

**Tetrahydrofuran–Katabolismus in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1:
Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung einer
Mehrkomponenten–Monooxygenase und einer
Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch–Naturwissenschaftlich–Technischen Fakultät
der Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg

von Barbara Thiemer
geboren am 1. Mai 1971 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. J.R. Andreesen
2. Prof. Dr. R. Müller
3. PD Dr. B. Averhoff

Tag der Verteidigung: 19. Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	8
2.1. Organismen und Vektoren	8
2.2. Nährmedien	9
2.2.1. Medium für <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1.....	9
2.2.2. Medium für <i>E. coli</i>	10
2.3. Zellanzucht und –ernte	10
2.4. Stammhaltung	11
2.5. Herstellung von Rohextrakten	11
2.6. Proteinbestimmung	12
2.6.1. Proteinbestimmung durch Färbung mit Coomassie Blue	12
2.6.2. Relative Proteinbestimmung durch Messung bei 280 nm	12
2.7. Bestimmung der Enzymaktivitäten	13
2.7.1. Messung von Reduktaseaktivitäten.....	13
2.7.2. Messung der Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase	14
2.7.3. Messung einer Monooxygenase an der Sauerstoffelektrode.....	14
2.8. Einengen von Proteinlösungen	15
2.9. Elektrophoretische Methoden	15
2.9.1. SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS–PAGE)	15
2.9.2. Native Gradienten PAGE.....	16
2.9.3. Transfer von Proteinen auf PVDF–Membran	16
2.10. Färbung und Trocknung von Gelen	16
2.10.1. Proteinfärbung mit Coomassie Blue (modifiziert nach WEBER und OSBORN, 1969)	16
2.10.2. Proteinfärbung mit Silber (BLUM <i>et al.</i> , 1987).....	16
2.10.3. Trocknung der Gele	17
2.11. Methoden zur Proteinreinigung	17
2.11.1. Anionenaustauschchromatographie	18
2.11.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie	18
2.11.3. Gelfiltration.....	18
2.11.4. Ammoniumsulfatfällung	19
2.12. Methoden zur Enzymcharakterisierung	19
2.12.1. UV/VIS–Spektrum	19
2.12.2. Bestimmung von Eisen.....	19
2.12.3. Bestimmung des kovalent–gebundenen Flavins.....	19
2.12.4. N–terminale Sequenzierung, Peptid–Mapping und Massenspektroskopie.....	20

2.13. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	21
2.13.1. Behandlung von Geräten und Lösungen.....	21
2.13.2. Fällung von DNA.....	21
2.13.3. Mikrodialyse von DNA	21
2.13.4. Phenol/Chloroform–Extraktion.....	21
2.13.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure–Lösungen	22
2.14. Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.14.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1 (SAITO und MIURA, 1963)	22
2.14.2. Isolierung von Plasmid–DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.14.2.1. Analytische Schnellpräparation (<i>quick check</i>)	23
2.14.2.2. Plasmid–Minipräparation (Phenol/Chloroform–Methode)	23
2.14.2.3. Plasmid–Präparation mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits (QIAGEN, Hilden)...	23
2.14.2.4. Plasmid–Midipräparation.....	24
2.14.3. Isolierung von Plasmid–DNA aus <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1	24
2.14.3.1. Plasmid–Isolierung mittels Säulenchromatographie	24
2.14.3.2. Analytische Megaplasmid–Isolierung (NIES <i>et al.</i> , 1987)	24
2.14.3.3. Probenvorbereitung zur präparativen Isolierung linearer Plasmide	25
2.14.4. Isolierung von RNA aus <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1	25
2.15. Agarose–Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	26
2.15.1. Standard–Agarose–Gelelektrophorese	26
2.15.2. Pulsfeld–Gelelektrophorese (PFGE)	26
2.15.3. Denaturierende Agarose–Gelelektrophorese	27
2.15.4. Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation von Gelen.....	27
2.16. Isolierung von DNA–Fragmenten aus dem Agarosegel	27
2.17. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.18. Dephosphorylierung von DNA–Fragmenten	28
2.19. Ligation von DNA–Fragmenten	28
2.20. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation (DOWER <i>et al.</i>, 1988)	28
2.20.1. Herstellung von kompetenten Zellen	28
2.20.2. Elektroporation.....	29
2.21. X–Gal–Test zur Selektion rekombinanter Klone	29
2.22. Polymerase–Ketten–Reaktion (PCR)	29
2.23. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	32
2.23.1. Herstellung von DIG–markierten Sonden.....	32
2.23.2. Southern–Hybridisierung	32
2.23.3. Herstellung von Nylonmembranen zur Koloniehybridisierung	33
2.23.4. Northern–Hybridisierung.....	34
2.23.5. Chemilumineszenz–Nachweis.....	34

2.24. RNA–Analyse	35
2.24.1. <i>Primer extension</i>	35
2.24.2. <i>Reverse transcription–Polymerase–Ketten–Reaktion (RT-PCR)</i>	35
2.25. DNA–Sequenzierung	36
2.25.1. Sequenzierung am ABI–Sequencer 377	36
2.25.2. Sequenzierung am A.L.F.™–Sequencer.....	37
2.25.3. Das Sequenzierungsgel	37
2.26. Auswertung der Sequenzdaten	38
2.27. Bezugsquellen	38
3. Ergebnisse	40
3.1. Messung der THF–Monooxygenase nach Zellaufschluß	40
3.2. Nachweis einer THF–induzierten Reduktase	41
3.3. Reinigung der NADH–Cytochrom c–Reduktase	42
3.4. Charakterisierung der NADH–Cytochrom c–Reduktase	45
3.4.1. Bestimmung der N–terminalen Aminosäuresequenz.....	45
3.4.2. Bestimmung des Molekulargewichtes	46
3.4.3. Kofaktoren der NADH–Cytochrom c–Reduktase	47
3.4.4. Untersuchungen zum kovalent–gebundenen Flavin der NADH–Cytochrom c–Reduktase	49
3.5. Klonierung und Charakterisierung der Gene der THF–Monooxygenase	52
3.5.1. Klonierungsstrategie	52
3.5.2. Erstellen einer Plasmid– Genbank von <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1	53
3.5.3. Identifizierung und Isolierung des für die NADH–Cytochrom c–Reduktase kodierenden Gens.....	53
3.5.4. Identifizierung der für die THF–induzierte Monooxygenase kodierenden Strukturgene <i>thmADBC</i>	55
3.5.5. Charakterisierung der Komponenten der THF–Monooxygenase.....	57
3.5.6. Bestimmung der Kopienzahl der <i>thm</i> –Gene in <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1.....	61
3.6. Transkriptionsanalyse der <i>thm</i>–Gene	62
3.6.1. Transkriptnachweis mittels Northern–Hybridisierung	62
3.6.2. Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte.....	64
3.6.3. Putative Promotor– und Terminator–Regionen	65
3.7. Lokalisation der <i>thm</i>–Gene	67
3.7.1. Nachweis der Plasmid–Kodierung von <i>thmADBC</i>	67
3.7.2. Charakterisierung des Plasmides pPSK60 als zirkuläres Plasmid	70
3.8. Auswertung der den <i>thm</i>–Genen benachbarten Sequenzbereiche	71
3.8.1. Identifizierung und Charakterisierung weiterer offener Leserahmen	71
3.8.2. Codonnutzung	74
3.8.3. Transkriptionsanalyse.....	76
3.8.4. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>orfZ</i> , <i>thmS</i> und <i>thmH</i>	79
3.9. Reinigung der Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase	83

4. Diskussion.....	87
4.1. Die THF–Monooxygenase	87
4.2. Weitere offene Leserahmen der klonierten Genregion	109
4.3. Die THF–induzierte Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase	114
4.4. Die Umsetzung von THF in <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1	116
4.5. Die <i>thm</i>–Gene aus <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1 sind auf einem zirkulären Plasmid kodiert	118
5. Zusammenfassung	122
6. Literaturverzeichnis.....	124
7. Anhang	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALDH	Aldehyd–Dehydrogenase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin–5'–triphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DCPIP	2,6–Dichlorphenolindophenol
DEPS	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EET	EDTA–EGTA–Tris
EGTA	Ethylenglycolbis–(2–aminoethylether)
<i>et al.</i>	N,N,N',N'–tetraessigsäure
ε	et alii (und andere)
FAD	Extinktionskoeffizient
FMN	Flavinadenindinukleotid
g	Flavinmononukleotid
G	Gramm
h	Guanin
HMW	Stunde
I	High Molecular Weight
IHF	Desoxyinosin
IPTG	<i>integration host factor</i>
K	Isopropyl–β–D–thiogalactopyranosid
kb	<i>Klebsiella</i>
kDa	Kilobasenpaare
K _m	Kilodalton
konz.	Michaelis–Menten–Konstante
KP–Puffer	konzentriert
	Kaliumphosphatpuffer

I	Liter
LB	Luria Bertani (Komplexmedium)
m	milli
M	molar; Marker
M_r	relatives Molekulargewicht
<i>M. capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
<i>M. trichosporium</i>	<i>Methylosinus trichosporium</i>
max.	maximal
μ	mikro
min	Minute
MMO	lösliche Mehrkomponenten–Monooxygenase mit binuklearem Eisenzentrum
MOPS	3–Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> –Ribonukleinsäure
n	nano
N	normal
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht durchgeführt
NAD(P) ⁺	Nicotinaminadenindinukleotid(phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinaminadenindinukleotid(phosphat), reduziert
NB	Nutrient Broth (Komplexmedium)
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase–Kettenreaktion
PES	Phenazinethosulfat
PFGE	Pulsfeld–Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
<i>R.</i>	<i>Rhodococcus</i>
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT–PCR	Reverse Transkription–Polymerase–Kettenreaktion
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylphosphat
SSDH	Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris–Acetat–EDTA
TBE	Tris–Borat–EDTA
TCC	Tricarbonsäurezyklus
TE	Tris–EDTA
TEMED	N,N,N',N'–Tetramethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	Trypticase Soja Broth
U	Unit (1U = 1 μ mol Substrat/min)
UAS	<i>upstream activator sequences</i>
Upm	Umdrehungen pro min
UV/VIS	ultraviolettes/sichtbares Licht

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

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

1. EINLEITUNG

Etherverbindungen sind ubiquitär in der Biosphäre verbreitet und sind entweder natürlichen oder anthropogenen Ursprungs. Zu den xenobiotischen Etherverbindungen gehören vor allem Agrochemikalien, wie Fungizide, Herbizide und Insektizide, und Detergenzien. Etherverbindungen werden aber auch im großen Maßstab in der Industrie eingesetzt, z.B. als Lösungsmittel, Schmiermittel, Antifrostmittel sowie in pharmazeutischen und kosmetischen Präparaten (WHITE *et al.*, 1996). Damit gelangen diese Verbindungen auch in die Umwelt. Da Etherverbindungen meist biologisch schwer abbaubar und oftmals toxische Substanzen sind, kann der erhöhte Eintrag in die Umwelt zu ernsthaften Störungen des ökologischen Gleichgewichts führen. Aufgrund dessen ist eine biologische oder technische Entsorgung dieser Substanzen dringend notwendig.

Ether sind aufgrund der Stabilität der C–O–C–Bindung relativ reaktionsträge Substanzen und erfordern zur chemischen Spaltung drastische Bedingungen wie konzentrierte Säuren und hohe Temperaturen (WHITE *et al.*, 1996; MO *et al.*, 1997). Der biologische Abbau von umweltrelevanten Verbindungen durch Mikroorganismen spielt eine bedeutende Rolle (VAN DER MEER *et al.*, 1992). Mikroorganismen sind in der Lage, xenobiotische, toxische Substanzen vollständig zu Kohlendioxid und Wasser zu metabolisieren, und somit das biologische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Über den mikrobiellen Abbau von Etherverbindungen ist bisher relativ wenig bekannt. Auch hier ist die Stabilität der Etherbindung das entscheidende Problem. Eine Labilisierung der C–O–C–Bindung kann durch Hydroxylierung eines Kohlenstoff–Atoms in Nachbarschaft zum Sauerstoff–Atom erfolgen. Das so entstandene Halbacetal ist instabil und wird spontan zum entsprechenden Alkohol und Aldehyd hydrolysiert (WHITE *et al.*, 1996). Diese Hydroxylierungsreaktion wird unter aeroben Bedingungen durch Oxygenasen katalysiert. Beispiele für solche Oxygenasen sind die 4–Methoxybenzoat–Demethylase aus *Pseudomonas putida* (BERNHARDT *et al.*, 1975), die Vanillat–Demethylase aus *Pseudomonas* sp. (BRUNEL und DAVISON, 1988) sowie die Veratrol, 2–Ethoxyphenol, 4–Methoxybenzoat und 7–Ethoxycoumarin umsetzenden P450–abhängigen Monooxygenasen (SUTHERLAND, 1986; TROWER *et al.*, 1989; KARLSON *et al.*, 1993). Weiterhin wird eine Oxidation von Dimethylether durch die Methan–Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STIRLING und DALTON, 1980), von Diethylether durch die Toluol–2–Monooxygenase aus *Burkholderia cepacia* G4/PR1 (HUR *et al.*, 1997) und von Dimethylether durch die Ammonium–Monooxygenase aus *Nitrosomonas europaea* (HYMAN *et al.*, 1994) beschrieben.

Unter anaeroben Bedingungen kann die Bildung eines Halbacetals und die Spaltung der Etherbindung durch Umlagerung einer vorhandenen Hydroxylgruppe im Substrat erfolgen, wenn der Ether aus einer C₂–Verbindung aufgebaut ist (WHITE *et al.*, 1996). Ein solcher Coenzym B₁₂–abhängiger Hydroxyl–Shift findet beispielsweise beim anaeroben Abbau von Polyethylenglykol und Phenoxyethanol statt (FRINGS und SCHINK, 1994). Methoxy–Verbindungen werden dagegen unter anaeroben Bedingungen durch O–Demethylasen gespalten. Diese katalysieren einen Transfer der Methylgruppe vom Substrat über ein Corrinoid–Protein (primärer Methylgruppen–Akzeptor) auf Tetrahydrofolat (sekundärer Methylgruppen–Akzeptor) (KREFT und SCHINK, 1993; KAUFMANN *et al.*, 1997).

Die Oxygenasen werden grundsätzlich in Di– und Monooxygenasen unterteilt. Während bei Dioxygenase–Reaktionen beide Atome des molekularen Sauerstoffs in das Produkt eingehen, inkorporieren Monooxygenasen nur ein Sauerstoffatom in das Substrat, das zweite wird zu Wasser reduziert (HARAYAMA *et al.*, 1992). Oxygenasen können aus einer oder mehreren Komponenten aufgebaut sein. Einkomponenten–Monooxygenasen sind immer Flavoenzyme, bei denen die Hydroxylierungsreaktion am gebundenen Flavin stattfindet (HARAYAMA *et al.*, 1992). Nicht alle Substrate, wie z.B. Dimethylstyrol, Enamine und Enolether, können so hinreichend aktiviert werden (WALSH und CHEN, 1988). Der bekannteste Vertreter dieser Enzymgruppe ist die *p*–Hydroxybenzoat–Hydroxylase aus *Pseudomonas fluorescens* (SCHREUDER *et al.*, 1990; PALFEY *et al.*, 1999). In jüngster Zeit wurde eine weitere Klasse der flavinabhängigen Monooxygenasen beschrieben, die nun als TC–FDM (*two-component flavin-diffusible monooxygenase*) bezeichnet werden sollen (GALAN *et al.*, 2000). Diese bestehen aus einer Reduktase– und Oxygenase–Komponente. Beide Komponenten enthalten Flavin nicht als prosthetische Gruppe, sondern als „lose“ gebundenes Coenzym. Das für die Monooxygenaseaktivität essentielle Flavin wird von der Reduktase reduziert und dann von der Oxygenase–Komponente zur Hydroxylierungsreaktion genutzt (GALAN *et al.*, 2000). Beispiele für Monooxygenasen der TC–FDM–Familie sind die Pyrrol–2–Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. (BECKER *et al.*, 1997), die 4–Hydroxyphenylacetat–3–Hydroxylase aus *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (GIBELLO *et al.*, 1997), die Styren–Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* Y2 (VELASCO *et al.*, 1998) und die 4–Hydroxyphenylacetat–3–Hydroxylase aus *E. coli* W (GALAN *et al.*, 2000).

Neben den flavinabhängigen Enzymen gibt es die eisenhaltigen Mehrkomponenten–Monooxygenasen, bei denen die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs am Übergangsmetall erfolgt (HARAYAMA *et al.*, 1992). Man unterscheidet Nicht–Häm Eisen Oxygenasen mit einem mononuklearen (BATIE *et al.*, 1991) oder binuklearen Eisenzentrum (FOX *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1994) und Cytochrom P450–abhängige Enzyme mit

einem Häm–Kofaktor (MUNRO und LINDSAY, 1996). Alle diese Mehrkomponenten–Oxygenasen enthalten neben der eigentlichen Oxygenase–Komponente ein Elektronentransportsystem, das für den Transfer der Elektronen von NAD(P)H auf die terminale Oxygenase–Komponente sorgt (HARAYAMA *et al.*, 1992).

Die Einteilung der Mehrkomponenten–Monooxygenasen mit einem mononuklearen Nicht–Häm Eisen im katalytischen Zentrum erfolgt nach der Anzahl der Elektronentransport–Komponenten sowie deren Kofaktoren (BATIE *et al.*, 1991). Klasse I sind die Zweikomponenten–Oxygenasen, deren Reduktase–Komponenten ein Chloroplasten–Typ [2Fe–2S]–Cluster und als Elektronentransfer–vermittelnder Kofaktor ein FMN (Klasse IA) oder FAD (Klasse IB) besitzen. Bei den Enzymen der Klasse II (Dreikomponenten–Monooxygenasen) befindet sich der Flavinkofaktor (immer FAD) und das Fe/S–Cluster vom Chloroplasten–Typ (Klasse IIA) oder vom Rieske–Typ (Klasse IIB) auf zwei verschiedenen Protein–Komponenten. Die Enzyme der Klasse III sind ebenfalls Dreikomponenten–Monooxygenasen. Das Elektronentransportsystem besteht wie beim Typ IB aus einer Reduktase mit FAD und einem Chloroplasten–Typ [2Fe–2S]–Cluster und aus einer zusätzlichen Ferredoxin–Proteinkomponente mit einem Rieske–Typ [2Fe–2S]–Cluster. Der Transfer der Elektronen erfolgt vom NAD(P)H über den Flavin–Kofaktor auf die [2Fe–2S]–Zentren, die dann die eigentliche Oxygenase–Komponente reduzieren (MASON und CAMMACK, 1992).

Die Mehrkomponenten–Monooxygenasen, bei denen die Katalyse an einem binuklearen Eisenzentrum erfolgt, werden aufgrund der unterschiedlichen Eisenkomplexierung im katalytischen Zentrum in zwei Klassen eingeteilt (FOX *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1994). Während bei den löslichen Mehrkomponenten–Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum die Eisenatome durch zwei Histidin– und vier Glutamatreste im aktiven Zentrum fixiert werden (LIPSCOMB, 1994), benötigen die Membran–assoziierten Enzyme acht Histidinreste (SHANKLIN *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1997). Die löslichen Mehrkomponenten–Monooxygenasen, die eine Hydroxylierung und/oder Epoxidation des Substrates katalysieren, sind meist Dreikomponenten–Enzyme, die aus einer NAD(P)H–Akzeptor–Reduktase, einer komplex aufgebauten Oxygenase und einem Kopplungsprotein (bisher nur in dieser Enzymklasse identifiziert) ohne redoxaktiven Zentren bestehen. Die am besten untersuchten Enzyme dieser Klasse sind die lösliche Methan–Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) und aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (zur Übersicht: LIPSCOMB, 1994; MURRELL *et al.*, 2000; WESTERHEIDE *et al.*, 2000). Weitere Vertreter sind die Alken–Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B–276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994) und die Phenol–Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* Stamm H

(HERRMANN *et al.*, 1995). In der Literatur werden aber auch Vierkomponenten–Monooxygenasen beschrieben, bei denen am Elektronentransport noch eine zusätzliche [2Fe–2S]–Ferredoxin–Komponente beteiligt ist. Beispiele dafür sind die Toluen–4–Monooxygenase aus *Pseudomonas mendocina* KR1 (PIKUS *et al.*, 1996), die Alken–Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 (ZHOU *et al.*, 1999) und die Isopren–Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. Stamm AD45 (VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000). Die Membran–assoziierten Mehrkomponenten–Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum sind wie folgt aufgebaut: aus zwei Komponenten, wie beispielsweise die Xylen–Monooxygenase (XylA: Reduktase, XylM: Membran–gebundene Hydroxylase–Komponente) aus *Pseudomonas putida* (SUZUKI *et al.*, 1991), oder aus drei Komponenten, wie z.B. die Alkan–Hydroxylase (AlkB: Membran–gebundene Hydroxylase–Komponente, AlkT: NADH–Rubredoxin–Reduktase; AlkG: Rubredoxin) aus *Pseudomonas oleovorans* (SHANKLIN *et al.*, 1997).

Die bakteriellen Cytochrom P450–abhängigen Monooxygenasen sind lösliche Proteine (HARAYAMA *et al.*, 1992) und bestehen meist aus drei Komponenten: einer Flavin–enthaltenden Reduktase, einem Eisen/Schwertel–Protein und dem Cytochrom P450 mit einem Häm–Kofaktor, an dem die Aktivierung des Sauerstoffs und dann die Substrathydroxylierung stattfindet (MUNRO und LINDSAY, 1996). Das Cytochrom P450 ist ein b–Typ Cytochrom, das ein Eisen–Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe enthält und über das Thiolat des Cysteins am Enzym gebunden ist (SARIASLANI, 1991). P450–abhängige Enzyme sind oftmals am Abbau von xenobiotischen Verbindungen beteiligt (SIELAFF *et al.*, 2001), unter anderem auch – wie bereits erwähnt – am Abbau von Etherverbindungen.

Tetrahydrofuran (THF), dessen Abbau in dieser Arbeit untersucht wurde, ist ein gut wasserlöslicher, leicht flüchtiger, zyklischer Ether. Aufgrund seiner hohen Lösungskraft wird THF in der Industrie im großen Maßstab eingesetzt, z.B. bei der Produktion von Farben, Klebstoffen, Polystyrol, Polyurethan und Polyvinylchlorid (FALBE und REGITZ, 1992). Aufgrund der genannten Eigenschaften und dem breiten Anwendungsspektrum in der chemischen Industrie kann THF die Umwelt stark belasten. Zunächst galt THF als biologisch nicht abbaubar. Die ersten Hinweise auf die Existenz von THF–abbauenden Mikroorganismen kamen durch die Arbeiten von DMITRENKO *et al.* (1987) und GVOZDYAK *et al.* (1988). Von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) wurde erstmals ein THF–abbauendes Bakterium in Reinkultur isoliert, das der Gattung *Rhodococcus* zugeordnet wurde. Dieser *Rhodococcus ruber* Stamm 219 zeigte ein Wachstum nur bei THF–Konzentrationen unter 10 mM. Die Fähigkeit des THF–Abbaus wurde auch für einen

1,4-Dioxan-abbauenden Actinomyceten (PARALES *et al.*, 1994) und für das Morpholin-abbauende *Mycobacterium* sp. Stamm RP1 (POUPIN *et al.*, 1998) beschrieben. Alle bisher beschriebenen THF-Abbauer können jedoch nur geringe THF-Konzentrationen tolerieren und zeigen ein sehr langsames Wachstum auf diesem Substrat. Der von KOHLWEYER *et al.* (2000) aus einer Abwasserprobe isolierte THF-abbauende *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 kann dagegen auf THF bis zu einer Konzentration von 70 mM wachsen und hat unter optimalen Bedingungen eine Generationszeit von 11 h. Auffallend ist, daß alle bisher beschriebenen THF-abbauenden Bakterien-Stämme vom Gram-positiven Zelltyp sind. Die Tolerierung und Adaptation an THF ist offensichtlich nur bei einer eng begrenzten Mikroorganismengruppe möglich. Organische Lösungsmittel können zur Zerstörung von biologischen Membranen führen (ISKEN *et al.*, 1999). Die komplex aufgebaute Zellwand der Gram-positiven Bakterien könnte als möglicher „Schutzwall“ dienen und so zur Tolerierung des Lösungsmittels beitragen. Für verschiedene Actinomyceten wurde gezeigt, daß unter Lösungsmittelstreß Veränderungen in der zellulären Fettsäurezusammensetzung auftreten, und man geht davon aus, daß diese auch im Zusammenhang mit dem Schutz vor Lösungsmitteln stehen (TSITKO *et al.*, 1999). Für eine Erniedrigung der Lösungsmittelkonzentration in der Zelle können Efflux-Systeme sorgen (KIEBOOM *et al.*, 1998).

Über den Abbauweg des THF's ist bisher wenig bekannt. Der von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) isolierte *Rhodococcus ruber* Stamm 219 kann neben THF, γ -Butyrolacton, 1,4-Butandiol und Succinat umsetzen. Anhand dieses Substratspektrums wurde folgender möglicher Abbauweg postuliert (Abb. 1).

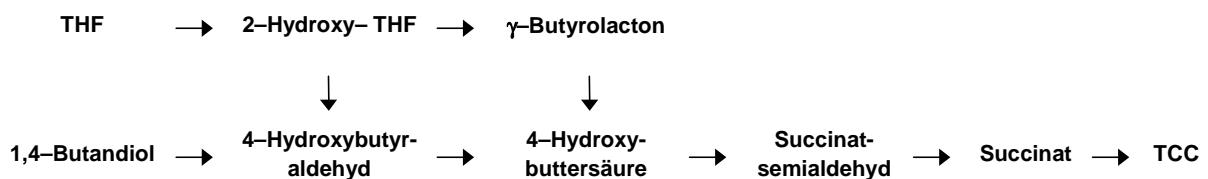


Abbildung 1 : Postulierter THF-Abbauweg (BERNHARDT und DIEKMANN, 1991).

Aus den Arbeiten von BOCK *et al.* (1996) und SPALLEK (1998) ergaben sich Hinweise, daß als einleitender Schritt beim THF-Abbau eine Hydroxylierung am C2-Atom des THF's erfolgt, die zur Bildung eines Halbacetals führt. Für die Umsetzung des dann entstehenden 2-Hydroxy-THF's werden zwei Möglichkeiten postuliert, aber entsprechende Intermediate konnten bisher nicht nachgewiesen werden. 2-Hydroxy-THF könnte zum einen durch

spontane hydrolytische Ringöffnung in 4–Hydroxybutyraldehyd überführt werden, wobei danach die Aldehydgruppe zu 4–Hydroxybuttersäure oxidiert wird, oder 2–Hydroxy–THF wird über eine Alkohol–Dehydrogenase weiter zu γ –Butyrolacton oxidiert, aus dem nach hydrolytischer Ringöffnung ebenfalls 4–Hydroxybuttersäure entstehen könnte. Nach weiterer Oxidation der Alkoholgruppe von 4–Hydroxybuttersäure zu Succinatsemialdehyd und der Aldehydgruppe zu Succinat wäre der Anschluß zum Tricarbonsäurezyklus gegeben. In dieses Abbauschema fügt sich auch der mögliche Abbau von 1,4–Butandiol problemlos ein, das ein Substrat von *R. ruber* und von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 ist. Bereits nach Oxidation von 1,4–Butandiol zu 4–Hydroxybutyraldehyd durch eine Alkohol–Dehydrogenase könnte der Abbau nach dem skizzierten THF–Abbauweg erfolgen. Über die am Abbau von THF und 1,4–Butandiol beteiligten Enzyme lagen zu Beginn der Arbeit keinerlei vertieften Informationen vor. Untersuchungen von BOCK (1994) und SPALLEK (1998) mit *R. ruber* Stamm 219 zeigten, daß eine sehr instabile Monooxygenase für den initialen Angriff von THF verantwortlich sein könnte.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das einleitende Enzym beim THF–Abbau in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zu identifizieren und zu charakterisieren. Sowohl in ganzen als auch in permeabilisierten, THF–gewachsenen Zellen war ein THF–abhängiger Sauerstoffverbrauch meßbar, der darauf hinwies, daß die einleitende Reaktion durch eine Monooxygenase katalysiert wird (KOHLWEYER, 2000). Problematisch war jedoch, daß nach Aufschluß der Zellen keine substratabhängige Reaktion mehr meßbar war, so daß das entsprechende Enzym nicht über eine Aktivitätsmessung aufgereinigt und charakterisiert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit mußte eine neue Strategie entwickelt werden, um die postulierte THF–induzierte Monooxygenase zu identifizieren. Da viele Oxygenasen – wie bereits erwähnt – eine separate Reduktase–Komponente besitzen, könnte durch Vergleich der Reduktaseaktivitäten in THF– und Succinat–gewachsenen Zellen eine durch THF spezifisch induzierte Reduktase nachgewiesen werden. Nach Aufreinigung und N–terminaler Aminosäurebestimmung der THF–induzierten Reduktase sollte es möglich sein, deren Gen mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zu identifizieren. Da die Strukturgene von Mehrkomponenten–Monooxygenasen meist in einem Gencluster vorliegen, könnten Informationen über weitere Komponenten durch Analyse der dem Gen der Reduktase benachbarten Regionen erhalten werden. Die THF–induzierte Transkription der identifizierten Gene kann dann durch Northern–Hybridisierungen gezeigt werden.

Da die Enzyme kataboler Stoffwechselleistungen oftmals durch extrachromosomal DNA – zirkuläre oder lineare Plasmide – kodiert sind (SAYLER *et al.*, 1990; MEINHARDT *et al.*, 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Frage nach der Lokalisation der Gene, die für Enzyme des THF-Katabolismus kodieren, nachgegangen, zumal THF als Komponente von Naturstoffen kaum bekannt ist. Somit könnte die Befähigung der Etherspaltung durch *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 durch Anpassung von vorhandenen Enzymen oder durch lateralen Gentransfer erworben worden sein. Der Abbau der danach wahrscheinlich entstehenden Intermediate beim THF-Abbau ist dagegen weniger problematisch, da diese natürlich vorkommende Substanzen sind.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. ORGANISMEN UND VEKTOREN

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1, die eingesetzten Plasmide in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL 1-Blue	F ⁻ ::Tn10, (Tet ^r), <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^r), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (rk ⁻ mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1	Wildtyp (DSM 44239)	KOHLWEYER <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	relevante Merkmale	Referenz
pUC18	Amp ^r , <i>lacPOZ</i> [*]	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
pGEM TM -T Easy		Promega, Heidelberg
pBT50	pUC18::4259 bp <i>Sau3A</i> -Fragment	diese Arbeit
pBT53	pUC18::4054 bp <i>Sau3A</i> -Fragment	diese Arbeit
pBT65	pUC18::3206 bp <i>Sau3A</i> -Fragment	diese Arbeit
pPSK60	Plasmid aus <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1; Lokalisation der <i>thm</i> -Gene	diese Arbeit

*Amp^r–Ampicillinresistenz, POZ – Promotor, Operator und α–Peptid der β–Galactosidase

2.2. NÄHRMEDIEN

2.2.1. Medium für *Pseudonocardia* sp. Stamm K1

Mineralmedium (KOENIG und ANDREESEN, 1989)

Salzlösung	50 ml
Spurenelementlösung	1 ml
Kaliumphosphatpuffer (1 M; pH 7,4)	100 ml
H ₂ O dest.	ad 1 l

Die Salzlösung, Spurenelementlösung und H₂O dest. wurden autoklaviert und nach Abkühlen der sterile Kaliumphosphatpuffer zugegeben.

Salzlösung:

	Endkonzentration [mM] im Mineralmedium
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,09
MnSO ₄ × H ₂ O	0,06
MgSO ₄	2,0
NH ₄ Cl	5,6
NaCl	0,85
ad H ₂ O dest.	1,0 l

Spurenelementlösung (modifiziert nach WIDDEL *et al.*, 1983)

	Endkonzentration [mM] im Mineralmedium
FeCl ₂ × 4 H ₂ O	1,0 × 10 ⁻⁵
ZnCl ₂	5,0 × 10 ⁻⁷
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	5,0 × 10 ⁻⁷
H ₃ BO ₃	1,0 × 10 ⁻⁸
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	8,0 × 10 ⁻⁷
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	2,0 × 10 ⁻⁸
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	1,0 × 10 ⁻⁷
HCl 25 % (v/v)	10,000 ml
ad H ₂ O dest.	1,000 l

Das Eisenchlorid wurde zuerst in der Salzlösung gelöst und dann mit H_2O dest. aufgefüllt, um darin die weiteren Spurenelemente zu lösen. Die Spurenelementlösung wurde 15 min autoklaviert.

Zur Herstellung fester Medien wurde dem Mineralmedium 2 % (w/v) Bacto–Agar zugegeben.

Trypticase–Soja–Broth (TSB)

Nach Herstellerangaben (Sigma, Deisenhofen) wurden 30 g/l H_2O dest. eingesetzt.

2.2.2. Medium für *E. coli*

LB–Medium: SAMBROOK *et al.*, 1989

LB–Agar: LB–Medium mit 2 % (w/v) Bacto–Agar

NB–Medium: 25 g/l Nährbouillon I (Immunpräparate, Berlin)

Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	125 mg/ml in H_2O dest.	125 μ g/ml
Tetracyclin	25 mg/ml in 70 % Ethanol	12,5 μ g/ml
X–Gal	2 % (w/v) in DMF	40 μ g/ml
IPTG	0,1 M in H_2O dest.	40 μ g/ml

2.3. ZELLANZUCHT UND –ERNTE

***Pseudonocardia* sp. Stamm K1**

Die Anzucht von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 erfolgte in Mineralmedium (2.2.) mit 20 mM THF oder mit einer Substratkonzentration von 10 mM (Succinat, 1,4–Butandiol, 4–Hydroxybuttersäure) als einziger Kohlenstoff– und Energiequelle. Die Zellen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen und Schraubverschluß mit Teflon–Silikon–Einlage (Ochs Glasgeräte, Bovenden) auf einem Rundschüttler bei 30 °C und 160 Upm inkubiert. Das Mediumvolumen betrug maximal 18 % des Kolbenvolumens. Das Animpfen der Kultur erfolgte aus einer Vorkultur, so daß eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von mindestens 0,1 erreicht wurde. Wurde die Kultur von der Platte beimpft, erwies es sich als notwendig, TSB–Medium oder Mineralmedium mit Succinat als Kulturmedium zu wählen, um so eine Aggregatbildung der Zellen zu vermeiden. Danach erfolgte das Überimpfen in Mineralmedium mit THF. Mit Glycerinkulturen (2.4.) konnte direkt das Mineralmedium mit

THF beimpft werden. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD₆₀₀ an einem Zweistrahlspktralphotometer Uvikon 930 (Kontron, Eching) verfolgt. Als Referenz diente H₂O. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 8500 Upm und 4 °C geerntet (Sorvall RC 5B Plus). Das Zellpellet wurde dreimal mit steriler Saline (0,9 % [w/v] NaCl) gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

E. coli

E. coli wurde in NB– oder LB–Medium (2.2.2.) in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Als Anzuchtgefäß dienten sterile Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben, wobei diese maximal mit Medium zu 1/5 des Volumens gefüllt wurden. Die Kultivierung erfolgte auf einem Rundschüttler bei 37 °C und 200 Upm. Das Zellwachstum wurde bei einer OD₆₀₀ verfolgt. Beimpfte LB–Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Zellernte erfolgte bei 4 °C durch 10 minütige Zentrifugation bei 5.000 Upm in einer Universal 30 RF–Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen).

