langsamer als ohne PycC oder PycD. Dass es weitere MO der Gruppe I geben könnte, zeigen Sequenzvergleiche mit Genclustern anderer Bakterien (Abb. 33). Aufgrund der hohen Identitäten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen kann angenommen werden, dass die Genprodukte der *pycC*- und *pycD*-homologen Gene dieser Gencluster die gleiche Funktion besitzen. Weiterhin wird die Reduktase-Komponente PycB durch das Substrat der MO-Komponente aktiviert. Es gilt abzuwarten, ob dieses für alle Vertreter dieser Gruppe zutrifft. Gruppe II besteht nur aus einer Flavin-Reduktase- und einer MO-Komponente und stellt die

Vertreter der TC-FDM im Sinne von Becker *et al.* (1997) und Galan *et al.* (2000) dar. Die Komponenten der Gruppe III zeigen Ähnlichkeiten zu den Luciferasen. Die Reduktase ist hier viel größer (>30 kDa) im Vergleich zu denen der Gruppen I und II (ca. 18 kDa). Weiterhin besitzen die Reduktase-Komponenten ein gebundenes Flavin nach der Reinigung und werden durch das Substrat der MO aktiviert. Die MO-Komponente ist im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen etwas kleiner (Tab. 18). Abschließend kann festgestellt werden, dass die P2C-MO eine Flavin-abhängige-MO, bestehend aus vier Komponenten, darstellt. Sie kann als Prototyp einer neuen Unterfamilie der Flavin-abhängigen Mehr-Komponenten-MO angesehen werden.

Gruppe I: z.B. P2C-MO von *Arthrobacter* sp. Py1



Gruppe II: z.B. *p*-Hydroxyphenylacetat-MO von *E. coli*



Gruppe III: z.B. *p*-Hydroxyphenylacetat-MO von *A. baumannii*

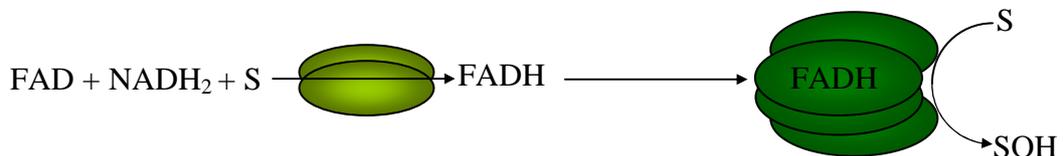


Abb. 42: Modell der verschiedenen Flavin-abhängigen Mehr-Komponenten-MO
(S, Substrat)

4.2. Stress-induzierte Selenoproteine in anaeroben Bakterien

4.2.1. Wachstum von *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* unter Stressbedingungen

Um Stress-induzierte Selenoproteine bei *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* nachweisen zu können, wurden zuerst Wachstumsversuche durchgeführt, die darüber Aufschluss geben sollten, welche Konzentration der Stress-induzierenden Substanzen die drei ausgewählten Stämme tolerieren. Weiterhin war es wichtig, nach der Stress-Induktion noch genügend Zellmaterial zur Verfügung zu haben, um Proteine isolieren und diese anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese auftrennen zu können. Allerdings war die Messung der optischen Dichte teilweise sehr problematisch. So kam es im Fall von Methylviologen in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu einer intensiven Blaufärbung. Nach Zugabe von Diamid erfolgte eine Gelbfärbung und eine Trübung des Mediums. Versuche, unbeimpfte Kulturröhrchen mitzuführen, um sie als *blank* zu verwenden, scheiterten daran, dass im Fall von Diamid eine Gelbfärbung bei den *blank*-Röhrchen ausblieb und die durch Elektronenübertragung auf Methylviologen induzierte Blaufärbung zu intensiv war, um anschließend eine Messung der optischen Dichte durchführen zu können. Wahrscheinlich reagierte Diamid nur mit Stoffwechselprodukten der untersuchten Stämme und nicht mit dem eingesetzten Medium, so dass aus diesem Grund die Gelbfärbung beim *blank* ausblieb. Eine weitere Möglichkeit, die optische Dichte nach Stressinduktion durch Diamid festzustellen, bestand in der Zentrifugation der Kulturröhrchen und der Messung der optischen Dichte vor und nach der Zentrifugation. Dies scheiterte jedoch an der Beschaffenheit der Röhrchen, sie hielten den Zentrifugalkräften nicht stand. Eine Lebendzellzahlbestimmung mittels Zählkammer wurde ausgeschlossen, da man nach Stressinduktion und der Zählung der lebenden Zellen unter Sauerstoffeinfluss nicht unterscheiden könnte, ob die Bakterien aufgrund des Stressinduktors abgestorben sind oder durch den Einfluss des eingebrachten Luftsauerstoffs. Somit könnte man keine Aussage treffen, wie viele Zellen die Stressinduktion überlebt haben. Weiterhin ist davon auszugehen, dass schon durch Stress geschwächte Bakterienzellen durch plötzlichen Sauerstoffeinfluss schneller lysieren als völlig vitale Zellen, was das Zählergebnis ebenfalls verfälschen würde.

Im Fall von Nitrit konnten von allen drei Stämmen Wachstumskurven aufgenommen werden. Es kam jedoch zu einer Rosafärbung, wahrscheinlich ausgelöst durch Stoffe, die durch die Lyse der Zellen ins Medium gelangten. So lysierten nach einer Stunde fast alle Zellen von *C.*

difficile nach Stress-Induktion durch 0, 5, 10, 20, 30, 40 mM Nitrit, woraufhin sich, abhängig von der Nitrit-Konzentration, später das Medium rosa färbte, worauf die beobachtete Erhöhung der optischen Dichte bei den Konzentrationen 30 und 40 mM zurückzuführen ist. Aufgrund der Empfindlichkeit von *C. difficile* wurde davon ausgegangen, dass diese Art keine Abwehrstrategien gegen Nitrit besitzt. Im Gegensatz dazu wurden im Fall von *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* 10 mM Nitrit zur Stressinduktion verwendet, da bei dieser Konzentration beide Stämme eine deutliche Abschwächung im Wachstum zeigten, jedoch nicht abstarben. Eine ähnliche Konzentration (5 mM Nitrit) verwendeten da Costa *et al.* (2002) im Fall von Untersuchungen bezüglich der Flavorubredoxin-Induktion in *E. coli*. Aus den oben geschilderten Gründen wurde für die Stress-Induktionsexperimente mittels Diamid und Methylviologen auf Konzentrationsangaben in der Literatur zurückgegriffen. So nutzten Leichert *et al.* (2003) bei der Stress-Induktion durch Diamid in *B. subtilis* 1 mM Diamid. Diese Konzentration eignete sich ebenfalls für *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum*, so dass genügend Zellmaterial für folgende Untersuchungen gewonnen werden konnte. Methylviologen wurde mit 0,5 ml Luft (105 μ M Sauerstoff in der Gasphase) kombiniert. Babiychuk *et al.* (1995) setzten diese Konzentration ebenfalls im Zuge von Versuchen bei *Sa. cerevisiae* ein. Cho *et al.* (2003) setzten bei Untersuchungen im Fall von *S. coelicolor* 0,1 und 0,2 mM Methylviologen in Nähragarplatten ein.

Da die Resistenz von Mikroorganismen gegenüber verschiedener Stressfaktoren wie z.B. ROS und RNO wichtige Pathogenitätsfaktoren darstellen, ist deren Erforschung äußerst wichtig. So führten beispielsweise Untersuchungen im Fall von *B. subtilis* zu dem Ergebnis, dass infolge der Stressantwort auf Diamid die Transkription von ca. 20 % der Gene positiv oder negativ reguliert wird. Die abgeleitete Aminosäuresequenzen der induzierten Gene zeigten die höchsten Identitäten zu Proteinen, die in die H₂O₂-, Superoxid-, Schwermetallresistenz und Hitzeschock-Resistenz involviert sind (Leichert *et al.*, 2003). Andererseits wird die Transkription der Gene vegetativer Proteine wie z.B. ribosomaler Proteine und allgemeine Stoffwechselproteine reprimiert. Das obligat anaerobe Bakterium *Bacteroides fragilis* kann unter Sauerstoffeinfluss (21% Sauerstoff) nicht wachsen, jedoch besitzt es eine große Toleranz gegenüber Sauerstoff. Im Zuge des Sauerstoff-Stress (5% Sauerstoff) werden 28 Gene aktiviert (Sund *et al.*, 2008). Darunter waren die Gene der Katalase, Superoxiddismutase, Alkyl-Hydroperoxid Reduktase, Thioredoxin-Reduktase, Cytochrom c-Peroxidase, Thiol-Peroxidase, DNA-Bindeprotein und Ferritin (Gregory, 1985; Rocha & Smith, 1995; Rocha *et al.*, 2000; Herren *et al.*, 2003; Sund *et al.*, 2006). Zusätzlich

zu diesen, der Detoxifizierung dienenden Enzymen wurden Gene des Metall-Metabolismus, Nukleinsäurereparatursysteme, Chaperone und Proteine, die die Redoxbalance aufrecht erhalten induziert (Sund *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Fall von *C. difficile*, *C. sticklandii* und *E. acidaminophilum* nach Wachstum unter Einfluss der Stressfaktoren Nitrit, Diamid, Methylviologen und Luftsauerstoff nur bei *C. sticklandii* ein zusätzlich durch Diamid-Stress induziertes Selenoprotein identifiziert werden. Diamid löst Disulfid-Stress aus indem es Thiole oxidiert, woraus nicht native Disulfidbrücken resultieren. Da dies ebenfalls durch ROS induziert wird, werden die durch Disulfid induzierten Proteine als Teil der Stressantwort des oxidativen Stresses angesehen (Leichert *et al.*, 2003). Das induzierte Protein war ca. 10 kDa groß und besaß einen isoelektrischen Punkt von 4,3. Leider war es nicht möglich, das betreffende Protein auszuschneiden und zu sequenzieren, da es nur sehr schwach induziert vorlag bzw. sich aufgrund der geringen Größe schlecht anfärben ließ. Weiterhin kommen vor allem redoxaktive Proteine bzw. Proteine mit katalytisch aktiven Cystein-Cystein-Paaren, in denen ein oder mehrere Cysteine durch Selenocysteine ersetzt sind, als Selenoproteine in Betracht.

4.2.2. Die mögliche Funktion des Diamid-induzierten Selenoproteins von *C. sticklandii*

SigR, RsrA, OxyR und PerR

Wie anaerobe Bakterien Disulfid-Stress wahrnehmen ist bislang unerforscht, im Fall von *S. coelicolor* ist dafür der Sigmafaktor SigR und der Anti-sigma-Faktor RsrA verantwortlich (Kang *et al.*, 1999; Paget *et al.*, 2001). RsrA bindet an σ^R , wodurch dieser deaktiviert wird. Disulfid-Stress induziert in RsrA eine oder mehrere Disulfidbindungen, wodurch dieser seine Affinität zu SigR verliert und dissoziiert (Abb. 42). Daraufhin kann SigR an bestimmte SigR-spezifische Promotorsequenzen binden und die sich anschließenden Gene induzieren, z.B. das Thioredoxin-System. RsrA wird Thioredoxin-abhängig reduziert, woraufhin es wiederum an SigR bindet (Kang *et al.*, 1999). Ein ähnlich funktionierendes Induktionssystem ist OxyR z.B. von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (Zheng *et al.*, 1998; Paget & Buttner, 2003). OxyR ist selbst leicht oxidierbar. Unter physiologischen Bedingungen liegt OxyR reduziert in der Zelle vor. Infolge von oxidativem Stress wird OxyR oxidiert und es bildet sich eine intramolekulare Disulfidbrücke, woraufhin sich vermutlich die Konformation des Proteins ändert und es an die Promotoren verschiedener Gene bindet, dessen Transkription daraufhin eingeleitet wird. Unter diesen Genen befinden sich auch die des Glutathion-Systems, welches

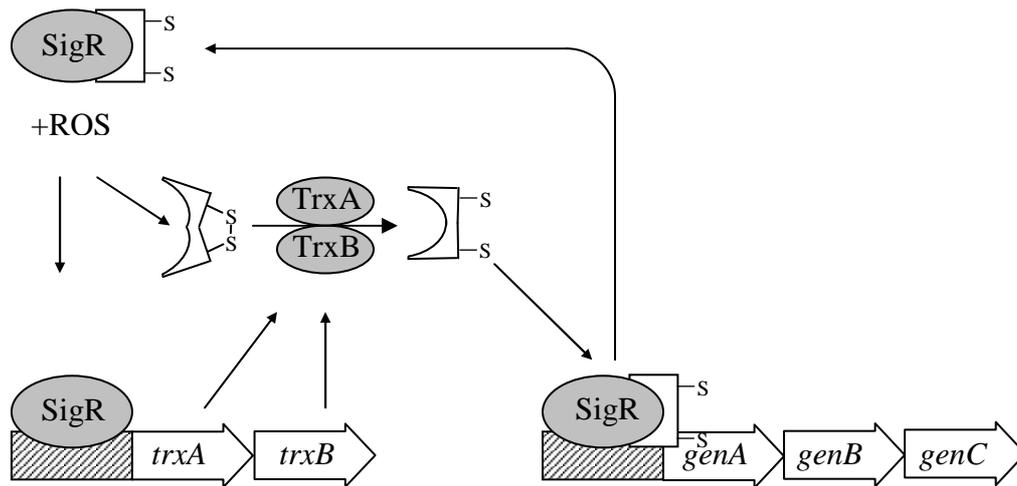


Abb. 42: Regulationsmodell von SigR und RsrA

RsrA (weiß) bindet an SigR wodurch dieser deaktiviert wird. Durch oxidativen Stress wird in RsrA eine Disulfidbindung induziert wodurch dieser seine Affinität zu SigR verliert und dissoziiert. Daraufhin kann SigR (grau) an bestimmte SigR-spezifische Promotorsequenzen (schwarz schraffiert) binden und die Transkription der darauf folgenden Gene induzieren. Durch das ebenfalls induzierte Thioredoxinsystem (TrxA, TrxB) wird die Disulfidbindung in RsrA reduziert, RsrA kann wieder an SigR binden und der SigR-RsrA-Komplex dissoziiert von der Promotorregion.

daraufhin OxyR durch Reduktion der Disulfidbrücke wieder deaktiviert (Zheng *et al.*, 1998). Jedoch scheint die Regulation dieses Systems doch komplexer zu sein, so dass Kim *et al.* (2002) herausfanden, dass in Folge verschiedener Modifikationen am Cys₁₉₉, wie z.B. Cys₁₉₉-S-NO oder Cys₁₉₉-S-S-Glutathion, unterschiedliche Konformationen von OxyR vorliegen. Daraus könnten sich, abhängig von der Konformation und deren Bindungsaffinität zu verschiedenen Promotoren, unterschiedliche OxyR-induzierte Expressionsmuster ableiten. Es ist zu vermuten, dass in den Clostridien ähnliche Redox-aktive Systeme in die Stresserkennung involviert sind. Möglich ist auch, dass ein Cystein innerhalb dieser Proteine durch ein Selenocystein ersetzt ist. Jedoch besitzt OxyR ein molekulares Gewicht von ca. 36 kDa und kommt so für das durch Diamid-Stress induzierte Protein im Fall von *C. sticklandii* nicht in Frage.