2.4. STAMMHALTUNG

***Pseudonocardia* sp. Stamm K1**

Die Stammhaltung erfolgte über 4 bis 6 Wochen auf LB–Agar bzw. auf Mineralmedium–Platten mit 10 mM THF. Über längere Zeiträume wurde der Stamm als Glycerinkultur (15 % [v/v] Glycerin) bei –80 °C gelagert.

E. coli

Die *E. coli*–Stämme wurden auf LB–Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, bei 37 °C inkubiert und über 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Von allen rekombinanten *E. coli*–Stämmen wurde eine Glycerinkultur angelegt. Dazu wurde die Kultur mit Glycerin (Endkonzentration 10 % [v/v]) versetzt und bei –80 °C gelagert.

2.5. HERSTELLUNG VON ROHEXTRAKTEN

Das Zellpellet von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde pro g Zellen in 2 ml 50 mM Tris/HCl–Puffer; pH 7,4 (Rohextrakt zur Bestimmung der Reduktase– und Succinatsemi-aldehyd–Dehydrogenase–Aktivität) oder in 2 ml 25 mM MOPS–Puffer; pH 7,4 mit 15 % (v/v) Glycerin (Rohextrakt zur Bestimmung der Monooxygenase–Aktivität) vorsichtig resuspendiert. Zu 1 ml Zellsuspension wurde 0,2 µl Benzonase (25 U/µl, Merck, Darmstadt)

zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte durch dreimalige Passage durch eine vorgekühlte 20K-Zelle einer French-Presse (SLM AMINCOTM, SLM Instrument Inc., Silver Springs, USA). Zelltrümmer und nicht zerstörte Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min, 15.000 Upm, 4 °C) in einer Sorvall-Zentrifuge im SS34-Rotor abgetrennt. Der Überstand wurde als Rohextrakt (RE) bezeichnet.

Für den anaeroben Aufschluß wurde dem Puffer (25 mM MOPS, 15 % [v/v] Glycerin; pH 7,4) 5 mM Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Die verwendete French-Press-Zelle und die Hungate-Röhrchen wurden ständig mit Stickstoff begast.

Für den Zellaufschluß mit Ultraschall wurde die Zellsuspension unter Eiskühlung in sechs Zyklen jeweils 30 s bei voller Leistung mit einem Uni-Equip-Gerät (Martinsried) beschallt und anschließend 30 s abgekühlt.

2.6. PROTEINBESTIMMUNG

2.6.1. Proteinbestimmung durch Färbung mit Coomassie Blue

Die Proteinbestimmung erfolgte nach BRADFORD (1976). Zur Herstellung der Bradford-Reagenz wurden 100 mg Serva Blau G (Coomassie Blue) in 50 ml 96 %igen (v/v) Ethanol gelöst, mit 100 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit H₂O dest. auf 1 l aufgefüllt. 100 µl Probe wurden mit 1 ml Reagenz gemischt, der Ansatz 12 min bei RT inkubiert und bei 595 nm im Uvikon 930 gemessen. Als Referenz diente Bradford-Reagenz mit Puffer. Anhand einer erstellten Eichkurve im Bereich von 5 bis 50 µg Rinderserumalbumin wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.6.2. Relative Proteinbestimmung durch Messung bei 280 nm

Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentration (WARBURG und CHRISTIAN, 1942) in Fraktionen von Säulenchromatographien erfolgte bei 280 nm in einer Quarzküvette (d = 1 cm) am Uvikon 930. Der Probenpuffer diente als Referenz.

2.7. BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN

Die Enzymaktivitäten wurden im linearen Abhängigkeitsbereich von Reaktionsgeschwindigkeit zur Extraktmenge gemessen. Die Enzymaktivitäten wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$U = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{d \cdot \epsilon \cdot v}$$

$\Delta E/\text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

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

V = Gesamtvolumen des Ansatzes (ml)

v = Probevolumen (ml)

Eine internationale Enzymeinheit (U) entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (U/mg Protein) wurde der entsprechende Proteingehalt der Probe (mg Protein/ml) berücksichtigt.

2.7.1. Messung von Reduktaseaktivitäten

Zum Nachweis einer THF-induzierten Reduktaseaktivität wurde der RE aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen an Q-Sepharose chromatographiert und die erhaltenen Fraktionen unter Einsatz von verschiedenen künstlichen Elektronenakzeptoren (Tab. 3) auf vorhandene Reduktaseaktivitäten untersucht.

Meßansatz:	Endkonzentration im Test
Probe	0,4 – 25 μl
FAD	0,2 mM
FMN	0,2 mM
NADH oder NADPH	0,12 mM
Elektronenakzeptor	siehe Tab. 3
50 mM Tris/HCl; pH 7,5	ad 1 ml

Tabelle 3: Eingesetzte Elektronenakzeptoren.

Elektronenakzeptor	Konz. der Stammlsg. [mM]	Konz. im Test [mM]	λ [nm]	ϵ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	Literatur
Nitroblautetrazoliumchlorid	1	0,2	535	18,3	KOENIG und ANDREESEN, 1989
Ferricyanid	100	1,0	420	1,0	OHE und WATANABE, 1979
Cytochrom c	2	0,02	550	21,1	DAWSON <i>et al.</i> , 1986
Akzeptor-Mix ¹			522	8,6	ARMSTRONG, 1964

¹Beim Akzeptor-Mix handelt es sich um 5 ml 10 mM PES (Phenazinethosulfat) in H₂O + 1 ml 5 % DCPIP in Ethanol; davon wurden 20 µl im Test eingesetzt

Die Messung der THF-induzierten NADH–Cytochrom c–Reduktase erfolgte mit dem genannten Meßansatz unter Einsatz von Cytochrom c bei 30 °C. Nach Zugabe von NADH wurde die endogene Rate über eine Minute bestimmt, dann wurde die Reaktion mit Enzym gestartet.

2.7.2. Messung der Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase

Zur Bestimmung der Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase–Aktivität in THF–gewachsenen Zellen wurde folgendes Testsystem etabliert.

Meßansatz:

Endkonzentration im Test

Probe	10 – 25 µl
NAD ⁺	1,6 mM
Succinatsemialdehyd	0,3 mM
50 mM Tris/HCl; pH 9,0	ad 1 ml

Der Enzymtest wurde bei 30 °C durchgeführt. Gemessen wurde die Bildung von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.7.3. Messung einer Monooxygenase an der Sauerstoffelektrode

Der THF-abhängige Sauerstoffverbrauch wurde im Rohextrakt (aerob und anaerob) mit Hilfe der Clark–Sauerstoff–Elektrode (Rank Brothers, Bottisham) bestimmt. Die Meßeinheit wurde mit luftgesättigtem Puffer auf 100 % O₂–Sättigung und mit Natriumsulfid–Lösung auf 0 % O₂–

Sättigung geeicht. Die Messung erfolgte bei 30 °C. Dies entspricht einer Konzentration an gelöstem O₂ von 237 nmol/ml.

Meßansatz:	Endkonzentration im Test
NADH oder NADPH	0,1 – 0,4 mM
FeSO ₄	0,01 – 0,02 mM
Rohextrakt (aerob oder anaerob)	5 – 200 µl
THF	0,5 – 20 mM
25 mM MOPS, 15 % (v/v) Glycerin; pH 7,5	ad 1,5 ml

2.8. EINENGEN VON PROTEINLÖSUNGEN

Das Einengen von proteinhaltigen Lösungen erfolgte mittels Ultrafiltration in Centriprep- bzw. Centricon-Röhrchen (Amicon, Witten) nach Herstellerangaben. Die Ausschlußgröße der Membran betrug 10 bzw. 30 kDa.

2.9. ELEKTROPHORETISCHE METHODEN

2.9.1. SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS–PAGE)

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades und zur Bestimmung der Größe des Proteins unter denaturierenden Bedingungen diente die SDS–PAGE nach LAEMMLI (1970). Dazu wurde die Proteingel–Apparatur Minigel Twin G42 (Biometra, Göttingen) eingesetzt. Es wurde mit 12,5 %igen Trengelen gearbeitet, die entsprechend dem Handbuch zur Elektrophoresekammer hergestellt wurden. Die Proben wurden mit 1 Vol. SDS–Probenpuffer versetzt, 5 min gekocht und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 × SDS–Elektrophoresepuffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Glycin, 0,1 % [w/v] SDS) bei maximaler Spannung und 25 mA pro Gel.

SDS–Probenpuffer:	250 mM Tris/HCl; pH 6,8	3,2 ml
	20 % (w/v) SDS–Lösung	1,0 ml
	Glycerin	1,0 ml
	β–Mercaptoethanol	0,02 ml
	Bromphenolblau	5 mg
	H ₂ O dest.	10 ml

Als Molekulargewichtsmarker der Proteine diente SDS–7 (Sigma, Deisenhofen).

2.9.2. Native Gradienten PAGE

Die Herstellung eines Gradientengels erfolgte nach den Vorgaben von HORMANN (1991). Es wurden Gele mit einem Gradienten von 5–25 % Acrylamid–Konzentration gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 5 µl Beschwererlösung (0,05 % [w/v] Bromphenolblau, 20 % [w/v] Saccharose) versetzt. Die Elektrophorese (Elektrophoresepuffer: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Glycin) erfolgte über 15 h bei 4°C und einer Spannung von 100 V pro Gel. Als Marker dienten HMW– und LMW–Marker (Pharmacia, Freiburg).

2.9.3. Transfer von Proteinen auf PVDF–Membran

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf eine Polyvinylidendifluorid–Membran (PVDF–Membran, Millipore, Eschborn) wurde eingesetzt, um nach der SDS–PAGE die partiell gereinigte Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase einer N–terminalen Aminosäure–Sequenzierung zugänglich zu machen. Der Transfer erfolgte mit dem Semi–dry Fast–Blot B34 (Biometra, Göttingen) nach Anleitung des Geräteherstellers.

2.10. FÄRBUNG UND TROCKNUNG VON GELEN

2.10.1. Proteinfärbung mit Coomassie Blue (modifiziert nach WEBER und OSBORN, 1969)

Die Färbung der Gele erfolgte für 30 min unter Schütteln mit Färbelösung (0,24 % [w/v] Serva Blau G–250, 45 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig). Zum anschließenden Entfärben wurde Entfärberlösung (33 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig) eingesetzt, die bis zum Entfärben des Hintergrundes mehrmals gewechselt wurde.

PVDF–Membranen wurden mit einer Färbelösung gleicher Zusammensetzung angefärbt. Zum Entfärben wurde der Blot–Membran–Entfärber (90 % [v/v] Methanol, 2 % [v/v] Eisessig) eingesetzt.

2.10.2. Proteinfärbung mit Silber (BLUM *et al.*, 1987)

Die Silberfärbung wurde zum Nachweis von geringen Proteinmengen eingesetzt, da diese bedeutend empfindlicher als die Coomassie Blue–Färbung ist. Die Färbung wurde in einer Glasschale unter ständiger Bewegung des Gels durchgeführt. Die Schritte der Färbeprozess sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Silberfärbung.

Schritt	Lösung	Zeitdauer
1. Fixieren	50 % Methanol 12 % Essigsäure 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd	1 h oder über Nacht
2. Waschen	50 % Ethanol	3 × 10 min
3. Vorbehandlung	0,2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	1 min
4. Spülen	H_2O	3 × 20 s
5. Imprägnieren	2 g/l AgNO_3 75 ml/l 37 % Formaldehyd	2 × 20 s
6. Spülen	H_2O	2 × 20 s
7. Entwickeln	60 g/l Na_2CO_3 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	≤ 10 min
8. Waschen	H_2O	2 × 10 s
9. Stoppen	50 % Essigsäure	100 min
10. Waschen	H_2O	≥ 20 min

2.10.3. Trocknung der Gele

Die Gele wurden für ca. 20 min in einer Lösung aus 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 3 % (v/v) Glycerin geschwenkt und zur Lufttrocknung zwischen zwei Cellulose-Folien gespannt.

2.11. METHODEN ZUR PROTEINREINIGUNG

Zur Anreicherung von Proteinen wurde eine Anlage verwendet, die sich aus folgenden Komponenten der Firma Pharmacia (Freiburg) zusammensetzte: LKB-Pumpe P-1, Fraktionssammler LKB RediFrak und der entsprechenden Säule. Das verwendete Säulenmaterial wurde ebenfalls von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Das eingesetzte Volumen an Säulenmaterial und die damit verbundene Dimension der Glassäule richtete sich nach der aufzutrennenden Proteinmenge und der Kapazität des Säulenmaterials. Je nach Säulen-durchmesser und Gelmaterial wurde die Flußrate gewählt. Alle Proteinaufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Folgende Laupuffer wurden eingesetzt:

Puffer A	50 mM Tris/HCl; pH 7,5
Puffer B	50 mM Tris/HCl; pH 7,5 + 1 M KCl
Puffer C	50 mM Tris/HCl; pH 7,5 + 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Das Packen der Säulen und die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte nach Herstellerangaben.

2.11.1. Anionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose Fast Flow wurde der Rohextrakt aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 aufgetrennt, um so vorhandene Reduktaseaktivitäten zu fraktionieren. Dazu wurde mit einer XK 26/20 Säule oder einer XK 50/30 Säule mit einer Flußrate von 1 bzw. 2 ml/min (Fraktionsgröße 1,5 bzw. 10 ml) gearbeitet. Die Säulen wurden mit 10 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und nach Auftragen der Probe mit 5–7 Vol. gewaschen, bis das nicht gebundene Protein vollständig eluiert war. Danach wurde ein linearer Salzgradient (0–1 M KCl) über das 10-fache Säulenvolumen angelegt. Der Gradient wurde durch Mischen von Puffer A und Puffer B in einem Gradientenmischer erzeugt.

2.11.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Als Säulenmaterial diente Butyl-Sepharose. 10 ml Säulenmaterial wurden in einer XK 26/20 Säule gepackt. Die Säule wurde mit 10 Vol. Puffer C äquilibriert. Nach Auftragen der Probe wurde nicht gebundenes Protein mit Puffer C in einem Waschschnitt eluiert und danach ein linearer Salzgradient von 1,5–0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ angelegt. Der Gradient wurde durch Mischen von Puffer C und Puffer A in einem Gradientenmischer erzeugt. Die Flußrate wurde auf 1 ml/min und die Fraktionsgröße auf 2 ml eingestellt.

2.11.3. Gelfiltration

Die Gelfiltration an SuperdexTM 200 HiloadTM (Pharmacia, Freiburg) diente als weiterer Anreicherungsschritt und zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Proteine. Die Säule wurde mit Puffer A bei einer Flußrate von 0,5 ml/min betrieben. Das Fraktionsvolumen betrug 1,3 ml.

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Proteine wurde eine Eichkurve erstellt. Als Eichproteine dienten Ferritin (440 kDa), Katalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) und Ovalbumin (45 kDa).

2.11.4. Ammoniumsulfatfällung

Zur Ammoniumsulfatfällung wurde die Proteinlösung mit fein gemörserten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf eine Endkonzentration von 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebracht. Die Zugabe des Salzes erfolgte portionsweise bei 4 °C und vorsichtigen Röhren. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (25 min, 15.000 Upm, 4 °C) abgetrennt. Das erhaltene Pellet wurde in Puffer A aufgenommen.

2.12. METHODEN ZUR ENZYMCHARAKTERISIERUNG

2.12.1. UV/VIS-Spektrum

Die Spektren wurden mit dem Zweistrahlspktralphotometer Uvikon 930 (Kontron, Eching) mit angeschlossenem Drucker aufgenommen. Als Referenz diente der entsprechende Puffer.

2.12.2. Bestimmung von Eisen

Die Eisenbestimmung erfolgte in Kooperation mit dem Institut Dr. Jost, Umweltanalytik GmbH in Queis durch Pyrolyse im Graphitrohr. Als Standard diente Cytochrom c (1 mol Fe/mol Enzym) im gleichen Puffersystem (50 mM Tris/HCl; pH 7,5) wie das zu analysierende Protein.

2.12.3. Bestimmung des kovalent-gebundenen Flavins

Fällung des Proteins

Die Fällung des Proteins erfolgte durch 10 minütiges Kochen und/oder Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 % [w/v]). Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm) in einer Biofuge pico (Heraeus, Osterode) pelletiert.

Quantifizierung des Flavins

Die quantitative Flavinbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption einer Proteinlösung bekannter Konzentration (2.6.1.) bei 450 nm. Bei Berechnung des Flavingehalts wurde ein Extinktionskoeffizient für FAD ϵ_{450} von $11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (DE JONG *et al.*, 1992) zugrundegelegt.

Fluoreszenzmessung

Zur Bestimmung der Emissions- und Exzitationsmaxima der Reduktase wurden Spektren am Spektrofluorometer FluoroMax-2 (ISA Instruments, Edison N.J., USA) aufgenommen. Dabei wurden entweder die Exzitations- oder die Emissionswellenlänge konstant gehalten.

Die Fluoreszenz des kovalent-gebundenen Flavins im SDS-Gel (2.9.1.) wurde am Fluorescent Image FLA-3000 (Fuji, Japan) detektiert. Es wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 473 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gearbeitet. Die Fluoreszenz wurde direkt nach der SDS-PAGE bestimmt.

Bestimmung des Flavins

Die Art des Flavins wurde durch Vergleich der relativen Fluoreszenz der Reduktase-Lösung vor und nach Phosphodiesterase-Behandlung bestimmt. Die Phosphodiesterase katalysiert die Umsetzung von FAD zu FMN, die sich in einer Erhöhung der Fluoreszenz beobachten lässt. Die Messung der relativen Fluoreszenz erfolgte am Fluoreszenzspektrophotometer SFM 25 (Kontron, Eching) bei einer Exzitationswellenlänge von 445 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Gearbeitet wurde mit einer Proteinkonzentration von 0,25 µM in 50 mM Tris/HCl; pH 7,5 sowie mit Referenz-Lösungen von FAD, FMN und Riboflavin gleicher Molarität. Nach Fluoreszenzmessung folgte eine Behandlung der Proteinlösung und der FAD-Lösung mit Phosphodiesterase I aus *Crotalus atrox* (0,2 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Fluoreszenz erneut gemessen.

2.12.4. N-terminale Sequenzierung, Peptid-Mapping und Massenspektroskopie

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz der Proteine erfolgte mit Hilfe des automatischen Edman-Abbaus am Proteinsequencer 476A (Applied Biosystem, Weiterstadt). Die Reduktase konnte nach Proteinreinigung direkt aus der Lösung sequenziert werden. Zur Analyse der partiell gereinigten Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase erfolgte die Sequenzierung von der PVDF-Membran (2.9.3.). Die Sequenzierung und das Peptid-Mapping wurden freundlicherweise von Dr. P. Rücknagel (Max-Planck-Gesellschaft, Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) durchgeführt.

Das Molekulargewicht der Reduktase wurde durch MALDI-Massenspektroskopie mit einem Gerät vom Typ ReflexTM (Bruker-Franzen Analytik) von Dr. A. Schierhorn (Max-Planck-Gesellschaft, Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) bestimmt.

2.13. STANDARDTECHNIKEN FÜR DAS ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN

2.13.1. Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden für 25 min bei 121 °C autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70 %igem (v/v) Ethanol abgewischt oder abgeflammt.

Beim Arbeiten mit RNA wurden alle Lösungen zur Inaktivierung der RNasen mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma, Deisenhofen) versetzt und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C für 25 min bei 121 °C autoklaviert (Zersetzung des DEPC's in CO₂ und Ethanol). Die verwendeten Geräte wurden doppelt autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit DEPC-behandeltem H₂O bidest. abgespült. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten grundsätzlich mit Einweghandschuhen durchgeführt.

2.13.2. Fällung von DNA

Die DNA–Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na–Acetat und 2,5 Vol. 96 %igem (v/v) unvergälltem Ethanol versetzt. Nach Durchmischung wurde der Ansatz für mindestens 1 h bei –20 °C gefällt. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation (12.000 Upm, 4 °C) in einer Universal 30 RF–Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Das erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA–Pellet bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde anschließend in dem je nach Verwendungszweck erforderlichen Puffer bzw. in H₂O bidest. aufgenommen.

2.13.3. Mikrodialyse von DNA

Die Mikrodialyse diente zur Entsalzung von Ligationsansätzen, die anschließend zur Elektroporation eingesetzt wurden. Dazu wurde ein Membranfilterblättchen mit einer Porengröße von 0,025 µm (Millipore, Eschborn) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche in einer Petrischale gelegt. Die DNA–Probe wurde aufgetropft und nach 30–60 minütiger Dialyse abpipettiert.

2.13.4. Phenol/Chloroform–Extraktion

Die Phenol/Chloroform–Extraktion wurde zur Abtrennung von Proteinen aus einer Nukleinsäure–Lösung angewendet. Dazu wurden die Ansätze auf ein handhabbares Volumen aufgefüllt (etwa 200 µl), 1 Vol. Phenol–Lösung zugefügt und durch Schwenken des Reaktionsgefäßes eine Durchmischung bewirkt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 12.000 Upm zentrifugiert. Die DNA–haltige Oberphase wurde abgenommen und zur

Entfernung von Phenolresten mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) extrahiert. Zur Verringerung des Volumens der erhaltenen DNA-Lösung erfolgte eine Ethanolfällung (2.13.2.).

Phenol-Lösung: Tris-gesättigtes Phenol; pH 8,0 (Roth, Karlsruhe)
 Chloroform
 Isoamylalkohol
 (25:24:1)

2.13.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette (Gene Quant, Pharmacia, Freiburg) gegen H₂O bestimmt. Die OD₂₆₀ von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml.

Die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Proben wurden aus dem Quotient OD₂₆₀:OD₂₈₀ geschlußfolgert, der unter optimalen Bedingungen zwischen 1,8 – 1,9 liegt.

Die DNA-Konzentration einer Plasmid-Präparation bzw. einer schwach konzentrierten Lösung wurde durch Vergleich der Bandenintensitäten im Agarosegel ermittelt. Dazu wurde pUC18 mit einer bekannten Konzentration von 0,5 µg/µl als Standard eingesetzt.

2.14. ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

2.14.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (SAITO und MIURA, 1963)

3 g tiefgefrorene Zellen (2.3.) wurden in 4 ml Saline-EDTA-Lösung (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA; pH 8,0) aufgenommen und nach Zugabe von 6 mg Lysozym 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde 1 h bei –20 °C eingefroren und anschließend mit 25 ml Tris-SDS-Puffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 1 % [w/v] SDS; pH 9,0) versetzt. Eine vollständige Zelllyse wurde durch mehrmaliges Einfrieren (–80 °C) und Auftauen (50 °C) bewirkt. Die erhaltene Suspension wurde mit 30 ml Tris-gesättigtem Phenol; pH 8,0 (Roth, Karlsruhe) versetzt und vorsichtig geschüttelt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis (unter gelegentlichem Schütteln) und eine grobe Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min, 5.000 Upm, 4 °C). Die wässrige Oberphase wurde erneut 10 min bei 15.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2,5 Vol. 96 %igem (v/v) Ethanol versetzt und zur Fällung der DNA über Nacht bei –20 °C gelagert. Die ausgefallene DNA wurde durch

Zentrifugation (30 min, 15.000 Upm, 4 °C) sedimentiert, und das erhaltene Pellet in 5 ml 1 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na–Citrat; pH 7,0) resuspendiert. Zur Entfernung der RNA wurde 11 µl RNase A–Lösung (10 mg/ml, DNase frei) zugesetzt und 25 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis erfolgte eine Phenol–Extraktion zur Entfernung der RNase. Es wurde mit 1 Vol. Tris–gesättigtem Phenol extrahiert, zur Phasentrennung zentrifugiert (5 min, 5.000 Upm, 4 °C) und der erhaltene Überstand nochmals zentrifugiert (15 min, 12.000 Upm, 4 °C). Die DNA aus der erhaltenen Oberphase wurde mit 2,5 Vol. 96 %igem (v/v) Ethanol über Nacht bei –20 °C gefällt. Das durch Zentrifugation (15 min, 15.000 Upm, 4 °C) erhaltene DNA–Pellet wurde nacheinander mit eiskaltem 70, 80 und 90 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung bei RT in 10 ml 1 × SSC aufgenommen. Nach Zugabe von 1,1 ml Acetat–EDTA–Lösung (3 M Na–Acetat, 1 mM EDTA; pH 7,0) erfolgte eine Fällung mit 0,7 Vol. Isopropanol. Das DNA–Pellet wurde erneut mit 70, 80 und 90 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung bei RT in 5 ml TE–Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) aufgenommen.

2.14.2. Isolierung von Plasmid–DNA aus *E. coli*

2.14.2.1. Analytische Schnellpräparation (*quick check*)

Zur schnellen Analyse von Plasmiden möglicher *E. coli*–Transformanden wurde die Methode von AKADA (1994) angewendet. Dazu wurden zu 100 µl einer Übernachtkultur 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) und 10 µl Stop–Mix (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol FF, 30 % [v/v] Glycerin) gegeben. Der Ansatz wurde 10 s gründlich gemischt und 5 min bei RT zentrifugiert (12.000 Upm). 20 µl des Überstandes wurden zur Analyse auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

2.14.2.2. Plasmid–Minipräparation (Phenol/Chloroform–Methode)

Die Isolierung von rekombinanten Plasmiden aus *E. coli* XL1–Blue zur Herstellung der Plasmid–Genbank erfolgte nach BIRNBOIM und DOLY (1979).

2.14.2.3. Plasmid–Präparation mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits (QIAGEN, Hilden)

Diese Methode wurde genutzt, um in kurzer Zeit qualitativ hochwertige Plasmid–DNA aus *E. coli* zu gewinnen, die hauptsächlich zur Sequenzierung eingesetzt wurde. Zur Präparation

wurde eine Übernachtkultur (5 ml) eingesetzt und nach Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die DNA wurde mit 50 μ l H₂O bidest. eluiert.

2.14.2.4. Plasmid–Midipräparation

Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid–DNA wurde das Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Das erhaltene DNA–Pellet wurde in 150 μ l H₂O bidest. aufgenommen.

2.14.3. Isolierung von Plasmid–DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1

2.14.3.1. Plasmid–Isolierung mittels Säulenchromatographie

Die Präparation von Plasmid–DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 erfolgte an Anionenaustauschersäulen unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden). Die Präparation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von BUSCH *et al.* (1996). 1 g tiefgefrorene Zellen (2.3.) wurden in 10 ml Puffer P1 (enthält 100 μ g/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 40 mg Lysozym und 10 mg *Achromobacter* Peptidase erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C. 10 ml Puffer P2 wurden vorsichtig zugemischt und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Nachdem 10 ml Puffer P3 zugegeben wurde, erfolgte eine Inkubation für 45 min auf Eis. Die weiteren Schritte der Plasmid–Isolierung verliefen analog dem Herstellerprotokoll. Das erhaltene DNA–Pellet wurde in 100 μ l H₂O bidest. aufgenommen.

2.14.3.2. Analytische Megaplasmid–Isolierung (NIES *et al.*, 1987)

Pseudonocardia sp. Stamm K1 wurde in Mineralmedium (2.2.1.) mit 10 mM THF oder Succinat bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 angezogen. 10 ml Zellsuspension wurde bei 5.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert und anschließend das Pellet in 2 ml E–Puffer (75 mM Tris–Acetat; pH 7,3, 1 mM EDTA) resuspendiert. 1 ml Lysispuffer (5 Teile 1 N NaOH, 6 Teile 20 % [w/v] SDS, 9 Teile H₂O) wurde vorsichtig zugegeben, und es folgte eine Inkubation bei 68 °C für 1 h. Nach Zugabe von 400 μ l 5 M NaCl–Lösung und 6 ml Phenol/Chloroform (1:1 [v/v]) wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (10 min, 5.000 Upm, 4 °C), die Oberphase abgehoben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die wäßrige Phase wurde mit 100 μ l 10 %iger (v/v) Essigsäure neutralisiert und mit 6 ml Diethylether extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 5.000 Upm, 4 °C) wurde die Ether– und Interphase verworfen und verbliebene Etherreste bei 60 °C für 20 min abgedampft. Die Plasmid–DNA wurde mit 6 ml 96 %igem (v/v) Ethanol für

45 min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (40 min, 5.000 Upm, 4°C) sedimentiert und das erhaltene DNA–Pellet in 500 μl H_2O bidest. resuspendiert. Zur DNA–Lösung wurden 10 μl 5 M NaCl–Lösung und 1 ml eiskalter 96 %iger (v/v) Ethanol zugegeben. Nach Fällung (40 min, -20°C) wurde die DNA sedimentiert (20 min, 12.000 Upm, 4°C), das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung bei RT in 20 μl H_2O bidest. aufgenommen.

2.14.3.3. Probenvorbereitung zur präparativen Isolierung linearer Plasmide

Der Nachweis von linearen Plasmiden wurde mit Hilfe der Pulsfeld–Gelelektrophorese (2.15.2.) durchgeführt. Dazu wurden ganze Zellen in Agarose gegossen und nachfolgend im Agarose–Blöckchen lysiert.

Pseudonocardia sp. Stamm K1 wurde in Mineralmedium (2.2.1.) mit 10 mM THF für 48 h angezogen. 350 μl Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Pellet in 250 μl EET–Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, 10 mM EGTA; pH 8,0) resuspendiert. Zum Ansatz wurde 750 μl auf 45°C vorgewärmte LMP– (*low melting point*–) Agarose (2 % [w/v] in H_2O gelöst) zugegeben, gut gemischt und in die Blöckchen–Gießapparatur (BioRad, München) pipettiert. Die erhaltenen Agarose–Blöckchen wurden für 4 h bei 30°C in TE–Puffer (2.14.1.) mit 2 mg/ml Lysozym, 2 mg/ml *Achromobacter* Peptidase und 0,5 mg/ml N–Lauroylsarcosin inkubiert. Die Blöckchen wurden in EET–Puffer mit 1 % (w/v) SDS und 0,25 mg/ml Proteinase K überführt und für 17 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Blöckchen in TE–Puffer für 2 h gewaschen, wobei mehrmals der Puffer gewechselt wurde. Bis zum Einsatz in der Pulsfeld–Gelelektrophorese wurden die Blöckchen bei 4°C in TE–Puffer gelagert.

2.14.4. Isolierung von RNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1

Die Gewinnung von Gesamt–RNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 erfolgte mit Hilfe des RNeasy TM Mini Kits (Qiagen, Hilden). Die Präparation wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei Modifikationen vorgenommen wurden. *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde in Mineralmedium (2.2.1.) mit dem entsprechenden Substrat bis zu einer OD_{600} von 0,9 angezogen. 7 ml Zellsuspension wurden bei 5.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 100 μl TE–Puffer (enthält 20 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Die folgenden Schritte der Reinigung entsprachen der Herstellervorschrift. Die RNA wurde von der Säule mit $2 \times 30 \mu\text{l}$ auf 60°C –vorgewärmtem H_2O (DEPC, 2.13.1.) eluiert.

Da in den Präparationen der Gesamt-RNA häufig Spuren von DNA nachweisbar waren, folgte eine DNase I-Behandlung. Dazu wurden zu 97 µl RNA-Lösung (50–60 µg) 30 U DNase I (Roche, Mannheim) gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der RNA erfolgte ebenfalls mit dem RNeasy™ Mini Kits nach Vorschrift.

2.15. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN

2.15.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern. Je nach Anwendung wurden Gele verschiedener Größe und Agarosekonzentration (0,7–1,5 % [w/v] in 1 × TAE-Puffer) eingesetzt. Als Laupuffer diente 1 × TAE (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,0). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. Stop-Mix (2.14.2.1.) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50–80 V für 1–16 h.

Als Größenmarker wurden verwendet:

pGEM™ DNA Marker	0,05–2,6 kb (Promega, Heidelberg)
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	0,08–1,0 kb (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	0,25–10 kb (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
λ-DNA mit <i>Pst</i> I geschnitten	0,50–14 kb (eigene Herstellung)

Für Southern-Hybridisierungen wurden die Digoxigenin-markierten DNA-Längenstandards II (0,12–23,1 kb), VI (0,15–2,1 kb) und VII (0,081–8,57 kb) der Firma Roche (Mannheim) verwendet.

2.15.2. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE wurde zur Detektion von linearen Plasmiden eingesetzt, die in einer Standard-Agarose-Gelelektrophorese nicht im Gel aufgetrennt werden können. Dazu wurde die Anlage CHEF-DR™ II (BioRad, München) eingesetzt.

Die Analyse der Proben erfolgte in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel. Die unter 2.14.3.3. präparierten Blöckchen wurden in die Slots gesteckt und mit 1 %iger (w/v) Agaroselösung übergossen. Im Falle der Plasmid-Präparation nach 2.14.3.1. erfolgte eine Auftragung mit 0,2 Vol. Stop-Mix (2.14.2.1.). Als Elektrophorese-Puffer diente 0,5 × TBE-Puffer (44,5 mM Tris, 44,5 mM Borat, 1 mM EDTA; pH 8,5), der während des Laufes umgewälzt und auf

13 °C gekühlt wurde. Die angelegte Spannung betrug 170 V. Um eine Auftrennung zwischen 10–1.000 kb zu erreichen, wurde die Pulszeit linear über 24 h von 20 s auf 80 s gesteigert.

Als Größenmarker wurden der λ DNA PFGE-Marker und der Yeast DNA PFGE-Marker (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt.

2.15.3. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Gesamt-RNA (6–12 µg) aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 %igen Formaldehyd-enthaltenden Agarosegel aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 15 ml 10 × MOPS (0,2 M MOPS, 0,05 M Na-Acetat, 0,01 M EDTA; pH 7,0) und 130,5 ml H₂O (DEPC, 2.13.1.) durch Aufkochen gelöst. Nachdem die Gellösung auf 50 °C abgekühlt war, wurde 4,5 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben. Zur Probenvorbereitung wurden 6 µl RNA mit 12,5 µl Formamid, 4 µl Formaldehyd und 2 µl 10 × MOPS-Puffer versetzt und 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden danach auf Eis gestellt und 3 µl Probenpuffer (0,1 M EDTA, 50 % [v/v] Glycerin, 0,1 % [w/v] SDS, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) sowie 2 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugegeben. Als Laufpuffer diente 1 × MOPS-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 V für 15 h.