Ein weiteres regulatorisch aktives Protein stellt PerR dar. Durch Bindung an die Promotoren der Gene reprimiert PerR im Fall von *C. acetobutylicum* die Expression der NADH-Oxidase, NADH-H₂O₂-Oxidoreduktase und der SOD (Hillmann *et al.*, 2008). PerP besitzt zwei Metallbindungszentren. Ein regulatorisches in dem ein Fe²⁺- oder Mn²⁺-Ion durch vier Histidinreste koordiniert und ein strukturelles in dem Zn²⁺-Ion durch vier Cysteine gebunden wird (Lee & Helmann, 2006). Man nahm an das die Regulation der Gene wie im Fall von OxyR erfolgt, indem durch Hydroperoxid-Einwirkung eine Disulfidbrücke zwischen Cys₁₃₆ und Cys₁₃₉ gebildet wird (Mongkolsuk & Helmann, 2002). Anschließend dissoziiert PerR von

den Promotorbereichen und die Gene können transkribiert werden. Dem ist jedoch nicht so, es konnte stattdessen festgestellt werden, dass ein Sauerstoffmolekül mit dem His₃₇- oder His₉₂-Rest reagiert und es so zu einer Strukturveränderung kommt (Lee & Helmann, 2006). Erstaunlich war das eine *ΔperR*-Mutante in der Lage war aerob zu wachsen. Durch die konstitutive Expression der NADH-Oxidase, NADH-H₂O₂-Oxidoreduktase und der SOD war es *C. acetobutylicum* möglich den Sauerstoff unschädlich zu machen (Hillmann *et al.*, 2008). Diese Form von Sauerstoffresistenz ist jedoch sehr energieaufwendig, da unter NAD(P)H-Verbrauch der Sauerstoff vollständig zu H₂O reduziert werden muss. Da die Cysteinreste keine katalytische Funktion besitzen würde es für den Organismus keine Vorteile bringen statt des Cysteins ein Selenocystein einzubauen. Es konnte aber schon in der Formiat-Dehydrogenase von *E. coli* (Axley *et al.*, 1991) Selenocysteine gefunden werden, die an der Koordination von Metall-Liganden beteiligt sind.

Das induzierte Protein könnte so ein Homolog zu RsrA und PerR von *E. coli* und *C. acetobutylicum* darstellen, dessen Molekulargewichte ca. 12 und 14,9 kDa. Die isoelektrischen Punkte betragen 4,7 und 5,5.

Thioredoxine

Wie oben erwähnt, wird das Thioredoxin-System in *S. coelicolor* durch Diamid zusätzlich induziert. Dies trifft auch für *B. subtilis* zu (Leichert *et al.*, 2003). Das Thioredoxin-System ist von den Archaea bis zu den Mammalia ubiquitär vorhanden (Arner & Holmgren, 2000). Die Hauptfunktion von Thioredoxin bei der Stressantwort auf Diamid ist die Reduktion von Disulfidbindungen. Im Fall des Thioredoxins von *E. coli* erfolgt ein nukleophiler Angriff des deprotonierten Cys₃₂ auf die zu oxidierende Disulfidbindung, wobei ein gemischtes Disulfid beider Proteine entsteht (Holmgren, 1995). Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff des danach deprotonierten Cys₃₅ auf das Cys₃₂, wodurch eine Disulfidbindung zwischen Cys₃₂ und Cys₃₅ des Thioredoxins hervorgeht. Die Disulfidbindung des Thioredoxins wird durch die Thioredoxin-Reduktase unter NADPH Verbrauch wieder reduziert. Aufgrund der Eigenschaft des Selenocysteins unter physiologischen Bedingungen bereits deprotoniert als Selenolat vorzuliegen, ist es vorstellbar, dass ein Thioredoxin mit einem Selenocystein an der Position 35 reaktiver ist. Tatsächlich konnte von Kryukov & Gladyshev (2004) z.B. im Genom des obligat anaeroben Bakteriums *Treponema denticola* ein Thioredoxin-ähnliches Protein mit einem Selenocystein und einer molekularen Größe von 12 kDa und einem isoelektrischen Punkt von ca. 5,6 identifiziert werden. So könnte es sich bei dem Diamid-induzierten Protein

um ein Thioredoxin handeln. Da jedoch Thioredoxin ebenfalls eine Funktion bei der DNA Synthese, speziell als Elektronendonator für die Ribonukleotid-Reduktase (Holmgren, 1989), sowie als Schlüsselprotein in der Disulfidreduktion von Proteinen besitzt (Stewart *et al.*, 1998), ist es eher wahrscheinlich, dass es konstitutiv exprimiert wird. Jedoch konnte für *S. coelicolor* gezeigt werden, dass die Transkription des Thioredoxinsystems in Folge von oxidativen Stress bis zu 50-fach induziert wurde (Kang *et al.*, 1999). Denkbar ist jedoch auch das Vorhandensein von mehreren Thioredoxinen wie es beispielsweise für *E. coli* festgestellt werden konnte (Arner & Holmgren, 2000), welche unterschiedlich reguliert werden.

Rubredoxine

Eine weitere Gruppe von redoxaktiven Proteinen stellen die Rubredoxine dar. Sie besitzen ein mononukleares Eisenzentrum mit dem sie Elektronen auf Rubrerythin oder die Superoxid-Reduktase übertragen können (Coulter & Kurtz, 2001). Das Molekulargewicht des Rubredoxins von *C. perfringens* beträgt ca. 5-6 kDa und der isoelektrische Punkt beträgt 4,82. Diese Werte entsprechen in etwa der Lage des identifizierten Proteinspots. Es wurde bei verschiedenen Bakterien z.B. *C. perfringens* festgestellt, dass Rubredoxine in die Detoxifizierung von ROS involviert sind (Lehmann *et al.*, 1996). So konnte die SOR- und Rubredoxin-abhängige Detoxifizierung des Superoxidanions über einen enzymatischen Aktivitätstest nachgewiesen werden (Doberenz, 2008). Somit ist nicht auszuschließen, dass Rubredoxine nicht auch durch Diamid induziert transkribiert werden, da Disulfid-Stress einen Teil des oxidativen Stresses darstellt. In der oxidativen Stressantwort liefern Rubredoxine nicht nur die Elektronen für die Superoxidreduktase, sondern sind eventuell auch an der Reduktion des H₂O₂ beteiligt (Weinberg *et al.*, 2004), indem sie für die Reduktion eines Rubrerythrins verantwortlich sein könnten. So könnte, trotz der geringeren Größe, für den das durch Diamid-induzierte Protein auch ein Rubredoxin in Frage kommen.

Rubrerythrine

Eine weitere Gruppe von kleinen Proteinen, die in die oxidative Stressantwort integriert ist, stellen die Rubrerythrine dar. Sie besitzen ein molekulares Gewicht von ca. 20 kDa und einen isoelektrischen Punkt im Fall des Rubrerythrins von *D. vulgaris* von 6,25 (Lumppio *et al.*, 2001). Das Rubrerythrin-Gen von *C. perfringens* wird unabhängig von oxidativen Stress transkribiert (Geissmann *et al.*, 1999), wohingegen die Transkription der Rubrerythringene

von *Porphyromonas gingivalis* und *E. acidaminophilum* durch die Zugabe von H_2O_2 zusätzlich induziert werden (Sztukowska *et al.*, 2002; Scholze, 2007). Eine heterologe Expression des Rubrerythrins von *E. acidaminophilum* gelang aufgrund der Bildung von *inclusion bodys* nicht (Scholze, 2007). Im Gegensatz zum Thioredoxin dienen die Cysteine im Rubrerythrin und Rubredoxin der Ausbildung eines $[Fe(SCys)_4]$ -Zentrums (deMare *et al.*, 1996), sind also im Gegensatz zum gebundenen Eisen selbst nicht redoxaktiv, wodurch die Vorteile des Selens im Selenocystein gegenüber dem Schwefel im Cystein wie im Fall von PerR verloren gehen würde. Wie oben schon angesprochen sind Selenocysteinreste in seltenen Fällen auch an der Bindung von Metallionen beteiligt, so dass auch ein Rubrerythrin für das Diamid-induzierte Protein in Frage kommen könnte. Da jedoch die Größe deutlich von der des Proteinspots abweicht, ist das eher unwahrscheinlich.

Peroxiredoxine

Von *E. acidaminophilum* konnte ein Gen *prxU* isoliert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Identität zu Peroxiredoxinen aufwies (Söhling *et al.*, 2001). Das Protein besitzt an der Position 47 statt eines Cysteins ein Selenocystein. Nach heterologer Expression in *E. coli* mit Hilfe eines besonderen Expressionsvektors konnte eine DTT-abhängige Peroxidaseaktivität für Linolsäurehydroperoxid festgestellt werden (Parther, 2003). Ob die Expression von *prxU* durch oxidativen Stress induziert wird, ist nicht bekannt. Im Rahmen von Untersuchungen bei *Mycobacterium bovis* konnten mittels 2D-Gelelektrophorese nach dem Einfluss von 5 mM Diamid zwei Protein-Spots identifiziert werden (Dosanjh *et al.*, 2005), die eine ähnliche Größe und isoelektrischen Punkt wie das in dieser Arbeit identifizierte Protein aus *C. sticklandii* besaßen. Sie konnten als Genprodukte von *ahpC* und *tpx* identifiziert werden. Beide stellen Peroxiredoxine dar, die, wie in der Einleitung erwähnt, in die Detoxifizierung von Peroxiden involviert sind. So wurde im Fall von *Neisseria gonorrhoeae* ein Operon gefunden, das OxyR abhängig H_2O_2 -induziert exprimiert wird (Seib *et al.*, 2006). Die Molekulargewichte von PrxU, AhpC und Tpx liegen jedoch mit 22, 21 und 17 kDa über dem des Diamid-induzierten Proteins von *C. sticklandii*, so dass beide Proteine als Homologe wohl nicht in Frage kommen.

PrpU

Von *E. acidaminophilum* ist ein Selenoprotein PrpU bekannt, dessen Molekulargewicht 11 kDa und der isoelektrische Punkt bei 4,85 beträgt. Jedoch wird dieses Protein in *E. acidaminophilum* konstitutiv exprimiert (A. Pöhlein, unveröffentlichte Daten). Weiterhin konnte im Genom von *C. sticklandii* bisher kein PrpU-Homolog gefunden werden (A. Kreimeyer, unveröffentlichte Daten), so dass auszuschließen ist, es könne sich bei dem Diamid-induzierten Protein um ein PrpU-Homolog handeln.

Abschließend ist festzustellen, dass aufgrund der Größe und des isoelektrischen Punktes des durch Diamid induzierten Proteins am ehesten ein Thioredoxin-ähnliches Protein in Frage kommt. Da Thioredoxine aktiv an der Beseitigung von nicht nativen Disulfidbrücken beteiligt sind. Schon im Fall von *S. coelicolor* konnte gezeigt werden, dass deren Gene Diamid-induziert exprimiert werden. So kann postuliert werden, dass es im Fall von *C. sticklandii* infolge von Disulfid-Stress durch Diamid zur Induktion eines Thioredoxins-ähnlichen Proteins kommt, das ein Selenocystein besitzt. Offen bleibt jedoch die Frage: wenn Disulfid-Stress Teil des oxidativen Stresses ist, warum wird das identifizierte Selenoprotein von *C. sticklandii* nicht auch unter Sauerstoffeinfluss induziert? Denkbar wäre es, dass *C. sticklandii* wie andere Organismen z.B. *E. acidaminophilum* und *E. coli* auch, mehrere Thioredoxine besitzt, die unterschiedlich reguliert werden. Ruft man sich die postulierte Regulation von OxyR ins Gedächtnis, bei der bedingt durch verschiedene Liganden am Cys₁₉₉ sich verschiedene DNA-Bindungsaffinitäten ergeben (Kim *et al.*, 2002), ist es durchaus denkbar, dass einzelne Thioredoxine unter unterschiedlichen Bedingungen induziert werden.

5. Zusammenfassung

- In dieser Arbeit wurden 7225 bp des Genoms von *Arthrobacter spec. Pyl* sequenziert. Innerhalb dieser Sequenz konnten die Gene *reg*, *mem*, *nit*, *pycC*, *pycA*, *pycD*, *pycB* und *abm* identifiziert werden.
- Durch Analyse der Aminosäuresequenzen wurden für Reg, Mem, Nit und Abm die Funktion eines GntR-Regulators, eines P2C-Transporters, einer Amidase und einer Antibiotika-Biosynthese-MO postuliert.
- *PycA* und *pycB* wurden als Strukturgene der Flavin-abhängigen P2C-MO identifiziert, *pycA* als MO- und *pycB* als Reduktase-Komponente. *PycA* und *pycB* werden mit *pycC*, *pycD*, *mem* und *nit* polycistronisch P2C-induziert transkribiert. Somit wurde vermutet, dass deren Genprodukte am P2C-Metabolismus beteiligt sind.
- Die Gene *pycA*, *pycB*, *pycC* und *pycD* konnten heterolog in *E. coli* exprimiert und die Genprodukte als *Strep*-tag II-Fusionsproteine gereinigt werden.
- Mittels HPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass PycA und PycB gemeinsam in der Lage sind, den P2C-Abbau zu katalysieren. Die P2C-Abbaurrate konnte durch Zugabe von PycC und/oder PycD zum Reaktionsansatz weiter gesteigert werden, was darauf hinwies, dass sie weitere Komponenten der P2C-MO sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in Anwesenheit von PycC und/oder PycD eine Verzögerung der Flavinoxidation erfolgte. Somit wurde postuliert, dass diese beiden Proteine reduzierte Flavine binden und sie so vor der Oxidation durch molekularen Sauerstoff bewahren.
- In dieser Arbeit konnte mit PycA, PycB, PycC und PycD erstmals eine Flavin-abhängige-MO beschrieben werden, welche aus vier Komponenten besteht. Sie stellt den ersten bekannten Vertreter einer neuen Unterklasse der Flavin-abhängigen Mehr-Komponenten-MO dar.