Als Marker wurde der Digoxigenin-markierte RNA-Längenstandard I (0,3–6,9 kb) (Roche, Mannheim) aufgetragen.

2.15.4. Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation von Gelen

Das Anfärben der DNA erfolgte grundsätzlich mit Ethidiumbromid. Dazu wurde der Agarose-Lösung vor dem Gießen Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. PFGE-Gele wurden nach dem Gellauf für 15–30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) angefärbt, da Ethidiumbromid das Laufverhalten der DNA in der PFGE negativ beeinflusst. Die DNA wurde unter UV-Licht am Transilluminator sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert.

2.16. ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS DEM AGAROSEGEL

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

2.17. SCHNEIDEN VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. des entsprechenden 10 × Restriktionspuffers und mit dem gewünschten Restriktionsenzym (2–10 U Enzym/µg DNA) gemischt, wobei der Anteil an Enzymvolumen unter 10 % des Gesamtansatzes lag. Ein vollständiger Verdau erfolgte meist über Nacht bei 37 °C, mindestens jedoch für 3 h. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zusatz von 0,02 M EDTA; pH 8,0 oder Stop-Mix (2.14.2.1.). Die verwendeten Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.18. DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Zur Vermeidung der Selbstligation linearisierter Vektor-DNA erfolgte im Anschluß an die DNA-Spaltung eine Dephosphorylierung durch Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP). Dazu wurde dem Restriktionsansatz direkt 1 U CIAP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zugesetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 3 h bei 37 °C.

2.19. LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Zur Ligation wurden etwa 0,2 µg linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA und 0,4–1 µg Insert-DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O bidest. auf 26 µl aufgefüllt, zur Freilegung der kohäsiven Enden 5 min bei 45 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 3 µl des 10 × Reaktionspuffers und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) erfolgte die Ligation bei 16 °C über Nacht. PCR-Produkte wurden in den pGEMTM-T Easy Vektor (Promega, Heidelberg) nach Anweisung des Herstellers ligiert.

2.20. TRANSFORMATION VON *E. COLI* MITTELS ELEKTROPORATION (DOWER ET AL., 1988)

2.20.1. Herstellung von kompetenten Zellen

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden 200 ml LB-Medium (beinhaltet 12,5 µg/ml Tetracyclin) mit 2 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,8 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (15 min, 5.000 Upm, 4 °C). Das Zellpellet wurde zweimal mit je 200 ml eiskaltem H₂O bidest. und einmal mit 30 ml 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen, in 0,5–0,7 ml 10 %igen Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei –80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.20.2. Elektroporation

Die Elektroporation wurde an einem Gene Pulser (BioRad, München) durchgeführt. Pro Transformation wurden 40 µl kompetente Zellen und 1–5 µl Ligationsansatz, der zuvor durch Mikrodialyse (2.13.3.) entsalzt wurde, eingesetzt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid–DNA versetzt und nach 1 min Inkubation auf Eis in die sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand (Peglab, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten um 4,0 ms erreicht wurden. Sofort nach dem Impuls wurde 1 ml LB–Medium zugegeben, die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf selektiven Nährboden ausplattiert.

2.21. X–GAL–TEST ZUR SELEKTION REKOMBINANTER KLONE

Die Transformanden wurden auf LB–Agar mit IPTG und X–Gal unter Zusatz von Antibiotikum (2.2.2.) selektiert. Rekombinante Klone wurden durch den Test auf α –Komplementation identifiziert (Blau–Weiß–Selektion, Sambrook *et al.*, 1989).

2.22. POLYMERASE–KETTEN–REAKTION (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA–Fragmente wurde die Methode der PCR angewendet. Als Matrize diente sowohl Gesamt–DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 als auch rekombinante Plasmid–DNA. Wurde zur PCR Koloniematerial von *E. coli*–Stämmen oder von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (Amplifikation der 16S rDNA) eingesetzt, wurde dieses zuvor in 50 µl H₂O bidest. suspendiert und zur Lyse der Zellen 10 min auf 99 °C erhitzt.

Die Standard–Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl im MastercyclerTMpersonal (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Reaktionsansatz:

ca. 0,1 µg Template–DNA
5 µl 10 × Reaktionspuffer
2,5 mM MgCl ₂
0,2 µM Primer 1 (in H ₂ O bidest.)
0,2 µM Primer 2 (in H ₂ O bidest.)
0,2 mM dNTP–Lösung
1 U Taq DNA–Polymerase (Roche, Mannheim)

Reaktionsbedingungen:

Der Ansatz wurde zur Denaturierung der DNA 2 min bei 95 °C inkubiert. Danach folgten 30 Zyklen.

Denaturierung:	15 s bei 95 °C
<i>annealing:</i>	30 s bei 50–65 °C (in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer)
Extension:	30 s – 3 min (ca. 1 kb/min) bei 72 °C
Abschließender Schritt:	3 min bei 72 °C

5–10 µl des Reaktionsansatzes wurde mittels Standard–Gelektrophorese (2.15.1.) aufgetrennt.

Die Reinigung des PCR–Produktes erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Anleitung oder durch Elution aus dem Gel (2.16.).

Die verwendeten Oligonukleotid–Primer wurden über die Firmen Metabion (Martinsried) und Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Die zur PCR, RT–PCR, *primer extension*–Reaktion bzw. Sequenzierung verwendeten Oligonukleotid–Primer sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Primer für PCR, RT–PCR, *primer extension* und Sequenzierung.

Orientierung der Primer in (→) bzw. entgegen (←) der Transkriptionsrichtung,
 a) degeneriertes Oligonukleotid mit (I) für Desoxyinosin, (R) für A+G, (Y) T+C, (H) T+C+A,
 b) Fluorescein–markierter Primer.

Primer	Orientierung	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
THF01 ^{a)}	→	GARGARATHGARTCIGGIGARGAYGARAC	Position der Basen (Abb. A, Anhang)
THF02	→	TTCCAGACGGGCTCAACTCAT	4031 – 4059
THF03	←	ATACAGAATCGGAATCGGCAG	5369 – 5389
THF04	←	TATCCACCCCTTCTCCTCTTG	5046 – 5066
THF05	←	TGTATTCCACTCGCTTGTAGG	4199 – 4218
THF06	→	GGCTCTCCCGATTGGTCACG	3796 – 3816
THF07	→	ATCACGGACTGGGCGGAGACC	1570 – 1589
THF08	←	AGTCGTAGTCCTCTGCTCAA	5741 – 5761
THF09	→	CCACCATTCCGCCGCTCTCG	3307 – 3327
THF10	→	GCGGCTCAAGGCTGGGACGAT	3844 – 3864
THF11	→	TCAGGAATCGGGCTCAAGTC	1927 – 1947
THF12	←	TCAAGAATAAGGTGCTCCATC	6109 – 6129
THF13	←	ATGACAGTGGCAGAGCGAAG	8300 – 8320
THF14	→	GTCCCAGAGTCAGATGTTACG	2891 – 2911
THF15	→	AGTCTCGGATGAACCTGATAG	4238 – 4258
			4816 – 4836

Fortsetzung nächste Seite

THF16	→	GTC CAG CCG AGC GTCC ACCG	5219 – 5238
THF17	→	ACT ATT CAT CCT GGTC GCG	6440 – 6460
THF18	←	CACTT GAT GGG CTT ACCG CTC	7934 – 7954
THF19	→	CAC GAT GACT GCCCC ACCGA	2231 – 2250
THF20	←	AGCA ACT CCAGCC ACCGA AG	2496 – 2515
THF21	←	GCAC AAA ATGAT GGATA CT A	7608 – 7627
THF22	→	CGCC ACA ACCGAG GAGAGTC	6731 – 6751
THF23	→	ATG CTT GTT GAT GCT CTC G	2574 – 2592
THF24	←	TCC ACC GTAGAAC ACCGAA AC	4715 – 4735
THF25	←	CGG C GACC AGGAT GAAT GAGT	6440 – 6460
THF26	←	GACT GAG ACCG CATT CCT GA	6109 – 6129
THF27	←	GGT CT CC GCCC AGT CC GTG AT	5741 – 5761
THF28	→	AGAAC GCT CCC CTG CTT GA	2989 – 3007
THF29	→	TTGAG CAGA AGGACT ACCG ACT	3307 – 3327
THF30	←	GAG TTCCA AGCGT CTA ATA	4357 – 4375
THF31	←	GAAC TCC AGCC AGAAC AAGCG	7254 – 7274
THF32	←	GGAT GGT GT GGGGGAGCGAC	6590 – 6609
THF33	→	CCCTGGTCGCTATGTCGGTG	3569 – 3588
THF34	←	CGT GACCA ATCGGGAGAGCC	1570 – 1589
THF35	→	GATGGAGCACCTTATTCTTGA	8300 – 8320
THF36	→	CTTTGGATTCTTACTGACCTC	9129 – 9149
THF37	→	CGT CGG CGG CTGAGA ATGGGA	6167 – 6187
THF38	→	GCT CTG CTGAC GGGGG CTC GG	244 – 264
THF39	←	GGT GT CTG CTGCG GGG CTTG	1165 – 1185
THF40	→	CAAG CCC GCG GAGCAGAC ACC	1165 – 1185
THF42	←	ATCGT CCC AGC CT TGAGCCGC	1927 – 1947
THF43	←	ATC AC GGT CATT CT ATT CTC	571 – 591
THF44	→	GAGAA ATAGA ATGAC CGTG AT	571 – 591
THF45	←	CGAGCCGCCAAACCAGCCT	842 – 860
THF46	→	AGG CT GGTTTGGCGG CTC G	842 – 860
THF47	←	CCT CTT CAT CGGT GGGG CAGT	2238 – 2258
THF48	←	CGGAC GCAA AGAAGAC ACT CG	6936 – 6956
THF49	→	CGAGT GT CTT CTT GCGT CCG	6936 – 6956
THF50	→	CGCTT GTT CTGGCT GGAGTT C	7254 – 7274
THF51	→	TAGT ATCCAT CATT TGTC	7608 – 7627
THF52	→	GAGCGGT AAGCCC ATCA AGTG	7934 – 7954
THF54	→	AGG CT CTG CGTT ATT GGC	157 – 174
THF55	←	GGGAGATGCC GTT GCGCT	319 – 335
THF56	←	CGT GCG TCTGAGCGTA ATA AC	217 – 237
THF57	←	ATC CTT CATT CC ACCA TACGG	9003 – 9023
THF58	→	CCG TATGGT GGAATGAAGGAT	9003 – 9023
THF59	→	GAATCCGAATGACGACGCAAC	8615 – 8635
Cy5PE1 ^{b)}	←	ATCTT CGT CCA ACCG CAGG	713 – 732
Cy5PE2 ^{b)}	←	GCTT GTAT CGC TGGG GT A	2343 – 2361
Cy5PE3 ^{b)}	←	CGG TGG AC GCT CGG CT GGAC	5219 – 5338
upr		TGT AAA AC GAC GGG CAGT	universal Primer pUC18
rpr		CAGGAA ACAG CTAT GAC	reverse Primer pUC18
fD1		AGAGTTT GAT CCT GGCT CAG	WEISBURG <i>et al.</i> , 1991
rP2		ACGGCTACCTT GTTACGACTT	WEISBURG <i>et al.</i> , 1991

2.23. NACHWEIS VON NUKLEINSÄUREN DURCH HYBRIDISIERUNG

2.23.1. Herstellung von DIG-markierten Sonden

PCR-Produkte, die als Sonde zur Hybridisierung dienten, wurden mit Hilfe des DIG High Prime (Roche, Mannheim) DIG-11-dUTP markiert. Die Markierung erfolgte nach Anweisung des Herstellers für 20 h bei 37 °C.

Für Hybridisierungsversuche mit Oligonukleotiden wurden 100 pmol Primer eingesetzt. Diese wurden mit dem DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit (Roche, Mannheim) am 3' Ende mit Digoxigenin-ddUTP nach Vorschrift des Herstellers markiert.

2.23.2. Southern-Hybridisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung wurde genutzt, um DNA-Fragmente nach vollständigem Verdau und das Vorhandensein von Plasmid-DNA in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 nachzuweisen.

Transfer der DNA auf Nylonmembran

Die zu analysierende DNA wurde in einer Standard-Agarose-Gelelektrophorese (2.15.1.) oder PFGE (2.15.2.) aufgetrennt. Die anschließende Behandlung des Gels erfolgte unter leichter Bewegung auf einer Laborwippe. Die DNA wurde in 0,25 N HCl 2 × 5 min depuriniert, um den Transfer größerer DNA-Fragmente zu erleichtern. Nach Spülen in H₂O bidest. wurde das Gel für 2 × 15 min mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) und nach Waschen mit H₂O bidest. für 2 × 15 min mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl, 3 M NaCl; pH 7,5) behandelt. Das Gel wurde bis zum Transfer in 10 × SSC (2.14.1.) aufbewahrt. Die Nylonmembran (Qiabrade, Qiagen, Hilden) wurde während des Neutralisierungsschrittes vorbereitet, indem sie 20 min in H₂O bidest. und 10 min in 10 × SSC äquilibriert wurde. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte 1–2 h mit 10 × SSC mit Hilfe des Vakuumblotgerätes (Appligene-Oncor, Heidelberg) bei 60 mbar. Danach wurde die Position des Gels auf der Membran markiert und die DNA durch zweiminütige UV-Bestrahlung (Transilluminator) fixiert. Die Membran wurde direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und bei RT aufbewahrt.

Hybridisierung

Die Hybridisierung der Nylonmembran mit fixierter DNA erfolgte mit Standard-Hybridisierungspuffer ($5 \times$ SSC, 1 % [w/v] Blocking-Reagent [Roche, Mannheim], 0,1 % [w/v] N-Lauroylsarcosin, 0,02 % [w/v] SDS) im Hybridisierungsofen (WTB-Binder, Tuttlingen). Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der DNA. Homologe Hybridisierung mit markiertem PCR-Produkt erfolgte bei 68 °C und mit Oligonukleotid-Sonde ca. 10 °C unter dem Schmelzpunkt des Oligonukleotids. Zur Blockierung unbesetzter Bindestellen wurde die Nylonmembran für mindestens 1 h bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur mit 20 ml Standard-Hybridisierungspuffer ohne Sonde prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde der Puffer gegen 20 ml Hybridisierungspuffer mit der markierten Sonde, die zuvor durch 10 minütiges Kochen denaturiert wurde, ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran 2 × 5 min bei RT mit Waschlösung 1 ($2 \times$ SSC, 0,1 % [w/v] SDS) und 2 × 15 min bei 68 °C mit Waschlösung 2 (0,1 × SSC, 0,1 % [w/v] SDS) gewaschen.

Wiederverwendung von Nylonmembranen

Um Nylonmembranen für weitere Hybridisierungen zu verwenden, mußte die Sonde durch „*stripfen*“ von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die Membran kurz in H₂O bidest. gespült und 2 × 20 min bei 37 °C mit *Stripping*-Puffer (0,2 M NaOH, 0,1 % [w/v] SDS) gewaschen. Die Membran wurde mit 2 × SSC gespült und zwischen Filterpapier getrocknet.

2.23.3. Herstellung von Nylonmembranen zur Koloniehybridisierung

Kolonien von *E. coli* XL1-Blue, die ein rekombinantes Plasmid trugen, wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf Nylonmembran-Rundfiltern (Qiagen, Hilden) ausgestrichen, die auf LB-Platten mit Ampicillin lagen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend für 30 min bei 4 °C gelagert. Nach Markierung der Membran auf der Platte wurde die Membran vorsichtig abgehoben und für 15 min mit den Kolonien nach oben auf ein mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl, 0,1 % [w/v] SDS) getränktes Filterpapier gelegt. Die Membran wurde für 15 min auf ein weiteres Filterpapier mit Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl; pH 7,5) transferiert und anschließend 10 min in 2 × SSC äquilibriert. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Es folgte eine Proteinase K-Behandlung. Dazu wurde eine Proteinase K-Lösung (2 mg/ml in 2 × SSC) auf der Membran verteilt, 1 h bei 37 °C inkubiert und mit H₂O bidest. die Zellreste abgewaschen. Die Membran wurde sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

oder getrocknet. Die Hybridisierung und Wiederverwendung der Membran erfolgte nach 2.23.2..

2.23.4. Northern–Hybridisierung

Mit Hilfe der RNA–DNA–Hybridisierung wurde Aussage über die Induktion von Transkripten in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 und deren Größe getroffen.

Transfer der RNA auf Nylonmembran

Die Gesamt–RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel nach 2.15.3. aufgetrennt. Nach Elektrophorese wurde das Gel 30 min in 20 × SSC äquilibriert. Die Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey–Nagel, Düren) wurde vorbereitet, indem sie 20 min in H₂O bidest. und 10 min in 20 × SSC geschwenkt wurde. Das Blotten der RNA auf die Nylonmembran erfolgte mit Hilfe des Vakuumblotgerätes (Appligene–Oncor, Heidelberg) für 3 h bei 60 mbar. Die RNA wurde anschließend durch Bestrahlung mit UV–Licht (2 min, Transilluminator) mit der Membran vernetzt.

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde High–SDS–Hybridisierungspuffer (7 % [w/v] SDS, 50 % Formamid, 5 × SSC, 2 % [w/v] Blocking–Reagent [Roche, Mannheim], 50 mM Na–Phosphatpuffer; pH 7,0, 0,1 % [w/v] N–Lauroylsarcosin) verwendet. 20 ml des Hybridisierungspuffers wurden zur Prähybridisierung (2–3 h, 50 °C) und 20 ml zur Hybridisierung mit Zusatz von markiertem PCR–Produkt (10 min denaturiert durch Kochen) über Nacht bei 50 °C eingesetzt. Die Membran wurde 2 × 5 min bei RT mit Waschlösung 1 (2 × SSC, 0,1 % [w/v] SDS) und 2 × 15 min bei 68 °C mit Waschlösung 2 (0,5 × SSC, 0,1 % [w/v] SDS) behandelt.

2.23.5. Chemilumineszenz–Nachweis

Der Chemilumineszenz–Nachweis von DNA–Fragmenten und Transkripten erfolgte mit Hilfe des DIG Luminescent Detection Kits (Roche, Mannheim) nach Anweisung des Herstellers. Im Nachweisverfahren wurde CDP–StarTM als Substrat für die Alkalische Phosphatase eingesetzt.

2.24. RNA-ANALYSE

2.24.1. *Primer extension*

Das 5' Ende einer mRNA (Transkriptionsstartpunkt) wurde mit Hilfe der *primer extension*-Reaktion bestimmt. Dabei synthetisiert die Reverse Transkriptase (Superscript™ II, Gibco BRL, Eggenstein) nach Anlagerung eines 3' *antisense*-Primers an die mRNA einen cDNA-Strang, der komplementär zur mRNA ist. Für die *primer extension*-Experimente wurde die Standardmethode nach SAMBROOK *et al.* (1989) an den automatischen A.L.F™ DNA-Sequencer angepaßt (GROßE *et al.*, 1999).

10 µg Gesamt-RNA (DNase I behandelt) aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde mit 20 pmol fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid-Primer gemischt (Gesamtvolumen 12 µl), 10 min bei 70 °C inkubiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Zum Ansatz wurden 4 µl 5 × *first strand*-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 0,5 µl 20 mM dNTP-Lösung pipettiert. Nach 2 minütiger Inkubation bei 50 °C wurde 1 µl Superscript™ II (200 U/µl) zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte 1 h bei 50 °C. Danach wurde die Reaktion durch Inkubation für 5 min bei 95 °C abgestoppt. Zur Konzentrierung der synthetisierten cDNA wurde der Ansatz in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac. SVC, Savant) bis zu einem Volumen von 4 µl eingengegt und 4 µl A.L.F. Stoplösung (2.25.2.) zugegeben.

Die Proben wurden auf einem 7 %igen denaturierenden Sequenziergel des automatisierten A.L.F.™ DNA-Sequencer analysiert (2.25.3.). Die Auswertung der *primer extension*-Reaktion erfolgte durch Zuordnung der Retentionszeit eines entstandenen Peaks zu der Base gleicher Retentionszeit bei einer Sequenzierungsreaktion von DNA mit dem gleichen Oligonukleotid-Primer (2.25.2.). Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ansatz mit Gesamt-RNA von nicht-induzierten Zellen und ein Ansatz ohne Zugabe von Enzym (Abgleich des Hintergrundes) mitgeführt.

2.24.2. *Reverse transcription*-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR wurde das Vorhandensein eines Transkriptes nachgewiesen. Dabei wurde die mRNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch anschließende PCR als doppelsträngige DNA amplifiziert. Im ersten Schritt (cDNA-Synthese) wurde 1–2 µg Gesamt-RNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 mit 10 pmol 3' *antisense*-Primer auf ein Volumen von 10 µl mit H₂O (DEPC, 2.13.1.) gebracht, dieser Ansatz bei 70 °C inkubiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden 2 µl 5 × *first strand*-

Puffer, 1 μ l 0,1 M DTT und 0,5 μ l dNTP-Lösung (20 mM) zugegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 50 °C wurde 0,5 μ l Superscript™ II (200 U/ μ l, Gibco BRL, Eggenstein) zum Ansatz pipettiert. Die cDNA-Synthese erfolgte für 1 h bei 50 °C. Danach schloß sich die PCR nach 2.22. an, bei der als Template 1–2 μ l RT-Ansatz eingesetzt wurde. In Kontrollreaktionen wurde als Template Gesamt-DNA (Positivkontrolle) eingesetzt als auch Gesamt-RNA, um so das Vorhandensein von DNA in der RNA-Präparation auszuschließen (Negativkontrolle).

2.25. DNA-SEQUENZIERUNG

Die DNA-Sequenzierung erfolgte über das Kettenabbruchverfahren nach SANGER *et al.* (1977). Zur Sequenzierung standen zwei Geräte zur Verfügung. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden durch *primer walking* am ABI-Sequencer 377 ermittelt. Die Sequenzierung am A.L.F.™-Sequencer (Pharmacia, Freiburg) erfolgte im Falle der *primer extension*-Versuche.

2.25.1. Sequenzierung am ABI-Sequencer 377

Zur Sequenzierung am ABI-Sequencer 377 wurde der dRhodamine Terminator cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) eingesetzt. Sequenziert wurden sowohl Plasmid-DNA als auch PCR-Produkte. In der Regel wurden 0,2 μ g DNA pro 1 kb Fragmentgröße im Reaktionsansatz eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen und sind der Tab. 5 zu entnehmen.

Reaktionsansatz: \times μ g DNA
8 pmol Primer
4 μ l ABI-Sequencing Mix
ad 20 μ l H₂O bidest.

Die Sequenzierung wurde im Mastercycler™ personal (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in 33 Zyklen.

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 30 s bei 95 °C
annealing: 30 s bei 47–60°C
(in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer)
Extension: 4 min 60 °C

Nach Ablauf des Programms erfolgte eine Ethanolfällung bei RT zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide. Dazu wurde der Ansatz mit 2 μ l 3 M Na-Acetat; pH 5,2 und 60 μ l

96 %igem Ethanol versetzt und zentrifugiert (20 min, 13.000 Upm). Das Pellet wurde mit 0,5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

2.25.2. Sequenzierung am A.L.F.™-Sequencer

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Mastercycler™personal (Eppendorf, Hamburg) mit Hilfe des SequiTherm EXCEL™II Long–Read™Premix DNA Sequencing Kit–ALF™ (Biozym, Oldendorf) nach Herstellervorschrift durchgeführt. Für die Sequenzierung verwendete Primer wurden am 5' Ende Fluorescin–markiert (5'–Cy5–Markierung, Metabion, Martinsried) und sind der Tab. 5 zu entnehmen.

2.25.3. Das Sequenzierungsgel

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden am A.L.F.™DNA–Sequencer in einem 7 %igen denaturierenden Harnstoff–Polyacrylamid–Gel in 1 × TBE als Laufpuffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8,0) aufgetrennt.

Gelzusammensetzung:	18,9 g	Harnstoff, A.L.F. grade (Pharmacia, Freiburg)
	5,5 ml	<i>Long Ranger Gel solution 50 %</i> (FMC BioProducts, Rockland, USA)
	5,0 ml	10 × TBE–Puffer
	ad 45 ml	H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde durch einen Filter der Porengröße 0,2 µm vakuumfiltriert und entgast. Nach Zugabe von 225 µl 10 % APS und 22,5 µl TEMED wurde das Gel gegossen. Die Polymerisation dauerte 1 h.

Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben 3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Laufbedingungen:	Vorlaufzeit:	30 min
		800 V, 45 mA, 30 W, 45 °C
	Laufzeit:	600 min

2.26. AUSWERTUNG DER SEQUENZDATEN

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit den Computerprogrammen Clone 4 (Clone Manager–Version 4.0, Scientific & Educational Software, USA) und Dnasis (Version V5.00). Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS–PROT enthaltenen DNA– und Proteinsequenzen wurden mit dem vom National Center for Biotechnology Information's (NCBI) bereitgestellten Programm Basic Logic Alignment Search Tool (BLAST, ALTSCHUL *et al.*, 1997) ermittelt. Vollständige Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet–Programm CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) durchgeführt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven und die Berechnung des theoretischen Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes eines Proteins wurden mit den Programmen DAS (CSERZO *et al.*, 1997), TMHMM1.0 (SONNHAMMER *et al.*, 1998), SMART (SCHULTZ *et al.*, 1998, SCHULTZ *et al.*, 2000), Compute pi/MW und Scan Prosites des Expasy Molecular Biology Servers (<http://www.expasy.ch>) ermittelt.

2.27. BEZUGSQUELLEN

Alle Standardchemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von Aldrich Chemie (Steinheim), Sigma Chemie (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Fluka Chemie (Neu–Ulm) oder Seva (Heidelberg) und waren vom Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“. Weiterhin lieferten:

Aldrich Chemie (Steinheim): Tetrahydrofuran, 1,4–Butandiol

Biometra (Göttingen): Cellulose–Folie

BioRad (München): TEMED, APS

Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg): SequiTherm EXELTM II Long–ReadTM Premix DNA Sequencing Kit–ALFTM, LMP–Agarose

Fluka Chemie (Neu–Ulm): Cytochrom c, Glycerin, DCPIP, FAD, FMN, 4–Hydroxy–buttersäure

Gerbu (Gaiberg): NADH, NADPH, NAD⁺, NADP⁺, DTT

Gibco BRL (Eggenstein): Primer für PCR, RT–PCR und Sequenzierung, Superscript II

MBI Fermentas (St. Leon–Rot): Restriktionsenzyme, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP), Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder, Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder

Merck (Darmstadt): Benzonase, EDTA, Ferricyanid, Bromphenolblau

Metabion (Martinsried): Fluorescin-markierte Primer für *primer extension*

Millipore (Eschborn): PVDF-Membran, Membranfilterblättchen (Porengröße 0,025 µm)

Peglab Biotechnologie (Erlangen): Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 2 mm)

Perkin-Elmer (Weiterstadt): dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Pharmacia-LKB (Freiburg): Hydrophobe- und Ionenaustauschmaterialien für die Säulenchromatographie, HMW- und LMW-Marker

Promega (Heidelberg): pGEMTM DNA-Marker, pGEMTM-T Easy Vektor

Qiagen (Hilden): Plasmid Midi Kit, RNase A; QIAprep Spin Miniprep Kit, RNeasyTM Mini Kit, QIAquick Gel Extractions Kit, Nylonmembran-Rundfilter,

Roth (Karlsruhe): Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, DEPC, Tris-gesättigtes Phenol, NBT, MOPS, SDS, Proteinase K

Roche (Mannheim): DNase I, DIG-markierte DNA- und RNA-Längenstandards, T4-DNA-Ligase, Taq DNA Polymerase, DIG High Prime, DIG Oligonucleotide 3'End Labeling Kit, Blocking-Reagent, DIG Luminescent Detection Kit

Serva (Heidelberg): Agarose für Standard-Gelektrophorese, Mercaptoethanol, Serva Blau, BSA, Xylencyanol, EGTA

Sigma (Deisenhofen): PES, *Achromobacter* Peptidase aus *Achromobacter lyticus*, Lysozym, Phosphodiesterase I aus *Crotalus atrox*, TSB-Medium, Molekulargewichtsmarker SDS-7, N-Lauroylsarcosin, Succinatsemialdehyd, Riboflavin.

3. ERGEBNISSE

3.1. MESSUNG DER THF-MONOXYGENASE NACH ZELLAUFSCHLUß

Der von KOHLWEYER *et al.* (2000) isolierte Stamm *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 ist in der Lage, auf THF als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Die ersten Untersuchungen zum THF-Abbau wiesen darauf hin, daß es sich beim einleitenden Enzym um eine Monooxygenase handelt, da sowohl in ruhenden als auch in permeabilisierten Zellen ein THF-abhängiger Sauerstoffverbrauch nachweisbar war. Es wurde jedoch festgestellt, daß nach Aufschluß der Zellen im erhaltenen RE keine THF-abhängige Aktivität meßbar war (KOHLWEYER, 2000).

Eine Labilität der Oxygenase-Aktivität wurde für verschiedene Mehrkomponenten-Monooxygenasen beschrieben (POWLOWSKI und SHINGLER, 1990; MIURA und DALTON, 1995; SPALLEK, 1998; GROSSE *et al.*, 1999) und stellte häufig das Hauptproblem bei der Proteinreinigung dar. Beispielsweise konnte im RE aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 erst nach Optimierung des Zellaufschlusses und Enzymtests die Aktivität der Phenol-Hydroxylase verfolgt werden. Es erwies sich als notwendig, den Zellaufschluß in MOPS-Puffer durchzuführen und im Enzymtest Fe^{2+} -Ionen zuzusetzen. Unter Einsatz von Phosphat-Puffer zum Zellaufschluß war dagegen keine Monooxygenase-Aktivität meßbar (POWLOWSKI und SHINGLER, 1990). Da nach KOHLWEYER (2000) die Messung in Phosphat-Puffer erfolgte, wurde als mögliche Ursache für den Aktivitätsverlust die Wahl des Puffersystems in Betracht gezogen. Weiterhin wurde für die Aktivität von Mehrkomponenten-Monooxygenasen im RE häufig ein stabilisierender Effekt unter Zusatz von Glycerin beobachtet. Ohne Zusatz von Glycerin im Aufschlußpuffer wurden in kurzer Zeit hohe Aktivitätsverluste verzeichnet (MIURA und DALTON, 1995; SMALL und ENSIGN, 1997). Ebenfalls wurde eine Sauerstoffempfindlichkeit der THF-Monooxygenase in Betracht gezogen, da eine solche für andere Oxygenasen beschrieben wurde (BÜNZ und COOK, 1993; NGUYEN *et al.*, 1998). Der Nachweis des THF-abhängigen Sauerstoffverbrauchs wurde nach 2.7.3. an der Sauerstoffelektrode durchgeführt. Ein THF-abhängiger Sauerstoffverbrauch konnte trotz Variationen in den Aufschlußbedingungen wie aerober oder anaerober Zellaufschluß mittels French-Pressen oder Ultraschall (2.5.), Zusatz von Glycerin und DTT in verschiedenen Aufschlußpuffern nicht verfolgt werden. Ebenfalls führten verschiedene Konzentrationen von Fe^{2+} als auch von THF im Enzymtest zu keinem Nachweis eines substratabhängigen Sauerstoffverbrauchs im RE. Damit stellte der Verlust

der Monooxygenase-Aktivität mit Aufschluß der Zellen das Hauptproblem dar, die in permeabilisierten Zellen meßbare THF-abhängige Monooxygenase zu reinigen.

3.2. NACHWEIS EINER THF-INDUZIERTEN REDUKTASE

Aus dem dargelegten Grund wurde eine alternative Strategie zur Identifizierung der THF-Monooxygenase entwickelt. Diese ging davon aus, daß die THF-Monooxygenase aus mehreren Komponenten bestehen könnte, u.a. aus einer Reduktase-Komponente.

Um eine THF-induzierte Reduktase zu identifizieren, wurde der RE (2.5.) aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen durch Chromatographie an Q-Sepharose aufgetrennt. Es wurde jeweils die gleiche Menge an Protein auf die Säule aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Reduktaseaktivitäten geprüft, wobei verschiedene künstliche Elektronenakzeptoren eingesetzt wurden (2.7.1.). Die erhaltenen Elutionsprofile der Reduktaseaktivitäten wurden für die REs aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen miteinander verglichen. Setzte man NADH als Elektronendonor und Cytochrom c als Elektronenakzeptor ein (Abb. 2), so eluierte bei einer KCl-Konzentration von 0,2–0,3 M eine NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivität, die sowohl in THF-Zellen als auch in Succinat-Zellen vorhanden war (Abb. 2, Peak A). Für die THF-Zellen konnte eine zweite NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivität identifiziert werden, die bei einer KCl-Konzentration von 0,6–0,75 M eluierte (Abb. 2, Peak B). Da diese Aktivität in Succinat-gewachsenen Zellen nicht nachweisbar war, mußte es sich um ein THF-induziertes Protein handeln. Diese NADH-Cytochrom c-Reduktase war, im Gegensatz zur uninduzierten Reduktaseaktivität, auch ohne Zugabe von Flavin im Enzymtest mit gleicher Aktivität meßbar. Unter Einsatz von NADPH als Elektronendonor und/oder anderen Elektronenakzeptoren (2.7.1.) im Enzymtest konnte keine THF-induzierte Aktivität nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

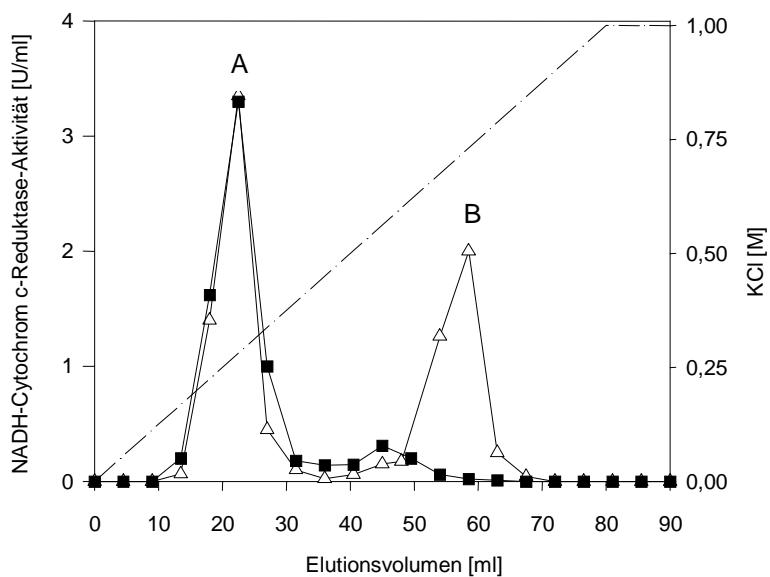


Abbildung 2: Elutionsprofil der NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivitäten im RE von THF- und Succinat-gewachsenen Zellen. (■) RE aus Succinat-gewachsenen Zellen, (Δ) RE aus THF-gewachsenen Zellen.