Papers die so rein müssen

Massey

Seol & Shatkin; Seol & Shatkin

Kobayashi *et al.*Bertoni *et al.* Kazlauskaite *et al.* Newman & Wackett Pikus *et al.*; Coufal *et al.* Merkx &Lippardvan Aalten *et al.*

¹⁾ Green & Dalton, (1985); Pulver *et al.* *et al.*, (1997); ²⁾ Griva *et al.* *et al.*, 2003; ³⁾ Qian *et al.* *et al.*, (1997), Cadieux & Powlowski(1999); ⁴⁾ Powlowski *et al.*, J., Sealy, J., Shingler, V., and Cadieux, E. (1997), ⁵⁾ Bertoni *et al.*, 1998; ⁶⁾ Kazlauskaite *et al.* *et al.* (1996); ⁷⁾ Newman & Wackett & Wackett (1995); ⁸⁾ PikPikus *et al.* *us* 1991; ⁹⁾ Coufal *et al.*, 2000; Merkx & Lippard ‡ & Lippard (2002)

Arner & HolmgrenHolzman & BaldwinEggink *et al.*

6. Literaturverzeichnis

- Abdurachim K., Ellis H. R. (2006) Detection of protein-protein interactions in the alkanesulfonate monooxygenase system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 188, 8153-8159
- Aboukhair N. K., Ziegler M. M., Baldwin T. O. (1985) Bacterial luciferase: demonstration of a catalytically competent altered conformational state following a single turnover. *Biochemistry*, 24, 3942-3947
- Adams E., Frank L. (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 1005-1061
- Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.*, 13, 111-118
- Alam K. Y., Clark D. P. (1991) Molecular cloning and sequence of the *thdF* gene, which is involved in thiophene and furan oxidation by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173, 6018-6024
- Alfieri A., Fersini F., Ruangchan N., Prongjit M., Chaiyen P., Mattevi A. (2007) Structure of the monooxygenase component of a two-component flavoprotein monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1177-1182
- Amphlett M. J., Callely A. G. (1969) The degradation of 2-thiophenecarboxylic acid by a *Flavobacterium* species. *Biochem. J.*, 112, 12-13
- Anderson C., Tu S. C., Hastings J. W. (1980) Subunit exchange between and specific activities of mutant bacterial luciferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1180-1186
- Andreesen J. R., Wagner M., Sonntag D., Kohlstock M., Harms C., Gursinsky T., Jäger J., Parther T., Kabisch U., Gräntzdorffer A., Pich A., Söhling B. (1999) Various functions of selenols and thiols in anaerobic gram-positive, amino acids-utilizing bacteria. *Biofactors*, 10, 263-270
- Arner E. S., Holmgren A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 267, 6102-6109
- Arunachalam U., Massey V. (1994) Studies on the oxidative half-reaction of *p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 269, 11795-11801
- Arunachalam U., Massey V., Miller S. M. (1994) Mechanism of *p*-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. A two-protein enzyme. *J. Biol. Chem.*, 269, 150-155
- Arunachalam U., Massey V., Vaidyanathan C. S. (1992) *p*-Hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. A two-protein component enzyme. *J. Biol. Chem.*, 267, 25848-25855
- Axley M. J., Bock A., Stadtman T. C. (1991) Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8450-8454

- Bab-Dinitz E., Shmueli H., Maupin-Furlow J., Eichler J., Shaanan B. (2006) *Haloferax volcanii* PitA: an example of functional interaction between the Pfam chlorite dismutase and antibiotic biosynthesis monooxygenase families? *Bioinformatics*, 22, 671-675
- Babiychuk E., Kushnir S., Belles-Boix E., Van Montagu M., Inze D. (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol. Chem.*, 270, 26224-26231
- Baldwin T. O., Berends T., Bunch T. A., Holzman T. F., Rausch S. K., Shamansky L., Treat M. L., Ziegler M. M. (1984) Cloning of the luciferase structural genes from *Vibrio harveyi* and expression of bioluminescence in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 23, 3663-3667
- Baldwin T. O., Christopher J. A., Raushel F. M., Sinclair J. F., Ziegler M. M., Fisher A. J., Rayment I. (1995) Structure of bacterial luciferase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 798-809
- Baldwin T. O., Ziegler M. M. (1992) The biochemistry and molecular biology of bacterial bioluminescence. CRC Press, Boca Raton
- Baldwin T. O., Ziegler M. M., Powers D. A. (1979) Covalent structure of subunits of bacterial luciferase: NH₂-terminal sequence demonstrates subunit homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4887-4889
- Ballou D. P., Entsch B., Cole L. J. (2005) Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 590-598
- Banner D. W., Bloomer A. C., Petsko G. A., Phillips D. C., Pogson C. I., Wilson I. A., Corran P. H., Furth A. J., Milman J. D., Offord R. E., Priddle J. D., Waley S. G. (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 255, 609-614
- Beadle C. A., Smith A. R. (1982) The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. *Eur. J. Biochem.*, 123, 323-332
- Becker D. (1997) Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Naphthalin, Phenanthren und Pyrrol-2-carboxylat (P2C): Charakterisierung der flavinabhängigen P2C-Zwei-Komponenten-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. Sedi2. Dissertation, Halle/Saale
- Becker D., Schröder T., Andreesen J. R. (1997) Two-component flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. *Eur. J. Biochem.*, 249, 739-747
- Beechey R. B., Ribbons D. W. (1972) Oxygen electrode measurements. *Met. Microbiol.*, 25-53
- Beltrametti F., Marconi A. M., Bestetti G., Colombo C., Galli E., Ruzzi M., Zennaro E. (1997) Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2232-2239
- Bertoni G., Martino M., Galli E., Barbieri P. (1998) Analysis of the gene cluster encoding toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3626-3632

- Birnboim H. C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523
- Blum H., Beier H., Grossert H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99
- Bork P., Koonin E. V. (1994) A new family of carbon-nitrogen hydrolases. *Protein Sci.*, 3, 1344-1346
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- Cadieux E., Powlowski J. (1999) Characterization of active and inactive forms of the phenol hydroxylase stimulatory protein DmpM. *Biochemistry*, 38, 10714-10722
- Cardy D. L., Laidler V., Salmond G. P., Murrell J. C. (1991) Molecular analysis of the methane monooxygenase (MMO) gene cluster of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Mol. Microbiol.*, 5, 335-342
- Chaiyen P., Brissette P., Ballou D. P., Massey V. (1997) Thermodynamics and reduction kinetics properties of 2-methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase. *Biochemistry*, 36, 2612-2621
- Chaiyen P., Brissette P., Ballou D. P., Massey V. (1997) Unusual mechanism of oxygen atom transfer and product rearrangement in the catalytic reaction of 2-methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase. *Biochemistry*, 36, 8060-8070
- Chaiyen P., Suadee C., Wilairat P. (2001) A novel two-protein component flavoprotein hydroxylase. *Eur. J. Biochem.*, 268, 5550-5561
- Cho Y. H., Kim E. J., Chung H. J., Choi J. H., Chater K. F., Ahn B. E., Shin J. H., Roe J. H. (2003) The *pqrAB* operon is responsible for paraquat resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 185, 6756-6763
- Collins M. D., Lawson P. A., Willems A., Cordoba J. J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Cai J., Hippe H., Farrow J. A. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 812-826
- Coufal D. E., Blazyk J. L., Whittington D. A., Wu W. W., Rosenzweig A. C., Lippard S. J. (2000) Sequencing and analysis of the *Methylococcus capsulatus* (Bath) soluble methane monooxygenase genes. *Eur. J. Biochem.*, 267, 2174-2185
- Coulter E. D., Kurtz D. M., Jr. (2001) A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 394, 76-86
- Culham D. E., Lasby B., Marangoni A. G., Milner J. L., Steer B. A., van Nues R. W., Wood J. M. (1993) Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J. Mol. Biol.*, 229, 268-276

- da Costa P. N., Teixeira M., Saraiva L. M. (2003) Regulation of the flavorubredoxin nitric oxide reductase gene in *Escherichia coli*: nitrate repression, nitrite induction, and possible post-transcription control. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 385-393
- Davies K. J., Delsignore M. E. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.*, 262, 9908-9913
- deMare F., Kurtz D. M., Jr., Nordlund P. (1996) The structure of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin reveals a unique combination of rubredoxin-like FeS₄ and ferritin-like diiron domains. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 539-546
- Detmer K., Massey V. (1984) Effect of monovalent anions on the mechanism of phenol hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 259, 11265-11272
- Di Gennaro P., Colmegna A., Galli E., Sello G., Pelizzoni F., Bestetti G. (1999) A new biocatalyst for production of optically pure aryl epoxides by styrene monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2794-2797
- Díaz E., Ferrandez A., Prieto M. A., Garcia J. L. (2001) Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 523-569, table of contents
- Dikshit K. L., Dikshit R. P., Webster D. A. (1990) Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.*, 18, 4149-4155
- Doberenz C. (2008) Nachweis der Aktivität von Proteinen, die am Detoxifizierungsmechanismus von reaktiven Sauerstoffspezies in *Eubacterium acidaminophilum* beteiligt sind. Diplomarbeit, Halle/Saale
- Dosanjh N. S., Rawat M., Chung J. H., Av-Gay Y. (2005) Thiol specific oxidative stress response in Mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 249, 87-94
- Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16, 6127-6145
- Duffner F. M., Kirchner U., Bauer M. P., Müller R. (2000) Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, 256, 215-221
- Eggink G., Engel H., Vriend G., Terpstra P., Witholt B. (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J. Mol. Biol.*, 212, 135-142
- Enroth C., Neujahr H., Schneider G., Lindqvist Y. (1998) The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. *Structure*, 6, 605-617
- Entsch B., Cole L. J., Ballou D. P. (2005) Protein dynamics and electrostatics in the function of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433, 297-311

- Entsch B., van Berkel W. J. (1995) Structure and mechanism of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Faseb J.*, 9, 476-483
- Eppink M. H., Schreuder H. A., Van Berkel W. J. (1997) Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. *Protein Sci.*, 6, 2454-2458
- Evans J. S., Venables W. A. (1990) Degradation of thiophene-2-carboxylate, furan-2-carboxylate, pyrrole-2-carboxylate and other thiophene derivatives by the bacterium *Vibrio* YC1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 715-720
- Fang F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 820-832
- Ferrandez A., Minambres B., Garcia B., Olivera E. R., Luengo J. M., Garcia J. L., Diaz E. (1998) Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J. Biol. Chem.*, 273, 25974-25986
- Fetzner S. (2002) Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 243-257
- Fetzner S. (2007) Cofactor-independent oxygenases go it alone. *Nat. Chem. Biol.*, 3, 374-375
- Fieschi F., Niviere V., Frier C., Decout J. L., Fontecave M. (1995) The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 270, 30392-30400
- Filiseti L., Valton J., Fontecave M., Niviere V. (2005) The flavin reductase ActVB from *Streptomyces coelicolor*: characterization of the electron transferase activity of the flavoprotein form. *FEBS Lett.*, 579, 2817-2820
- Franke K. W. (1934) A new toxicant occurring naturally. in certain samples of plant foodstuffs. The occurrence of the toxicant in the protein fraction. *J. Nutr.*, 8, 597-608
- Froland W. A., Andersson K. K., Lee S. K., Liu Y., Lipscomb J. D. (1992) Methane monooxygenase component B and reductase alter the regioselectivity of the hydroxylase component-catalyzed reactions. A novel role for protein-protein interactions in an oxygenase mechanism. *J. Biol. Chem.*, 267, 17588-17597
- Fujii T., Kaneda T. (1985) Purification and properties of NADH/NADPH-dependent *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium cyclohexanicum*. *Eur. J. Biochem.*, 147, 97-104
- Galan B., Diaz E., Prieto M. A., Garcia J. L. (2000) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.*, 182, 627-636
- Gao B., Ellis H. R. (2007) Mechanism of flavin reduction in the alkanesulfonate monooxygenase system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1774, 359-367
- Garcin E., Vernede X., Hatchikian E. C., Volbeda A., Frey M., Fontecilla-Camps J. C. (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7, 557-566

- Geissmann T. A., Teuber M., Meile L. (1999) Transcriptional analysis of the rubrerythrin and superoxide dismutase genes of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 181, 7136-7139
- Genthner B. R., Davis C. L., Bryant M. P. (1981) Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 12-19
- Gisi M. R., Xun L. (2003) Characterization of chlorophenol 4-monooxygenase (TftD) and NADH:flavin adenine dinucleotide oxidoreductase (TftC) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.*, 185, 2786-2792
- Gonzales-Prevatt V., Webster D. A. (1980) Purification and properties of NADH-cytochrome c Reductase from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.*, 255, 1478-1482
- Gräntzdörffer A. (2000) Molekulare und biochemische Charakterisierung der Wolfram- und Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen sowie einer Eisen-Hydrogenase. Dissertation, Halle/Saale
- Green J., Dalton H. (1985) Protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). A novel regulatory protein of enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, 260, 15795-15801
- Gregory E. M. (1985) Characterization of the O₂-induced manganese-containing superoxide dismutase from *Bacteroides fragilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 83-89
- Griva E., Pessione E., Divari S., Valetti F., Cavaletto M., Rossi G. L., Giunta C. (2003) Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. Isolation and characterization of the regulatory component. *Eur. J. Biochem.*, 270, 1434-1440
- Gromer S., Johansson L., Bauer H., Arscott L. D., Rauch S., Ballou D. P., Williams C. H., Jr., Schirmer R. H., Arner E. S. (2003) Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 12618-12623
- Gursinsky T., Jäger J., Andreesen J. R., Söhling B. (2000) A *selDABC* cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.*, 174, 200-212
- Hall I. C., O'Toole E. (1936) Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difcilis*. *Am. J. Dis. Child*, 49, 390-402
- Hartmans S., van der Werf M. J., de Bont J. A. (1990) Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenine dinucleotide-dependent styrene monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1347-1351
- Hausladen A., Gow A. J., Stamler J. S. (1998) Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14100-14105
- Hausladen A., Gow A., Stamler J. S. (2001) Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 10108-10112
- Haydon D. J., Guest J. R. (1991) A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 63, 291-295

- He Q., Huang K. H., He Z., Alm E. J., Fields M. W., Hazen T. C., Arkin A. P., Wall J. D., Zhou J. (2006) Energetic consequences of nitrite stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, inferred from global transcriptional analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4370-4381
- Heacock A. M., Adams E. (1973) Source of pyrrole-2-carboxylate in mammalian urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 392-397
- Heider J., Böck A. (1992) Targeted insertion of selenocysteine into the alpha subunit of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.*, 174, 659-663
- Hemmi H., Studts J. M., Chae Y. K., Song J., Markley J. L., Fox B. G. (2001) Solution structure of the toluene 4-monooxygenase effector protein (T4moD). *Biochemistry*, 40, 3512-3524
- Hermann M., Knerr H. J., Mai N., Gross A., Kaltwasser H. (1992) Creatinine and N-methylhydantoin degradation in two newly isolated *Clostridium* species. *Arch. Microbiol.*, 157, 395-401
- Herren C. D., Rocha E. R., Smith C. J. (2003) Genetic analysis of an important oxidative stress locus in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Gene*, 316, 167-175
- Hesp B., Calvin M., Hosokawa K. (1969) Studies on *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.*, 244, 5644-5655
- Hewitt J., Morris J. G. (1975) Superoxide dismutase in some obligately anaerobic bacteria. *FEBS Lett.*, 50, 315-318
- Hillmann F., Fischer R. J., Saint-Prix F., Girbal L., Bahl H. (2008) PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol. Microbiol.*, 68, 848-860
- Ho R. Y. N., Liebman J. F., Valentine J. S. (1995) Biological reactions of dioxygen: an introduction. In: Active oxygen in biochemistry. Chapman & Hall, Glasgow, pp 1-36
- Hofmann K., Stoffel W. (1993) TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 166
- Holmgren A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, 264, 13963-13966
- Holmgren A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 3, 239-243
- Holzman T. F., Baldwin T. O. (1980) The effects of phosphate on the structure and stability of the luciferases from *Beneckea harveyi*, *Photobacterium fischeri*, and *Photobacterium phosphoreum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94, 1199-1206
- Holzman T. F., Baldwin T. O. (1980) Proteolytic inactivation of luciferases from three species of luminous marine bacteria, *Beneckea harveyi*, *Photobacterium fischeri*, and *Photobacterium phosphoreum*: evidence of a conserved structural feature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6363-6367

- Holzman T. F., Riley P. L., Baldwin T. O. (1980) Inactivation of luciferase from the luminous marine bacterium *Beneckea harveyi* by proteases: evidence for a protease labile region and properties of the protein following inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 205, 554-563
- Hoon M. J., Makita Y., Nakai K., Miyano S. (2005) Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput. Biol.*, 1, e25
- Hormann K. (1991) Untersuchungen zum aeroben Abbau von Pyrrol-2-carboxylat und Charakterisierung einer Flavin abhängigen Pyrrol-2-carboxylat Oxygenase. Dissertation, Göttingen
- Hormann K., Andreesen J. R. (1991) A flavin-dependent oxygenase reaction initiates the degradation of pyrrole-2-carboxylate in *Arthrobacter* strain Py1 (DSM 6386). *Arch. Microbiol.*, 157, 43-48
- Hormann K., Andreesen J. R. (1994) Purification and characterization of a pyrrole-2-carboxylate oxygenase from *Arthrobacter* strain Py1. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 375, 211-218
- Hosokawa K., Stanier R. Y. (1966) Crystallization and properties of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.*, 241, 2453-2460
- Huber R. E., Criddle R. S. (1967) The isolation and properties of beta-galactosidase from *Escherichia coli* grown on sodium selenate. *Biochim. Biophys. Acta*, 141, 587-599
- Hübner A., Danganan C. E., Xun L., Chakrabarty A. M., Hendrickson W. (1998) Genes for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: characterization of the *tftC* and *tftD* genes and locations of the *tft* operons on multiple replicons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2086-2093
- Inouye S. (1994) NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Lett.*, 347, 163-168
- Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M. (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14925-14930
- Jacob C., Giles G. I., Giles N. M., Sies H. (2003) Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 4742-4758
- Jandhyala D. M., Willson R. C., Sewell B. T., Benedik M. J. (2005) Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 327-335
- Jeffers C. E., Nichols J. C., Tu S. C. (2003) Complex formation between *Vibrio harveyi* luciferase and monomeric NADPH:FMN oxidoreductase. *Biochemistry*, 42, 529-534
- Jeffers C. E., Tu S. C. (2001) Differential transfer of reduced flavin cofactor and product by bacterial flavin reductase to luciferase. *Biochemistry*, 40, 1749-1754
- Jenney F. E., Jr., Verhagen M. F., Cui X., Adams M. W. (1999) Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science*, 286, 306-309

- Johnson G. R., Olsen R. H. (1995) Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3336-3346
- Kabisch U. C., Gräntzdorffer A., Schierhorn A., Rücknagel K. P., Andreesen J. R., Pich A. (1999) Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. *J. Biol. Chem.*, 274, 8445-8454
- Kadiyala A., Spain J.C. (1998) A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2479-2484
- Kämpfer P., Kohlweyer U., Thiemer B., Andreesen J. R. (2006) *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 1535-1538
- Kang J. G., Paget M. S., Seok Y. J., Hahn M. Y., Bae J. B., Hahn J. S., Kleanthous C., Büttner M. J., Roe J. H. (1999) RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *Embo J.*, 18, 4292-4298
- Kantz A., Chin F., Nallamotheu N., Nguyen T., Gassner G. T. (2005) Mechanism of flavin transfer and oxygen activation by the two-component flavoenzyme styrene monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 442, 102-116
- Karasawa T., Ikoma S., Yamakawa K., Nakamura S. (1995) A defined growth medium for *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 141 (Pt 2), 371-375
- Kasak L., Horak R., Nurk A., Talvik K., Kivisaar M. (1993) Regulation of the catechol 1,2-dioxygenase- and phenol monooxygenase-encoding *pheBA* operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *J. Bacteriol.*, 175, 8038-8042
- Kazlauskaitė J., Hill H. A., Wilkins P. C., Dalton H. (1996) Direct electrochemistry of the hydroxylase of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur. J. Biochem.*, 241, 552-556
- Kendrew S. G., Federici L., Savino C., Miele A., Marsh E. N., Vallone B. (2000) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a monooxygenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) involved in the biosynthesis of the polyketide actinorhodin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 56, 481-483
- Kendrew S. G., Hopwood D. A., Marsh E. N. (1997) Identification of a monooxygenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) involved in biosynthesis of actinorhodin: purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.*, 179, 4305-4310
- Kim, Merchant K., Nudelman R., Beyer W. F., Jr., Keng T., DeAngelo J., Hausladen A., Stamler J. S. (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell*, 109, 383-396
- Kim J. M., Shimizu S., Yamada H. (1987) Amidohydrolysis of N-methylhydantoin coupled with ATP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 1006-1012

- Kim S. H., Hisano T., Takeda K., Iwasaki W., Ebihara A., Miki K. (2007) Crystal structure of the oxygenase component (HpaB) of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.*,
- Kim S. O., Orii Y., Lloyd D., Hughes M. N., Poole R. K. (1999) Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.*, 445, 389-394
- Kirchner U., Westphal A. H., Müller R., van Berkel W. J. (2003) Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J. Biol. Chem.*, 278, 47545-47553
- Kitagawa W., Kimura N., Kamagata Y. (2004) A novel *p*-nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. *J. Bacteriol.*, 186, 4894-4902
- Knobel H. R., Egli T., van der Meer J. R. (1996) Cloning and characterization of the genes encoding nitrilotriacetate monooxygenase of *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600. *J. Bacteriol.*, 178, 6123-6132
- Kobayashi M., Komeda H., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H. (1992) Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *J. Biol. Chem.*, 267, 20746-20751
- Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H. (1992) Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue. *Biochemistry*, 31, 9000-9007
- König K., Andreesen J. R. (1989) Molybdenum involvement in aerobic degradation of 2-furoic Acid by *Pseudomonas putida* Fu1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1829-1834
- König K., Andreesen J. R. (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme a dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *J. Bacteriol.*, 172, 5999-6009
- Kryukov G. V., Gladyshev V. N. (2004) The prokaryotic selenoproteome. *EMBO Rep.*, 5, 538-543
- Kukor J. J., Olsen R. H. (1992) Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol/cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and functional analysis of the encoded enzyme. *J. Bacteriol.*, 174, 6518-6526
- Leahy J. G., Batchelor P. J., Morcomb S. M. (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 449-479
- Lee J. W., Helmann J. D. (2006) The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, 440, 363-367
- Lehmann Y., Meile L., Teuber M. (1996) Rubrerythrin from *Clostridium perfringens*: cloning of the gene, purification of the protein, and characterization of its superoxide dismutase function. *J. Bacteriol.*, 178, 7152-7158

- Lei B., Liu M., Huang S., Tu S. C. (1994) *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. *J. Bacteriol.*, 176, 3552-3558
- Lei B., Tu S. C. (1998) Mechanism of reduced flavin transfer from *Vibrio harveyi* NADPH-FMN oxidoreductase to luciferase. *Biochemistry*, 37, 14623-14629
- Leichert L. I., Scharf C., Hecker M. (2003) Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 185, 1967-1975
- Leveau J. H., de Vos W. M., van der Meer J. R. (1994) Analysis of the binding site of the LysR-type transcriptional activator TcbR on the *tcbR* and *tcbC* divergent promoter sequences. *J. Bacteriol.*, 176, 1850-1856
- Li L. Y., Seddon A. P., Meister A., Inubushi T. (1989) Study of the 5-oxoprolinase reaction by ^{13}C NMR. *J. Biol. Chem.*, 264, 3096-3101
- Louie T. M., Webster C. M., Xun L. (2002) Genetic and biochemical characterization of a 2,4,6-trichlorophenol degradation pathway in *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.*, 184, 3492-3500
- Louie T. M., Xie X. S., Xun L. (2003) Coordinated production and utilization of FADH₂ by NAD(P)H-flavin oxidoreductase and 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase. *Biochemistry*, 42, 7509-7517
- Lübbers M., Andreesen J. R. (1993) Components of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Cloning, sequencing and identification of the genes for thioredoxin reductase, thioredoxin and selenoprotein P_A. *Eur. J. Biochem.*, 217, 791-798
- Lumppio H. L., Shenvi N. V., Summers A. O., Voordouw G., Kurtz D. M., Jr. (2001) Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J. Bacteriol.*, 183, 101-108
- Massey V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.*, 28, 283-296
- McLeod M. P., Warren R. L., Hsiao W. W., Araki N., Myhre M., Fernandes C., Miyazawa D., Wong W., Lillquist A. L., Wang D., Dosanjh M., Hara H., Petrescu A., Morin R. D., Yang G., Stott J. M., Schein J. E., Shin H., Smailus D., Siddiqui A. S., Marra M. A., Jones S. J., Holt R., Brinkman F. S., Miyauchi K., Fukuda M., Davies J. E., Mohn W. W., Eltis L. D. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15582-15587
- Merkx M., Kopp D. A., Sazinsky M. H., Blazyk J. L., Muller J., Lippard S. J. (2001) Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane Monooxygenase: a tale of two irons and three proteins a list of abbreviations can be found in section 7. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40, 2782-2807
- Merkx M., Lippard S. J. (2002) Why OrfY? Characterization of MMOD, a long overlooked component of the soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Biol. Chem.*, 277, 5858-5865

- Mongkolsuk S., Helmann J. D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.*, 45, 9-15
- Mongodin E. F., Shapir N., Daugherty S. C., DeBoy R. T., Emerson J. B., Shvartzbeyn A., Radune D., Vamathevan J., Riggs F., Grinberg V., Khouri H., Wackett L. P., Nelson K. E., Sadowsky M. J. (2006) Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet.*, 2, e214
- Morawski B., Segura A., Ornston L. N. (2000) Repression of *Acinetobacter* vanillate demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Lett.*, 187, 65-68
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1, 263-273
- Neidle E. L., Hartnett C., Ornston L. N. (1989) Characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* catM, a repressor gene homologous in sequence to transcriptional activator genes. *J. Bacteriol.*, 171, 5410-5421
- Neujahr H. Y. (1983) Effect of anions, chaotropes, and phenol on the attachment of flavin adenine dinucleotide to phenol hydroxylase. *Biochemistry*, 22, 580-584
- Newman L. M., Wackett L. P. (1997) Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, and turnover-dependent inactivation. *J. Bacteriol.*, 179, 90-96
- Niviere V., Fieschi F., Decout J. L., Fontecave M. (1999) The NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. Evidence for a new mode of binding for reduced pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 274, 18252-18260
- Niviere V., Vanoni M. A., Zanetti G., Fontecave M. (1998) Reaction of the NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli* with NADPH and riboflavin: identification of intermediates. *Biochemistry*, 37, 11879-11887
- Nordlund I., Powlowski J., Shingler V. (1990) Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.*, 172, 6826-6833
- Notomista E., Lahm A., Di Donato A., Tramontano A. (2003) Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. *J. Mol. Evol.*, 56, 435-445
- Novo C., Tata R., Clemente A., Brown P. R. (1995) *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys166 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism. *FEBS Lett.*, 367, 275-279
- O'Leary N. D., Duetz W. A., Dobson A. D., O'Connor K. E. (2002) Induction and repression of the sty operon in *Pseudomonas putida* CA-3 during growth on phenylacetic acid under organic and inorganic nutrient-limiting continuous culture conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 208, 263-268

- O'Reilly C., Turner P. D. (2003) The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 1161-1174
- Ohtsubo Y., Delawary M., Kimbara K., Takagi M., Ohta A., Nagata Y. (2001) BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. *J. Biol. Chem.*, 276, 36146-36154
- Omura H., Wieser M., Nagasawa T. (1998) Pyrrole-2-carboxylate decarboxylase from *Bacillus megaterium* PYR2910, an organic-acid-requiring enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 253, 480-484
- Otto K., Hofstetter K., Rothlisberger M., Witholt B., Schmid A. (2004) Biochemical characterization of StyAB from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase. *J. Bacteriol.*, 186, 5292-5302
- Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 87, 315-424
- Paget M. S., Buttner M. J. (2003) Thiol-based regulatory switches. *Annu. Rev. Genet.*, 37, 91-121
- Paget M. S., Molle V., Cohen G., Aharonowitz Y., Buttner M. J. (2001) Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the sigmaR regulon. *Mol. Microbiol.*, 42, 1007-1020
- Palfey B. A., Moran G. R., Entsch B., Ballou D. P., Massey V. (1999) Substrate recognition by "password" in *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemistry*, 38, 1153-1158
- Pao S. S., Paulsen I. T., Saier M. H., Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1-34
- Parther T. (2003) Die Peroxidase-Aktivität Selenocystein-haltiger Proteine des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Halle/Saale
- Payne J. W., Bolton H., Jr., Campbell J. A., Xun L. (1998) Purification and characterization of EDTA monooxygenase from the EDTA-degrading bacterium BNC1. *J. Bacteriol.*, 180, 3823-3827
- Perkins E. J., Gordon M. P., Caceres O., Lurquin P. F. (1990) Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.*, 172, 2351-2359
- Phillips R. W., Wiegel J., Berry C. J., Fliermans C., Peacock A. D., White D. C., Shimkets L. J. (2002) *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 933-938
- Pikus J. D., Studts J. M., Achim C., Kauffmann K. E., Munck E., Steffan R. J., McClay K., Fox B. G. (1996) Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mossbauer studies of the purified diiron and rieske components of a four-protein complex. *Biochemistry*, 35, 9106-9119