3.3. REINIGUNG DER NADH-CYTOCHROM C-REDUKTASE

Die Anreicherung der spezifisch durch THF-induzierten NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivität erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Chromatographien an Q-Sepharose, Butylsepharose und Superdex 200 (2.11.). Als Enzymtest diente der in 2.7.1. beschriebene Meßansatz unter Verwendung von Cytochrom c als Elektronenakzeptor. Das in Tab. 6 gezeigte Anreicherungsschema ist repräsentativ für eine mehrfach durchgeführte Enzymreinigung, bei der homogenes Enzym erhalten wurde.

Als Ausgangsmaterial für die Anreicherung der NADH-Cytochrom c-Reduktase dienten 40 g THF-gewachsene Zellen (2.3.). Nach Aufschluß der Zellen mittels French-Pressen (2.5.) wurde der erhaltene RE (880 mg Protein) an Q-Sepharose chromatographiert, um so eine vollständige Trennung der THF-induzierten von der nicht induzierten Reduktaseaktivität zu gewährleisten (3.2.). Der angegebene Anreicherungsfaktor von 1,7 und die Ausbeute von 20 % beziehen sich auf die im RE vorhandene Gesamtaktivität der NADH-Cytochrom c-Reduktasen, so daß die Werte für die THF-induzierte Reduktase höher liegen sollten. Der Q-Sepharosepool wurde mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt (Endkonzentration 1,5 M) und an

Butylsepharose getrennt (Abb. 3). Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linearen Salzgradienten von 1,5–0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Reduktaseaktivität eluierte ab 0,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis in den anschließenden Waschschnitt mit 50 mM Tris/HCl; pH 7,5. Nach Vereinigung der aktiven Fraktionen wurde die Enzimlösung auf 2 ml eingeengt (2.8.) und an Superdex 200 aufgetrennt (Abb. 4). Die aktiven Fraktionen wurden im SDS–Gel auf ihre Reinheit analysiert. Die NADH–Cytochrom c–Reduktase konnte mittels der beschriebenen Anreicherung bis zur Homogenität gereinigt werden. Abb. 5 zeigt das reine Protein nach Trennung durch SDS–PAGE. Anhand des Molekulargewichtsmarkers konnte im SDS–Gel ein Molekulargewicht von 46 kDa ermittelt werden.

Tabelle 6: Anreicherungsschema für die THF–induzierte NADH–Cytochrom c–Reduktase.

Verfahren	Gesamt-einheiten [U]	Gesamt-protein [mg]	spezif. Aktivität [U/mg]	Aus-beute [%]	Anreicherungs-faktor
RE	512	880	1,7	100	1
Q-Sepharose	104	35	2,97	20	1,7
Butylsepharose	18	7,6	2,4	3,5	1,4
Superdex 200	9,2	5,6	1,6	1,8	1

Die NADH–Cytochrom c–Reduktase erwies sich während der Aufreinigung als sehr instabil, was ein zügiges Arbeiten erforderte. Die Instabilität des Enzyms machte sich nicht nur während der Reinigung, sondern auch zwischen den Reinigungsstufen bemerkbar. Es zeigte sich, daß die zwischenzeitliche Lagerung der Proteinlösung bei 4 °C nicht so hohe Aktivitätsverluste brachte wie das Einfrieren bei –20 °C. Negativ auf die Aktivität wirkte sich vor allem ein mehrmaliges Einfrieren und Auftauen aus. Zur längeren Lagerung wurde die homogene NADH–Cytochrom c–Reduktase in Aliquots bei –20 °C eingefroren und zeigte sich dann relativ stabil (nach einem Jahr noch 30 % der Aktivität). Versuche zur Stabilisierung der Enzymaktivität wurden nicht durchgeführt, da das Ziel der Arbeiten hauptsächlich in der Reinigung der Reduktase zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz bestand. Die Labilität der NADH–Cytochrom c–Reduktaseaktivität ist aus dem erhaltenen Anreicherungsfaktor von 1 ersichtlich, der sich jedoch nur unwesentlich erhöht, wenn man berücksichtigt, daß die initiale Aktivität der THF–induzierten Reduktase geringer gewesen sein sollte als in Tab. 6 für den RE angegeben.

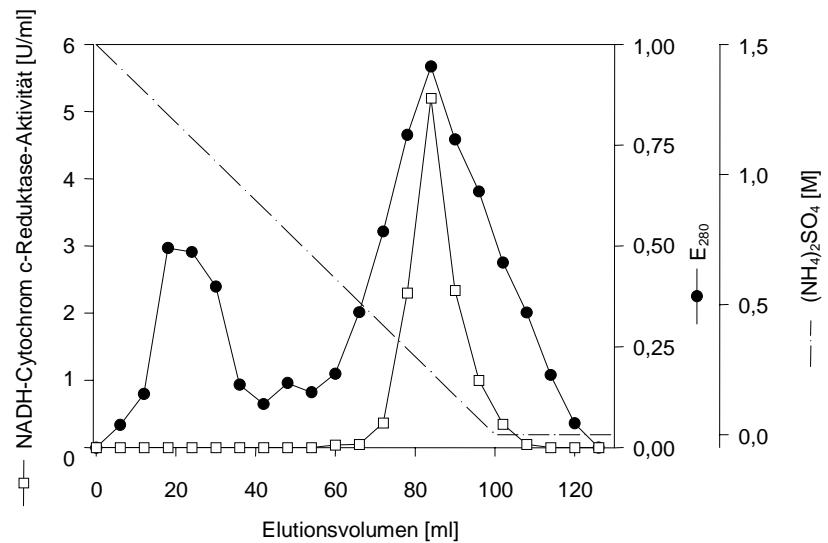


Abbildung 3: Chromatographie der NADH-Cytochrom c-Reduktase an Butylsepharose.

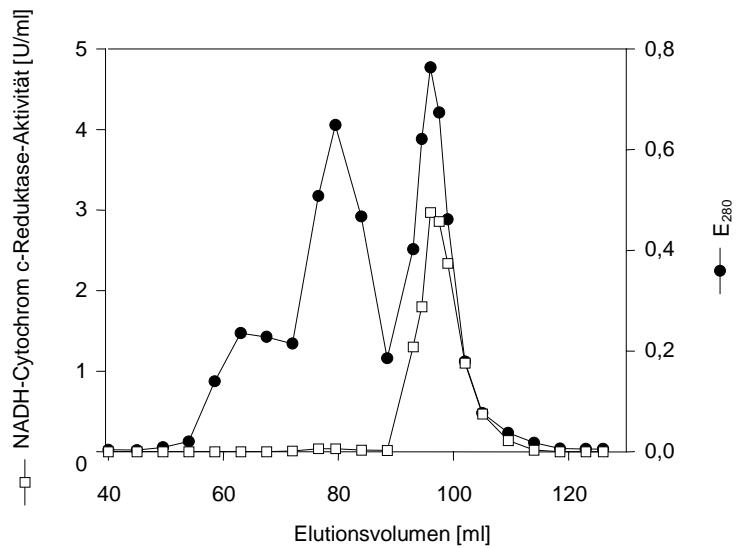


Abbildung 4: Chromatographie der NADH-Cytochrom c-Reduktase an Superdex 200.

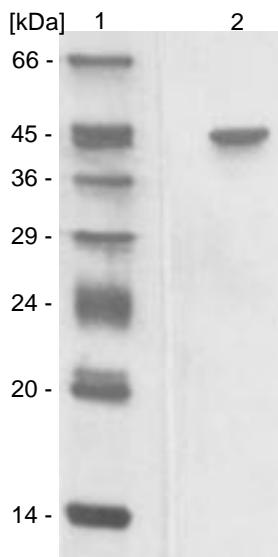


Abbildung 5: SDS-PAGE der homogenen NADH-Cytochrom c-Reduktase. (1) Marker, (2) NADH-Cytochrom c-Reduktase.

3.4. CHARAKTERISIERUNG DER NADH-CYTOCHROM C-REDUKTASE

3.4.1. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die homogene NADH-Cytochrom c-Reduktase wurde N-terminal ansequenziert (2.12.4.). Die erhaltene Aminosäuresequenz ist in Abb. 6 wiedergegeben. Die 16. Aminosäure konnte nicht genau zugeordnet werden und ist deshalb mit einem Fragezeichen versehen. Ein Vergleich der erhaltenen Aminosäuresequenz mit Daten der Genbanken ergab, daß diese eine hohe Homologie zu verschiedenen Reduktase-Komponenten von Mehrkomponenten-Monooxygenasen aufwies (Abb. 6). Auffallend war, daß diese Reduktase-Komponenten alle zu den löslichen Mehrkomponenten-Monooxygenasen gehören, die die Katalyse an einem binuklearen Eisenzentrum durchführen. Diese Mehrkomponenten-Monooxygenasen werden im folgenden als MMOs bezeichnet. Die höchste Homologie (56,7 % Identität) bestand zur Reduktase-Komponente der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* Stamm H (HERRMANN *et al.*, 1995), die die Hydroxylierung von Phenol zu Catechol katalysiert.

NADH-Cytochrom c-	?
Reduktase	G T F N V R F E P I G E E I E S G E D E T I L D A A F R S G
PhlF	M T Y N V T I E P T G E I I E V E E G Q T I L Q A A L R Q G
DmpP	M S Y N V T I E P T G E V I E V E D G Q T I L Q A A L R Q G
DsoF	M S Y Q V T I E P A G T I I Q V E E D Q T I L D A A L R Q G
AmoD	M T T I N V - - Q P F S H E Y S C E D G E S L L D G A L R N S

Abbildung 6: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz der NADH–Cytochrom c–Reduktase mit den entsprechenden Sequenzen der Reduktase–Komponente verschiedener MMOs. PhlF: Phenol–Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* Stamm H (HERRMANN *et al.*, 1995); DmpP: Phenol–Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990); DsoF: Dimethylsulfid–Monooxygenase aus *Acinetobacter* sp. Stamm 20B (HORINOUCHI *et al.*, 1997); AmoD: Alken–Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B–276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994). Mit Fragezeichen versehen ist das Serin der NADH–Cytochrom c–Reduktase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1, das nicht genau bestimmt werden konnte.

Die bestehenden Homologien des N–Terminus der THF–induzierten NADH–Cytochrom c–Reduktase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zu den Reduktasen verschiedener Mehrkomponenten–Monooxygenasen deuteten darauf hin, daß diese Reduktase ebenfalls eine Komponente einer Mehrkomponenten–Monooxygenase sein könnte, die zur Gruppe der MMOs gehört. Der eindeutige Nachweis sollte durch molekularbiologische Untersuchungen erfolgen, indem das Gen der NADH–Cytochrom c–Reduktase und die davon stromaufwärts und stromabwärts liegenden DNA–Bereiche analysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Kapitel 3.5. beschrieben. Die proteinchemische Reinigung von weiteren möglichen Komponenten einer Monooxygenase war nicht möglich, da keine THF–abhängige Monooxygenase–Aktivität im RE meßbar war und sich für weitere mögliche Komponenten einer Mehrkomponenten–Monooxygenase kein individuelles Testsystem anbot.

3.4.2. Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht der NADH–Cytochrom c–Reduktase wurde unter denaturierenden Bedingungen im SDS–Gel (Abb. 5) auf 46 kDa bestimmt. Die massenspektrometrische Analyse ergab eine Größe von 40,17 kDa. Mit Hilfe der Gelfiltration an Superdex 200 konnte anhand einer erstellten Eichkurve ein Molekulargewicht unter nativen Bedingungen von 40 kDa ermittelt werden. Dies wies auf eine monomere Struktur des Enzyms hin.

Das Molekulargewicht von 40 kDa und die monomere Struktur der NADH–Cytochrom c–Reduktase stehen in Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der in Abb. 6 genannten Reduktasen von MMOs.

3.4.3. Kofaktoren der NADH–Cytochrom c–Reduktase

Um Hinweise auf mögliche Kofaktoren der NADH–Cytochrom c–Reduktase zu erhalten, wurde ein Absorptionsspektrum des nativen Enzyms im Bereich von 300–600 nm aufgenommen (Abb. 7). Das Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 337, 418 und 457 nm sowie eine Schulter bei 550 nm. Diese spektralen Eigenschaften sind ähnlich den der Reduktase–Komponente von anderen MMOs, der Alken–Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B–276 (Umbenennung von *Nocardia corallina* B–276) (MIURA und DALTON, 1995), der Phenol–Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (POWLOWSKI und SHINGLER, 1990) und der Methan–Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (COLBY und DALTON, 1978) und aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (FOX *et al.*, 1989). Für diese Reduktase–Komponenten wurden als Kofaktoren ein Flavin und ein [2Fe–2S]–Cluster beschrieben. Das Absorptionsmaximum bei 457 nm der nativen NADH–Cytochrom c–Reduktase war ein Hinweis auf die Anwesenheit eines Flavins (MIURA und DALTON, 1995; PESSIONE *et al.*, 1999). In Abb. 7 ist weiterhin das Absorptionsspektrum der NADH–Cytochrom c–Reduktase nach Denaturierung (10 min Kochen) und anschließender Resuspendierung in 1 % SDS gezeigt. Dieses stellt ein Flavin–Spektrum dar, das jedoch zu kürzeren Wellenlängen verschoben ist. Unter diesen Bedingungen wurde also nur das [2Fe–2S]–Cluster und nicht der Flavin–Kofaktor abgetrennt. Diese Beobachtung deutete auf eine kovalente Bindung des Flavin–Kofaktors hin, was in weiteren Versuchen bestätigt werden konnte. So war es möglich, das Spektrum des [2Fe–2S]–Clusters darzustellen (Abb. 7, als Insert), wobei das Spektrum der denaturierten NADH–Cytochrom c–Reduktase, das – wie schon erwähnt – zu kürzeren Wellenlängen verschoben war, um den Blaushift korrigiert wurde. Das resultierende Differenzspektrum von nativem und denaturiertem Enzym ergab Absorptionsmaxima bei 337, 412, 470 und 535 nm, die charakteristisch für ein [2Fe–2S]–Cluster sind (PALMER, 1975).

Zur Bestimmung der Emissions– und Exzitationsmaxima der NADH–Cytochrom c–Reduktase wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abb. 8). Die Aufnahme des Emissionsspektrums erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 450 nm und zeigte ein Maximum bei 520 nm. Die Exzitationsmaxima wurden bei einer konstanten Emissionswellenlänge von 530 nm auf 375 und 449 nm bestimmt. Diese Fluoreszenzeigenschaften sind typisch für Flavine (COLBY und DALTON, 1978; NAKAYAMA *et al.*, 2000).

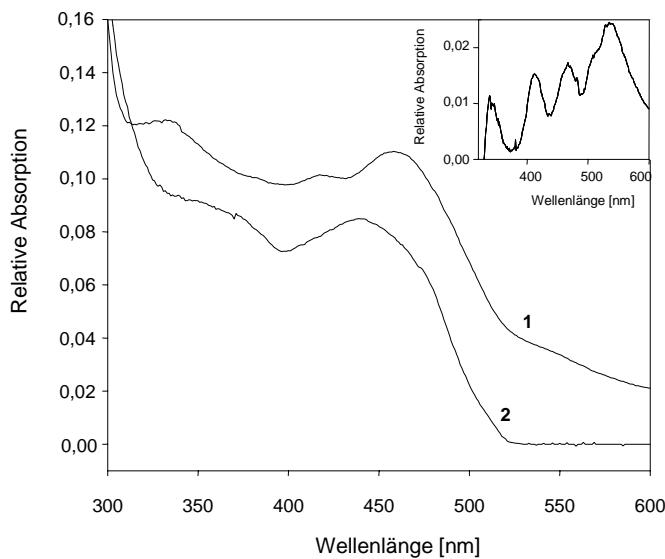


Abbildung 7: **Absorptionsspektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase.** (1) Spektrum der nativen NADH-Cytochrom c-Reduktase; (2) Spektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase nach 10 min Kochen und anschließender Resuspension in 1 % SDS; Insert: Differenzspektrum von nativem und denaturiertem Enzym. Das Spektrum des denaturierten Enzyms wurde um den Blaushift korrigiert.

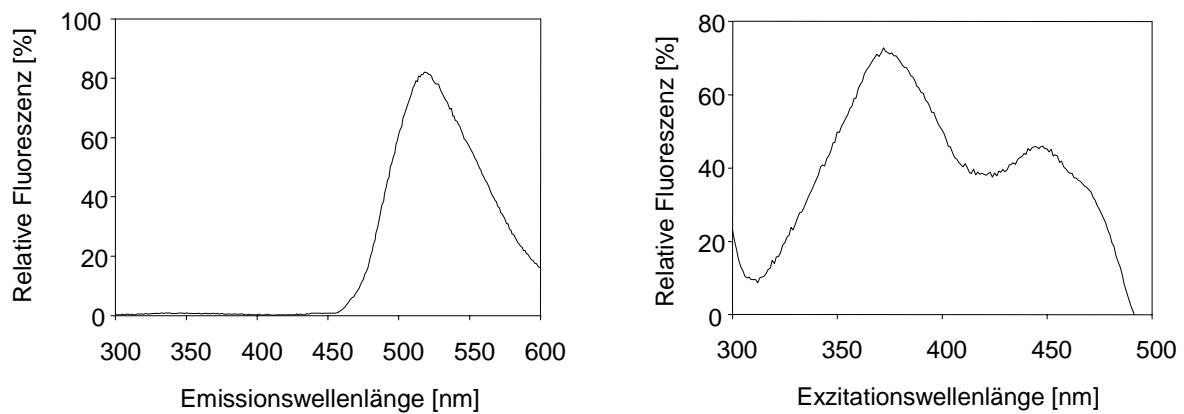


Abbildung 8: **Emissions- und Exzitationsspektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase.**

Da das UV/VIS-Spektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase auf das Vorhandensein eines [2Fe–2S]-Clusters und eines Flavins deutete, wurde eine Eisen- und Flavinbestimmung durchgeführt. Die Eisenbestimmung erfolgte nach 2.12.2.. Als Referenzproteinlösung wurde Cytochrom c (1 mol Fe/mol Protein) in gleicher Molarität (0,925 µM) und im gleichen Puffer eingesetzt. Es zeigte sich, daß der Eisengehalt der NADH-Cytochrom c-Reduktase dem

des Referenzproteins entsprach, das heißt 1 mol Fe/mol Enzym. Dieser Wert spiegelt die Labilität des [2Fe–2S]–Clusters wieder, die ein Grund für den Aktivitätsverlust der NADH–Cytochrom c–Reduktase während der Proteinreinigung sein kann. Während der Anreicherung wurden auch Enzympräparationen mit homogenem Protein erhalten, die keine Aktivität besaßen und ihr [2Fe–2S]–Cluster vollständig verloren hatten. Das Spektrum dieser Enzympräparationen entsprach dem eines Flavins mit Maxima bei 384 nm und 452 nm.

Die Tatsache, daß sich das Flavin unter denaturierenden Bedingungen nicht vom Protein trennen ließ, war ein klarer Hinweis darauf, daß es kovalent gebunden ist. Eine kovalente Bindung des Flavins in der Reduktase–Komponente einer Monooxygenase wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben (COLBY und DALTON, 1978; POWLOWSKI und SHINGLER, 1990; MEWIES *et al.*, 1998; PESSIONE *et al.*, 1999). Eine weitere Charakterisierung des Flavins und dessen Bindung an das Enzym ist im folgenden Kapitel 3.4.4. beschrieben.

3.4.4. Untersuchungen zum kovalent–gebundenen Flavin der NADH–Cytochrom c–Reduktase

Neben den dargestellten Ergebnissen deuteten auch enzymatische Untersuchungen auf eine kovalente Bindung des Flavins hin, da der Zusatz von Flavin im Enzymtest keinen Einfluß auf die Aktivität hatte. Eine Quantifizierung des Flavins (2.12.3.) bestätigte, daß in jeder Enzympräparation konstant 1 mol Flavin/mol Reduktase gebunden war und somit kein Verlust des Flavin–Kofaktors während der Aufreinigung zu verzeichnen war, ganz im Gegensatz zum Fe/S–Cluster (s.o.).

Zum Nachweis der kovalenten Bindung des Flavin–Kofaktors wurde unter anderem die klassische Methode der Trichloressigsäure–Fällung angewendet (SINGER und McINTIRE, 1984). Es zeigte sich, daß auch durch Behandlung des Enzyms mit Trichloressigsäure und durch anschließendes Kochen keine Abtrennung des Flavins vom Protein bewirkt werden konnte. Damit wurde eindeutig gezeigt, daß der Flavin–Kofaktor kovalent gebunden ist. Zusätzlich wurde die kovalente Bindung unter denaturierenden Bedingungen im SDS–Gel analysiert. Nach SDS–PAGE des homogenen Enzyms wurde das erhaltene Gel bei einer Exzitationswellenlänge von 473 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm auf Fluoreszenz gescannt (2.12.3.). Eine Exzitationswellenlänge von 473 nm mußte gewählt werden, da das verfügbare Gerät keine Anregung im näheren Bereich um das Exzitationsmaximum von 449 nm zuließ. Laut Exzitationsspektrum (Abb. 8) sollte jedoch eine Anregung bei 473 nm ausreichen, um eine Fluoreszenz nachzuweisen. In Abb. 9 B ist die erhaltene Fluoreszenz nach Auf trennung der NADH–Cytochrom c–Reduktase im SDS–Gel

wiedergegeben. Die NADH–Cytochrom c–Reduktase ist deutlich als fluoreszierende Bande sichtbar. Zum Vergleich ist in Abb. 9 A das gleiche Gel nach Anfärbung mit Coomassie Blue gezeigt. Der aufgetragene Proteinmarker diente neben der Funktion als Größenstandard auch als Kontrolle für die Spezifität des Fluoreszenzsignals. Die Fluoreszenz der NADH–Cytochrom c–Reduktase nach Auftrennung im SDS–Gel bestätigte die kovalente Bindung des Flavins an das Protein.

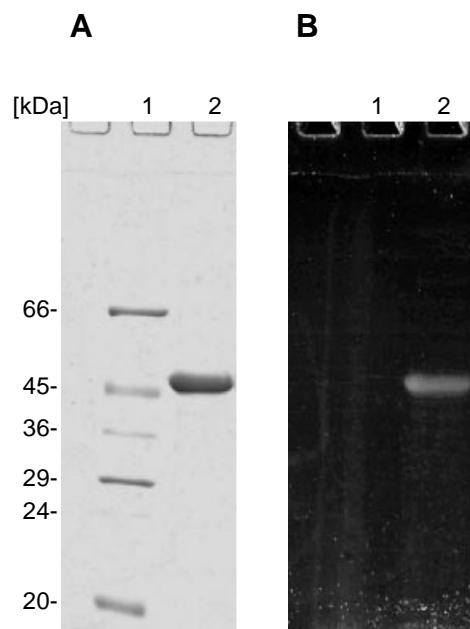


Abbildung 9: Nachweis des kovalent-gebundenen Flavins der NADH–Cytochrom c–Reduktase nach SDS–PAGE. (1) Marker, (2) NADH–Cytochrom c–Reduktase; **A** Gel mit Coomassie Blue gefärbt, **B** zur Fluoreszenz angeregtes SDS–Gel.

In weiteren Untersuchungen wurde die Art des Flavins und seine Bindung an das Enzym charakterisiert. Die Bestimmung der Art des Flavins wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bei einer Exzitationswellenlänge von 445 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt (2.12.3.). Als Referenzlösungen wurden FAD, FMN und Riboflavin gleicher Molarität eingesetzt. Für die NADH–Cytochrom c–Reduktase wurde eine relative Fluoreszenz bestimmt, die dem Wert des FAD's entspricht. FMN und Riboflavin zeigten dagegen eine 3-fach höhere Fluoreszenz. Nach Phosphodiesterase–Behandlung der NADH–Cytochrom c–Reduktase und FAD erhöhte sich auch deren relative Fluoreszenz auf den Wert von FMN und Riboflavin. Dieses Ergebnis zeigte, daß das Flavin der NADH–Cytochrom c–Reduktase als FAD vorliegt, welches durch Spaltung der Phosphodiester–Bindung zu FMN umgesetzt wird, was dann eine Erhöhung der Fluoreszenz auf das FMN–

Level bewirkt. Die NADH–Cytochrom c–Reduktase enthält somit als Kofaktor ein kovalent–gebundenes FAD.

Die weiteren Untersuchungen zum kovalent–gebundenen FAD der NADH–Cytochrom c–Reduktase sollten Aufschluß über die Art der Bindung an das Enzym geben. Bisher wurde eine kovalente Bindung an die Aminosäure–Reste Histidin, Cystein, Tyrosin (MEWIES *et al.*, 1998) und Threonin (NAKAYAMA *et al.*, 2000) beschrieben. Bezuglich des Flavins wurden zwei Positionen des Isoalloxazinringes beschrieben, über die eine Bindung am Aminosäure–Rest erfolgen kann. Man unterscheidet deshalb 8 α –substituiertes Flavin (His[N₁]–8 α –Flavin, His[N₃]–8 α –Flavin, Cys[S]–8 α –Flavin, Tyr[O]–8 α –Flavin) und 6 α –substituiertes Flavin (Cys[S]–6 α –Flavin). Ein Cys(S)–6 α –Flavin kann schon aufgrund seines ungewöhnlichen UV/VIS–Spektrums identifiziert werden (SINGER und EDMONDSON, 1980). In Abb. 10 ist das Absorptionsspektrum der NADH–Cytochrom c–Reduktase (ohne [2Fe–2S]–Cluster) unter nativen Bedingungen und mit Zusatz von SDS dargestellt. Die native NADH–Cytochrom c–Reduktase (ohne [2Fe–2S]–Cluster) zeigt ein typisches Flavinspektrum für 8 α –substituierte Flavine mit zwei Absorptionsmaxima (384 nm und 452 nm). Für ein Cys(S)–6 α –Flavin erwartet man dagegen nur ein Absorptionsmaximum bei 437 nm (DECKER und BRANDSCH, 1997). Mit Zugabe von SDS wurde eine spektrale Verschiebung der Absorptionsmaxima zu kürzeren Wellenlängen beobachtet (Abb. 10). Diese hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima ist charakteristisch für 8 α –substituierte Flavine (EDMONDSON *et al.*, 1978). Kontrollansätze mit freiem Flavin zeigten keine Blauverschiebung der Absorptionsmaxima unter den gewählten Bedingungen. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die NADH–Cytochrom c–Reduktase ein kovalent–gebundenes FAD enthält, welches über die 8 α –Position des Isoalloxazinringes an das Protein gebunden ist.

Der Aminosäurerest über den das Flavin kovalent mit dem Protein verknüpft ist, kann durch Peptid–Mapping bestimmt werden (DECKER und BRANDSCH, 1997; NAKAYAMA *et al.*, 2000). Zur Entsalzung und Entfernung von eventuell vorhandenen Fremdproteinen wurde die homogene Reduktase–Präparation an einer *Reversed phase*–Säule chromatographiert. Es zeigte sich jedoch, daß das Protein an dem verwendeten Säulenmaterial extrem stark band und nur unter sehr drastischen Bedingungen eluiert werden konnte. Dadurch kam es zu einem Verlust von 90 % des eingesetzten Proteins. Dieser Effekt kann in erster Linie auf eine starke Aggregatbildung zurückgeführt werden (RÜCKNAGEL, persönliche Mitteilung), die ebenfalls unter nativen Bedingungen im Gradientengel beobachtet wurde. Aus diesem Grund war es nicht möglich, ein Peptid–Mapping durchzuführen.

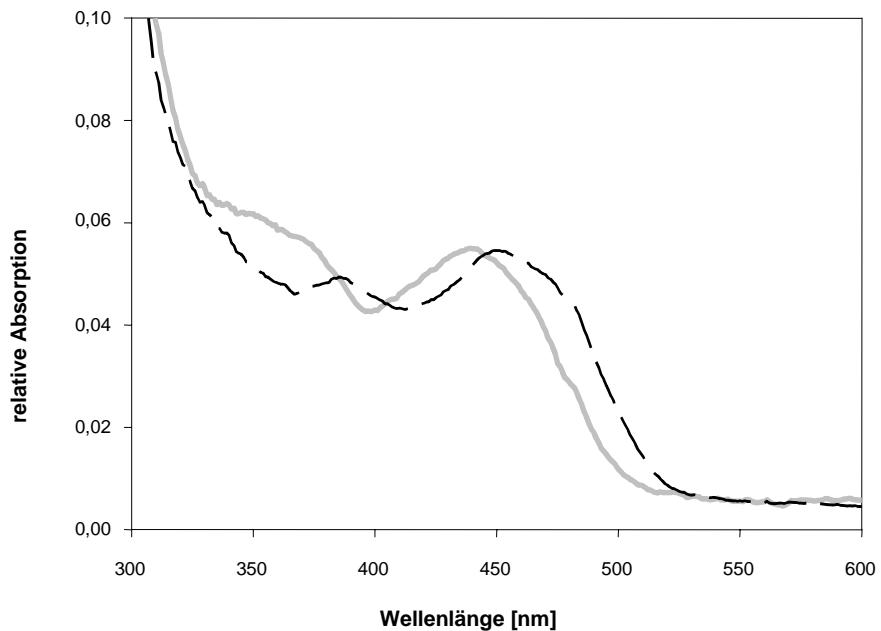


Abbildung 10: Spektrale Verschiebung des Flavinspektrums nach Zugabe von SDS. (—) Spektrum der nativen NADH–Cytochrom c–Reduktase (ohne [2Fe–2S]–Cluster), (—) Spektrum der NADH–Cytochrom c–Reduktase nach Zusatz von 0,5 % [w/v] SDS.

3.5. KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER GENE DER THF–MONOOXYGENASE

3.5.1. Klonierungsstrategie

Der N-Terminus der THF-induzierten NADH–Cytochrom c–Reduktase wies die höchsten Identitäten zu Reduktase–Komponenten verschiedener MMOs auf. Dies deutete darauf hin, daß die NADH–Cytochrom c–Reduktase eine Komponente einer Mehrkomponenten–Monooxygenase ist, die durch THF induziert wird. Um Informationen über weitere Komponenten dieser Monooxygenase zu erhalten, wurde zunächst das Gen der Reduktase und anschließend die stromaufwärts und stromabwärts lokalisierten Regionen analysiert. Den Ausgangspunkt stellte der N-Terminus der NADH–Cytochrom c–Reduktase dar, aus dem ein degeneriertes Oligonukleotid abgeleitet wurde. Dieses sollte als Primer für die PCR eingesetzt werden, um so ein spezifisches DNA–Fragment zu amplifizieren. Dazu war es zunächst erforderlich, eine Plasmid–Genbank der Gesamt–DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 herzustellen, um so einen zweiten, plasmidkodierten Primer zur Amplifikation zur Verfügung zu haben.

3.5.2. Erstellen einer Plasmid– Genbank von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1

Zur Herstellung der vollständigen Genbank aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde Gesamt–DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* partiell verdaut, so daß DNA–Fragmente von 3,0–4,5 kb erhalten wurden. Die DNA–Fragmente dieses Größenbereiches wurden gereinigt und in den *BamHI* gespalteten, dephosphorylierten Vektor pUC18 ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* XL1–Blue und Selektion der rekombinanten Klone mit Hilfe des X–Gal–Tests wurden 50 Platten mit jeweils 96 Klonen angelegt. Nach Wachstum der Zellen wurde das Koloniematerial jeder Platte separat mit NB–Medium abgeschwemmt und zur Plasmid–Isolierung nach 2.14.2.2. eingesetzt. Die erhaltene *Sau3A*–Genbank bestand somit aus 50 Plasmid–Poolen. Zur Überprüfung der Größe der Plasmid–Inserts wurde von 20 Klonen das Plasmid isoliert und durch Restriktionsverdau linearisiert. Es konnte eine durchschnittliche Insertgröße von 4 kb ermittelt werden.

3.5.3. Identifizierung und Isolierung des für die NADH–Cytochrom c–Reduktase kodierenden Gens

Aus dem N–Terminus der NADH–Cytochrom c–Reduktase wurde der degenerierte Primer THF01 abgeleitet (Abb. 11). Dazu wurde die Sequenz in die möglichen mRNAs umgeschrieben und ein Bereich von Aminosäuren ausgewählt, der eine geringe Anzahl an möglichen Codons besaß. In dem abgeleiteten Primer wurde die dritte Position des Codons „gewobbelt“ bzw. mit Desoxyinosin (I) besetzt. Für die Aminosäure Serin wurde aufgrund der „codon usage“ von Streptomyzeten das Triplet TCI verwendet.

Position	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Aminosäuresequenz	Glu	Glu	Ile	Glu	Ser	Gly	Glu	Asp	Glu	Thr
mRNA	GAA	GAA	AUU	GAA	UCU	GGU	GAA	GAU	GAA	ACU
	G	G	C	G	C	C	G	C	G	C
			A		A	A				A
					G	G				G
						AGU				
						G				
Primer THF01 5'										AC 3'

Abbildung 11: Ableitung eines degenerierten Oligonukleotids aus der N–terminalen Aminosäuresequenz der NADH–Cytochrom c–Reduktase. Der Einsatz von Desoxyinosin ist mit I, von A+G mit R, von T+C mit Y und von T+C+A mit H gekennzeichnet.

Zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes aus der *Sau3A*-Genbank wurde das Oligonukleotid-Gemisch und jeweils ein plasmidkodierter Primer (Primer upr bzw. rpr, Tab. 5) zur PCR eingesetzt. Als Template-DNA diente der Gesamt-Plasmid-Pool (alle 50 Plasmid-Poole vereinigt). Mit der Kombination der Primer THF01 und dem plasmidkodierten upr konnte ein DNA-Fragment THF01-upr mit einer Größe von etwa 1,4 kb erhalten werden. Dieses wurde in den pGEMTM-T Easy Vektor ligiert, das Plasmid in *E. coli* XL1-Blue transformiert und das Plasmid-Insert sequenziert. Durch den Vergleich der erhaltenen Sequenz mit Datenbanken zeigte sich, daß das amplifizierte PCR-Fragment die vollständige NADH-Cytochrom c-Reduktase sowie den N-Terminus einer weiteren Komponente von MMOs, der β -Untereinheit der Oxygenase kodierte. Da die β -Untereinheit nicht vollständig auf dem PCR-Produkt kodiert war, stand fest, daß eine Anschlußsequenz notwendig war. Aus diesem Grund wurde aus der Nukleinsäuresequenz der β -Untereinheit ein Primer THF02 (Tab. 5) abgeleitet. Mittels PCR unter Verwendung des Gesamt-Plasmid-Poolen und der Primer THF02 und rpr konnte ein DNA-Fragment (THF02-rpr) amplifiziert werden, das im Agarosegel etwa einer Größe von 3,3 kb entsprach. Auch dieses konnte als spezifisch identifiziert werden, da sich nach Sequenzanalyse zeigte, daß dieses für den fehlenden Teil der β -Untereinheit kodierte. Die weitere Sequenzierung des PCR-Fragmentes mit dem Primer rpr ergab eine Sequenz, die nach Datenbankanalyse signifikante Homologien zu verschiedenen Aldehyd-Dehydrogenasen aufwies, d.h., das entsprechende Gen gehört nicht mehr zur Monooxygenase. Das Screenen der Genbank nach den entsprechenden Plasmiden, die die beschriebenen PCR-Fragmente ergaben, erfolgte mittels PCR und Koloniehybridisierung (Sonde: Primer THF02 DIG-markiert). Die isolierten Plasmide wurden mit pBT53 (Plasmid-Insert: 4054 bp) und pBT50 (Plasmid-Insert: 4259 bp) bezeichnet. Eine Kartierung der erhaltenen PCR-Produkte (ohne vektorkodierten Bereich), der Plasmid-Inserts und die Position der zur PCR eingesetzten Primer ist in Abb. 12 dargestellt.

3.5.4. Identifizierung der für die THF-induzierte Monooxygenase kodierenden Strukturgene *thmADBC*

Die in den Plasmiden pBT53 und pBT50 enthaltene DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurden mittels „primer walking“ unter Verwendung der in Tab. 5 angegebenen Primer sequenziert. Die Absicherung der Sequenzdaten erfolgte durch mehrfache Sequenzierung der komplementären DNA-Stränge. Nach Sequenzierung und Analyse der Inserts der Plasmide pBT53 und pBT50 konnten vier offene Leserahmen (ORFs) nachgewiesen werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen signifikante Homologien zu verschiedenen Komponenten von MMOs zeigten, zur α - und β -Untereinheit der Oxygenase, zur Reduktase und zum Kopplungsprotein. Die den ORFs entsprechenden Gene wurden mit *thmADBC* bezeichnet. Die Anordnung der Gene und deren Lokalisation auf den Plasmid-Inserts sind schematisch in Abb. 12 dargestellt. Die erhaltene DNA-Sequenz der *thm*-Gene und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abb. A, Anhang wiedergegeben. Die Identitäten und Ähnlichkeiten von ThmADBC zu den Komponenten von MMOs sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Die höchsten Sequenzidentitäten bestehen zu den Komponenten der Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276, die ebenfalls durch vier Gene kodiert ist (SAEKI und FURUHASHI, 1994).

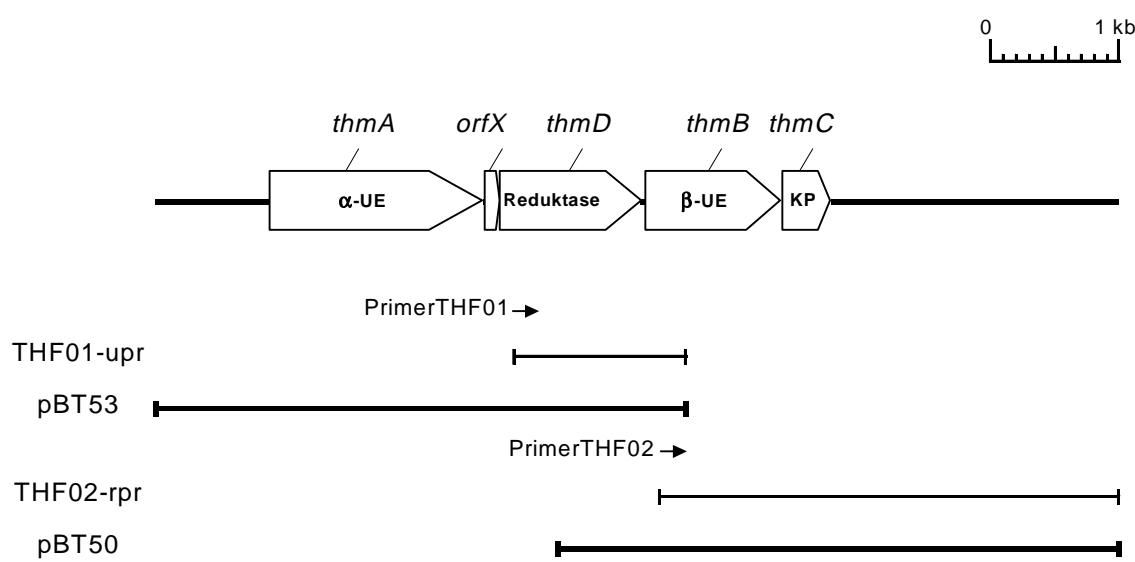


Abbildung 121: Anordnung der Strukturgene *thmADBC* und deren Lokalisation auf den PCR-Produkten THF01-upr, THF02-rpr (ohne vektorkodierten Bereich) und auf den Plasmid-Inserten pBT53, pBT50 sowie die Position der abgeleiteten Primer THF01 und Primer THF02.

Tabelle 7: **Homologien der aus *thmADBC* abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu den Komponenten von MMOs.** Amo: Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994); Dmp: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990); Mmo: Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990); (–) keine signifikante Homologie.

Mehrkomponenten-Monooxygenase	Identität / Ähnlichkeit [%]			
	ThmA	ThmB	ThmC	ThmD
Amo ABCD	34/53 (C)	28/49 (A)	21/42 (B)	37/53 (D)
Dmp KLMNOP	24/41 (N)	26/42 (L)	–	33/52 (P)
Mmo XYBZC	30/48 (X)	27/44 (Y)	–	34/53 (C)

ThmA besteht aus 1638 Nukleotiden (Position: 2235–3872 bp in Abb. A, Anhang), und *ThmA* zeigte die höchsten Homologien zur α -Untereinheit der Oxygenase-Komponente verschiedener MMOs. Stromaufwärts des Translationsstartcodons ATG wurde als mögliche Ribosomenbindestelle AAGG identifiziert (SHINE und DALGARNO, 1974). Als weiterer möglicher Translationsstartpunkt wurde das 12 bp stromabwärts gelegene ATG-Codon in Betracht gezogen, wurde später jedoch ausgeschlossen, da stromaufwärts dieses Codons keine purinreiche Sequenz als mögliche Ribosomenbindestelle vorlag. Eine Homologie zur Konsensus-Sequenz eines bekannten Promotors war aus der DNA-Sequenz stromaufwärts von *thmA* nicht ersichtlich. Das Gen *thmB* umfaßt 1041 Nukleotide (Position: 5108–6148 bp in Abb. A, Anhang) und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Homologien zur β -Untereinheit von verschiedenen MMOs. Die Nukleinsäuresequenz AGGAG stromaufwärts des Translationsstartpunktes könnte eine putative Ribosomenbindestelle darstellen. Das Stopcodon von *thmB* TGA überlappt mit dem Startcodon ATG von *thmC*. *ThmC* ist ein ORF aus 354 Nukleotiden (Position: 6148–6501 bp in Abb. A, Anhang), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine 21 %ige Identität und 42 %ige Ähnlichkeit zum Kopplungsprotein der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 aufweist (SAEKI und FURUHASHI, 1994). Als mögliche Ribosomenbindestelle könnte die Sequenz GAGG fungieren. *ThmD* ist das für die NADH-Cytochrom c-Reduktase kodierende Gen (Position: 3995–5077 bp in Abb. A, Anhang). Vor dem Startcodon von *thmD* findet man als mögliche Ribosomenbindestelle die Sequenz GAAGG. Die vom Gen *thmD* kodierte Aminosäuresequenz entspricht am N-Terminus der zuvor mittels Edman-Abbau erhaltenen Aminosäuresequenz der NADH-Cytochrom c-Reduktase. Der Vergleich zeigte weiterhin, daß die native NADH-Cytochrom c-Reduktase am N-Terminus kein Methionin aufwies, was auf eine

posttranskriptionale Modifikation deutet. Stromaufwärts der Reduktase-Komponente wurde ein weiterer möglicher offener Leserahmen *orfX* identifiziert. Dieser umfaßt 132 Nukleotide (Position: 3882–4013 bp in Abb. A, Anhang), und OrfX zeigte keine Homologie zu einem bekannten Protein. Eine mögliche Ribosomenbindestelle stromaupwärts von *orfX* konnte auch durch Vergleich mit den für Streptomyzeten beschriebenen Shine–Dalgarno-Sequenzen (STROHL, 1992) nicht zugeordnet werden. Im Gencluster der Methan-Monoxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990) und aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (CARDY *et al.*, 1991b) befindet sich ebenfalls ein kleiner ORF stromaupwärts der Reduktase, dem man bisher keine Funktion zuordnen konnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das für die THF-induzierte NADH–Cytochrom c–Reduktase kodierende Gen *thmD* zwischen ORFs lokalisiert ist, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen signifikante Homologien zu verschiedenen Komponenten von MMOs aufweisen. Es sollte sich somit bei den durch die Gene *thmADBC* kodierenden Proteinen um die Komponenten einer THF-induzierten Monoxygenase handeln. Dies konnte durch Transkriptionsanalyse der Gene bestätigt werden (3.6.1.).

3.5.5. Charakterisierung der Komponenten der THF–Monoxygenase

Die Komponenten ThmADBC der THF–Monoxygenase wurden anhand ihrer Aminosäuresequenz charakterisiert. *ThmA* ist das Strukturen der α –Untereinheit der Oxygenase und aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergibt sich ein theoretisches Molekulargewicht von 62,5 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 5,84. Durch Vergleiche mit Datenbanken konnten zwei identische, hoch konservierte Motive EX_(28–32)DEXRH identifiziert werden. Diese sind charakteristisch für die löslichen Mehrkomponenten–Monoxygenasen, bei denen die Sauerstoffbindung und Substrathydroxylierung an einem binuklearen Fe–O–Fe Eisenzentrum stattfindet (ERICSON *et al.*, 1988; FOX *et al.*, 1988; LIPSCOMB, 1994). Die Fixierung jedes Eisenatoms im aktiven Zentrum der Monoxygenase erfolgt über konservierte Aminosäuren, was sich im zweimaligen Auftreten des Sequenzmotivs EX_(28–32)DEXRH ausdrückt. Abb. 13 zeigt einen Vergleich der α –Untereinheiten von verschiedenen MMOs.

Die Funktion von ThmB als β –Untereinheit der Oxygenase wurde anhand seiner Sequenzhomologien zu den entsprechenden Proteinen verschiedener MMOs postuliert. Das theoretische Molekulargewicht dieser Komponente liegt bei 39,3 kDa und der isoelektrische Punkt bei 4,81.

ThmA	-----MTAPPMKRPRRSITASHAKIGELGWDRTYYPHERGKYPNSRYKLPNKP-	47
AmoC	-----MASNPTQLHEKSYSYDWDFTSV-ERRPKFETKYKMPKK--	37
DmpN	-----MATHNKKRNLKDKYRYLTRDLAWETTYQ-KKEDVFPLEHFEGIKIT	46
MmoX	MALSTATKAATDALAANRAPTSVNAQEVRWLQSFNWFK---NNRTKYATKYKMANE--	55
	: . *: . . . : . : :	
ThmA	----GRDPMKQIMGDYLHMQNEKDDRVHGGGLDAAVRAE-VPGKAPLRWLELLKPYLLTVI	102
AmoC	----GKDPFRVLIRDYMKMEAEKDDRTHGFLDGAVRTR-EATRIEPRFAEAMKIMVPQLT	92
DmpN	DWDKWEDPFRLTMDTYWKYQAEKEKKLYAIFDAFAQNNGHQNISDARYVNALKLFLTAVS	106
MmoX	----TKEQFKLIAKEYARMEAVKDERQFGSLQVALTRLNAGVRVHPKWNETMKVVSNFLE	111
	: . : * : : * : . : :	
ThmA	SAEAAATRCMGLVDALDDPELQNAYYIQQQLDEQRHTAMQMNLRYRWMKNMPEPGWNLG	162
AmoC	NAEYQAVAGCGMIISAVENQELRQGYAAQMLDEVRHAQLEMTLRRNYYAKHWCDPSGFDIG	152
DmpN	PLEYQAFQGFSRVGRQFSGAGARVACQMIADELRHVQTVHAMSHYNKHFDD---LHD	162
MmoX	VGNEYNAIAATGMLWDSAQAAEQNGLAQLVDEIRHTHQCAVNYYFAKNGQDPAGHNDA	171
	* * . : . : . * : * : * : * :	
ThmA	-LQAVGGDSILVAAQNLTGSMFTGDPFQAAVALQVVVETAFNTNTILVAFPDVAVRNHDFA	221
AmoC	QRGLYQHPAGLVSIGEFQH-FNTGDPLDVIIDLNTVAETAFTNILLVATPQVAVANGDNA	211
DmpN	FAHMYDRVWYLSVPKSYMDDARTAGPFEFLTAVSFSFEYVLTNLLFVPMMSGAYNGDMA	222
MmoX	RRRTRTIGPLWKGMKRVFSDGFIISGDAVECSLNLQLVGEACFTNPLIVAVTEWAAANGDEI	231
	: . . : * : * : * : . * . * . * :	
ThmA	LPTVMNSVQSDEARHINNGYATLLYLLQEPEN-APLLEQDIQQMFWTVHAFVDAFMGILV	280
AmoC	MASVFLSIQSDEARHMANGYGSVMALLENEDN-LPLLNQSLSDRHFWRAHKALDNAGWCS	270
DmpN	TVTGFQSAQSDEARHMTLGLEVIKFMLEQHEDNVPIIQRWIDKWFWRGYRLLT-LIGMM	281
MmoX	PTPTVFLSIEΤDELRHMANGYQTVVSIANDPAS-AKYLNTDLNNNAFWTQQKYFTPVLGMLF	290
	: . * : * : * : * : . : : : . * : . : * :	
ThmA	EYAPTDATDPESWTTKWDWRWVNDYYRSYIVNLGKLGLKIPDSIFKRARERIAADYHHKV	340
AmoC	EYG--ARKRPWSYKAQWEWVVFDDFVGGYIDRLSEFGVQAPACLGAADEVKWS--HHTL	326
DmpN	DYM--LPNKVMSWSEAWG-VYFEQAGGALFKDLERYGIRPPKYVEQTTIGKEHIT--HQV	336
MmoX	EYG--SKFKVEPWVKTWNRWVYEDWGGIWIGRLGKYGVESPRSLKDAKQDAYWA--HHDL	346
	: * . : * : * : . * : . * : * :	
ThmA	AVGVWASWPFHYYKGNLEQKDYDWFEVKYPGWNEKFGAFWRGYADVR--YPGSGPLQLP	398
AmoC	GQVLSAVWPLNFWRSDAMGPADFEWFENHYPGWSAAYQGYWEGYKAL--ADPAGGRIMLQ	384
DmpN	WGALYQYSKATSFHTWIPGDEELNLSEKYP---DTFDKYYRPRFEFWREQQAKGERFY	393
MmoX	YLLAYALWPTGFFRLALPDQEEMEWFEANYPGWYDHGKTYEEWRARGCEDPSSGFIPLM	406
	: . : : * : . : * : . : . : * :	
ThmA	GLLEG--AGPICWTCQLG--CLRPE--EQCHRIVDEHTR--FYCSPECKWIDMTNPGRY	449
AmoC	ELPG--LPPMCQVCQVP-CVMPRLD--MNAARIIEFEGQKIALCSEPCQRIFTNWPEAY	438
DmpN	DTLP---HLCQVCQLPVIFTEPDDPTKLSRSLVHEGERYQFCSDGCCDIFKNEPVKY	448
MmoX	WFIENNHPYIDRVSQVPFCPSLAKG--ASTLRVHEYNGQMHTFSDQWGERMWLAEPERY	464
	: . * : * : . : . : * : . : * * :	
ThmA	VGDRV----WFDRYHGWEYSEIVRDLGFLRPDGKTLTGQPHVDPDPAKQWTIDDLRELG	504
AmoC	RHRKQ----YWARYHGWLADIVVLDGYIRPDGKTLIGQPLLEME--RLWTIDDIRALQ	491
DmpN	IQAQLPVHQIYQGNCEGGDVETVVQKYYHKGVDNLEYLGSPEHQ--RWLALKGQTPPT	506
MmoX	ECQN----IFEQYEGRELSEVIAELHGLRSDGKTLIAQPHVRGD--KLWTLDDIKRLN	516
	: . * : . : : . : : . : * : . : : . :	
ThmA	HIMQSPNILTAAERLGLPYKRVEYTGTKGDPMPPTIPPLFGV	545
AmoC	YEVKDPLQEA-----	501
DmpN	AAPADKSLGAA-----	517
MmoX	CVFKNPVKAFN-----	527

Abbildung 132: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmA mit der Sequenz der α -Untereinheit von verschiedenen MMOs. AmoC: Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), DmpN: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), MmoX: Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (–). Die konsevierten Aminosäure-Reste des Sequenzmotivs des binuklearen Eisenzentrums EX₍₂₈₋₃₂₎DEXRH₍₉₁₋₉₄₎EX₍₂₈₋₃₂₎DEXRH sind grau unterlegt. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

Für die abgeleitete Aminosäuresequenz der Reduktase-Komponente (ThmD) wurden drei konservierte Motive, die Hinweise auf mögliche Kofaktoren geben, identifiziert. Abb. 14 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz der Reduktase-Komponenten von MMOs und deren konservierten Sequenzmotive. In der N-terminalen Region findet man vier konservierte Cysteinreste CXXXXCXXC₍₃₀₋₃₂₎C, die für die Bildung eines [2Fe–2S]-Clusters vom Chloroplasten-Typ Ferredoxin verantwortlich sind (OTAKA und OOI, 1989). Zwei weitere Regionen der Reduktase zeigen Homologien zur Binderegion des Flavin-Isoalloxazinringes (RXXS) und zur Binderegion der NAD(P)-Ribose (HARAYAMA *et al.*, 1991; NEIDLE *et al.*, 1991). Die Analyse der Aminosäuresequenz der Reduktase-Komponente ThmD auf konservierte Bindemotive für Kofaktoren steht im Einklang mit den bestimmten Kofaktoren der NADH-Cytochrom c-Reduktase (3.4.3.). Berechnet man aus der Aminosäuresequenz den theoretischen Wert für das Molekulargewicht und für den isoelektrischen Punkt der Reduktase, so erhält man einen Wert von 39,85 kDa und 4,44. Ein Vergleich des berechneten Molekulargewichtes, das aufgrund der posttranslationalen Abspaltung des Methionins (3.5.4.) auf 39,7 kDa korrigiert werden muß, mit dem massenspektrometrischen Wert von 40,17 kDa (3.4.2.) ergibt eine Differenz von 470 Da. Dieser Wert könnte im Zusammenhang mit dem kovalent-gebundenen Flavin (3.4.4.) stehen und würde etwa einem FMN (M_r 456,4 g/mol) entsprechen. Der Flavin-Kofaktor der Reduktase wurde jedoch auf ein FAD (M_r 785,6 g/mol) bestimmt. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, daß die kovalente Bindung des Flavin-Isoalloxazinringes während der massenspektrometrischen Analyse nicht beeinflußt wurde, das FAD aber fragmentiert wurde.

Die Funktion von ThmC als Kopplungsprotein der THF-Monooxygenase konnte aufgrund seiner Homologie zum Kopplungsprotein der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994) postuliert werden. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Effizienz der Katalyse und besitzt keine Kofaktoren. Das theoretische Molekulargewicht wurde auf 12,5 kDa, der isoelektrische Punkt auf 4,06 berechnet.



Abbildung 14: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmD mit der Sequenz der Reduktase-Komponente von verschiedenen MMOs. AmoD: Alken-Monoxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), DmpP: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), MmoC: Methan-Monoxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (-). Die vier konservierten Cysteinreste für die Bildung des [2Fe-2S]-Clusters, das RXXS-Motiv für die Bindung des Flavin-Isoalloxazinringes und die Glycinreste für die Bindung der NAD(P)-Ribose sind grau unterlegt. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

3.5.6. Bestimmung der Kopienzahl der *thm*-Gene in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1

Bevor weitere Untersuchungen zu den *thm*-Genen durchgeführt wurden, sollte zunächst deren Kopienzahl in der Gesamt-DNA bestimmt werden. Dazu wurde Gesamt-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig verdaut (2.17.) und anschließend mit Gen-spezifischen DIG-markierten Oligoprimeren, die keine dieser Schnittstellen trugen, hybridisiert. In Abb. 15 ist als Beispiel das erhaltene Autoradiogramm nach Hybridisierung mit dem Primer THF02 (Tab. 5) als Sonde gegen *thmB* wiedergegeben. Das erhaltene Autoradiogramm macht deutlich, daß für die einzelnen Restriktionen der Gesamt-DNA nur eine Bande detektiert werden konnte. Unter Einsatz von Sonden gegen *thmA*, *thmC* und *thmD* wurde ebenfalls nur jeweils ein DNA-Fragment erhalten. Diese Ergebnisse zeigten, daß die *thm*-Gene in der Gesamt-DNA von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 nur einmal vorhanden sind.

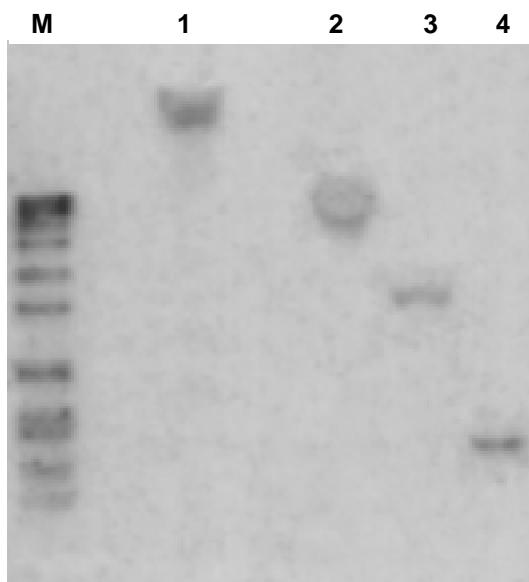


Abbildung 15: Southern-Hybridisierungen der Gesamt-DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Die Gesamt-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III (1), *Nof*I (2), *Pst*I (3) und *Bam*HI (4) geschnitten. (M) DIG-markierter DNA-Größenstandard VII. Als Hybridisierungssonde wurde der DIG-markierte Primer THF02 eingesetzt.

3.6. TRANSKRIPTIONSANALYSE DER *thm*-GENE

3.6.1. Transkriptnachweis mittels Northern–Hybridisierung

Aufgrund der Tatsache, daß die NADH–Cytochrom c–Reduktase in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 THF–induziert vorlag, wurde angenommen, daß die Expression aller *thm*–Gene durch THF induziert wird. Der Nachweis dieser Induktion sollte durch Vergleich der Transkripte in THF– und Succinat–gewachsenen Zellen erfolgen. Eine Modifikation der unter 2.14.4. beschriebenen RNA–Präparation wurde notwendig, da nach Herstellerprotokoll keine Lyse der Zellen erreicht werden konnte. Durch Erhöhung der Lysozymkonzentration im Resuspensionspuffer (20 mg/ml statt 3 mg/ml) und Modifikation der Lysozymbehandlung (30 min bei 37 °C statt 10 min bei RT) konnten die Zellen lysiert und Gesamt–RNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 isoliert werden. Die Gesamt–RNA aus THF– und Succinat–gewachsenen Zellen wurde im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und mit einem DIG–markierten spezifischen PCR–Produkt hybridisiert, das jeweils homolog zu einem *thm*–Gen war. Folgende Sonden wurden eingesetzt: THF19–THF5 homolog zu *thmA*, THF16–THF26 homolog zu *thmB*, THF01–THF03 homolog zu *thmD* und THF37–THF25 homolog zu *thmC* (Tab. 5). In Abb. 16 ist für jedes *thm*–Gen ein erhaltenes Northern–Blot gezeigt.

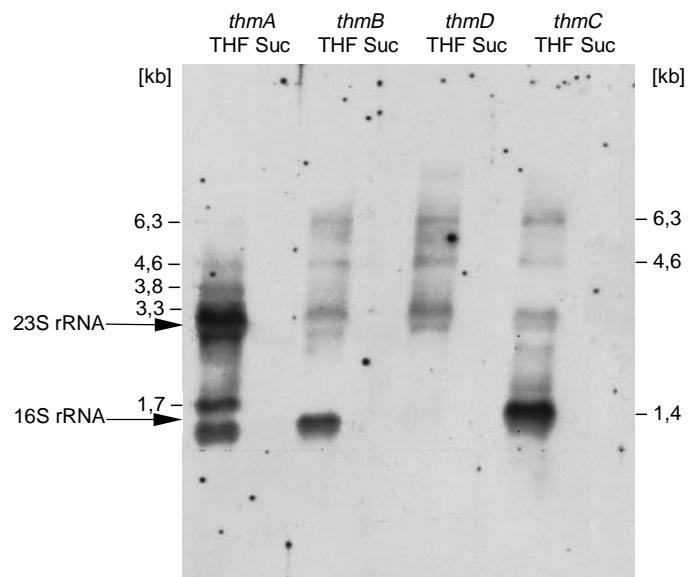


Abbildung 16: Transkriptionsanalyse der *thm*–Gene. Analyse der Gesamt–RNA aus THF–gewachsenen Zellen (THF), Analyse der Gesamt–RNA aus Succinat–gewachsenen Zellen (Suc). Als Hybridisierungssonden wurden die PCR–Produkte THF19–THF5 homolog zu *thmA*, THF16–THF26 homolog zu *thmB*, THF01–THF03 homolog zu *thmD* und THF37–THF25 homolog zu *thmC* eingesetzt.

Aus dem erhaltenen Autoradiogramm geht hervor, daß die Transkripte der *thm*-Gene nur in der RNA-Präparation aus THF-gewachsenen Zellen nachweisbar waren, nicht aber aus Succinat-gewachsenen Zellen. Ein Verlust des THF-Abbaupotentials durch Anzucht auf Succinat konnte ausgeschlossen werden, da von KOHLWEYER (2000) gezeigt wurde, daß bei Wachstum auf Succinat auch nach mehreren Generationen die Fähigkeit zum Abbau von THF nicht verloren ging. Weiterhin zeigten die unter 3.7.1. beschriebenen Versuche, daß die für den THF-Abbau verantwortlichen Gene stabil vererbt werden. Anhand der Transkriptionsanalyse wurde eindeutig gezeigt, daß *thmADBC* THF-induziert transkribiert werden. Dies belegt die Hypothese, daß die *thm*-Gene für eine THF-induzierte MMO kodieren.

Um weitere Aussagen über das Transkriptionsmuster der *thm*-Gene treffen zu können, wurde die Größe aller Transkripte bestimmt. Unabhängig von der eingesetzten Sonde konnten mRNAs von etwa 6,3 kb und 4,6 kb detektiert werden. Dies zeigt, daß die vier *thm*-Gene (4265 bp) polycistronisch transkribiert werden und noch ein weiterer Bereich auf dem 6,3 kb Transkript kodiert sein muß. Die Signale bei etwa 2,8 kb in allen vier Autoradiogrammen nach Northern-Hybridisierung ist unspezifischer Hintergrund, verursacht durch die 23S rRNA. Die Hybridisierung gegen *thmA* mit der Sonde THF19-THF5 ergab spezifische Signale bei etwa 3,8 kb, 3,3 kb und 1,7 kb. Das Hybridisierungssignal bei etwa 1,4 kb im dargestellten Autoradiogramm mußte dagegen als unspezifisch gewertet werden, da dieses in weiteren Versuchen und nach gezielter Auftrennung in diesem Größenbereich nicht erhalten wurde. Dieses unspezifische Signal könnte im Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Auftreten der 16S rRNA stehen, die zu einer Verdrängung der Transkripte und somit zur Streuung des Fluoreszenzsignals führt. *ThmA* (1638 bp) wird monocistronisch (1,7 kb mRNA) transkribiert. Die Transkripte der Größe 3,8 kb und 3,3 kb können neben *thmA* nur stromaufwärts dieses Gens gelegene Bereiche kodieren, da für das benachbarte Gen *thmD* ein solches Fragment nicht erhalten wurde. Nach Hybridisierung mit der Sonde THF26-THF16 gegen *thmB* (1041 bp) und THF37-THF25 gegen *thmC* (354 bp) wurde ein Fluoreszenzsignal bei 1,4 kb erhalten. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß *thmB* und *thmC* bicistronisch transkribiert werden. Für *thmD* hybridisierte neben den schon erwähnten größeren Transkripten keine eigene kleine mRNA. Die Auswertung der Transkripte ist in Abb. 17 schematisch zusammengefaßt.

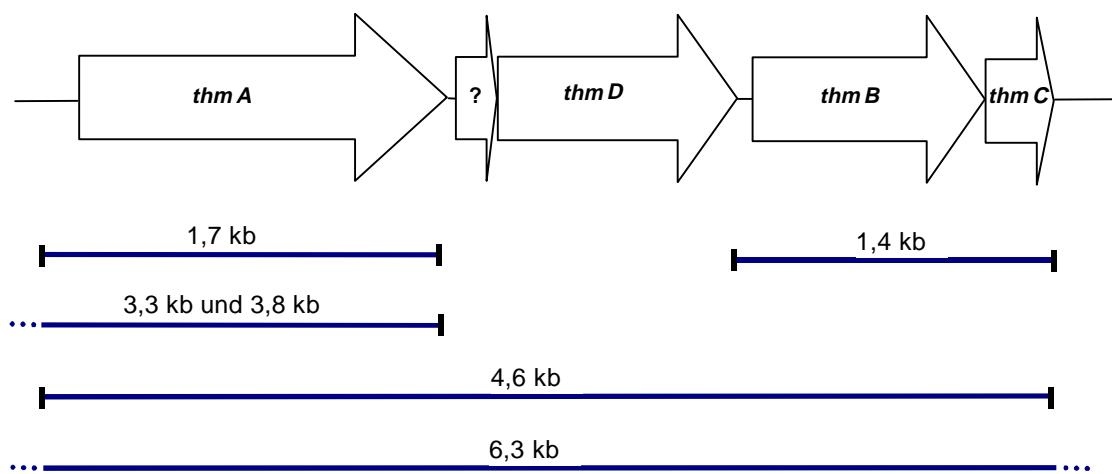


Abbildung 17: Nachgewiesene Transkripte der *thm*-Gene.

3.6.2. Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte

Da mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen mRNAs nachgewiesen wurden, deren Transkriptionsstartpunkte stromaufwärts von *thmA* und von *thmB* liegen, sollte mittels *primer extension*-Experimenten der Transkriptionsstartpunkt dieser mRNAs genau bestimmt werden. Als Primer wurden Fluorescein-markierte 3' *antisense* Primer sowie Gesamt-RNA aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen eingesetzt. Als Beispiel ist in Abb. 18 die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes stromaufwärts von *thmB* dargestellt. Als Primer wurde der 3' *antisense*-Primer Cy5pe3 (Tab. 5) eingesetzt.

Für die mRNA aus THF-gewachsenen Zellen wurde ein Peak bei einer Retentionszeit von 116 min : 52 s erhalten, der nicht in der Kontrollreaktion mit mRNA aus Succinat-gewachsenen Zellen detektierbar war. Anhand der parallel gelaufenen Sequenzierung konnte das Cytosin, welches sich 41 Nukleotide stromaufwärts des ATG-Startcodons von *thmB* befindet, der gleichen Retentionszeit zugeordnet werden. Stromaufwärts von *thmA* (Einsatz von Primer Cy5pe2, Tab. 5) wurde der Transkriptionsstartpunkt als ein Adenin bestimmt, welches 61 Nukleotide vor dem Translationsstartpunkt liegt. Die ermittelten Transkriptionsstartpunkte wurden durch Mehrfachbestimmungen abgesichert.

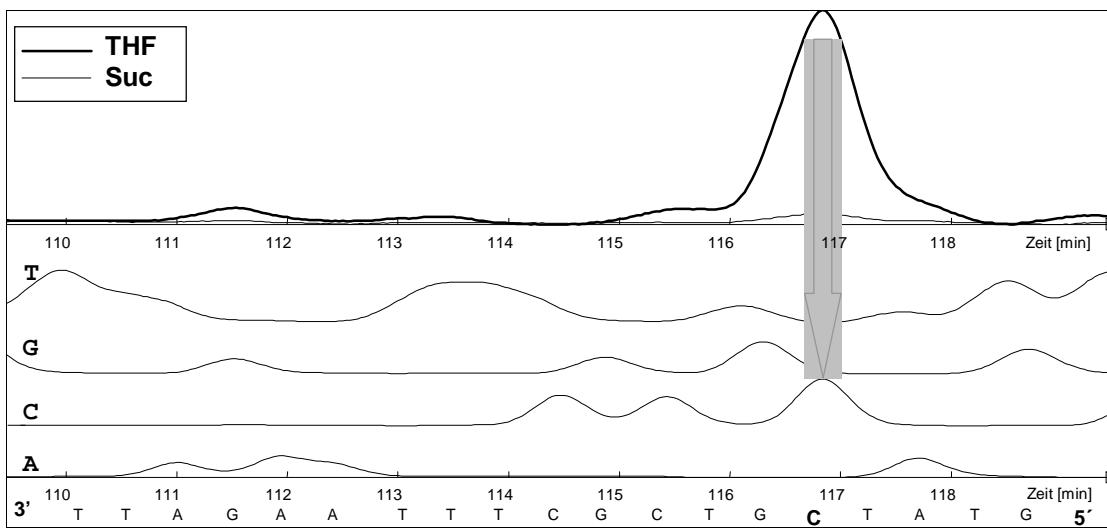


Abbildung 18: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes stromaufwärts von *thmB* mittels primer extension. Im oberen Teil der Abb. ist das erhaltene Fluorogramm der primer extension-Reaktion mit RNA aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen dargestellt, im unteren Teil der Abb. die entsprechende Sequenzierungsreaktion. Die erhaltene DNA-Sequenz ist in 3' → 5' Richtung angegeben.