- Pinsent J. (1954) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem. J.*, 57, 10-16
- Poole L. B. (2005) Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433, 240-254
- Poole L. B., Reynolds C. M., Wood Z. A., Karplus P. A., Ellis H. R., Li Calzi M. (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 267, 6126-6133
- Poole R. K. (2005) Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, 33, 176-180
- Powlowski J., Sealy J., Shingler V., Cadieux E. (1997) On the role of DmpK, an auxiliary protein associated with multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Biol. Chem.*, 272, 945-951
- Powlowski J., Shingler V. (1990) In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.*, 172, 6834-6840
- Prieto M. A., Diaz E., Garcia J. L. (1996) Molecular characterization of the *p*-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.*, 178, 111-120
- Prieto M. A., Garcia J. L. (1994) Molecular characterization of *p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme. *J. Biol. Chem.*, 269, 22823-22829
- Prieto M. A., Perez-Aranda A., Garcia J. L. (1993) Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *J. Bacteriol.*, 175, 2162-2167
- Pulver S. C., Froland W. A., Lipscomb J. D., Solomon E. I. (1997) Ligand field circular dichroism and magnetic circular dichroism studies of component B and substrate binding to the hydroxylase component of methane monooxygenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 387-395
- Qian H., Edlund U., Powlowski J., Shingler V., Sethson I. (1997) Solution structure of phenol hydroxylase protein component P2 determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 36, 495-504
- Rafanan E. R., Jr., Le L., Zhao L., Decker H., Shen B. (2001) Cloning, sequencing, and heterologous expression of the *elmGHJ* genes involved in the biosynthesis of the polyketide antibiotic elloramycin from *Streptomyces olivaceus* Tu2353. *J. Nat. Prod.*, 64, 444-449
- Rigali S., Derouaux A., Giannotta F., Dusart J. (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.*, 277, 12507-12515

- Rocha E. R., Owens G., Jr., Smith C. J. (2000) The redox-sensitive transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, 182, 5059-5069
- Rocha E. R., Smith C. J. (1995) Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, 177, 3111-3119
- Rossmann M. G., Moras D., Olsen K. W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, 250, 194-199
- Rothmel R. K., Aldrich T. L., Houghton J. E., Coco W. M., Ornston L. N., Chakrabarty A. M. (1990) Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida* catR: a positive regulator of the catBC operon is a member of the LysR family. *J. Bacteriol.*, 172, 922-931
- Rowland I., Tristram H. (1975) Specificity of the *Escherichia coli* proline transport system. *J. Bacteriol.*, 123, 871-877
- Rudolph J. (2000) Klonierung einer weiteren Kopie des Selenoproteins A aus *Eubacterium acidaminophilum* und vergleichende 2-D-Elektrophorese Stress-induzierter cytoplasmatischer Proteine verschiedener Bakterien. Diplomarbeit, Halle/Saale
- Russell T. R., Demeler B., Tu S. C. (2004) Kinetic mechanism and quaternary structure of *Aminobacter aminovorans* NADH:flavin oxidoreductase: an unusual flavin reductase with bound flavin. *Biochemistry*, 43, 1580-1590
- Saint C. P., Romas P. (1996) 4-Methylphthalate catabolism in *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* Pc701: a gene encoding a phthalate-specific permease forms part of a novel gene cluster. *Microbiology*, 142 (Pt 9), 2407-2418
- Sambrook J. , Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning, vol.1-3. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*,
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467
- Santos P. M., Blatny J. M., Di Bartolo I., Valla S., Zennaro E. (2000) Physiological analysis of the expression of the styrene degradation gene cluster in *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1305-1310
- Sawada O., Ishida T., Horiike K. (2001) Frontal gel chromatographic analysis of the interaction of a protein with self-associating ligands: aberrant saturation in the binding of flavins to bovine serum albumin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 129, 899-907
- Scholze A. (2007) Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in *Eubacterium acidaminophilum* Identifizierung und Charakterisierung eines Rubrerythins. Diplomarbeit, Halle/Saale
- Schreuder H. A., Prick P. A., Wierenga R. K., Vriend G., Wilson K. S., Hol W. G., Drenth J. (1989) Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution. Analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. *J. Mol. Biol.*, 208, 679-696

- Schuler G. D., Altschul S. F., Lipman D. J. (1991) A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins*, 9, 180-190
- Sciara G., Kendrew S. G., Miele A. E., Marsh N. G., Federici L., Malatesta F., Schimperna G., Savino C., Vallone B. (2003) The structure of ActVA-Orf6, a novel type of monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis. *Embo J.*, 22, 205-215
- Seddon A. P., Li L. Y., Meister A. (1984) Resolution of 5-oxo-L-prolinase into a 5-oxo-L-proline-dependent ATPase and a coupling protein. *J. Biol. Chem.*, 259, 8091-8094
- Seib K. L., Wu H. J., Srikhanta Y. N., Edwards J. L., Falsetta M. L., Hamilton A. J., Maguire T. L., Grimmond S. M., Apicella M. A., McEwan A. G., Jennings M. P. (2007) Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.*, 63, 54-68
- Seol W., Shatkin A. J. (1991) *Escherichia coli kgtP* encodes an alpha-ketoglutarate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3802-3806
- Seol W., Shatkin A. J. (1992) *Escherichia coli* alpha-ketoglutarate permease is a constitutively expressed proton symporter. *J. Biol. Chem.*, 267, 6409-6413
- Seol W., Shatkin A. J. (1992) Site-directed mutants of *Escherichia coli* alpha-ketoglutarate permease (KgtP). *Biochemistry*, 31, 3550-3554
- Shen B., Hutchinson C. R. (1993) Tetracenomycin F1 monooxygenase: oxidation of a naphthacenequinone to a naphthacenequinone in the biosynthesis of tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry*, 32, 6656-6663
- Sinclair J. F., Waddle J. J., Waddill E. F., Baldwin T. O. (1993) Purified native subunits of bacterial luciferase are active in the bioluminescence reaction but fail to assemble into the alpha beta structure. *Biochemistry*, 32, 5036-5044
- Söhling B., Parther T., Rücknagel K. P., Wagner M. A., Andreesen J. R. (2001) A selenocysteine-containing peroxiredoxin from the strictly anaerobic organism *Eubacterium acidaminophilum*. *Biol. Chem.*, 382, 979-986
- Sonntag D. (1998) Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Organisation und Transkription der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase-spezifischen Gensätze. Dissertation, Halle/Saale
- Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517
- St John G., Brot N., Ruan J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Weissbach H., Nathan C. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9901-9906
- Stackebrandt E., Schumann P. (2006) The Prokaryotes. Springer, New York
- Stadtman T. C., McClung L. S. (1957) *Clostridium sticklandii* nov. spec. *J. Bacteriol.*, 73, 218-219

- Stewart E. J., Aslund F., Beckwith J. (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo J.*, 17, 5543-5550
- Stintzi A., Cornelis P., Hohnadel D., Meyer J. M., Dean C., Poole K., Kourambas S., Krishnapillai V. (1996) Novel pyoverdine biosynthesis gene(s) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 142 (Pt 5), 1181-1190
- Stintzi A., Johnson Z., Stonehouse M., Ochsner U., Meyer J. M., Vasil M. L., Poole K. (1999) The pvc gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*: role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. *J. Bacteriol.*, 181, 4118-4124
- Sucharitakul J., Chaiyen P., Entsch B., Ballou D. P. (2005) The reductase of *p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii* requires *p*-hydroxyphenylacetate for effective catalysis. *Biochemistry*, 44, 10434-10442
- Sucharitakul J., Chaiyen P., Entsch B., Ballou D. P. (2006) Kinetic mechanisms of the oxygenase from a two-component enzyme, *p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *J. Biol. Chem.*, 281, 17044-17053
- Sucharitakul J., Phongsak T., Entsch B., Svasti J., Chaiyen P., Ballou D. P. (2007) Kinetics of a two-component *p*-hydroxyphenylacetate hydroxylase explain how reduced flavin is transferred from the reductase to the oxygenase. *Biochemistry*, 46, 8611-8623
- Sund C. J., Greg Wells W., Jeffrey Smith C. (2006) The *Bacteroides fragilis* P20 scavengase homolog is important in the oxidative stress response but is not controlled by OxyR. *FEMS Microbiol. Lett.*, 261, 211-217
- Sund C. J., Rocha E. R., Tzinabos A. O., Wells W. G., Gee J. M., Reott M. A., O'Rourke D. P., Smith C. J. (2008) The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence. *Mol. Microbiol.*, 67, 129-142
- Sztukowska M., Bugno M., Potempa J., Travis J., Kurtz D. M., Jr. (2002) Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Microbiol.*, 44, 479-488
- Takeo M., Yasukawa T., Abe Y., Niihara S., Maeda Y., Negoro S. (2003) Cloning and characterization of a 4-nitrophenol hydroxylase gene cluster from *Rhodococcus* sp. PN1. *J. Biosci. Bioeng.*, 95, 139-145
- Tanner J. J., Lei B., Tu S. C., Krause K. L. (1996) Flavin reductase P: structure of a dimeric enzyme that reduces flavin. *Biochemistry*, 35, 13531-13539
- Thiemer B., Andreesen J. R., Schröder T. (2001) The NADH-dependent reductase of a putative multicomponent tetrahydrofuran mono-oxygenase contains a covalently bound FAD. *Eur. J. Biochem.*, 268, 3774-3782
- Thiemer B., Andreesen J. R., Schröder T. (2003) Cloning and characterization of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in *Pseudonocardia* sp. strain K1. *Arch. Microbiol.*, 179, 266-277

- Thotsaporn K., Sucharitakul J., Wongratana J., Suadee C., Chaiyen P. (2004) Cloning and expression of *p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*: evidence of the divergence of enzymes in the class of two-protein component aromatic hydroxylases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1680, 60-66
- Timothy L., Elkan B., Elkan C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. AAI Press, Menlo Park
- Tropel D., van der Meer J. R. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 474-500
- Tu S. C., Becvar J. E., Hastings J. W. (1979) Kinetic studies on the mechanism of bacterial NAD(P)H:flavin oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 193, 110-116
- Turner D. C., Stadtman T. C. (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 366-381
- Uetz T., Schneider R., Snozzi M., Egli T. (1992) Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from "*Chelatobacter*" strain ATCC 29600. *J. Bacteriol.*, 174, 1179-1188
- Uhde A. (1990) Wachstumsphysiologische Untersuchungen zum Abbau von Aminosäuren und mögliche Funktion eines elektronentransferierenden Flavoproteins bei *Clostridium sticklandii*. Dissertation, Göttingen
- Valton J., Fontecave M., Douki T., Kendrew S. G., Niviere V. (2006) An aromatic hydroxylation reaction catalyzed by a two-component FMN-dependent Monooxygenase. The ActVA-ActVB system from *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, 281, 27-35
- van Aalten D. M., DiRusso C. C., Knudsen J. (2001) The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *Embo J.*, 20, 2041-2050
- van Aalten D. M., DiRusso C. C., Knudsen J., Wierenga R. K. (2000) Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. *Embo J.*, 19, 5167-5177
- van Berkel W. J. H., Müller F. (2000) Flavin-dependent monooxygenases with special reference to *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. CRC Press, Boca Raton
- van Berkel W. J., Kamerbeek N. M., Fraaije M. W. (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.*, 124, 670-689
- van Berkel W. J., van Den Tweel W. J. (1991) Purification and characterisation of 3-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase: a novel FAD-dependent monooxygenase from a *Flavobacterium* species. *Eur. J. Biochem.*, 201, 585-592
- van den Heuvel R. H., Westphal A. H., Heck A. J., Walsh M. A., Rovida S., van Berkel W. J., Mattevi A. (2004) Structural studies on flavin reductase PheA2 reveal binding of NAD in an unusual folded conformation and support novel mechanism of action. *J. Biol. Chem.*, 279, 12860-12867

- van der Meer J. R., de Vos W. M., Harayama S., Zehnder A. J. (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.*, 56, 677-694
- Vorholt J. A., Vaupel M., Thauer R. K. (1997) A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Mol. Microbiol.*, 23, 1033-1042
- Waddle J. J., Johnston T. C., Baldwin T. O. (1987) Polypeptide folding and dimerization in bacterial luciferase occur by a concerted mechanism *in vivo*. *Biochemistry*, 26, 4917-4921
- Wagner M. (1997) Untersuchungen zu Proteinkomponenten der substratspezifischen Untereinheiten der Glycin-, Sarcosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Halle/Saale
- Wagner M., Sonntag D., Grimm R., Pich A., Eckerskorn C., Söhling B., Andreesen J. R. (1999) Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur. J. Biochem.*, 260, 38-49
- Weinberg M. V., Jenney F. E., Jr., Cui X., Adams M. W. (2004) Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase. *J. Bacteriol.*, 186, 7888-7895
- West C. A., Salmond G. P., Dalton H., Murrell J. C. (1992) Functional expression in *Escherichia coli* of proteins B and C from soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1301-1307
- White-Stevens R. H., Kamin H. (1970) Uncoupling of oxygen activation from hydroxylation in a bacterial salicylate hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 882-889
- Wiberg N. (2007) Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter & Co, Berlin
- Wierenga R. K., de Jong R. J., Kalk K. H., Hol W. G., Drenth J. (1979) Crystal structure of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Mol. Biol.*, 131, 55-73
- Wierenga R. K., Terpstra P., Hol W. G. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.*, 187, 101-107
- Wilting R., Schorling S., Persson B. C., Böck A. (1997) Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. *J. Mol. Biol.*, 266, 637-641
- Wood Z. A., Poole L. B., Karplus P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 300, 650-653
- Xun L. (1996) Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.*, 178, 2645-2649
- Yamamoto I., Saiki T., Liu S. M., Ljungdahl L. G. (1983) Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *J. Biol. Chem.*, 258, 1826-1832

- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119
- Yoon J. H., Cho Y. G., Kang S. S., Kim S. B., Lee S. T., Park Y. H. (2000) *Rhodococcus koreensis* sp. nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50 Pt 3, 1193-1201
- Zheng M., Aslund F., Storz G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279, 1718-1721
- Zhou N. Y., Jenkins A., Chan Kwo Chion C. K., Leak D. J. (1999) The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene, and phenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1589-1595
- Zindel U., Freudenberg W., Rieth M., Andreesen J. R., Schnell J., Widdel F. (1988) *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. Description and enzymatic studies. *Arch. Microbiol.*, 150, 254-266
- Zuker M., Mathews D.H., Turner D.H. (1999) Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology. Kluwer Academic Publishers

1451 ATGAAAGCGC CCGGCGCGCG TTCTGGGCTT CATGGCCCAA CATGGGCCCCG
 E S A R R A F W A S W P N M G P
 1501 CCCTTGGGCA ACCTCATGGC TGCCGGTGTC CTGGCCATCC TCGCCGCCAC
 P L G N L M A A G V L A I L A A T
 1551 CATGCCGAA AGCGAGTTCC TGGCCTGGGG CTGGCGCATC GCGTTCCGGGT
 M P E S E F L A W G W R I A F G L
 1601 TGTCTGCCCT GCTGGTAGTC ATCGGCCTGG TCCTGCGGCT CTACGTGCAG
 S A L L V V I G L V L R L Y V Q
 1651 GAAACCCCGC TGTTCAAGGA AGCACAGCGG AAGCGGAAG CCGAAGGCAA
 E T P L F K E A Q R K R E A E G N
 1701 CAAGGAACGG AAGATGCCGC TGACCATCCT GTTCCGCCGC AACTGGCGCG
 K E R K M P L T I L F R R N W R E
 1751 AAATCCTCAT CGCCACCGGA AGCCGGATGG GCGAGAACGC AGGCTTCTAC
 I L I A T G S R M G E N A G F Y
 1801 ATCTACTCAC TGTTTCATCAT CACCTACGTC ACCCAAATCA TGGGACTGCA
 I Y S L F I I T Y V T Q I M G L Q
 1851 AAGGCAGACC GGCCTCACCG CCGTCATGAT CGGCCAGGGC GTGGCCGTCG
 R Q T G L T A V M I G Q G V A V V
 1901 TCGCCATTCC CATCCTGGCG CTCTACGCGG ACAAGGTGGG CCGGAAGCCC
 A I P I L A L Y A D K V G R K P
 1951 ATTCTGATCG GCGCTTCGAT TGCCACCATG GTCTGGGCTT TCGCGTTCTT
 I L I G A S I A T M V W A F A F F
 2001 CTTCTGCTG AACACCGGGC AGGTATGGGG CATCATCGCT GCCCGAGTTG
 F L L N T G Q V W G I I A A A V G
 2051 GCGGGCTCCT GATCTTCGCC GCCTACAGCT CCGTGATCGG AGCCTTCTTC
 G L L I F A A Y S S V I G A F F
 2101 TCCGAGCTCT TCCCCACGGA TGTCCGGTAC AGCGGCACGT CCGGTCTCCTA
 S E L F P T D V R Y S G T S V S Y
 2151 CAACCTGGCG TCCCTGATCG CCGGCTCGTT GTCACCGATC ATCGCCTTGG
 N L A S L I A G S L S P I I A L A
 2201 CCCTCTACAG CGCCTTCGGC ACCGGCTATG CCATTGGCAT CTACCTCGCC
 L Y S A F G T G Y A I G I Y L A
 2251 GTCATGGGCT TGATCTCCAT GGTCTCGGTG ATGTTTGCCA AGGAGACCAA
 V M G L I S M V S V M F A K E T K
 2301 GGGTCTGAAG CTCAGCGACC TGGATGAGCC CACCCCTGAG AGTAAGGAAC
 G L K L S D L D E P T P E S K E Q
 NIT→
 2351 AAGCATGAAA ATCGCACTCG TCCAGGTGGC AAGCCCGGAC TCTGAAACCC
 A -
 M K I A L V Q V A S P D S E T R
 2401 GCGAAAACCG GATTGACCGC GTCGAAGCGA TCCTGCGGGG CATCAACGGC
 E N R I D R V E A I L R G I N G
 2451 GCCGAACTGA TCGTCCTGCC CGAACTATGG AGCGCCGGCT ACTTCCATTT
 A E L I V L P E L W S A G Y F H F
 2501 CGACGAGTAT GAGGCGTTGG CAGAAACACT CACCGGCCCC ACCGTCTCCA
 D E Y E A L A E T L T G P T V S M
 2551 TGTGCTCAGC CGTAGCCGCA GATCTTGGCG TCTACCTTCA CCTTGGCAG
 C S R V A A D L G V Y L H L G S
 2601 ATCATCGAGG CCGGCGAGGA TGGCCGGCTC AGCAACACCT CCATCCTGCT
 I I E A G E D G R L S N T S I L L
 2651 GGGACCGGAC GGCAGCGTGG TCCACACGTA CCGGAAGATC CACGTGTTCCG
 G P D G S V V H T Y R K I H V F G
 2701 GCTACAAATC CAAGGAGGCA AGCCTGCTGA CGGCAGGATC TTCCCTTCCC
 Y K S K E A S L L T A G S S L P
 2751 GTGGTCCCCT TGCCTTTCGG ATCTGTGCGC GGCATCACGT GCTACGACCT
 V V P L P F G S V A G I T C Y D L
 2801 CCGCTTCCCG GGGCTGTGGA TGGAGCTCAG CGACCGGGGC GCGGAGATAG
 R F P G L W M E L S D R G A E I V
 2851 TGATCGTTCC CGCCGCTGG CCCGCGGCC GCGGGAACA TTGGCGCCTT
 I V P A A W P A A R R E H W R L
 2901 CTCACCACGG CCAGGGCTGT GGAGCACCAG ATCTTCGTGA TCGCCTGCAA
 L T T A R A V E H Q I F V I A C N

2951 CGCTGCCGGC ACTCAGGAAG GCGTGGAAC TGGTGGGCAT AGTCGCGTGG
 A A G T Q E G V E L G G H S R V V
 3001 TGGATCCCAC CGGCAACGTC CTCGCCGAAG CGTCCTCCGA CGAAACCGTG
 D P T G N V L A E A S S D E T V
 3051 CTGATGGTGG ACATCGATCC GCAGCAAGTG AGCACCGTCC GCAGCGAGTT
 L M V D I D P Q Q V S T V R S E F
 3101 CCCTGTTCATC GGGGACCGCC TCGCGGCCTA CGACACACTC ACCGTTTAGA
 P V I G D R L A A Y D T L T V -
 PycC→
 3151 CCCACAACCG CTTAAAGCCA TCCAAGGAGA CGGAATGGAA ACAACAAGGC
 M E T T R Q
 3201 AAGTCCCACCT CACCTTCCGG GTGGTGGGCA CAGACAAGAC CATCGTGGTC
 V P L T F R V V G T D K T I V V
 3251 ACGGAATTCC ACGCAGTGGT GGCCGGCTAC ACGGGCCGGG ATCCGAAAAGC
 T E F H A V V A G Y T G R D P K A
 3301 AGTCCAGCAC CACATCGATG AACTGGCAGC CATCGGAGTA GCTCCGCCGC
 V Q H H I D E L A A I G V A P P P
 3351 CGGAGGTTCC CATGTTCTAC CGGATGGACT CGGACCTGTT CGAGACCTCG
 E V P M F Y R M D S D L F E T S
 3401 GGTGAGCACG ACACCACCGA GAACCTGACC TCCGGCGAGA TCGAACCCCT
 G E H D T T E N L T S G E I E P L
 3451 CTACATCCGC CACGACGGCC AGTTCTACCT GGGCATCGGC TCAGACCACA
 Y I R H D G Q F Y L G I G S D H T
 3501 CGGACCGGGA CATCGAGGCC CGGGATATCG GAGACTCCAA GCGGGCCTGC
 D R D I E A R D I G D S K R A C
 3551 CCCAAGCCCG TCGCCGCTGA GGTTCATCGCC GTCGAATCCC TGGAGGACCT
 P K P V A A E V I A V E S L E D L
 3601 CGACCTTGAC CAGTGCACGG CACGCTCCTG GGTGGACGGG GAACGTATC
 D L D Q C T A R S W V D G E L Y Q
 3651 AAGAGGGTTC GCTGAGCGGC CTGCGCAAGC CGGCCGACGT CGTCGAACGT
 E G S L S G L R K P A D V V E R
 3701 CTCCTGGCAC GCACTGACAT CGGTGACGCC GATTTTCATGT GCCTGGGCGG
 L L A R T D I G D A D F M C L G G
 3751 CACCCTGCCG CTGCTCAACG GCAAGTTCGT GGATGGAAAT TCCTGGAAGT
 T L P L L N G K F V D G N S W K L
 3801 TGGAGCTCTC CTTCCCGAAT GGGACCACAA TCGAACATAA CTACAAAATC
 E L S F P N G T T I E H N Y K I
 PycA→
 3851 AAGAAAGGCT CACTTCGATG AGAACCGGTA AGCAGTATTT GAAGTCCCTG
 L L G S L R -
 M R T G K Q Y L K S L
 3901 AACGACGGCC GGACAGTGAT CCTCGATGGC GAGGTAGTCG GCAACGTCCCT
 N D G R T V I L D G E V V G N V L
 3951 GGAACACCCG GCCTTCGCGA AGGTTGCCCG GACCATGTCC GAGCTGTTCCG
 E H P A F A K V A R T M S E L F D
 4001 ACATCGCAGC CGACCCCGCC AACGGCATGC AGTTCCATTC CGAGGAAATC
 I A A D P A N G M Q F H S E E I
 4051 GACGGACCCG CCAACCGCAC GTTCGCCGCT CCCCACCC AGGAAGAGCT
 D G P A N R T F A A P R T Q E E L
 4101 GGTGCTGCGG CGCCAGGCAA TCGAGAAGTG GGCCAAGCAC ACCCACGGCT
 V L R R Q A I E K W A K H T H G W
 4151 GGGTGGGCCG GAGCCCCGAC CACGTCCGGA CGTTCTTCGC CGCGTTCGGC
 V G R S P D H V G T F F A A F G
 4201 TCCCACCCGG ACGTCTTCAA GAATGATGAG CGGGACTTCG CTGGCAACGT
 S H P D V F K N D E R D F A G N V
 4251 TGAGCGGTAT TACAAGAAGA TCCTGTCCGA GAACCTCTAC CTTTCTACG
 E R Y Y K K I L S E N L Y L S Y A
 4301 CCATCATTCC CCCGCAGGTT TCCC CGCAA CCACAGCGTC CGGCTGGGAC
 I I P P Q V S R A T T A S G W E
 4351 GGCGAATACC TGCAGGTCCG GCGTCGTACG TGAAACCGAG GAGGCATCAT
 G E Y L Q V G V V R E T E E G I I
 4401 TGTCCGCGGT TCCCAGATGC TCGTACCGG CGCCGCGATC GCTGACGAAG

4451 V R G S Q M L A T G A A I A D E V
 TGTTTGTAC CTGCATCAAG CCGCTGGGCC CGGACGACGT TGA^{CTTCGCC}
 F V T C I K P L G P D D V D F A

4501 GTCAGCTTCG CCATCCCCGT GGCCACCGAC GGA^{CTGAAGC} TCTACTGCCG
 V S F A I P V A T D G L K L Y C R

4551 CCGCCCGTTC GCTCCTGCCG CCACCAGCGA CTT^{CGACTAC} CCACTGACCA
 R P F A P A A T S D F D Y P L T S

4601 GCCACTACGA CGAGCCGGAC GCCCTGGTGG TGT^{TCGACGA} CGTCCTCATC
 H Y D E P D A L V V F D D V L I

4651 CCGTGGGACC GTGTGTTTCA CAACCGGAAC AT^{CGACACCC} TGCGCCGCCA
 P W D R V F I N R N I D T L R R Q

4701 GTTCTTCGAC ACCGGCGCCC ACGCGTTGGG CA^{ACTGGCAG} GCCCAGATCC
 F F D T G A H A L G N W Q A Q I R

4751 GGTTCCTCCAC CAAGCTGAAG TTCATCGCCT C^{CGTGGCCCG} CAAGGTCACC
 F S T K L K F I A S V A R K V T

4801 CAGGTGAACG GCACGGACAA GATCCCCGGC GT^{CCAGGAGA} AGCTCGGCCA
 Q V N G T D K I P G V Q E K L G E

4851 GCTCGCCGCT ATTGTCCAGT CCGTTGAGTC TG^{CCGTCCTG} GCCGCCGAGT
 L A A I V Q S V E S A V L A A E Y

4901 ACACGGCAAC AACGGACGAC GCCGGCATGC G^{GGTTCGGG} GAAGAGCGCG
 T A T T D D A G M R V P G K S A

4951 CTGTACGGGG CCATGGGCCT GCAGTCCGAG A^{CGTATCCGC} GCGTGATCTC
 L Y G A M G L Q S E T Y P R V I S

5001 GATTCTCCGC GACCTGGTGG GAGCGGGCGT G^{CTGCAGTTG} CCCTCCAGCA
 I L R D L V G G G V L Q L P S S I

5051 TCGCCGACAT GACCAGCAGC GTGACCCGGC C^{GGACATGGA} ACRGTACGTC
 A D M T S S V T R P D M E R Y V

5101 CAGTCCCCCG GCGTTACCAG TGAAGAACGA G^{TGAAGCTCT} TCAA^{ACTCGC}
 Q S P G V T S E E R V K L F K L A

5151 CTGGGACATC ATCGGATCCG AGTTCGCCGG C^{CGCCACCAG} CAGTACGAAA
 W D I I G S E F A G R H Q Q Y E M

5201 TGTTCTATGC CCGTGCTCCC TTCGTGGTCC G^{CGGCGCCTA} CACCTACAGG
 F Y A G A P F V V R G A Y T Y R

5251 AATTACGGTT ACGACGCCCT GGTGGCGGAG C^{TGGACACGT} TCCTGGGTT^C
 N Y G Y D A L V A E L D T F L G S

PycD→

5301 CTACAGCATT GACAGCAGCA TTGAATCGGA G^{GGGATCTGA} CCATGGCAAAA
 Y S I D S S I E S E G I - M A K

5351 GCCCGAATTC GAGTTCACCC CCGTGTCTCT G^{GTGGATTTC} GCGCCCTGCA
 P E F E F T P V S S V D F A P C N

5401 ACCCGCACAT AGAGGGTCTG TCCGAGGCCA T^{CCTTGCCCC} GGA^{CTCGGAC}
 P H I E G L S E A I L A R D S D

5451 AACGACAGCG TCACCCGGAT CCTCAAGTTC G^{AACCCGGCA} CTGACACGTC
 N D S V T R I L K F E P G T D T S

5501 CCCCAATGGC GTCCTGACCC ACGATTCTG G^{GAAGAGGTG} TTCATCTTCG
 P N G V L T H D F W E E V F I F E

5551 AAGGCTCGTT CGTGGACCAG CGCCTCGGCC A^{GACCTTCAA} GGCCGGCGAC
 G S F V D Q R L G Q T F K A G D

5601 TGGGCCACCC GTCCCCGGG CATGGAACAC G^{GCCCCTGGG} TCTCCGAGAA
 W A T R P P G M E H G P W V S E N

5651 TGGAGCCAGG ATGTTGAGG TCCGGTATTA C^{ACAAATCCG} GTACAAACTG
 G A R M F E V R Y Y T N P V Q T G

PycB→

5701 GGCGGAGCAA **CTGACATGAG** CCTGGCACCA G^{CCTTCACCA} TCCCTGATGC
 R S N - M S L A P A F T I P D A

5751 CATGGGGATG CGCCGCGCCA TGGGCCGCTT C^{CTCACCGGC} GTCGCCGTGG
 M G M R R A M G R F L T G V A V V

5801 TGACCACCCA GCATGAGGAC GAGCAGTACG G^{GATGACCAT} CAGCTCGCTG
 T T Q H E D E Q Y G M T I S S L

5851 ACCTCCATCA GCCTGGAACC GCCCATCTCG AT^{GATCTCGC} TGA^{ACTTCGG}
 T S I S L E P P I L M I S L N F G

Anhang C, Alignment von Mem

```

Mem_Apy1      MTDLKKAEALRQKHSLSL---VVAASSLAGTAVEWYDFFLYGTAAALVFNKLYFPTDDPL 57
OrfF_Aaur     MTELKKAELRQKHSLSL---VVAASSLAGTAVEWYDFFLYGTAAALVFNKLYFPTDDPL 57
OrfF_Nfar     MATAKDKSINRRAHTSLP---VIAGSSLAGTAVEWYDFFLYGTAAALVFNKLFPPSEDPL 57
OrfF_Rrha     MATANNKSINRRPHTSLP---VIAGSSLAGTAVEWYDFFLYGTAAALVFNKLFPPTEDPL 57
ShiA_Ecol     MDSTLISTRDEGTLSSRRARRAALGSFAGAVVDWYDFFLYGITAAALVFNREFFPQVSPA 60
*             .   **   *   .:***.:*:*****:*****:***   .
-----E-----EEEEHHH-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----H
              i             a
Mem_Apy1      VGTMLALGTFAAGFLARPIGAIVLGHLGDKHGRRATLVASLMLMGVATTLIAFIPSYAAI 117
OrfF_Aaur     VGTMLALGTFAAGFLARPIGAIVLGHLGDKHGRRATLVASLMLMGVATTLIAFIPSYAAI 117
OrfF_Nfar     VGTMLAFATYAVGFVARPLGAAVLGHFGDKHGRRATLIASLLMLMGVSTFLIALLPYAAI 117
OrfF_Rrha     VGTMLAFATYAVGFVARPLGAAVLGHYGVKGRRATLIASLMLMGVSTFLIAFLPTYASI 117
ShiA_Ecol     MGTLAAFATFGVGFVFRPLGGVIFGHFGDRLGKRKRLMLTVWMMGIATLIGILPSFSTI 120
*:*:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
a-----i-----i-----
Mem_Apy1      GLAAPLLLLLRLIQGFALGGEWGAVLLVSEHSNESARRAFWASWPNMGPPGLGNLMAAG 177
OrfF_Aaur     GLAAPLLLLLRLIQGFALGGEWGAVLLVSEHSNESTRRAFWASWPNMGPPGLGNLMAAG 177
OrfF_Nfar     GVTAPLLLLLRLVQGFALGGEWGAVLLVSEHG-DSKRRAFWASWPNLGPPLGNLMAAG 176
OrfF_Rrha     GVAAPLILVLLRLVQGFALGGEWGAVLLVSEHG-DSKRRAFWASWPNLGPPLGNLLAAG 176
ShiA_Ecol     GWWAPILLVTLRAIQGFALGGEWGGAALLSVESAPKNKK-AFYSSGVQVGYGVGLLLSTG 179
*   *:*:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
->a-----a-----
Mem_Apy1      VLAILAATMPSEFLAWGWRIAFGLSALLVVIGLVRLRYVQETPLFKEAQRKREAEKNKE 237
OrfF_Aaur     VLAILAATMPSEFLAWGWRIAFGLSALLVVIGLILRLRYVQETPLFKEAQRKREAEKNKE 237
OrfF_Nfar     ALALLGAVLPEEAFLSWGWVAFGMSALLVVIGLVRLRYVAETPLFEQT---RAATSPAV 233
OrfF_Rrha     VLAVLGSTLSEDAFLSWGWRIFGLSALLVVIGLVRLRYVAETPLFEQS---RDTATAEK 233
ShiA_Ecol     LVSLISMMTTDEQFLSWGWRIPFLFSIVLVLGALWVRNGMEESAQFEQQ---QHYQAAAK 236
:~::~. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
->i-----i-----a-----
Mem_Apy1      RKMPILTILFRRNWREILLIATGSRMGENAGFYIYSLFIITYVTQIMGLQRQTGLTAVMIGQ 297
OrfF_Aaur     RKMPILTILFRRNWREILLIATGSRMGENAGFYIYSLFIITYVTQIMGLQRQTGLTAVMIGQ 297
OrfF_Nfar     LRMPLTAAVRGYWRQILLAAFTFRGENAGFYIFSLFVITYLTQILDLPSTGLNAVMIIGM 293
OrfF_Rrha     KGMPLAAAVRGHWRQILLAAFTFRGENAGFYIFSLFVITYITQILELERSTGLNAVMIIGM 293
ShiA_Ecol     KRIPVIEALLRHPGAFKIIALRLCELLTMYIVTAFALNYSTQNMGPLPRELFLNIGLLVG 296
*:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:
---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
              a-----i-----i-----
Mem_Apy1      GVAVVAIPILALYADKVGRRKPIILGASIAMVWAFVFFLLNTGQV-WGIIAAAVGGLLI 356
OrfF_Aaur     GVAVVAIPILAIYADKVGRRKPIILGASIAMVWAFVFFLLNTGQV-WGIIAAAVGGLLI 356
OrfF_Nfar     VVALVAIPILFAVLADRI GRRPIYIGASIAMVWAFVFFALLDTEAT-GAIFLAVAVGLVI 352
OrfF_Rrha     VVALVTIPMFVAVLADRI GRRPIYIGASIAMVWAFVFFALLDTKNP-AAITLAVAVGGLLI 352
ShiA_Ecol     GLSCLTIPCFVAVLADRI GRRRVYITGTLIGTSAFPFFMALEAQSIFWIVFFSIMLANIA 356
:~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~*~::~
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
->a-----a-----i-----i-----
Mem_Apy1      FAAYSSVIGAFFSELPDTRVYSGTSVSYNLAASLIAGSLSPIIALALYSAFG-TGYAIGI 415
OrfF_Aaur     FAAYSSVIGAFFSELPDTRVYSGTSVSYNLAASLIAGSLSPIIALALYSAFG-TGYAIGI 415
OrfF_Nfar     FAAYSAVIGAFFSELPTEVRYSGVSLAYNLASVLGASLAPIIAIALYDRFG-SGQAIGA 411
OrfF_Rrha     FAAYSAVIGAFFSELPTEVRYSGVSLAYNLASVLGASLAPIIAIALYTRFG-TGYAIGA 411
ShiA_Ecol     HDMVVVCQPMFTMGASVYRSGVGYQVAVSVGGFTPFIAALITYFAGNWHVSAI 416
. .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
HHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
->a-----a-----
Mem_Apy1      YLAVMGLISMVSMFAKETKGLKLSLDLDEPTPESKEQ----- 452
OrfF_Aaur     YLAAMGLISMVSMFAKETKGLKLSLDLDEPTPESKEQA----- 453
OrfF_Nfar     YLALMGVISLVAALVAKETRTVDLADVQEEAPATGTATDAAVVIP 456
OrfF_Rrha     YLVAMGVISLIASLLARETQSVDLAAGDEAISRTLETSPASVHH- 455
ShiA_Ecol     YLLAGCLISAMTALLMKDSQRA----- 438
**   *:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
->i-----

```

Alignment der Aminosäuresequenz des putativen Membranproteins von *Arthrobacter* spec. Stamm Py1 (Mem_Apy1) mit OrfF_Aaur von *A. aurescens* TC1 (98%, 99%), OrfF_Nfar von *N. farcinica* IFM10152 (67%, 85%), OrfF_Rrha von *Rhodococcus* spec. RHA1 (66%, 85%) und ShiA_Ecol dem Shikimat Transporter von *E. coli*. (36%, 59%).

Die Identitäten und Ähnlichkeiten bezüglich Mem sind in Klammern angegeben. Die vom Tool „Jpred“ vorausgesagte Sekundärstruktur ist unter dem Alignment angeführt (H, α -Helix; E, β -Faltblatt). Die putativen Transmembrandomänen sind mit Pfeilen und dessen Ausrichtung mit innen (i) und außen (a) markiert. Die Sequenzmotive P-(LIV)-G-(GAS)-x-(LIVF)-(LIVFM)-G-x₃-D-(RK)-x-G-R und G-x₃-(DE)-(RK)-x-G-(RK)-RK) wurden eingerahmt und die konservierten Reste grau unterlegt.

Anhang D, Alignment von Nit

```

                                     ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
                                     h hhhhPEhh Gh
Nit_Apy1      MKIALVQVASPDSETRENRIDRVEAILRCGING-AELIVLPELWSAGYFHFDEYEALA 59
OrfE_Aaur     MKIALVQVASPDSETREDRIDRVEAILRCGING-AELIVLPELWSAGYFHFDEYEALA 59
OrfE_Nfar     MKVALAQLASPDAAETAARHLERVRQSLAAFFRADADLIVLPELWRVGYNHFDYQAAA 60
OrfE_Rrha1    MKIALAQLASPDSETPAHLRLVRNLLTCLAERVDLIVLPELWRVGYNHFDYSTAA 60
               **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
               ---HHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHH--- --EEEE-----HHHHHH-----

                                     ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
                                     hhhtPDG
Nit_Apy1      TGPTVSMCSRVAADLGVYLHLGSIIEAGEDGRLSNTSILLGPDGSSVVHTYRYIHVFGYKS 119
OrfE_Aaur     TGPTVSMCSRVAADLGVYLHLGSIIEAGQDQQLSNTSILLGPDGSSVVHTYRYIHVFGYKS 119
OrfE_Nfar     DGPTVQVLAAVARERRCYLHIGSIVERADGDRLRNTAVLLDPDGRIAHRYSIHVFGYRS 120
OrfE_Rrha1    GGGTVQVLAAVAVERQCYIHAGSIVEQGEGRLRNTAVLIGPDGQIHHSYSVHVFGYDS 120
               * * * . : * * : * : * * * * * . : . : * * * : : * * * : * * * * * * *
               --HHHHHHHHHHHH--EEEE-----EEEEEEEE-----EEEE-----

Nit_Apy1      KEASLLTAGSSLPVVPLPFGSVAGITYDLRFPGLWMELESDRGAEIVIVPAAWPAARREH 179
OrfE_Aaur     KEASLLTAGSSLPVVPLPFGSVAGITYDLRFPGLWMELESTRGAEIVIVPAAWPAARREH 179
OrfE_Nfar     EEARLLQPGRQIRVADTAFGRTAAITYDLRFPGLWSELVDAGAEIVVPAAWPAARLAH 180
OrfE_Rrha1    LEAQLLQPQTQIHTTDTDPFGPIAATTYDLRFPGLWTELVAAGQLVIVPAAWPKARKEH 180
               ** * * . * . : . . . * * . * * * * * * * * * * * * * * * * *
               -----EEEE-----EEEE-----HHHHHHHH--EEEE-----HHH

Nit_Apy1      WRLLTARAVEHQIFVIACNAAGTQEGVELGGHSRVVDPTGNVLAEASSDETVMVDIDP 239
OrfE_Aaur     WRLLTARALEHQIFVIACNAAGTQEGVALGGHSRVVDPSGTVLAEADSDEAVLMDVDIDP 239
OrfE_Nfar     WRLLTGARAVDNQVIVIAACNAVGTHNGVELGGHSRVVDPWGEVLGEAGAEEGFTVVDIDP 240
OrfE_Rrha1    WRLLTSARAVDNQVFVIACNATGTHNSVELGGHSRIVDPWGTVIAEADSSEGITIAEIDP 240
               ***** * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
               HHHHHHHHHHH--EEEE-----EE-----EEEE-----EEE-----EEEEEE--HH

Nit_Apy1      QQVSTVRSEFPVIGDRLAAYDTLTV----- 264
OrfE_Aaur     LQVDAVRSEFPVIGDRLPAYNTLTV----- 264
OrfE_Nfar     AVVARTRAEFPVLADRLDDYRGLNRCEVPA 270
OrfE_Rrha1    AVVDRTRAEFPVLRDRLDYSFLNRRRVLS 270
               * . * : * * * : * * * * * .
               HHHHHHHHH-----E-

```

Alignment der Aminosäurefrequenz von Nit des Stammes *Arthrobacter* spec. Py1 (Nit_Apy1) mit OrfE_Aaur von *A. aurescens* TC1 (94%, 97%), OrfE_Nfar von *N. farcinica* IFM10152 (60%, 72%) und OrfE_Rrha1 von *Rhodococcus* spec. RHA1 (60%, 72%).

Die putativen Aminosäuren Glu₃₀₍₅₇₎-Lys₁₁₂-Cys₁₄₇ die das katalytische Zentrum des Enzyms darstellen könnten sind grau unterlegt (Novo *et al.*, 2002). Die konservierten Aminosäurereste der von Bork & Koonin (1994) und Novo *et al.* (1995) beschriebenen Sequenzmotive sind mit Pfeilen markiert (h, hydrophobe AS; t, polar). Die durch das Programm „Jpred“ berechnete Sekundärstruktur des Proteins ist unter dem Alignment angegeben (H, α -Helix; E, β -Faltblatt).