3.6.3. Putative Promotor- und Terminator-Regionen

Auf der Grundlage der ermittelten Transkriptionsstartpunkte wurde in der stromaufwärts liegenden DNA-Region nach putativen Promotor-Sequenzen gesucht. Es konnte jedoch keine Promotor-Sequenz identifiziert werden, die Ähnlichkeit zur Erkennungssequenz von bekannten σ -Faktoren besaß (STROHL, 1992, WÖSTEN, 1998). Aufgrund der Annahme, daß die Transkription der *thm*-Gene durch den gleichen σ -Faktor initiiert wird und damit ähnliche Promotor-Sequenzen vorliegen sollten, wurden die DNA-Sequenzen stromaufwärts der erhaltenen Transkriptionsstartpunkte miteinander verglichen. Ein entsprechender Sequenzvergleich ist in Abb. 19 dargestellt.

	-40	-30	-20	-10	+1
<i>thmA</i>	TGGTACC CCGG TAAGC ACG A TAC CT C GG A CT C G A T A T C CC G C A				
<i>thmB</i>	ACCT CGA CCGG CCCC GAGG ACT TG CCG ATT C CG AT T C TGT TAC				

Abbildung 19: Vergleich der Promoter-Region stromaufwärts von *thmA* und *thmB*. Identische Nukleotide sind fett gedruckt.

Der Vergleich der Promotor-Region stromaufwärts von *thmA* und *thmB* zeigt, daß eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen besteht. Die daraus resultierende Konsensus-Sequenz konnte jedoch auch durch Vergleich mit den für Streptomyzeten beschriebenen Promotor-Sequenzen (STROHL, 1992), die sich zum Teil gravierend von Erkennungssequenzen bekannter σ -Faktoren unterscheiden, keinem bekannten Promotor zugeordnet werden. Jedoch kann aufgrund der Ähnlichkeit der Promotor-Region stromaufwärts von *thmA* und *thmB* angenommen werden, daß diese vom gleichen σ -Faktor erkannt werden.

Um Aussagen über putative Terminator-Strukturen zu erhalten, wurde die DNA-Sequenz stromabwärts der Stopcodone der *thm*-Gene auf palindromische Sequenzen untersucht. Als mögliche Terminationsstruktur findet man 67 bp stromabwärts des TGA-Stopcodons von *thmA* eine *inverted repeat*-Struktur (Position: 3939–3957 bp in Abb. A, Anhang). Die Ausbildung einer doppelsträngigen, haarnadelförmigen Sekundärstruktur würde einer freien Energie von –32,7 kJ/mol entsprechen und könnte somit eine Termination der mRNA-Synthese bewirken (Abb. 20 A). Diese Haarnadelschleife ist nicht gefolgt von einer Poly-T-Sequenz und zeigt damit nicht die typische Struktur einer Rho-unabhängigen Termination (ROSENBERG und COURT, 1979). Stromabwärts von *thmC* wurde eine *inverted repeat*-Struktur identifiziert (Position: 6612–6649 bp in Abb. A, Anhang), die eine Terminationsstruktur aus einem GC-reichen Stamm mit einer freien Energie von –162,4 kJ/mol ausbilden könnte (Abb. 20 B). Diese Struktur ist ebenfalls nicht gefolgt von einer Poly-T-Sequenz, sondern zeigt überlappend noch eine weitere *inverted repeat*-Struktur (Position: 6638–6656 bp in Abb. A, Anhang) mit einer freien Energie von –72,8 kJ/mol. Die hier postulierten Terminationsstrukturen deuten auf einen Abbruch der RNA-Synthese nach *thmA* und nach *thmC* hin. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den nachgewiesenen Transkripten nach Northern-Hybridisierung (3.6.1.).

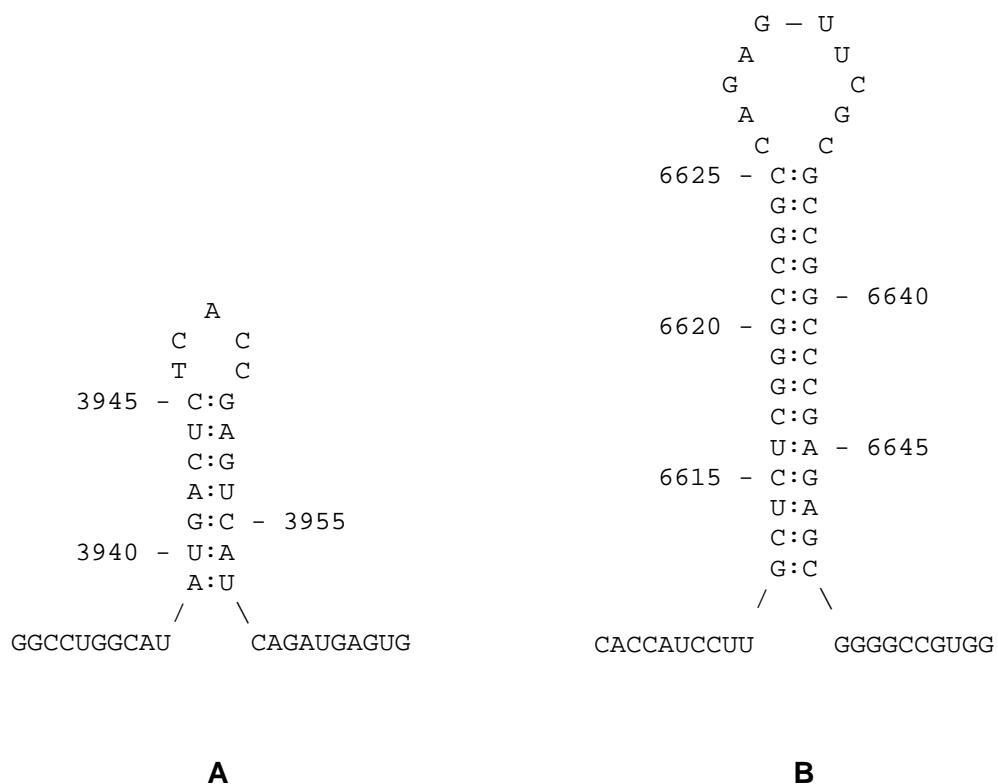


Abbildung 20: Postulierte Terminatorstrukturen des *thm*-Clusters. **A** Terminatorstruktur nach *thmA* mit einer freien Energie von $-32,7$ kJ/mol, **B** Terminatorstruktur nach *thmC* mit einer freien Energie von $-162,4$ kJ/mol.

3.7. LOKALISATION DER *thm*-GENE

3.7.1. Nachweis der Plasmid-Kodierung von *thmADBC*

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die *thm*-Gene chromosomal- oder plasmidkodiert vorliegen. Die Plasmidisolierung aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 erfolgte nach 2.14.3.1.. Die Modifikationen im Protokoll wurden notwendig, da sich die Zellen nur sehr schwer lysieren ließen. Zum Zellaufschluß wurde neben Lysozym eine Endopeptidase aus *Achromobacter lyticus* zugesetzt, die für eine effektive Zelllyse von Actinomyceten beschrieben wurde (SAEKI, 1998; Produktinformation der Firma Wako Chemicals, Neuss). Die so erhaltene Plasmid-Präparation wurde in einem 0,7 %igen Agarosegel analysiert (Abb. 21 A). Neben der Plasmid-Präparation wurde Gesamt-DNA und das Plasmid pBT50 aufgetragen. Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel zeigt, daß für die Plasmid-Präparation aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zwei DNA-Banden erhalten wurden.

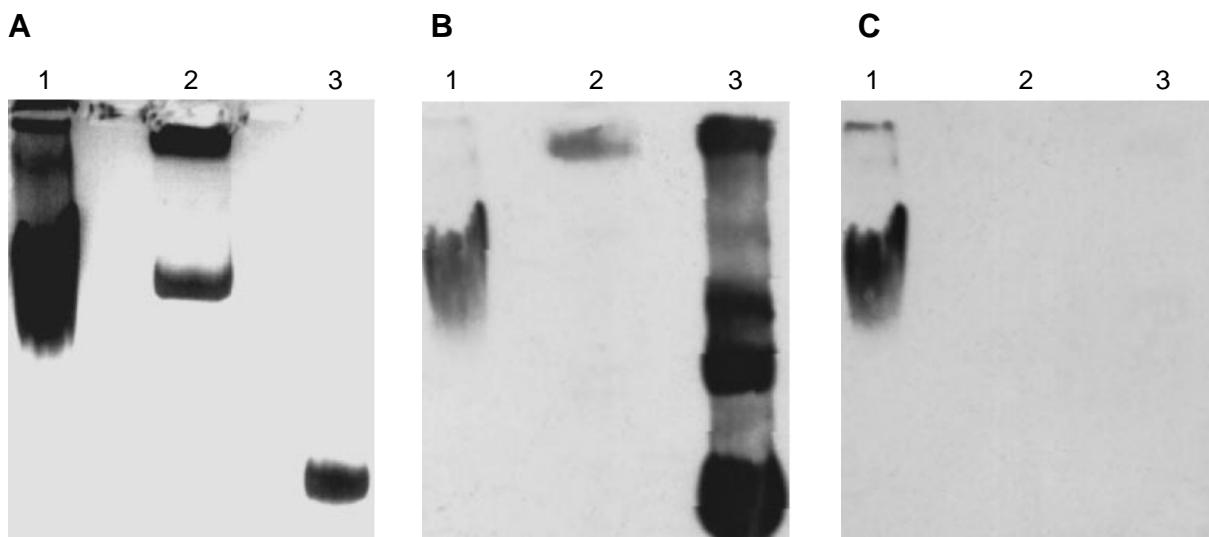


Abbildung 21: Nachweis von Plasmiden in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. **A** Auf trennung der Gesamt-DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (1), der isolierten Plasmid-Präparation aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (2) und des Plasmides pBT50 (3) in einem 0,7 %igen Agarosegel. Erhaltene Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierungen **B** mit dem PCR-Produkt THF07-THF25 gerichtet gegen die *thm*-Gene und **C** mit dem PCR-Produkt fD1-rP2 gerichtet gegen die 16S rDNA von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1.

Zum Nachweis der *thm*-Gene wurde eine DNA-DNA-Hybridisierung mit dem PCR-Produkt THF07-THF25 durchgeführt, welches homolog zu einem Bereich der *thm*-Gene (Position: 5741–6460 bp in Abb. A, Anhang) ist. Zur Kontrolle wurde als Sonde das PCR-Produkt fD1-rP2 (Tab. 5) verwendet, das gegen die 16S rDNA gerichtet ist und somit zur Detektion chromosomaler DNA eingesetzt werden kann. Nach Hybridisierung mit der *thm*-spezifischen Sonde wurde, wie zu erwarten war, ein Signal für die Gesamt-DNA-Präparation erhalten (Abb. 21 B). Das Plasmid pBT50 (positive Kontrolle) wurde, so wie es für zirkuläre Plasmide charakteristisch ist, in drei Plasmid-Konformationen (offene zirkuläre, lineare und superhelikale) detektiert. Die Plasmid-Präparation von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zeigte dagegen ein positives Signal auf Höhe der Geltasche. Für die Hybridisierung mit der 16S rDNA-Sonde wurde nur ein Signal mit der Gesamt-DNA, aber nicht mit den Plasmid-Präparationen erhalten (Abb. 21 C). Dieses Ergebnis zeigt, daß in der Plasmid-Präparation aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 keine chromosomal DNA enthalten war. Das gleichzeitig erhaltene positive Signal mit der *thm*-spezifischen Sonde ließ den Schluß zu, daß die *thm*-Gene plasmidkodiert vorliegen. Für die zweite Bande der Plasmid-Präparation, die auf Höhe der Gesamt-DNA lief, konnte weder mit der Sonde gegen die *thm*-Gene noch

mit der Sonde gegen die 16S rDNA ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Dies deutet darauf hin, daß ein zweites Plasmid in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 vorhanden ist.

Zum Nachweis, daß das Fluoreszenzsignal in der Geltasche ein retardiertes Plasmid ist, wurden mit der erhaltenen Plasmid-Präparation Restriktionen durchgeführt und diese anschließend mittels Hybridisierung analysiert. In Abb. 22 ist ein *PstI*-Verdau nach Auftrennung im Agarosegel dargestellt. Zum Vergleich wurde die nicht geschnittene Plasmid-Präparation aufgetragen.

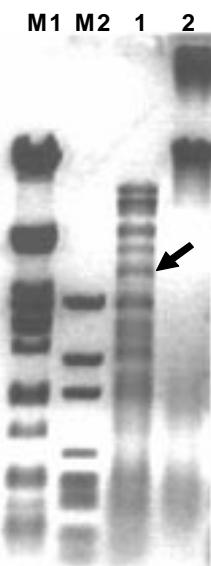


Abbildung 22: *PstI*-Verdau der Plasmid-Präparation aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Plasmid-Präparation geschnitten mit *PstI* (1) und unbehandelt (2), Größenmarker λ-DNA geschnitten mit *PstI* (M1) und pGEM™ DNA Marker (M2). Mit Pfeil ist das erhaltene Hybridisierungssignal mit der *thm*-spezifischen Sonde THF07–THF25 gekennzeichnet.

Der Verdau der Plasmid-Präparation mit *PstI* führte zu einem definierten Restriktionsmuster, und die in der un behandelten Probe vorhandene Bande in der Geltasche war nicht mehr vorhanden. Dieses Ergebnis kann als weiterer Hinweis darauf gesehen werden, daß es sich bei der entsprechenden DNA-Bande um ein Plasmid handeln muß. Die weitere Analyse wurde mittels Southern-Hybridisierung durchgeführt. Beim Einsatz der *thm*-spezifischen Sonde konnte ein Hybridisierungssignal bei etwa 3,8 kb (in Abb. 22 mit Pfeil gekennzeichnet) erhalten werden. Die Größe dieses DNA-Fragments steht im Einklang mit dem Hybridisierungssignal nach vollständigem *PstI*-Verdau der Gesamt-DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (3.5.6.). Mit der 16S rDNA-Sonde wurde kein Signal erhalten. Die Größe des Plasmides wurde durch Bestimmung der Größe der erhaltenen

Restriktionsfragmente anhand der mitgeführten Größenmarker und deren Summierung auf 60 kb abgeschätzt, wobei dieser Wert beim Vorhandensein eines zweiten Plasmides niedriger liegen würde. Anhand dieser Ergebnisse konnte eindeutig gezeigt werden, daß die *thm*-Gene auf einem Plasmid lokalisiert sind. Dieses Plasmid wurde mit pPSK60 bezeichnet.

Da die Fähigkeit zum THF-Abbau nach Anzucht auf Succinat (220 Generationen) nicht verloren ging (KOHLWEYER, 2000), würde dies bedeuten, daß kein „Verlust“ des Plasmides unter diesen Wachstumsbedingungen erfolgt. Diese Tatsache konnte durch den Nachweis von Plasmid pPSK60 in Succinat-gewachsenen Zellen bestätigt werden.

3.7.2. Charakterisierung des Plasmides pPSK60 als zirkuläres Plasmid

Im folgenden sollte geklärt werden, ob pPSK60 ein zirkuläres oder lineares Plasmid ist. Ausgangspunkt für die folgenden Versuche war die Beobachtung, daß das Plasmid pPSK60 in einer Standard-Gelelektrophorese nicht in das Gel wanderte, sondern in der Geltasche verharrte. Da für lineare Plasmide ein solcher Effekt bekannt war (KALKUS, 1992; DABROCK, 1993), wurde zunächst davon ausgegangen, daß es sich um ein lineares Plasmid handelt. Der Nachweis eines linearen Plasmides sollte mit Hilfe der PFGE (2.15.2.) erfolgen, bei der die Auf trennung von hochmolekularer, linearer DNA durch ständigen Wechsel des elektrischen Feldes bewirkt wird. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine schonende Methode (2.14.3.3.) eingesetzt, bei der die Plasmid-DNA aus den in Agarose eingebetteten Zellen freigesetzt wird und so Scherkräfte vermieden werden. Zusätzlich wurde die Plasmid-Präparation nach 2.14.3.1. zur PFGE eingesetzt. Nach Auswertung der erhaltenen Gele wurde wiederum festgestellt, daß auch in der PFGE das Plasmid pPSK60 in der Auftragetasche des Gels zurückgehalten wurde. Eine Auf trennung von linearer DNA wurde nicht beobachtet. Da das Vorhandensein eines linearen Plasmides in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 mittels PFGE und Einsatz von Agarose-Blöckchen mit intakter Gesamt-DNA nicht gezeigt werden konnte und für diese Methode das Zurückbleiben von zirkulären Plasmiden im Agarose-Blöckchen beschrieben wurde (KALKUS *et al.*, 1990), sprachen diese Ergebnisse eher dafür, daß pPSK60 ein zirkuläres Plasmid ist. Die fehlende Mobilität des Plasmides im elektrischen Feld der Standard-Gelelektrophorese könnte auf Verunreinigungen in der Plasmid-Präparation zurückzuführen sein. Der Einsatz einer weiteren Methode der Plasmid-Isolierung (2.14.3.2.), die eine Phenol/Chloroform-Extraktion beinhaltet, führte nicht zu einer Veränderung des Laufverhaltens. Erst durch mehrmalige Extraktion (2.13.4.) der Plasmid-Präparation (2.14.3.1.) wurde eine leichte Bewegung des Plasmides im Gel erzielt. Eine vollständige Aufhebung der Retardierung konnte nicht erreicht werden. Die Durchführung einer mehrmaligen Phenol/Chloroform-Extraktion war durch die

geringe Menge an verfügbarer Plasmid-DNA und durch die relativ hohen Verluste bei der Extraktion limitiert. Ein Verdau der eventuell am Plasmid gebundenen Proteine mit Proteinase K (in Anlehnung an die Proteinase K-Behandlung, siehe 2.14.3.3.) brachte keinen positiven Effekt. Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 ein zirkuläres Plasmid pPSK60 mit einer Größe von < 60 kb besitzt, auf dem die Gene *thmADBC* für die THF-Monoxygenase kodiert sind. Weiterhin wurde gezeigt, daß sehr wahrscheinlich keine linearen Plasmide in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 vorhanden sind.

3.8. AUSWERTUNG DER DEN *thm*-GENEN BENACHBARTEN SEQUENZBEREICHE

3.8.1. Identifizierung und Charakterisierung weiterer offener Leserahmen

Nach der Sequenzierung der Plasmid-Inserts von pBT53 und pBT50 wurden vier ORFs *thmADBC* identifiziert (3.5.4.), die die Strukturgene der THF-induzierten MMO (3.6.1.) sind. Im folgenden sollten die benachbarten Sequenzbereiche der *thm*-Gene auf das Vorhandensein weiterer ORFs untersucht werden. Die Analyse ergab, daß stromaufwärts von *thmA* auf dem Plasmid-Insert von pBT53 ein putatives Protein kodiert ist, dessen C-Terminus signifikante Ähnlichkeiten zu Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDHs) zeigte. Stromabwärts von *thmC* wurden zwei als *orfQ* und *orfZ* bezeichnete ORFs identifiziert, die von einem unvollständigen ORF gefolgt wurden. Dessen abgeleitete N-terminale Sequenz besitzt ebenfalls signifikante Homologien zu ALDHs.

Zur Vervollständigung der N- bzw. C-terminalen Teilsequenzen der putativen ALDHs wurde in der *Sau3A*-Genbank von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (3.5.2.) nach Anschlußsequenzen gesucht. Diese DNA-Sequenzen waren von besonderem Interesse, da im postulierten THF-Abbauweg (Abb. 1) zwei mögliche ALDH-Reaktionen (Oxidation von Succinatsemialdehyd und von 4-Hydroxybutyraldehyd) vorkommen. Es wurde vermutet, daß eines oder beide Enzyme in den Abbau von THF involviert sind. Das Durchsuchen der Genbank nach Anschlußsequenzen erfolgte mittels PCR analog 3.5.3.. Zur Amplifikation wurden die aus der bekannten Sequenz abgeleiteten Primer THF34 bzw. THF35 (Tab. 5) in Kombination mit den vektorkodierten Primern upr und rpr eingesetzt. Als Template diente der Gesamt-Plasmid-Pool der *Sau3A*-Genbank. Mit der Primerkombination THF34-upr wurde ein spezifisches PCR-Produkt von 1,6 kb erhalten, und die Kombination THF35-rpr ergab ein spezifisches PCR-Produkt von 0,9 kb. Mittels PCR (THF34 und upr als Primer) und Koloniehybridisierung (Sonde: Primer THF34 DIG-markiert) wurde das entsprechende Plasmid der *Sau3A*-Genbank identifiziert und mit pBT65 bezeichnet. Das 0,9 kb PCR-

Fragment wurde nach Elution aus dem Gel (2.16.) direkt zur Sequenzierung eingesetzt (2.25.1.). Nach Sequenzierung des Plasmid-Inserts von pBT65 und des 0,9 kb PCR-Fragmentes wurden zwei vollständige ORFs stromaufwärts von *thmA* (*orfY*, *thmS*) und ein ORF stromabwärts von *orfZ* (*thmH*) identifiziert. Abb. 23 gibt einen schematischen Überblick über die Anordnung aller identifizierten ORFs sowie deren Lokalisation auf den Plasmid-Inserts und den erhaltenen PCR-Produkten (ohne vektorkodierten Bereich). Die erhaltene DNA-Sequenz des 9179 bp *Sau3A*-Fragmentes und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abb. A, Anhang wiedergegeben und in der EMBL-Datenbank unter der Accession Number AJ296087 hinterlegt.

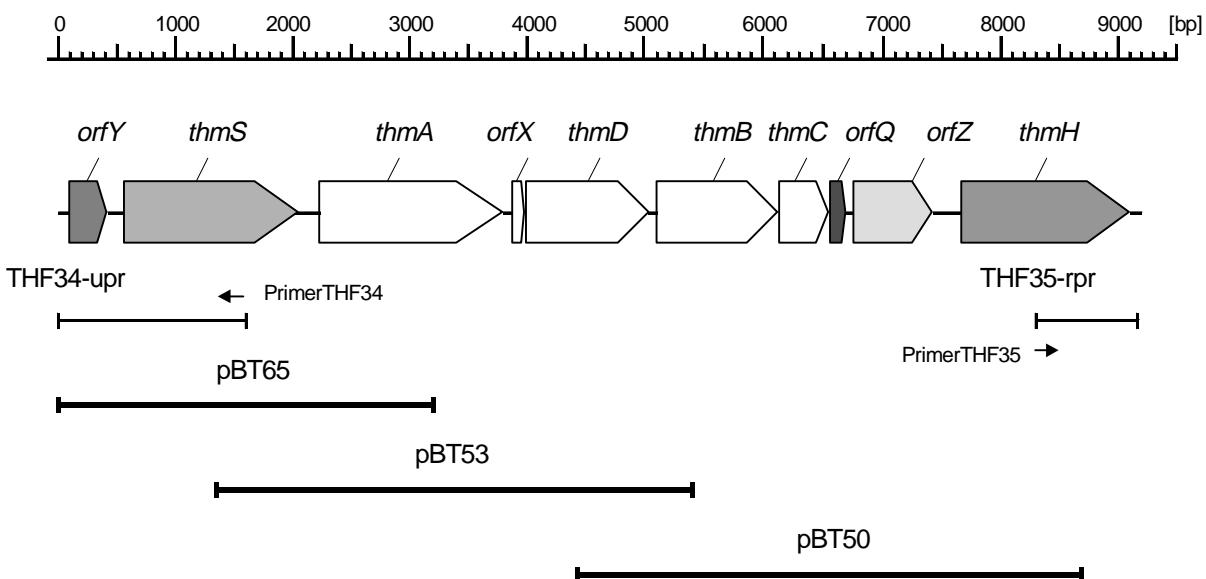


Abbildung 23: Anordnung aller identifizierten ORFs und deren Lokalisation auf den Plasmid-Inserts (pBT65, pBT53, pBT50) und den amplifizierten PCR-Produkten (THF34-upr, THF35-rpr). Die Lokalisation und Orientierung der verwendeten Primer THF34 und THF35 sind mit der Pfeilrichtung gekennzeichnet.

OrfY ist ein offener Leserahmen, der aus 324 bp (Position: 105–428 bp in Abb. A, Anhang) besteht und 7 bp stromaufwärts seines ATG-Startcodons eine purinreiche Sequenz GGAGG als mögliche Ribosomenbindestelle aufweist. Das durch *orfY* kodierte Protein hat eine Größe von 107 Aminosäuren und zeigt über einen Bereich von 69 Aminosäuren eine 30 %ige Identität und 48 %ige Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein (Orf4) mit bisher unbekannter Funktion. Das Gen dieses Proteins ist im Gencluster eines P450-abhängigen

Enzyms aus *Rhodococcus* sp. Stamm NI86/21 (NAGY *et al.*, 1995, *Accession Number* P43491) zwischen den Genen des Cytochrom P450 und des Ferredoxins lokalisiert. Für das abgeleitete Protein von *orfY* konnte ein theoretisches Molekulargewicht von 11,78 kDa und ein isoelektrischer Punkt von 4,43 bestimmt werden.

ThmS liegt stromaufwärts von *thmA* und hat eine Größe von 1503 bp (Position: 581–2083 bp in Abb. A, Anhang). Stromaufwärts des *thmS*–Startcodons ATG befindet sich im Abstand von 7 bp eine wahrscheinliche Ribosomenbindestelle AGGAG. Das abgeleitete Genprodukt (500 AS) würde einem theoretischen Molekulargewicht von 53,47 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5,15 entsprechen. *ThmS* zeigte signifikante Homologien zu prokaryotischen ALDHs, z.B. eine 48 %ige Identität zur *p*–Isopropylbenzaldehyd–Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* F1 (*Accession Number* U24215) und eine 47 %ige Identität zur Phenylacetaldehyd–Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* ST (*Accession Number* Z92524), aber auch zu zahlreichen eukaryotischen ALDHs, die cytosolisch oder mitochondrial lokalisiert sind.

OrfQ ist 62 Nukleotide stromabwärts von *thmC* lokalisiert und umfaßt 144 bp (Position: 6563–6706 bp in Abb. A, Anhang). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies keine Übereinstimmung mit den in Datenbanken erfaßten Proteinen auf. Eine mögliche Ribosomenbindestelle stromaufwärts des postulierten Startcodons ATG war aus der Sequenz nicht erkennbar, was nicht für eine Translation des Proteins spricht. 45 Nukleotide stromabwärts von *orfQ* befindet sich *orfZ*, der eine Größe von 666 bp hat (Position: 6752–7417 bp in Abb. A, Anhang). Als mögliche Ribosomenbindestelle könnte das Sequenzmotiv AGGAG stromaufwärts des Startcodons dienen. Die Translation von *orfZ* würde ein Protein von 22,3 kDa mit einem isoelektrischen Punkt von 4,02 ergeben. Dieses hypothetische Protein zeigte Homologien zu hypothetischen Transmembranproteinen, die im Rahmen von Sequenzierungsprojekten postuliert wurden. Diese Sequenzhomologien erstrecken sich jedoch nur über Teilsequenzen, z.B. 143 Aminosäuren (Aminosäure 10–152) mit 25 % Identität zu MTH215 aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (*Accession Number* 026317) und über 107 Aminosäuren (Aminosäure 26–117) mit 25 % Identität zu einem Orf aus *E. coli* (*Accession Number* P28695).

ThmH befindet sich 253 bp stromabwärts von *orfZ* und besteht aus 1440 bp (Position: 7671–9110 bp in Abb. A, Anhang) und weist als Besonderheit ein GTG–Startcodon auf. Als weiterer möglicher Translationsstartpunkt könnte das Startcodon ATG 141 bp stromabwärts von GTG in Betracht kommen, der jedoch später aufgrund einer fehlenden purinreichen Sequenz als mögliche Ribosomenbindestelle stromaufwärts dieses Codons ausgeschlossen

wurde. Weiterhin reichten die Homologien der Aminosäuresequenz zu verschiedenen ALDHs über dieses Startcodon hinaus. Die Berechnung des theoretischen Molekulargewichtes ergab 51,47 kDa für Valin (GTG) und 46,5 kDa für Methionin (ATG) als Startcodon. Ersteres entspricht dabei eher dem typischen Molekulargewicht von ALDHs von etwa 50 kDa. Die Nutzung von GTG als Startcodon wird für Streptomyzeten häufig in der Literatur beschrieben (STROHL, 1992; NAGY *et al.*, 1995; LARKIN *et al.*, 1998; VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000). Die höchsten Sequenzhomologien für ThmH (479 Aminosäuren) bestehen zu verschiedenen hypothetischen, pro- und eukaryotischen ALDHs, unter anderem auch zu Succinatsemialdehyd-Dehydrogenasen, z.B. der hypothetischen ALDH aus *Streptomyces coelicolor* (59 % Identität, *Accession Number* AL355913), aus *Deinococcus radiodurans* (33 % Identität, *Accession Number* AE001862), aus *Bacillus subtilis* (32 % Identität, *Accession Number* D50453) und aus *Arabidopsis thaliana* (31 % Identität, *Accession Number* AF117335).

3.8.2. Codonnutzung

Der Ermittlung der Codonnutzung wurden die Sequenzdaten der Gene *thmADBC*, *thmS* und *thmH* zugrundegelegt. Die Berechnung des G+C-Gehalts ergab für *thmA* 62,7 %, für *thmB* 61 %, für *thmC* 59 %, für *thmD* 56 %, für *thmS* 61,3 % und für *thmH* 58,7 %. Der daraus resultierende G+C-Gehalt für die *thm*-Gene von etwa 60 % liegt somit bedeutend niedriger als der bestimmte G+C-Gehalt der Gesamt-DNA von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 von 71,3 % (KOHLWEYER *et al.*, 2000). Trotz dieser Differenz sollte eine bevorzugte Nutzung von G und C an dritter Stelle des jeweiligen Codons zu erwarten sein. Die analysierte Codonnutzung in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 sowie die verwendeten Start- und Stopcodons sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Aus der Tab. 8 geht hervor, daß für alle Aminosäuren das Codon mit einem G und/oder C an dritter Position am häufigsten genutzt wird. Für die Kodierung der Aminosäuren Leucin und Arginin mit 6 Codon-Möglichkeiten werden bevorzugt die Codons mit dem höchsten G+C-Gehalt genutzt. Das für Leucin kodierende Codon TTA ist in den analysierten Genen nicht aufgetreten. Als Startcodon wurde am häufigsten ATG, als Stopcodon TGA gefunden.

Tabelle 8: Codonnutzung von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Der Berechnung wurden die Sequenzdaten der Gene *thmADBC*, *thmS* und *thmH* zugrundegelegt.

Aminosäure	Codon	Anzahl	Gesamt-Anteil [%]	Aminosäure	Codon	Anzahl	Gesamt-Anteil [%]
Phe	TTT	15	16,9	Ala	GCT	41	17,9
	TTC	74	83,8		GCC	67	29,2
Leu	TTA	0	0	Tyr	GCA	40	17,5
	TTG	18	8,9		GCG	81	35,4
	CTT	48	23,8		TAT	31	40,3
	CTC	67	33,1		TAC	46	59,7
	CTA	7	3,5				
	CTG	62	30,7		His	CAT	19
Ile	ATT	33	27,0	Gln	CAC	31	38,0
	ATC	86	70,5		CAA	7	62,0
	ATA	3	2,5		CAG	82	7,9
Met	ATG	39	100	Asn	AAT	18	29,0
Val	GTT	33	17,9		AAC	44	71,0
	GTC	82	44,6	Lys	AAA	7	10,1
	GTA	13	7,1		AAG	62	89,9
	GTG	56	30,4	Asp	GAT	65	38,7
Ser	TCT	17	12,4		GAC	103	61,3
	TCC	20	14,6				
	TCA	15	11,0		Glu	GAA	22
	TCG	44	32,1		GAG	128	14,7
	AGT	10	7,3				85,3
	AGC	31	22,6		Cys	TGT	4
Pro	CCT	24	18,6	Trp	TGC	20	16,7
	CCC	30	23,2		TGG	48	83,3
	CCA	17	13,2				
	CCG	58	45,0		Arg	CGT	31
Thr	ACT	22	17,6	Arg	CGC	46	20,4
	ACC	52	41,6		CGA	22	30,3
	ACA	17	13,6		CGG	38	14,5
	ACG	34	27,2		AGA	4	25,0
Gly	GGT	52	26,5	Start	AGG	11	2,6
	GGC	77	39,3		ATG	5	7,2
	GGA	27	13,8		GTG	1	16,6
	GGG	40	20,4				
Stop				Stop	TAA	1	16,6
					TAG	1	16,6
					TGA	4	66,7

3.8.3. Transkriptionsanalyse

Durch Sequenzierung der benachbart von *thmADBC* gelegenen DNA-Bereiche konnten zwei ORFs *thmS* und *thmH* mit Homologie zu ALDHs identifiziert werden, die möglicherweise beide für Enzyme des THF-Abbaus kodieren. Um Aussage über deren Induktion zu erhalten, wurde *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf unterschiedlichen Verbindungen (Succinat, THF, 4-Hydroxybuttersäure und 1,4-Butandiol) angezogen, die von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 abgebaut werden können (KOHLWEYER, 2000) und Substrate bzw. Intermediate im postulierten Abbauweg (Abb. 1) sind. Von allen Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und diese anschließend mittels Northern-Hybridisierungen auf spezifische Transkripte untersucht. Für die Hybridisierungen wurden die PCR-Produkte THF40-THF42 homolog zu *thmS* und THF52-THF57 homolog zu *thmH* eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Transkriptionsanalyse sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Auswertung der Transkriptionsanalyse von *thmS* und *thmH*. (+) Transkripte detektierbar; (-) keine Transkripte detektierbar; (n.d.) nicht durchgeführt.

Wachstumssubstrat	<i>thmS</i>	<i>thmH</i>
Succinat	-	-
THF	+	-
4-Hydroxybuttersäure	+	n.d.
1,4-Butandiol	+	+

Da *thmS* beim Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf THF, 4-Hydroxybuttersäure und 1,4-Butandiol induziert war, konnte geschlußfolgert werden, daß das entsprechende Protein eine Rolle beim Abbau von THF und 1,4-Butandiol spielt. Da Succinatsemialdehyd ein gemeinsames Intermediat beim postulierten Abbau von THF, 4-Hydroxybuttersäure und 1,4-Butandiol ist, wurde die Hypothese aufgestellt, daß es sich bei *thmS* um das Gen einer Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (SSDH) handeln könnte. Die Transkription von *thmH* ist dagegen nur auf 1,4-Butandiol nachweisbar und nicht auf THF (Abb. 24). Dies könnte dadurch erklärt werden, daß *thmH* für eine 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase kodiert. Der Abbau von THF würde damit nach Hydroxylierung über γ -Butyrolacton und 4-Hydroxybuttersäure verlaufen, so daß 4-Hydroxybutyraldehyd nicht als Zwischenprodukt entsteht (Abb. 1). Es stellte sich allerdings die Frage, warum

ThmS keine Sequenzhomologien zu SSDHs besaß, dagegen aber ThmH. Eine eindeutige Identifizierung von *thmS* als Gen einer SSDH erfolgte durch Reinigung des Enzyms und N-terminaler Aminosäurebestimmung. In Kapitel 3.9. sind die entsprechenden Experimente beschrieben.