Anhang F, Alignment von PycB

```

PycB_Apy1      MSLAPAF TIPDAMGMRRAMGRFLTGVAVVTTQHED-EQYGMTISSLTSISLEPPILMISL 59
OrfG_Aau       MSLAPAF TIPDAMGMRRAMGRFLTGVAVVTTQHED-EQYGMTISSLTSISLEPPILMISL 59
PyrB_Rsed1    MTL-PAFHAPTPTDMRRSMGRFTTGVAVVSADDGDGSPSAMTISLSDPAILLVSL 59
OrfG-RHA1     MTL-PAFHAPTPTDMRRSMGRFTTGVAVVSADDGDGSPSAMTISLSDPAILLVSL 59
OrfG-IFM10152 MTL-PAFHCTPSPDMRRSMGRFTTGVAVVSADDGTGNPCAMTISLSDPAILLVSL 59
*:* ** * . .***:*** ***:***: . . .*****:***:***:***
-----HHHHHHHH-----EEEE-----EEEEEEEEEE-----EEEE-

PycB_Apy1      NFGTRTGEALMESGKFAVSILGAKQESVARRFAVRGGDRFGDGFVDVTDNGLPVIK 119
OrfG_Aau       NFGTRTGEALMESGKFAVSILGAKQESVARRFAVRGGDRFGDGFVDVTDNGLPVIK 119
PyrB_Rsed1    THGSRTTEAVEAAGSFAVSILGSRQEALARRFATRGGARFDDLPCDRSRSGPLIK 119
OrfG-RHA1     THGSRTTEAVEAAGSFAVSILGSRQEALARRFATRGGARFDDLPCDRSRSGPLIK 119
OrfG-IFM10152 THGSRTTDAVEAGGRFAVSILGSRQEAIARRFATRGGARFEGLPVDLSRSGPLIP 119
..** * : * . * ***:***:***:***:***:*** ** * : .***:***
----HHHHHH--EEEE--HHHHHHHH-----HHHH

PycB_Apy1      QADCSVVQQYDVGDHQVFFGQVTTCDRDRDGEVLAFKAGRFGSFSDFGHAEIPW 174
OrfG_Aau       QADCTVVQQYDVGDHQVFFGQVTTCDRDRDGEVLAFKAGRFGSFSDFGHAEIPW 174
PyrB_Rsed1    QLECRVHSAHDIGDHRVVFYGEVTDRCREGTGLVVFYSGRFGDFHDFGHDEVP 174
OrfG-RHA1     QLECRVHSAHDIGDHRVVFYGEVTDRCREGTGLVVFYSGRFGDFHDFGHDEVP 174
OrfG-IFM10152 QLECRVHSAHDVGDHRVVFYGEVDMRWRDGTGLAFYSGRFGDFHDFGHDEL 174
*:* * : . :***:***:***: * * * * * * * :***: * * * * * * * :
HEEEEEEE-----EEEEEEEEEE-----EEE-----

```

Multiples Alignment der Aminosäuresequenz von PycB des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* (PycB_Apy1) mit OrfG_Aau von *A. aurescens* TC1 (99%, 100%) PyrB_Rsed1 von *R. koreensis* Sedi2 (57%, 74%), OrfG_Rha1 *Rhodococcus spec. Stamm RHA1* (57%, 74%) und OrfG_Nfar von *N. farcinica* IFM10152 (56%, 74%). Die Identitäten und Ähnlichkeiten bezüglich PycB sind in Klammern angegeben. Die durch das Programm „Jpred“ berechnete Sekundärstruktur des Proteins ist unter der Consensussequenz angegeben (H, α -Helix; E, β -Faltblatt). Der variable Loop7 (PheA2-Nummerierung) der Sekundärstruktur ist durch ein Rechteck markiert.

Anhang G, Alignment von PycC

```

PycC-Py1      METTRQVPLTFRVVGTDKTIIVVTEFHAVVAGYTGRDPKAVQHHIDELAAIGVAPPPEVPM 60
OrfA-RHA1     MTGATTEVLTFETLDSSEILQFGDGRTLVAGYTGRDEAAVQHHIDELAAIGVAPPAQVPM 60
OrfA-IFM10152 MTETITAALSCTVLDSETLSFDGARAIVAGYTGRDEAAVRHHIDELAAIGVAPPESVPM 60
OrfA-Sedi2    -----
*   :   * :   . : . : . : .   : : *****   * : *****   . * *
-----EEE-----EEHHHEEEEE-----HHHHHHHHHHHHHH-----EEHHH-

PycC-Py1      FYRMSDLFETSGEHDTTENLTSGEIEPLYIRHDGQFYLGIGSDHTDRDIEARDIGDSKR 120
OrfA-RHA1     FYPVEIATITTASQAPVTGAHTSGEVEPVILRHRGRYLLGVGSDHTDRQLETVDIGDSKR 120
OrfA-IFM10152 LYPVSTATVTTAATTPVPSADTSGEVEPVLLRHRGRYFLGVGSDHTDRALETIDIGESKR 120
OrfA-Sedi2    -----
: * : .   . * : .   .   ***** : * * : : * : * : * : * : * : * : * : *
-----EEEE-----EEEEEEEE-----EEEE-----EEEEEEEE-----

PycC-Py1      ACPKPVAAEVIAVESLEDLDDQCTARSWVDGELYQEGSLSGLRKPADVVERLLARTDIG 180
OrfA-RHA1     ACPKPVGPVAVEIADWSSFDWDACRARSWVDGVLYQDGTLANLRTPQTLQIFADRIGDT 180
OrfA-IFM10152 ACAKPIGPHVVEVADWSRFDWDACRARSWVDGKLYQDGTLANLRTPDLLGVVADRLGDD 180
OrfA-Sedi2    -----DWDACRARSWVDGVLYQDGTLANLRTPHNLLQIFADRIGDT 41
* * : * : .   . * : :   .   : * * * * * * * * * * * * * * * * * : :   .   * .
-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHH-----

PycC-Py1      DADFMCLGGTLPPLNGKFVDGNSWLELSFPNGTTIEHNYKILLGSLR---- 228
OrfA-RHA1     GEDLLCFAGTLPPLDGKFTPGHRWDLELTLPDGRTLTHSYTT-EGH----- 225
OrfA-IFM10152 GGDFVCFAGTLPPLDGFTPGTRWDLELLLPDGRALHTHTYTTLEGARDAHRS 232
OrfA-Sedi2    GEDLLCFAGTLPPLDGKFTAGHRWDLELTLPDGRTLTHTYTT-EGH----- 86
. * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EEEE--E-----HHHHHHHH-----EEE-----

```

Multiples Alignment der Aminosäuresequenz von PycC des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* (PycC) mit OrfA-RHA1 von *Rhodococcus spec. Stamm RHA1* (48%, 68%), OrfA-IFM10152 von *N. farcinica IFM10152* (47%, 66%) und OrfA-Sedi2 *R. koreensis Sedi2* (25%, 41%).

Die Identitäten und Ähnlichkeiten bezüglich PycC sind in Klammern angegeben. Die durch das Programm „Jpred“ berechnete Sekundärstruktur des Proteins ist unter der Consensussequenz angegeben (H, α -Helix; E, β -Faltblatt).

Anhang H, Alignment von PycD

```

OrfB-Py1      MAKPEFEFTPVSSVDFAPCNPHIEGLSEAILARDSDNDVTRILKFEPGTDTSPPNGVLTH 60
OrfB-IFM10152 MAKPEFEFFPVTDVEYTVCPGGDPAITERILARDPDGNVATRILRYEPGADSTPMGVQKH 60
OrfB-RHA1     MAKPEFEFFPVTDVEWTVCPGDDPKITERILAKDPEGNVATRILRYEPGADSTPLGVQKH 60
OrfB-Sedi2    MAKPEFEFFPVTDVEWTVCPGDDPKITERILAKDPEGNVATRILRYEPGADSTPMGVQKH 60
              ***** **:.*::: *      ::* **:*.:.: .****:****:*** ** .*
              -----EEEE-----EEEE-----
OrfB-Py1      DFWEEVFIFEGSFVDQRLGQTFKAGDWATRPPGMEHGPWVSENGARMFVRYTNPVQTG 120
OrfB-IFM10152 DFWEEVYILEGSFTDLTLGQTFRTAGMYACRPPGMPHGPWRTDEGVVTFEVRYHSR----- 115
OrfB-RHA1     DFWEEVYILEGSFTDLPLGETFTAGMYACRPPGMPHGPWSTDEGVVTFEVRYHSK----- 115
OrfB-Sedi2    DFWEEVYILEGS----- 72
              *****:****.* **:*.* ** :* ***** ** *::*. *****:
              ---EEEEEEEE-----EEE-----EEEE-----
OrfB-Py1      RSN 123
OrfB-IFM10152 ---
OrfB-RHA1     ---
OrfB-Sedi2    ---

```

Alignment der Aminosäuresequenz von PycC des Stammes *Arthrobacter spec. Py1* (PycC) mit OrfA-RHA1 von *Rhodococcus spec. RHA1* (48%, 68%), OrfA-IFM10152 von *Nocardia farcinica* Stamm IFM10152 (47%, 66%) und OrfA-Sedi2 von *R. koreensis* Sedi2 (25%, 41%).

Die Identitäten und Ähnlichkeiten bezüglich PycC sind in Klammern angegeben. Die durch das Programm „Jpred“ berechnete Sekundärstruktur des Proteins ist unter der Consensussequenz angegeben (H, α -Helix; E, β -Faltblatt).

Anhang I, Alignment von Abm

```

Abm_Apy1      VIFIVVKFNVKPDWSERWLDLVADFTEATRAEPCNLFWDWSRSVDNPNFVLEAFQD-D 59
Abm_Aaur      MIFIVVKFNVKPEWSERWMDLVADFTEATRAEPCNLFWDWSRSVDNTNEFVLEAFQD-D 59
Abm_Blin      MIFIVVKFQVKPEKAEWPQIIKEFTEATRAEPCNLFWDWSRSLDDPNEYVLEAFDD-D 59
Abm_Mavi      MIFIVVKFETKPEWADRWPDLVAAF'AAATRAEPCNLFWFSRSLDDPAEYVLEAFRDGD 60
Abm_Afb24     MIFIVVKFVKPDWSDKWLGLVEDFTQATRQEP'CNLFWDWSRVEDPNEFVLEAFKD-D 59
Abm_Rrha1     MIFIVVNF'VKPDHADGWLDLVQPF'TDATRNEPCNLFWFYWSRAVEDPDLYVLEAFRDD 60
:*****:*. ** : : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
-EEEEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEEEE-----EEEEEEEE-HH H

Abm_Apy1      AAEAHVNSEHF'KKAMAD---MPQALVETPHIISRQFEGSGWDRMGELTIA 106
Abm_Aaur      AAEAHVNSDHF'KKAMAD---MPQALVETPHIISRQFEGSGWDRMGELTIA 106
Abm_Blin      AAEAHVKSDF'QKATADGGPMNSALASTPKIISRQIDGDGWDGEMGELQVG 109
Abm_Mavi      AGSAHVNSDHF'KRAMQE---LPQALKSTPKIISQTVEATGWSRMGEMTVD 107
Abm_Afb24     AAGD'VNSAHF'QKAMAD---MPQALAE'PRIISRQLDGDGWDGDRMGELTIA 106
Abm_Rrha1     AAVAHVQSEHF'FRNAMRE---LKPALAQT'PRIINTTIDGTEWSLMGELEVD 107
* . ** : * ** : * : : * * . ** : * * . : . * . ** : :
HHHHH---HHHHHHHHHH      HHHHH-----EEEE-----

```

Alignment von Abm von *Arthrobacter* spec. Py1 (Abm_Apy1) mit Abm_Aaur von *A. aurescens* TC1 (95%, 100%), Abm_Blin von *Brevibacterium linens* BL2 (67%, 84%), Abm_Mavi von *Mycobacterium avium* 104 (66%, 83%), Abm_Afb24 von *Arthrobacter* spec. FB24 (64%, 75%) und Abm_Rrha1 von *Rhodococcus* spec. RHA1 (59%, 79%). Die Identitäten und Ähnlichkeiten bezüglich PycA sind in Klammern angegeben. Die mit dem Programm „Jpred“ berechnete Sekundärstruktur von PycA ist unter der Consensussequenz angegeben (H, α -Helix; E, β -Faltblatt). Die His₆₄- und His₆₉-Reste sind fett hervorgehoben. Das partiell konservierte Sequenzmotiv PGF(V/R)(R/W)H weiß auf schwarzen Grund markiert.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen für die Überlassung der interessanten Themen, die zu jeder Zeit gewährte Diskussionsbereitschaft und das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Dr. Barbara Thiemer bedanke ich mich ganz herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit, die vielen, auch manchmal etwas angeregteren, Diskussionen und das Korrekturlesen der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Labore 205/206 für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt hier vor allem Karola Otto, Bernhard Sielaff, David Rauh and Katrin Makdessi.

Bei Ute Lindenstrauß möchte ich mich für die durchgeführten DNA-Sequenzierungen und die Auswertung der *primer extensions*-Proben bedanken.

Claudia danke ich für die Hilfe bei der Proteinaufreinigung und ihre doch ganz eigene Art.

Allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, sei hier ebenfalls gedankt.

Der DFG möchte ich für die Finanzierung dieser Arbeit danken.

Weiterhin schulde ich meinen Freunden in Weißwasser und Halle und Doreen Dank für jedwede Art der Hilfestellung.

Meinen Eltern und meiner restlichen Familie möchte ich herzlich für die ständige Unterstützung danken.

Jana möchte ich für die gemeinsam verbrachte Zeit danken, in der Hoffnung sie möge noch lange andauern.

Lebenslauf

Name	Thomas Wolsch	
geboren	27.8.1975 in Weißwasser	
Schule	1982-1990	„Geschwister Scholl“-Oberschule in Weißwasser
	1990-1991	„Bruno Bürgel“-Oberschule in Weißwasser
	1991-1994	„Lew Landau“-Gymnasium in Weißwasser
Zivildienst	1994-1995	Zivildienst in der Parkgemeinde Kromlau
Studium	1995-2001	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	2002-2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation)
	2005-2006	Mitarbeiter am Institut für Genetik (Abt. Pflanzengenetik) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	2006-2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thomas Wolsch, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Halle/Saale, den 5.6.2008

Thomas Wolsch