Die Größe der für *thmS* und *thmH* erhaltenen Transkripte wurde anhand von DIG-markierten RNA-Längenstandards bestimmt. Die Auswertung der für *thmS* erhaltenen Transkripte nach Wachstum der Zellen auf den genannten Substraten ergab jeweils Größen von etwa 3,3 kb, 3,8 kb und 6,3 kb (Ergebnis nicht dargestellt). Für *thmH* wurde ein Transkript mit einer Größe von etwa 4,7 kb erhalten (Abb. 24). Anhand der Größe der erhaltenen Transkripte war ersichtlich, daß *thmS* und *thmH* nicht monocistronisch abgelesen werden, sondern co-transkribiert werden.

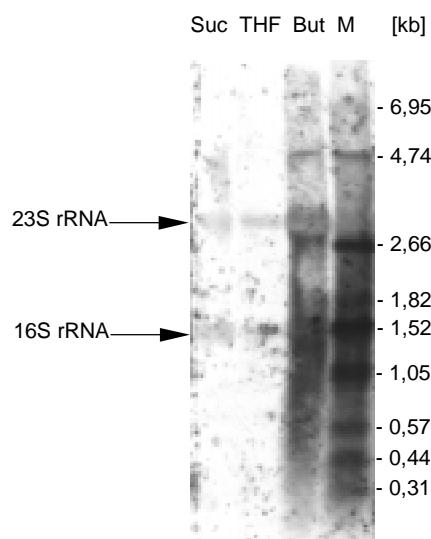


Abbildung 24: Transkriptanalyse von *thmH*. Analyse der Gesamt-RNA aus Succinat-gewachsenen Zellen (Suc), THF-gewachsenen Zellen (THF) und 1,4-Butanol-gewachsenen Zellen (But) von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. (M) DIG-markierter RNA-Größenstandard I. Als Hybridisierungssonde wurde das PCR-Produkt THF52-THF57 homolog zu *thmH* eingesetzt.

Die für *thmS* erhaltenen Transkripte hatten die gleiche Größe wie die für *thmA* erhaltenen Transkripte (3.6.1., bis auf die 4,6 kb-mRNA für *thmADBC* und die 1,7 kb-mRNA für *thmA*), was durch gleichzeitige Hybridisierung gegen *thmA* bestätigt wurde. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß *thmS* zusammen mit *thmA* (3,3 kb und 3,8 kb) bzw. *thmADBC* (6,3 kb) abgelesen wird. Diese Beobachtung schien jedoch aus physiologischer Sicht nicht plausibel, da beim Wachstum auf 4-Hydroxybuttersäure oder 1,4-Butanol die Transkription des

Gens der α -Untereinheit der THF-Monooxygenase nicht notwendig ist. Eine genaue Analyse der Transkripte wurde deshalb mittels RT-PCR (2.24.2.) durchgeführt. Strategie war es, die cDNA ausgehend vom 3' antisense Primer THF08 (kodiert in *thmA*) zu synthetisieren und anschließend mittels PCR spezifisch DNA-Fragmente zu amplifizieren; für *thmA* THF19–THF13, für den Übergang *thmA* und *thmS* THF10–THF20 und für *thmS* THF40–THF42. Zur RT-PCR wurde Gesamt-RNA aus THF-, 4-Hydroxybuttersäure- und 1,4-Butandiol-gewachsenen Zellen eingesetzt. Nach Auftrennung der PCR-Produkte in einer Standard-Agarose-Gelelektrophorese wurde festgestellt, daß für alle drei Primer-Kombinationen die gleichen Produkte wie mit Gesamt-DNA erzielt wurden, die in Kontrollreaktionen nicht auf vorhandene DNA in der Gesamt-RNA zurückgeführt werden konnten. Dieses Ergebnis zeigte, daß *thmS* mit *thmA* auch bei Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf 4-Hydroxybuttersäure- und 1,4-Butandiol transkribiert wird.

Der Transkriptionsstartpunkt stromaufwärts von *thmS* wurde mittels *primer extension* (2.24.1.) und Einsatz des Primers Cy5pe1 (Tab. 5) auf ein Thymin 37 bp stromaufwärts des ATG-Startcodons bestimmt. Als mögliche Promotor-Region könnte das Sequenzmotiv 5'CGGCTC-N₅-TAGCA 3' stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes in Frage kommen, das Ähnlichkeit zur -24/-12-Erkennungssequenz eines σ^{54} -Faktors aufweist (Abb. 25). Eine mögliche Terminator-Region stromabwärts von *thmS* ist aus der Nukleinsäuresequenz nicht ersichtlich, was im Einklang mit den nachgewiesenen Transkripten von *thmS* steht.

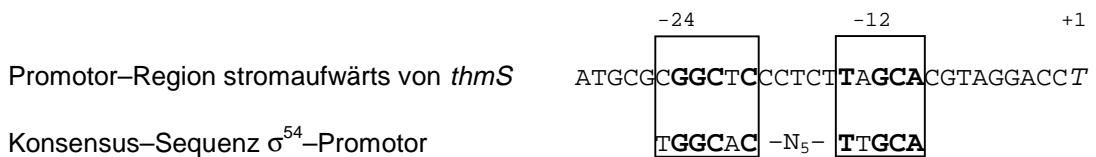


Abbildung 25: Vergleich der DNA-Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes von *thmS* mit der Konsensus-Sequenz eines σ^{54} -Faktors (WÖSTEN, 1998). Identische Nukleotide sind fett gedruckt.

Da weiterhin für *thmS* und *thmA* eine mRNA von 3,8 kb detektiert wurde und diese nur zusätzlich einen Bereich stromaufwärts von *thmS* kodieren kann, wurde Gesamt-RNA aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen mit einer spezifischen Sonde gegen *orfY* (Einsatz von PCR-Produkt THF54–THF55) hybridisiert. Es zeigte sich, daß die Transkription von *orfY*

nur in THF–gewachsenen, nicht aber in Succinat–gewachsenen Zellen erfolgte und für *orfY* nur das 3,8 kb–Transkript detektiert werden konnte. Anhand der Transkriptionsanalyse von *orfY* kann geschlußfolgert werden, daß *orfY* gemeinsam mit *thmS* und *thmA* THF–induziert transkribiert wird.

Das für *thmH* erhaltene Transkript mit einer Größe von 4,7 kb konnte auch mit einer *orfZ*–spezifischen Sonde (Einsatz von PCR–Produkt THF49–THF31) detektiert werden. Aufgrund der bestimmten Größe muß aber noch weitere genetische Information stromabwärts von *thmH* auf diesem Transkript liegen. Die Transkription von *orfZ* wurde analog zu *thmH* nur beim Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf 1,4–Butandiol induziert und nicht beim Wachstum auf den Substraten Succinat und THF. Stromabwärts von *orfZ* befindet sich eine *inverted repeat*–Struktur (Position: 7498–7535 bp in Abb. A, Anhang), die eine Haarnadelstruktur mit einer freien Energie von –143,1 kJ/mol ausbilden könnte. Die Ausbildung dieser Sekundärstruktur, die zu einer Termination der Transkription führen würde, scheint jedoch nach dem Ergebnis der Transkriptionsanalyse als unwahrscheinlich, da diese ein gemeinsames Transkript für *orfZ* und *thmH* ergab.

3.8.4. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *orfZ*, *thmS* und *thmH*

Da die von *orfZ* abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien zu hypothetischen Transmembranproteinen zeigte, wurde diese mit den Programmen des Expasy–Servers DAS (CSERZO *et al.*, 1997), SMART (SCHULTZ *et al.*, 1998, SCHULTZ *et al.*, 2000) und TMHMM1.0 (SONNHAMMER *et al.*, 1998) auf die mögliche Sekundärstruktur untersucht. In Abb. 26 ist das erhaltene Ergebnis mit dem Internet–Programm TMHMM1.0 wiedergegeben. Vorausgesagt wird die Wahrscheinlichkeit der Topologie von OrfZ. Danach sind für OrfZ mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit 6 transmembrane Helices zu erwarten. Der N– und C–Terminus dieses Proteins befinden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit im periplasmatischen Raum. Da auch die Analyse der Sekundärstruktur von OrfZ mit den Computerprogrammen DAS und SMART die gleichen Ergebnisse brachte, scheint es wahrscheinlich, daß der beim Wachstum auf 1,4–Butandiol transkribierte *orfZ* für ein Transmembranprotein kodiert. Die computergestützte Analyse (SMART) ergab weiterhin, daß keine Signalsequenz vorhanden ist.

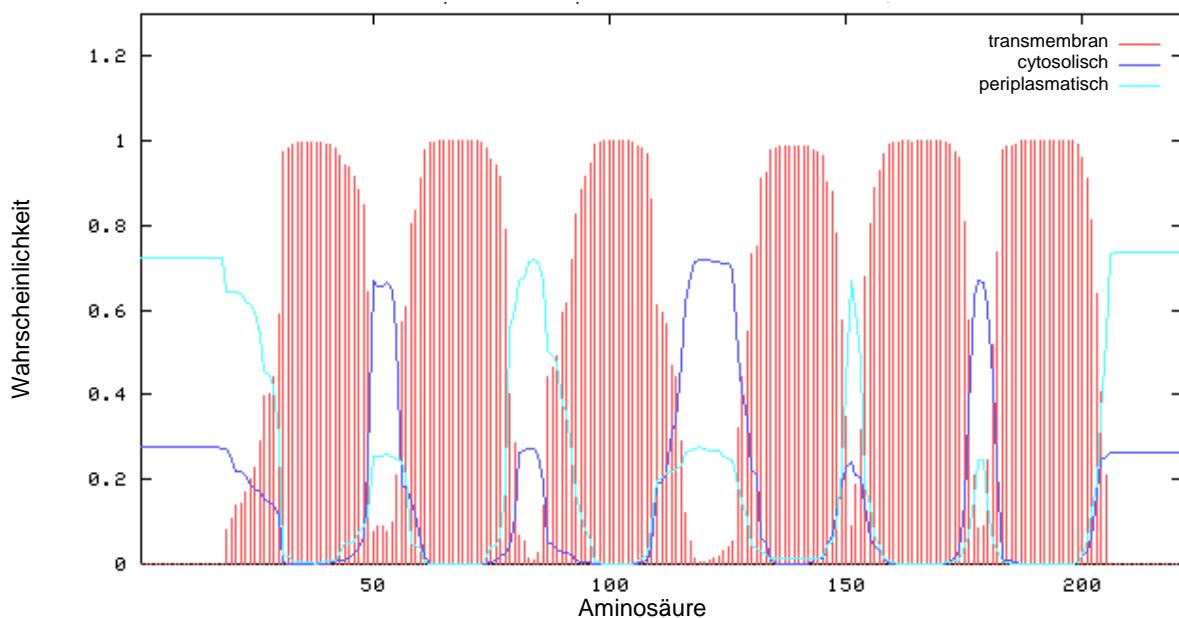


Abbildung 26: Putative Topologie von OrfZ. Die Topologievoraussage wurde unter Verwendung des Programms TMHMM1.0 (SONNHAMMER *et al.*, 1998) erstellt.

Für *thmS* wurde nach Transkriptionsanalyse postuliert, daß dieses Gen eine THF-induzierte SSDH kodiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies Homologien zu verschiedenen ALDHs auf, unter denen sich jedoch keine SSDH befand. Ein Sequenzvergleich von ThmS mit der Aminosäuresequenz der *p*-Isopropylbenzaldehyd-Dehydrogenase CymC aus *Pseudomonas putida* F1 (EATON, 1997) und der Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase StyD aus *Pseudomonas fluorescens* ST (BELTRAMETTI *et al.*, 1997) ist in Abb. 27 dargestellt. Im Vergleich der Gesamt-Sequenzen dieser ALDHs sind 35 % der Aminosäuren identisch. ThmS zeigte in den Aminosäure-Clustern **LELGGKSP** (Aminosäure 270–277) und **FYNNGQTCTAGS** (Aminosäure 298–309) eine gute Übereinstimmung zu den für ALDHs beschriebenen Konsensus-Sequenzen (PROSITE-DOCUMENT: PDOC00068). Diese Sequenzmotive enthalten ein hoch konserviertes Glutamat (E₂₇₁) und Cystein (C₃₀₅), die im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisiert sind (VELASCO *et al.*, 1998). Weiterhin findet man in der Aminosäuresequenz von ThmS ein GXXXXG-Motiv (Aminosäure 249–254), das in ALDHs als Bindemotiv für den Nicotinamid-Ring von NAD(P)⁺ konserviert vorliegt (VEDADI *et al.*, 1997).

ThmS	MTVIAKPDHLLRDDVQKFIDRPKKLFINGQWHDSIKGETLEVYDPAVGTKICTVAAGDAE	60
CymC	MSASSK---FNVDPAGFRNRN---LIGGQWKGSISGETITVENPATEEIIAHIPQGRHE	53
StyD	MTRSLTMN--SSLPAIDGLRLPHQMLIGGQWVNAQSDKTLNVYNPATGDTLTDVPGDVE	58
	*: . .: . * * . : . : * : * . : . * *	
ThmS	DVDRARAAARHAFDEGPWSKLNPNSERGRLVWRALDLLEEHADFAQIDALDNGKPVTAR	120
CymC	DIDEAVRVARATFESPAWRKIRPIDRGRILENVARKIEHADELAYLESLDTGKALTFAK	113
StyD	DVNAAVESAAATLQSDAWRRMPPSARERILLRLADLLEAHGDELARLETLNNGKLLIYSK	118
	*: * * : : . * : * * * : . * : * * . * : * : * :	
ThmS	AVDVAFSIELLRYMAGWSNKIYGETIPLTN---PADFHAYTLREPVGVVGQIVPWNFPL	176
CymC	AIDLPSTIDVFRYMGGWCSKLGTTTPPISFD---GREYHTYTRREPIGVVGAIITPWNYPL	170
StyD	MMEVGASAQWLRYMAGWATKLTGSTLDLSPPLPPDVRSRASTQRVPVGVVAIIPWNFPL	178
	: : : : : * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
ThmS	MMAVWKVAPALAACTVILKPAEQTPLSALRLAELTEEAEGFPPGVFNVITGFGETAGAAI	236
CymC	ALGSWKIASALAAGCTMVLKPTELPLSTLRLAELCLEAGLPEGALNIVNGHGEAGEAL	230
StyD	LMAVWKIAPALACGNTVVLKPAEETPLTALRLAELAMEAGLPAGALNVVTGRGETAGDAL	238
	: . * * : * . * * : * : * : * : * : * : * : * . * * : *	
ThmS	AAHDNIDKVAFTCSTEVCRLIAQAASGNLKKVSLELGGKSPVIVFGDSDIEQAVAGASSA	296
CymC	ARHPGVDKITFTCSTVVCKKIVEYALGNMKRVTLELGGKSPSIVFADADLDQVGLGAALA	290
StyD	VRHPKVAFTCSTEVCRIIGSACGRSLKAVSLELGGKSPVIVLADCDPQEAAEGAAAA	298
	: * : * : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
ThmS	IFYNNGQTCTAGSRLYVHRKVYDKVVEGIASEASALPIGHGLDPATRIGPLISAEQRDRV	356
CymC	VFFNSGQICFAASRLFVQDSVYDQVVEAVAAAAAQFKVGNGLDPDTLLGPLVSRKQQERV	350
StyD	IFFNHGQVCTAGSRLYVHESIYEDVIQRLAVIGESIVVGSLEQGVHMGPMVSKHHENV	358
	: * : * * * ↑ * . * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
ThmS	TGYIAQGREAGAEVIVGG-DTVGDGGYFIQOPTILTKTDP-SMSVVREEIFGPVILCAMAFD	414
CymC	MGYVQSGIEQGARLVCAGG-KSVGEKGYFLQOPTVFADAAP-SMRIAQEEIFGPVVSVIRFK	408
StyD	LRHIRNGIEDGADLICGGTEAPCAQGFFVKPTIFANREKKDIRLLSQEVFGPVLVATPFS	418
	: : . * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
ThmS	EDTIDSVVREANNSVYGLAASIYTRDISVAHRVAKRLKAGTIGINTHHVVDVALPFGGFK	474
CymC	DEAEA--IRMANDTAYGLAANIWTRDIKKAHRAHRLQAGSVWINCHGVIDPAAPFGGFK	466
StyD	DIAEV--VNEANRSVYGLGASIWTNDLSAALRINDELEAGTVWVNTHNMVDPNLPFGGFK	476
	: : . * * : * * . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
ThmS	QSGYGRDMGRDAIDQYTEVKSIGIAL-- 500	
CymC	QSGWGREVSEEGLSAYTETKTVCALLDD 494	
StyD	DSGVGREHGAAIAEHYTTTRSLVIAY-- 502	
	: * * : . . . * : * : :	

Abbildung 27: Vergleich der Aminosäuresequenz von ThmS mit verschiedenen ALDHs. CymC: *p*-Isopropylbenzaldehyd-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* F1 (EATON, 1997), StyD: Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* ST (BELTRAMETTI *et al.*, 1997). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (-). Die Sequenzmotive von ALDHs mit dem hoch konservierten Cystein und Glutamat (↑) und das Bindemotiv GXXXXG für den Nicotinamid-Ring von NAD(P)⁺ sind grau unterlegt. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

ThmH zeigte Homologien zu hypothetischen ALDHs. Zur Charakterisierung der Aminosäuresequenz von ThmH ist in Abb. 28 ein Sequenzvergleich mit ThmS dargestellt. ThmH und

ThmS weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine 32 %ige Identität auf. In der Aminosäuresequenz von ThmH findet man in Analogie zu ThmS ein konserviertes GXXXXG-Motiv (Aminosäure 227–232) und die hoch konservierten Aminosäuren Glutamat (E₂₄₇) und Cystein (C₂₈₅) (Abb. 28). Jedoch fiel auf, daß im Bereich des konservierten Cysteins mit NYQAGQSCISVQ (Aminosäure 278–289) keine gute Übereinstimmung zur Konsensus-Sequenz [F/Y/L/V/A]–XXX–G–[Q/E]–X–C–[L/I/V/M/G/S/T/A/N/C]–[A/G/C/N]–X–[G/S/T/A/D/N/E/K/R] (PROSITE-DOCUMENT: PDOC00068) bestand.

ThmS	MTVIAKPDHLLRDDVQKFIDRPKKLFINGQWHDSIKGETLEVYDPAVGTKICTVAAGDAE	60
ThmH	-----VQAEPFWIAG--RPATGSTVIDVQYPYDGRTVASVFVPSAE	39
	: : : * * : : . . : * * * . : . . * . . . *	
ThmS	DVDRAVAARHAFDEGPWSKLNPSERGRLVWRLLADLLEEHADEFFAQIDALDNGKPVTDAR	120
ThmH	QVEEAVAAMHAARD--VVGATSAHRRASALSHVADRLEQRSEEAAQVIVLESGKPIKWAR	97
	: * . * * * : * * . . . * . : : * * * : * * : . * : . * * : . *	
ThmS	AVDVAFSIELLRYMAGWSNKIYGETIPLTNPAD--FHAYTLREPVGVVQIVPWNFPLM	177
ThmH	-VEVARAASTFRWAAEEARWSGTLQRLLTDAGGAGRLALVRRFPRGSLLAITPFNFPLN	156
	* : * : . : * : * . : * * . * . * . * * * : * . * : * * : * * : * * :	
ThmS	MAWKVAPALAAAGCTVILKPAEQTPLSALRLLAELTEEAAGFPPGVFNVITGFGETAGAAIA	237
ThmH	LVAHKVAPAIAVGVPIIKPAPSTPLSSLFLGQLLAETDLHQGSWSVLP-VPNSQMEHLI	215
	: . . * * * : * . * * : * . * * : * . : * : * . : . : :	
ThmS	AHDNIDKVAFTGSTEVRCLIAQAASGNLKKVSLELGGKSPVIVFGDS---DIEQAVAGA	293
ThmH	LDPRRLPIISFTCISGPVWDIKSLVPR-KHVTLELGGNAAAVVCSDSSEQDLEWAAQRI	273
	. . : : * * * * * . . . * : * : * ↑ * * : : : * . * * : * * .	
ThmS	SSAIFYNNNGQTCTAGSRLYVHRKVYDKVVEGIASEASALPIGHGLDPATRIGPLISAEQR	353
ThmH	ALFANYQAGQSCISVQRYVVPRELYEVFTVLLSRHIGALRQGNPNDATDVGPVINEASA	333
	: * : * * : ↑ : * . * : * : * : . : : . * * : * : * * : * : * .	
ThmS	DRVTGYIAQGREAGAEVIVGGDTVGDGYYFIQPTILTKTDPSMSVVREEIFGPVLCAMAF	413
ThmH	IRIEQWIDDADVHAGAKILVGGRNGTS--LEPTLLADVPLAARILRDEAFGPVVSITPF	390
	* : * : . . * * : * : * * : * . : : * : * : * * : . .	
ThmS	DEDTIDSVVREANNSVYGLAASIYTRDISVAHRAVAKRLKAG-TIGINTHHVVDVALPFGG	472
ThmH	DS--LDSAAFAVNDSDFGLQTGVFTRDIRTAFRAHRDLEVGGVIIGDVPYSRADQMPYGG	448
	* . : * * . . * : * : * : . : * : * * * . * . : * : . : * : * :	
ThmS	FKQSGYGRDMGRDAIDQYTEVKSIGIAL--- 500	
ThmH	MKDSGIGREGVRSAMDDFTVEKVLVLAGVAL 479	
	: * : * * : * . * : * : * * : * : :	

Abbildung 28: Vergleich der Aminosäuresequenz von ThmS und ThmH. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (-). Das Sequenzmotiv von ALDHs mit dem hoch konservierten Glutamat (↑) und das Bindemotiv GXXXXG für den Nicotinamid-Ring von NAD(P)⁺ sind grau unterlegt. Das Sequenzmotiv mit dem hoch konservierten Cystein (↑) ist eingerahmt. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

3.9. REINIGUNG DER SUCCINATEMIALDEHYD-DEHYDROGENASE

Die anhand des Transkriptmusters von *thmS* aufgestellte Hypothese, daß es sich bei dem entsprechenden Protein um eine THF-induzierte SSDH handelt, sollte durch Aufreinigung des Enzyms aus THF-gewachsenen Zellen bewiesen werden. Ziel war es, nach der Reinigung des Enzyms dessen N-terminale Aminosäuresequenz zu bestimmen und diese mit der aus *thmS* abgeleiteten Sequenz zu vergleichen. Als Kontrolle für die Spezifität der Induktion wurden parallel Extrakte aus Succinat-gewachsenen Zellen auf SSDH-Aktivität untersucht. Zur Optimierung des Testsystems der SSDH-Aktivität wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Succinatsemialdehyd und den Elektronenakzeptoren NAD⁺ bzw. NADP⁺ bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen gearbeitet. Als Enzymlösung wurde RE aus THF-gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 eingesetzt. Es zeigte sich, daß eine maximale substratabhängige Aktivität mit Einsatz von 0,3 mM Succinatsemialdehyd, 1,6 mM NAD⁺ und einem pH-Wert von 9,0 zu verzeichnen war. Eine Substratkonzentration im Enzymtest von > 0,3 mM führte zu einer Substratüberschüß-Hemmung. Keine Aktivität war unter gleichen Bedingungen unter Einsatz von NADP⁺ nachweisbar. In REs aus Succinat-gewachsenen Zellen war unter keinen Bedingungen eine SSDH-Aktivität zu messen. Dies war ein klarer Hinweis darauf, daß es sich um eine NAD⁺-abhängige, THF-induzierte SSDH handelt.

Tabelle 10: Anreicherungsschema der SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1.

Verfahren	Gesamt-Einheiten [U]	Gesamt-protein [mg]	spezif. Aktivität [U/mg]	Aus-beute [%]	Anreicherungs-faktor
RE	59,2	520	0,11	100	1
Q-Sepharose	21,45	207,5	0,10	36,2	0,91
Ammoniumsulfat-fällung	13	110,5	0,12	22,0	1
Superdex 200	0	4,2	0	0	0

Zur Aufreinigung der SSDH wurde der nach Optimierung der Testbedingungen entwickelte Enzymtest eingesetzt (2.7.2.). Die SSDH wurde durch drei aufeinanderfolgende Schritte angereichert, so daß ein partiell gereinigtes Enzym erhalten wurde (Abb. 29). Diese Präparation wurde für die N-terminale Sequenzierung eingesetzt. Die Reinigungsschritte und die Bilanz der Anreicherung sind der Tab. 10 zu entnehmen.

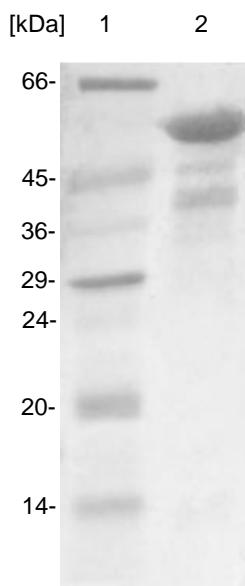


Abbildung 29: SDS-PAGE der partiell gereinigten SSDH. (1) Marker, (2) SSDH-Präparation.

Im ersten Schritt der Proteinreinigung wurde RE (2.5.) aus THF-gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 an Q-Sepharose getrennt. Abb. 30 zeigt das erhaltene Elutionsprofil der SSDH-Aktivität. Die SSDH eluierte innerhalb des linearen Gradienten von 0–1 M KCl bei einer Salzkonzentration von 0,4–0,6 M. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Endkonzentration 1,5 M) versetzt. Damit kam es zur vollständigen Fällung der SSDH, da nach Zentrifugation im Überstand keine Aktivität meßbar war, sondern nur im resuspendierten Pellet. Nach zwei Aufreinigungsschritten, Chromatographie an Q-Sepharose und Ammoniumsulfatfällung, wurde laut Tab. 10 keine Anreicherung des Enzyms (Anreicherungsfaktor 1) erzielt. Dieser Wert spiegelt jedoch die Instabilität der Enzym-Aktivität wieder. Nach Chromatographie an Superdex 200 kam es dann zum völligen Verlust der SSDH-Aktivität.

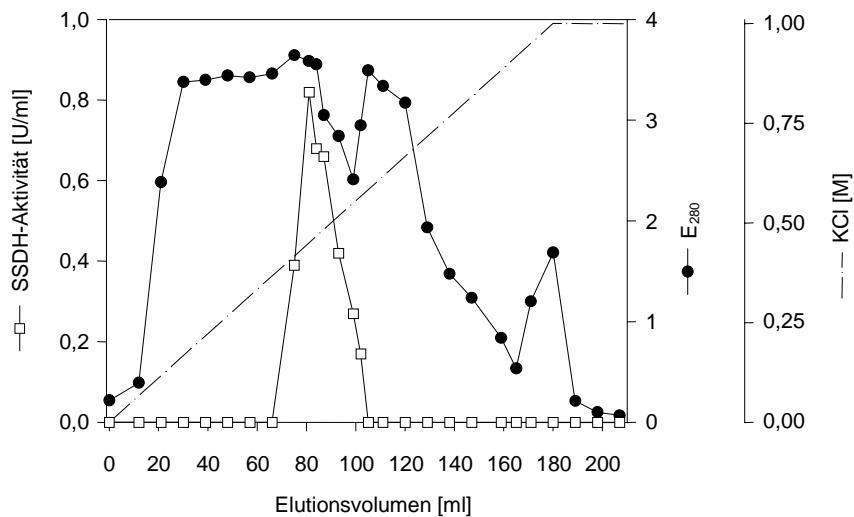


Abbildung 30: Chromatographie der SSDH an Q-Sepharose.

Da das Ziel der Aufreinigung ausschließlich in der Gewinnung des Proteins zur N-terminalen Aminosäurebestimmung bestand und somit kein aktives Enzym erforderlich war, sollte es ausreichen, in den erhaltenen Fraktionen nach Gelfiltration an Superdex 200 die SSDH anhand ihrer postulierten Größe (53,47 kDa für ThmS) zu identifizieren. Durch Aufnahme des Proteinelutionsprofiles bei 280 nm konnten drei Peaks detektiert werden, die anhand der erstellten Eichkurve für die verwendete Säule einem nativen Molekulargewicht von 550, 220 und 65 kDa entsprachen (Ergebnis nicht dargestellt). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Für das Protein mit einem nativen Molekulargewicht von 220 kDa konnte auf diese Weise gezeigt werden, daß es aus Untereinheiten von 53 kDa bestand (Abb. 29). Dies deutete auf eine homotetramere Struktur des Proteins hin, was im Einklang mit anderen ALDHs steht (SANCHEZ *et al.*, 1989; IWABUCHI und HARAYAMA, 1997; BUSCH und FROMM, 1999). Weiterhin ist aus dem SDS-Gel ersichtlich, daß neben dem 53 kDa-Protein noch kontaminierende Proteinbanden bei 40 und 45 kDa vorlagen.

Das 53 kDa-Protein wurde N-terminal ansequenziert. Die erhaltene Aminosäuresequenz ist in Abb. 31 wiedergegeben. Der Vergleich dieser Sequenz mit der von ThmS ergab eine 100 %ige Übereinstimmung. In der aus *thmS* abgeleiteten Sequenz befand sich ein zusätzlicher N-terminaler Methionin-Rest, der offenbar bei der Reifung des Proteins abgespalten wird.

N-Terminus der gereinigten SSDH (53 kDa)	T	V	I	A	K	
N-Terminus ThmS	M	T	V	I	A	K

Abbildung 31: Vergleich der aminoterminalen Sequenz der gereinigten SSDH nach Edmanabbau mit der von *thmS* abgeleiteten Aminosäuresequenz.

Nach der Reinigung der SSDH aus THF-gewachsenen Zellen können folgende Schlüsse gezogen werden: 1.) Die gereinigte SSDH wird durch *thmS* kodiert, da die N-terminale Sequenz des gereinigten Enzyms mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *thmS* übereinstimmt. 2.) Die SSDH ist THF-induziert, da keine Aktivität im RE von Succinat-gewachsenen Zellen meßbar war. Damit wurden die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von *thmS* bestätigt. Durch die Reinigung der SSDH gelang es erstmals, eine THF-induzierte ALDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zu isolieren. 3.) Die SSDH liegt unter nativen Bedingungen als Homotetramer vor, was ebenfalls durch native Gradienten PAGE bestätigt wurde.

4. DISKUSSION

4.1. DIE THF-MONOXYGENASE

Pseudonocardia sp. Stamm K1 ist in der Lage, auf THF bis zu einer Konzentration von 70 mM als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (KOHLWEYER, 2000). Der THF-Abbau konnte gaschromatographisch nachgewiesen werden, wobei eine THF-Konzentration von 20 mM innerhalb von 75 Stunden verstoffwechselt wurde. Erste Untersuchungen zum einleitenden Enzym beim THF-Abbau zeigten, daß sowohl eine Dehydrogenase als auch eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase ausgeschlossen werden können. Von KOHLWEYER (2000) wurde postuliert, daß der Abbau von THF durch eine Monooxygenase initiiert wird, da sowohl in ganzen als auch in permeabilisierten Zellen ein THF-abhängiger Sauerstoffverbrauch nachweisbar war. Diese Hypothese stützte sich auch auf den von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) postulierten THF-Abbauweg in *Rhodococcus ruber* 219, bei dem als einleitendes Enzym eine Monooxygenase vorschlagen wird (Abb. 1). Eine Reinigung der THF-Monooxygenase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 war jedoch nicht möglich, da nach Aufschluß der Zellen im Rohextrakt (RE) keine THF-spezifische Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (KOHLWEYER, 2000). Auch das Enzym aus *Rhodococcus ruber* Stamm 219 erwies sich als extrem instabil (BOCK, 1994; SPALLEK, 1998).

Eine Labilität der Oxygenase-Aktivität nach Aufschluß der Zellen wurde vor allem für viele Mehrkomponenten-Oxygenasen beschrieben (POWLOWSKI und SHINGLER, 1990; HARTMANS *et al.*, 1991; MIURA und DALTON, 1995; SMALL und ENSIGN, 1997; SPALLEK, 1998; GROSSE *et al.*, 1999). Ausgehend davon, daß das einleitende Enzym beim THF-Abbau eine Monooxygenase ist, wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem auch beschriebene Meßbedingungen für Mehrkomponenten-Oxygenasen beachtet. POWLOWSKI und SHINGLER (1990) stellten für die Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 fest, daß ihre Aktivität nur nach Aufschluß der Zellen in MOPS-Puffer, nicht aber in Phosphat-Puffer erhalten blieb. Gleichfalls konnte nur mit Zusatz von Fe^{2+} im Enzymtest eine Monooxygenase gemessen werden. Eine Abhängigkeit von der Zugabe von Fe^{2+} im Enzymtest wurde auch für andere Mehrkomponenten-Oxygenasen beschrieben (FOX *et al.*, 1989; WHITED und GIBSON, 1991; LOCHER *et al.*, 1991a; HARTMANS *et al.*, 1991; NEWMAN und WACKETT, 1995; HIGGINS *et al.*, 1996). Beispielsweise zeigten LOCHER *et al.* (1991a), daß mit Zusatz von Fe^{2+} die Monooxygenase-Aktivität im RE verdoppelt wird und für das gereinigte Enzym eine 5-fache

Aktivitätssteigerung zu verzeichnen war. Dieser Effekt könnte auf eine Komplementierung der Monooxygenase mit Eisenionen beruhen, die während der Enzymreinigung verloren gingen. Für viele Mehrkomponenten–Oxygenasen spielte für den Erhalt der Aktivität im RE auch der Zusatz von Glycerin im Aufschlußpuffer eine große Rolle (HARTMANS *et al.*, 1991; MIURA und DALTON, 1995; SMALL und ENSIGN, 1997). Beispielsweise wurde für die Alken–Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B–276 (MIURA und DALTON, 1995) ohne Zusatz von Glycerin innerhalb von 3 h ein Aktivitätsverlust von mehr als 70 % verzeichnet. Der Zusatz von DTT hatte dagegen keinen stabilisierenden Effekt auf die Oxygenase–Aktivität. Im Gegensatz dazu wird oft für die Herstellung von REs zur anschließenden Oxygenasebestimmung beschrieben, daß ein Aufschluß unter reduzierenden, aber auch unter anaeroben Bedingungen einen positiven Einfluß auf die Monooxygenase–Aktivität hat (HORMANN, 1991; BÜNZ und COOK, 1993; NGUYEN *et al.*, 1998), obwohl Sauerstoff das Substrat der Oxygenase darstellt. Aus diesem Grund wurde auch zur Bestimmung der THF–Monooxygenase RE eingesetzt, der unter reduzierenden und anaeroben Bedingungen hergestellt wurde. Trotz Variation der Bedingungen von Zellaufschluß und Enzymtest konnte in aufgeschlossenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 keine THF–abhängige Monooxygenase–Aktivität gemessen werden.

Wie sich im Laufe der vorliegenden Arbeit herausstellte, handelt es sich bei der putativen THF–Monooxygenase um eine Mehrkomponenten–Monooxygenase. Dieser komplexe Aufbau könnte ein Grund für den Verlust der Monooxygenase–Aktivität nach Aufschluß der Zellen sein. Eine irreversible Trennung der Protein–Komponenten voneinander durch Aufhebung von nichtkovalenten Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen, oder durch rein mechanischen Zerfall und/oder die Dissoziation der Kofaktoren könnte als Inaktivierungsgrund in Frage kommen.

Da im RE von THF–gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 keine Monooxygenase–Aktivität meßbar war und somit kein Enzymtest für die Aufreinigung zur Verfügung stand, mußte eine neue Strategie zur Identifizierung des einleitenden Enzyms beim THF–Abbau eingeschlagen werden. Diese Strategie ging davon aus, daß alle Oxygenasen eine Reduktaseaktivität besitzen, die häufig durch eine separate Komponente katalysiert wird (HARAYAMA *et al.*, 1992; MASON und CAMMACK, 1992). Die Reinigung einer solchen Reduktase–Komponente wurde in der Literatur oft beschrieben. Dabei bestand das eigentliche Ziel jedoch immer in der Identifizierung der Monooxygenase (PESSIONE *et al.*, 1999; WEBER *et al.*, 1992; BECKER *et al.*, 1997). Bei der Auftrennung von RE durch Chromatographie wurden die einzelnen Komponenten der Monooxygenase voneinander

getrennt, was mit einem vollständigen Aktivitätsverlust verbunden war. Die Reduktaseaktivität konnte mit Hilfe eines künstlichen Testsystems, bei dem die Elektronen von NAD(P)H auf einen artifiziellen Elektronenakzeptor wie Cytochrom c (POWLOWSKI und SHINGLER, 1990; PESSIONE *et al.*, 1999; GROSSE *et al.*, 1999), 2,6-Dichlorphenol-indophenol (BÜNZ und COOK, 1993; FOX *et al.*, 1989) oder Ferricyanid (WEBER *et al.*, 1992; MIURA und DALTON, 1995) übertragen wurden, nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Reduktaseaktivitäten von THF- und Succinat-gewachsenen Zellen konnte in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 eine THF-induzierte NADH-Cytochrom c-Reduktase detektiert werden, die anschließend bis zur Homogenität gereinigt wurde.

Die Aufreinigung der NADH-Cytochrom c-Reduktase erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Reinigungsstufen, wobei sich das Enzym unter den gewählten Bedingungen als sehr instabil erwies. Dies spiegelte sich in einem Anreicherungsfaktor von 1 wieder. Dazu ist jedoch anzumerken, daß die Aktivität im RE nicht nur auf die gereinigte THF-induzierte NADH-Cytochrom c-Reduktase zurückzuführen ist, sondern auch auf andere unspezifische NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivitäten beruht. Der eigentliche Anreicherungsfaktor für die THF-induzierte Reduktase müßte somit höher liegen. Die beobachtete Instabilität der Reduktase-Komponente während der Aufreinigung und nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen der Proteinlösung könnte auf den Verlust eines Kofaktors beruhen. Nach Charakterisierung dieser Enzym-Komponente wurde ein Verlust des [2Fe-2S]-Clusters nachgewiesen. Eine Instabilität des [2Fe-2S]-Clusters der Reduktase-Komponente wurde auch für die Alken-Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 beschrieben, wobei trotzdem noch ein Anreicherungsfaktor von 179 erreicht werden konnte (SMALL und ENSIGN, 1997). Das gereinigte Enzym wies nur noch einen Eisengehalt von 1,3 mol/mol Reduktase auf, der somit bedeutend niedriger als 2 mol Fe/mol Enzym für ein [2Fe-2S]-Cluster liegt und den Aktivitätsverlust erklärt. Auch die Reduktase-Komponente der Methan-Monooxygenase aus *Methylocystis* sp. Stamm WI14 erwies sich als sehr instabil, wobei die Aktivität des inaktiven Enzyms durch Zusatz von Fe^{2+} (2 mM FeSO_4) fast vollständig wieder hergestellt werden konnte (GROSSE *et al.*, 1999). Dieser Effekt könnte durch teilweise Rekonstitution des [2Fe-2S]-Clusters im inaktivierten Enzym erklärt werden. Da die Aufreinigung der THF-induzierten Reduktase primär nur als Teilschritt zur eigentlichen Charakterisierung der THF-Monooxygenase anzusehen ist, reichte das entwickelte Aufreinigungsschema aus, homogenes Enzym zu erhalten, mit dem eine strukturelle Charakterisierung durchgeführt werden konnte.

Die gereinigte Reduktase zeigte schon anhand ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz signifikante Homologien zu den Reduktase-Komponenten verschiedener löslicher Mehrkomponenten-Monooxygenasen wie der Phenol-Hydroxylasen aus *Pseudomonas putida* Stamm H (HERRMANN *et al.*, 1995) und *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), der Dimethylsulfid-Monooxygenase aus *Acinetobacter* sp. Stamm 20B (HORINOUCHI *et al.*, 1997) und der Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994). Alle diese Monooxygenasen gehören zu einer Klasse von Monooxygenasen, deren katalytisches Zentrum durch ein binukleares Eisenzentrum gebildet wird. Diese MMOs sind meist aus drei Komponenten aufgebaut: einer Oxygenase (aus 2–3 Untereinheiten), einer NAD(P)H-Akzeptor-Reduktase und einem Kopplungsprotein. Zu dieser Klasse gehören aber auch Vierkomponenten-Monooxygenasen, die als zusätzliche Komponente ein Ferredoxin mit einem Rieske-Typ [2Fe–2S]-Cluster besitzen (YEN und KARL, 1992; ZHOU *et al.*, 1999; VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000). Die NAD(P)H-Akzeptor-Reduktase dieser komplex aufgebauten Enzymsysteme ist ein etwa 40 kDa großes Protein mit monomerer Struktur und katalysiert den Elektronentransfer von NAD(P)H zur terminalen Oxygenase. In allen untersuchten Fällen war die Reduktaseaktivität mit NADH als Elektronendonator bedeutend höher als mit NADPH (NEWMAN und WACKETT, 1995; MIURA und DALTON, 1995; SMALL und ENSIGN, 1997; PESSIONE *et al.*, 1999). Am Transport der Elektronen sind ein Flavin-Kofaktor und ein Chloroplasten-Typ [2Fe–2S]-Cluster beteiligt (LUND *et al.*, 1985; MASON und CAMMACK, 1992). Diese charakteristischen Merkmale der NAD(P)H-Akzeptor-Reduktasen konnten auch für die isolierte NADH-Cytochrom c-Reduktase nachgewiesen werden (Tab. 11). Das Spektrum der homogenen Reduktase, das durch Überlagerung der Spektren der beiden Kofaktoren zustande kam, zeigte Ähnlichkeit zum Spektrum der Reduktase-Komponente verschiedener MMOs, z.B. der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (MIURA und DALTON, 1995), der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (POWLOWSKI und SHINGLER, 1990) und der Methan-Monooxygenasen aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (COLBY und DALTON, 1978) und *Methylosinus trichosporium* OB3b (FOX *et al.*, 1989).

Tabelle 11: Eigenschaften der NAD(P)H-Akzeptor-Reduktase verschiedener MMOs. Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276 (MIURA und DALTON, 1995), Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (COLBY und DALTON, 1978), Toluen-2-Monooxygenase aus *Burkholderia cepacia* G4 (NEWMAN und WACKETT, 1995), Alken-Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 (SMALL und ENSIGN, 1997), Phenol-Hydroxylase aus *Acinetobacter radioresistens* (PESCIONE et al., 1999), Toluen-4-Monooxygenase aus *Pseudomonas mendocina* KR1 (PIKUS et al., 1996), (n.b.) nicht bestimmt.

Die Bestimmung des Fe–Gehalts der homogenen Reduktase–Komponente ergab einen maximalen Wert von 1 mol Fe/mol Enzym, d.h. nur 50 % des zu erwartenden Wertes für ein [2Fe–2S]–Cluster. Bei einigen Präparationen wurde sogar ein völliger Verlust des Eisens beobachtet, was zu einem vollständig inaktiven Protein führte. D.h., die niedrige spezifische Aktivität der Reduktase–Komponente während der Anreicherung und der damit verbundene schlechte Anreicherungsfaktor sind in erster Linie auf die Instabilität des [2Fe–2S]–Clusters zurückzuführen.

Für den Flavin–Kofaktor der isolierten Reduktase konnte gezeigt werden, daß dieser kovalent am Enzym gebunden ist. Diese Tatsache stellt insofern eine Besonderheit dar, da bisher 1.) erst ca. 25–30 Enzyme mit einem kovalent–gebundenen Flavin bekannt sind und 2.) für die NAD(P)H–Akzeptor–Reduktase einer Mehrkomponenten–Oxygenase noch nie ein kovalent–gebundenes Flavin beschrieben wurde (MEWIES *et al.*, 1998). Vielmehr war die schwache Flavin–Bindung ein Problem bei der Proteinreinigung dieser Reduktasen (WEBER *et al.*, 1992; XUN, 1996; NEWMAN und WACKETT, 1995; PIKUS *et al.*, 1996; HIGGINS *et al.*, 1996; PESSIONE *et al.*, 1999). Die kovalente Bindung des Flavins konnte für die isolierte Reduktase durch eine Vielzahl von Ergebnissen belegt werden. Alle erhaltenen Präparationen der Reduktase–Komponente zeigten einen konstanten Flavingehalt von 1 mol Flavin/mol Protein. Nach Denaturierung der Reduktase mittels Trichloressigsäure und Hitze konnte im erhaltenen Überstand kein Flavin nachgewiesen werden, und das gesamte Flavin befand sich im Pellet. Auch unter denaturierenden Bedingungen im SDS–Gel kam es zu keiner Abtrennung des Flavins, und die Reduktase konnte über die Anregung des Flavins als fluoreszierende Bande sichtbar gemacht werden. Ein möglicher Grund für die kovalente Bindung des Flavin–Kofaktors könnte die Beteiligung der Reduktase am Abbau des Lösungsmittels THF sein. In Gegenwart dieses Lösungsmittels wird – insbesondere bei hohen Konzentrationen – ein stabiles Enzymsystem benötigt, das auch durch die starke Bindung der Kofaktoren gewährleistet werden kann. Die beobachtete Labilität des [2Fe–2S]–Clusters ist Folge der Enzymreinigungsprozedur und steht somit nicht im Widerspruch zu dieser Hypothese. So werden unter anderem kovalent–gebundene Flavine für Enzyme beschrieben, die am Abbau von aromatischen Verbindungen beteiligt sind (DECKER, 1993). Beispiele sind die *p*–Cresol–Methylhydroxylase aus *Pseudomonas putida* (MCINTIRE *et al.*, 1981) und die Vanillylalkohol–Oxidase aus *Penicillium simplicissimum* (DE JONG *et al.*, 1992; FRAAIJE *et al.*, 1997).

Wie bereits erwähnt, konnte ein kovalent–gebundenes Flavin bisher erst für 25–30 Enzyme beschrieben werden (MEWIES *et al.*, 1998). Diese Tatsache läßt vermuten, daß die

kovalente Bindung des Flavin-Kofaktors nur sehr selten auftritt. Auffallend ist, daß die überwiegende Zahl der Enzyme mit einem kovalent-gebundenen Flavin Dehydrogenasen oder Oxidasen sind. Die hier isolierte Reduktase-Komponente einer MMO stellt somit eine Besonderheit dar. Beispiele für Dehydrogenasen sind die *p*-Cresol-Methylhydroxylase aus *Pseudomonas putida* (MCINTIRE *et al.*, 1981) und die Succinat-Dehydrogenase, die sowohl in Bakterien als auch in Eukaryonten nachgewiesen wurde (MEWIES *et al.*, 1998). Oxidasen mit einem kovalent-gebundenen Flavin sind z.B. die Vanillylalkohol-Oxidase aus *Penicillium simplicissimum* (DE JONG *et al.*, 1992; FRAAIJE *et al.*, 1997) und die Sarcosin-Oxidase aus *Corynebacterium* sp. P-1 (WILLIE *et al.*, 1996).

Kovalent-gebundene Flavine können als FAD oder FMN vorliegen (DECKER, 1993). Für die isolierte Reduktase konnte der Flavin-Kofaktor mittels Phosphodiesterase-Behandlung (DE JONG *et al.*, 1992) als FAD identifiziert werden. Auch in allen anderen NAD(P)H-Akzeptor-Reduktasen von MMOs liegt der Flavin-Kofaktor als FAD vor (siehe Tab. 11; POWLOWSKI und SHINGLER, 1990). Der Befund, daß der Fluoreszenzwert des Flavins nach Umsetzung mit Phosphodiesterase dem Wert von freiem FMN entsprach, war insofern ungewöhnlich, als kovalent-gebundene Flavine bedingt durch ein Fluoreszenz-Quenching durch das Protein gewöhnlich deutlich niedrigere Fluoreszenzwerte als die freien Kofaktoren aufweisen (EDMONDSON *et al.*, 1978; DE JONG *et al.*, 1992; DECKER und BRANDSCH, 1997). Andererseits konnte auch das Phosphodiesterase-behandelte Flavin vollständig mit Trichloressigsäure ausgefällt werden und somit auch unter diesen Bedingungen eine kovalente Bindung an das Enzym bestätigt werden.

Die kovalent-gebundenen Flavine werden nach der Art der Bindung ihres Isoalloxazinringes an den Aminosäurerest des Enzyms eingeteilt: His(N₁)-8 α -Flavin, His(N₃)-8 α -Flavin, Cys(S)-8 α -Flavin, Cys(S)-6 α -Flavin und Tyr(O)-8 α -Flavin (MEWIES *et al.*, 1998). Kürzlich wurde auch die kovalente Bindung an einen Threonin-Rest beschrieben (NAKAYAMA *et al.*, 2000), wobei hier noch keine Details über die genauen Bindungseigenschaften vorliegen. Die Unterscheidung eines 8 α -substituierten Flavins von einem 6 α -substituierten Flavin ist durch einfache spektrale Analyse möglich (SINGER und EDMONDSON, 1980). Ein Cys(S)-6 α -Flavin zeigt im Gegensatz zu den 8 α -substituierten Flavinen ein abweichendes Absorptionsspektrum mit nur einem Maximum von 437 nm (DECKER und BRANDSCH, 1997). Das UV/VIS Spektrum von 8 α -substituierten Flavinen ist dagegen durch die zwei typischen Absorptionsmaxima bei ca. 380 und 450 nm charakterisiert (EDMONDSON *et al.*, 1978). Das Flavin der isolierten Reduktase konnte aufgrund seiner spektralen Eigenschaften

(Maxima bei 384 und 452 nm und hypsochromen Verschiebung des Spektrums nach Zugabe von SDS) der Gruppe der 8 α -substituierten Flavine zugeordnet werden.

Die Identifizierung des Aminosäurerestes, an dem das Flavin kovalent gebunden ist, kann durch Analyse der Fluoreszenzeigenschaften des Flavins unter unterschiedlichen Bedingungen, wie z.B. in Abhängigkeit vom pH-Wert, von der Oxidation mit Perameisenäsäure oder der reduktiven Spaltung mit Dithionit, erfolgen (SINGER und McINTIRE, 1984). Diese Tatsache nutzten SINGER und McINTIRE (1984), um ein Schema für die Vorgehensweise zur Identifizierung der Flavin–Aminosäure–Bindung zu entwickeln. Alle diese Untersuchungen gehen vom Aminoacyl–Flavin aus, um so eine Beeinflussung der Flavin–Fluoreszenz durch das Protein zu verhindern. Eine Möglichkeit, Aussage über den genauen Ort der Flavinbindung zu erhalten, ist die Isolierung des Flavin–Peptides und die Bestimmung der Sequenz mittels Edman–Abbau (DECKER und BRANDSCH, 1997; NAKAYAMA *et al.*, 2000), wobei sich die Aminosäure, die das Flavin trägt, durch ein ungewöhnliches Elutionsverhalten auszeichnet. Dies setzt jedoch voraus, daß die vollständige Aminosäuresequenz des Enzyms bekannt ist. Untersuchungen zur Bindungsstelle des Flavins der isolierten Reduktase wurden nicht durchgeführt. Grundvoraussetzung für diese Untersuchungen ist – wie schon erwähnt – das Vorliegen eines Flavin–Peptides. Ein solches Peptid konnte für die isolierte Reduktase nicht erhalten werden. Die Bestimmung der Flavin–Aminosäure–Bindung stellt zweifelsfrei eine interessante Aufgabenstellung dar, die jedoch nicht im Focus der vorliegenden Arbeit stand. Da es für kovalent–gebundene Flavine keine konservierten Sequenzmotive gibt, die Rückschlüsse auf den Ort der Bindung zulassen (SINGER und McINTIRE, 1984; MEWIES *et al.*, 1998), konnte auch aus der Aminosäuresequenz der Reduktase keine derartige Information abgeleitet werden.

Da die isolierte Reduktase die typischen Eigenschaften von NAD(P)H–Akzeptor–Reduktasen von MMOs besaß, war davon auszugehen, daß es sich hierbei um die Reduktase–Komponente der THF–Monooxygenase handelt. Diese Hypothese wurde durch Analyse der dem Gen der Reduktase benachbarten Gene bzw. der von ihnen kodierten Proteine untermauert. Die Isolierung weiterer Komponenten der putativen THF–Monooxygenase war nicht möglich, da – wie schon erwähnt – keine THF–abhängige Monooxygenase–Aktivität im RE detektierbar war und sich zur Aufreinigung weiterer Komponenten kein geeignetes Testsystem anbot. Die Primärstruktur der Reduktase–Komponente (ThmD) wies eine 33–37 %ige Identität zu den Reduktase–Komponenten verschiedener MMOs auf. In der Aminosäuresequenz konnten drei konservierte Motive identifiziert werden, die für die Bildung

des [2Fe–2S]–Clusters vom Chloroplasten–Typ Ferredoxin, für die Bindung des Flavin–Isoalloxazinringes und die Bindung der NAD(P)H–Ribose verantwortlich sein sollen (JOHNSON und OLSON, 1995; HORINOUCHI *et al.*, 1997). Das für ThmD kalkulierte Molekulargewicht steht ebenfalls in Einklang mit dem der isolierten Reduktase. Damit decken sich die aus ThmD ableitbaren Daten mit den bestimmten Eigenschaften der gereinigten THF–induzierten NADH–Cytochrom c–Reduktase und bestätigen die Annahme, daß dieses Protein die Reduktase–Komponente einer Mehrkomponenten–Monooxygenase ist.

Die von *thmD* stromaufwärts bzw. stromabwärts lokalisierten Gene *thmABC* wiesen signifikante Homologien zu weiteren Komponenten verschiedener MMOs auf. Die höchsten Homologien von ThmADBC bestanden mit 21–37 % Identität zur Alken–Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B–276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), aber auch zu den meist untersuchten Enzymen dieser Klasse, den löslichen Methan–Monooxygenasen aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990) und *Methylosinus trichosporium* OB3b (CARDY *et al.*, 1991a, 1991b). Weitere Homologien bestanden zu MMOs, die an der Umsetzung von Phenol, Toluol, Alkenen oder Dimethylsulfid beteiligt sind (NORDLUND *et al.*, 1990; YEN und KARL, 1992; EHRT *et al.*, 1995; HORINOUCHI *et al.*, 1997; HINO *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1999).

Die Analyse des Aufbaus von MMOs erfolgte für einige Enzyme nach Reinigung und Charakterisierung der Proteinkomponenten. Die Aufreinigung solcher komplex aufgebauten Enzyme ist sehr schwierig, so daß für einige MMOs Informationen über deren Struktur nur auf der Auswertung molekulärbiologischer Daten beruhen (VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000; putative MMOs in Datenbanken). Eine charakteristische Eigenschaft für die Aktivität von Mehrkomponenten–Enzymen im zellfreien Extrakt, wie sie auch für MMOs beschrieben wurde, ist, daß keine Proportionalität zwischen eingesetzter Proteinmenge und meßbarer Enzymaktivität zu beobachten ist (WHITED und GIBSON, 1991; HARTMANS *et al.*, 1991; TAN *et al.*, 1994). Beispielsweise beschreiben TAN *et al.* (1994) für die aus drei Komponenten bestehende Benzen–Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* ML2, daß mit Einsatz einer 5–fachen Proteinmenge im Enzymtest eine 27–fache Aktivitätssteigerung der Dioxygenase zu verzeichnen war. Diese Nicht–Linearität zwischen eingesetzter Proteinmenge und meßbarer Enzymaktivität im RE wurde auf die Limitierung einer Komponente zurückgeführt, da eine deutliche Aktivitätssteigerung mit Zusatz der gereinigten Ferredoxin–Komponente zum Testsystem erreicht werden konnte. Die deutliche Abnahme der Aktivität mit niedrigen Proteinmengen im Enzymtest ist durch die damit verbundene hohe Verdünnung der Enzylösung verursacht. STRIJEWSKI (1982) geht von einer Dissoziation

des Oxygenase–Komplexes bei geringen Proteinkonzentrationen aus. Für andere Mehrkomponenten–Oxygenasen wurde eine Limitierung der Reduktase–Komponente im zellfreien Extrakt gezeigt (BATIE *et al.*, 1987; LOCHER *et al.*, 1991b; BÜNZ und COOK, 1993). Eine weitere Schwierigkeit bei der Aufreinigung eines Mehrkomponenten–Enzyms besteht in der Dissoziation der Komponenten bei der Chromatographie des RE's. Die Wiederherstellung der Di– bzw. Monooxygenase–Aktivität konnte erst durch Komplemen-tierung einzelner Proteinfraktionen erreicht werden (HARTMANS *et al.*, 1991; WHITED und GIBSON, 1991; SMALL und ENSIGN, 1997; BECKER *et al.*, 1997; PESSIONE *et al.*, 1999). Mit dieser Strategie wurden einige MMOs aufgereinigt, und deren Komponenten konnten proteinchemisch charakterisiert werden. Beispiele für eine erfolgreiche Proteinreinigung sind die Methan–Monooxygenasen aus *M. capsulatus* (Bath) und aus *M. trichosporium* OB3b (COLBY und DALTON, 1978; FOX *et al.*, 1989), die Alken–Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B–276 (MIURA und DALTON, 1995), die Toluol–4–Monooxygenase aus *P. mendocina* KR1 (WHITED und GIBSON, 1991), die Toluol–2–Monooxygenase aus *B. cepacia* G4 (NEWMAN und WACKETT, 1995) und die Alken–Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 (SMALL und ENSIGN, 1997) Tab.12 gibt einen Überblick über den Aufbau verschiedener MMOs und deren Kofaktoren.

Die Alken–Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B–276 und die Methan–Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) sind Vertreter der Dreikomponenten–Enzyme und katalysieren die Hydroxylierung und/oder Epoxidation des entsprechenden Substrats. Die Oxygenase–Komponente der Alken–Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B–276 ist ein Heterodimer (53 kDa und 35 kDa). Dieser Aufbau ist jedoch nicht charakteristisch für MMOs, da diese Struktur bisher ausschließlich für die Oxygenase–Komponente der Alken–Monooxygenase nachgewiesen wurde. Andere bekannte MMOs besitzen eine Oxygenase–Komponente, die aus drei verschiedenen Untereinheiten besteht und eine heterohexamere Struktur bilden. Alle Oxygenase–Komponenten dieses Typs haben gemeinsam, daß die α –Untereinheit zwei Sauerstoff–verbrückte Eisenatome enthält, die das katalytische Zentrum des Enzyms bilden (FOX *et al.*, 1989; GALLAGHER *et al.*, 1997). Die am Transfer der Elektronen beteiligte Reduktase–Komponente wurde bereits vorgestellt (Tab. 11). Die dritte Komponente der MMOs ist ein regulatorisches Protein, das keine Kofaktoren besitzt und trotz ähnlicher Funktion unterschiedlich benannt wurde. So wird es bei der Alken–Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B–276 als Kopplungsprotein, bei der Methan–Monooxygenase als Protein B, bei der Alken–Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 als kleines Protein und bei der Toluol–4–Monooxygenase als Effektorprotein bezeichnet. Dieses regulatorische Protein besitzt keine Kofaktoren und ist nicht direkt am Elektronentransport beteiligt, sondern spielt

eine Rolle bei der Effizienz der Katalyse (LLOYD *et al.*, 1997). Für die Methan-Monoxygenase aus *M. trichosporium* OB3b wurde beschrieben, daß in Anwesenheit von Protein B eine 150-fache Aktivitätssteigerung beobachtet werden konnte (FOX *et al.*, 1989).

Für die Toluen-4-Monoxygenase aus *P. mendocina* KR1 wurde eine vierte, essentielle Komponente identifiziert, was durch Deletionsmutationen im Gencluster und dem damit verbundenen Verlust der Monoxygenase-Aktivität gezeigt werden konnte (YEN *et al.*, 1991). Diese Komponente ist ein 12,5 kDa Protein dimerer Struktur mit einem Rieske-Typ [2Fe-2S]-Cluster und wurde als Ferredoxin-Komponente identifiziert. Dieses Ferredoxin dient als Elektronenakzeptor der Reduktase-Komponente und überträgt die Elektronen auf die katalytische Untereinheit der terminalen Oxygenase-Komponente (MASON und CAMMACK, 1992; SMALL und ENSIGN, 1997). Eine Ferredoxin-Komponente wurde außer bei der Toluen-4-Monoxygenase aus *P. mendocina* KR1 auch für die Alken-Monoxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 (SMALL und ENSIGN, 1997; ZHOU *et al.*, 1999), die Isopren-Monoxygenase aus *Rhodococcus* sp. Stamm AD45 (VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000), die Phenol-Hydroxylase aus *Ralstonia eutropha* JMP134 (Accession Number AF06589), die Toluen/o-Xylen-Monoxygenase aus *Pseudomonas stutzeri* OX1 (BERTONI *et al.*, 1998) und die Toluen-3-Monoxygenase aus *Pseudomonas pickettii* PKO1 (BYRNE *et al.*, 1995) beschrieben.

Die vollständigen Sequenzen einer ganzen Reihe von MMOs sind in Datenbanken hinterlegt. Die aus den Gensequenzen verschiedener MMOs abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen untereinander signifikante Homologien (BYRNE *et al.*, 1995; BERTONI *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1999). Durch Sequenzvergleiche mit Datenbanken konnten die in dieser Arbeit beschriebenen Gene *thmADBC* als Strukturgene einer MMO identifiziert werden. Der Sequenzvergleich von ThmADBC zeigte, daß *thmA* und *thmB* für die α -Untereinheit und β -Untereinheit der Oxygenase, *thmD* für die Reduktase und *thmC* für das Kopplungsprotein kodieren. Die THF-Monoxygenase kann somit in die Gruppe der Dreikomponenten-Monoxygenasen eingeordnet werden. Ihr Aufbau entspricht dem der Alken-Monoxygenase aus *R. rhodochrous* B-276, zu deren Komponenten ThmADBC auch die höchsten Sequenzhomologien aufwiesen. Eine Aussage über die Untereinheitsstruktur des nativen Proteins kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht getroffen werden.

Tabelle 12: Aufbau und Kofaktoren von MMOs. Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276 (MIURA und DALTON, 1995), Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (COLBY und DALTON, 1978), Alken-Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 (SMALL und ENSIGN, 1997) und Toluen-4-Monooxygenase aus *Pseudomonas mendocina* KR1 (YEN *et al.*, 1991; YEN und KARL, 1992), (–) nicht vorhanden.

Mehrkomponenten-Monooxygenase	Alken-Monooxygenase	Methan-Monooxygenase	Alken-Monooxygenase	Toluol-4-Monooxygenase
Organismus	<i>R. rhodochrous</i> B-276	<i>M. capsulatus</i> (Bath)	<i>Xanthobacter</i> Stamm Py2	<i>P. mendocina</i> KR1
Aufbau	3 Komponenten	3 Komponenten	4 Komponenten	4 Komponenten
Katalytische Aktivität	Epoxidation	Hydroxylierung Epoxidation	Epoxidation	Hydroxylierung
Oxygenase				
Untereinheitsstruktur	$\alpha\beta$	$(\alpha\beta\gamma)_2$	$(\alpha\beta\gamma)_2$	$(\alpha\beta\epsilon)_2$
Molekulargewicht der Untereinheiten [kDa]	53; 35	54; 42; 17	58,1; 38; 9,6	55; 35; 9,6
Natives Molekulargewicht [kDa]	95	210	195	220
Fe-Gehalt [mol/mol]	2	4,6	3,8	3
Reduktase				
siehe Tab. 11				
Regulatorisches Protein	Kopplungsprotein	Protein B	Kleines Protein	Effektorprotein
Untereinheitsstruktur	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer
Molekulargewicht [kDa]	14	16	11	11,6
Prosthetische Gruppe	–	–	–	–
Ferredoxin				
Untereinheitsstruktur	–	–	Dimer	Dimer
Molekulargewicht [kDa]			13	12,5
Prosthetische Gruppe			Rieske-Typ Fe_2S_2	Rieske-Typ Fe_2S_2

Die Strukturgene aller bisher beschriebenen MMOs liegen in einem Gencluster vor, wobei interessanterweise die Anordnung der Gene für die verschiedenen MMOs unterschiedlich ist. Abb. 32 zeigt die Organisation der Gene verschiedener MMOs im Vergleich mit dem *thm*-Gencluster.

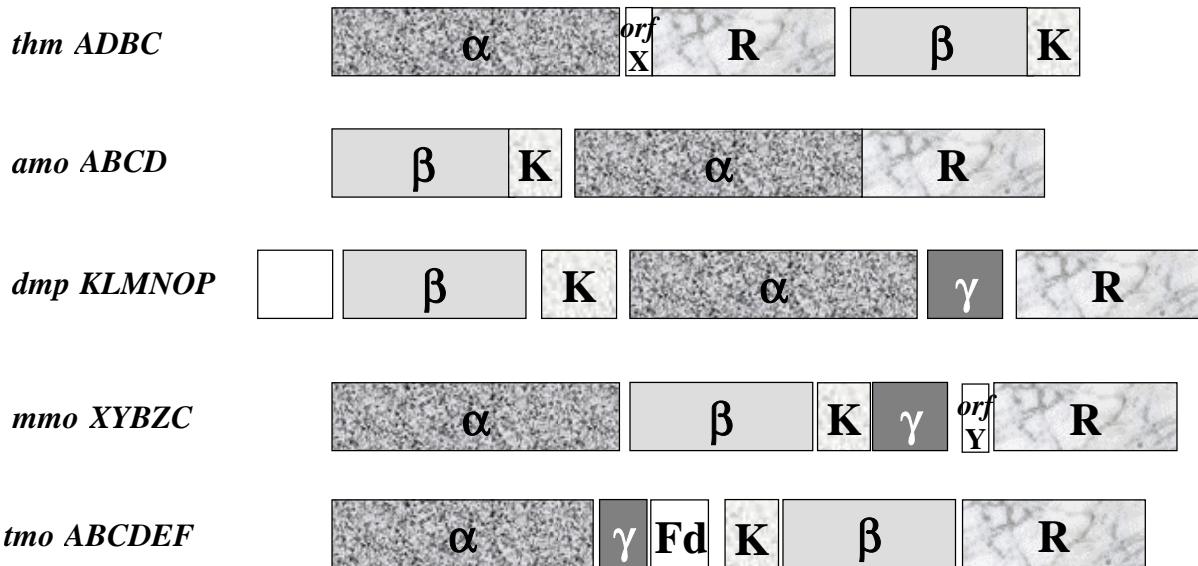


Abbildung 32: Anordnung der Strukturgene verschiedener MMOs. *thm*: THF-Monooxygenase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1; *amo*: Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), *dmp*: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), *mmo*: Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990) und *tmo*: Toluen-4-Monooxygenase aus *P. mendocina* KR1 (YEN und KARL, 1992).

Auffallend ist, daß bei allen MMOs das Gen der Reduktase-Komponente sonst immer am 3'-Ende zu finden ist. Die Lokalisation des Reduktase-Gens zwischen den Strukturgenen der Oxygenase, so wie es im *thm*-Gencluster der Fall ist, wurde dagegen bisher noch nie beschrieben. Die unterschiedliche Organisation der Strukturgene und in einigen Fällen das Vorhandensein des Gens für die γ -Untereinheit der Oxygenase und für die Ferredoxin-Komponente könnte auf eine Rekombination der Gene bzw. von Genbereichen im Laufe der Evolution beruhen. Auch in der Klasse der Mehrkomponenten-Monooxygenasen und -Dioxygenasen, deren Oxygenase-Komponente im Gegensatz zu den MMOs ein mononukleares, Nicht-Häm Eisen und ein Rieske [2Fe-2S]-Cluster besitzt, wird eine Kombination von funktionellen Domänen diskutiert (ROSCHE *et al.*, 1997). Interessant ist nun, daß auch zwischen diesen beiden Klassen teilweise signifikante Ähnlichkeiten in den Komponenten der Elektronentransportkette vorliegen. ROSCHE *et al.* (1997) machten dies in

einem Dendrogramm deutlich, aus dem hervorgeht, daß die Aminosäuresequenz der Reduktase-Komponente der Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) und der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 phylogenetisch zueinander eine größere Distanz aufweisen als zu verschiedenen Reduktase-Komponenten der Klasse von Mehrkomponenten-Enzymen mit einem mononuklearen Eisenzentrum. Auch die Primärstruktur der in MMOs teilweise vorkommenden Ferredoxin-Komponente besitzt die höchsten Homologien zu den Ferredoxin-Komponenten dieser Klasse (YEN *et al.*, 1991; ZHOU *et al.*, 1999). Diese Fakten lassen vermuten, daß zwischen den Klassen der Mehrkomponenten-Oxygenasen mit Nicht-Häm Eisen evolutionäre Zusammenhänge bestehen.

Stromaufwärts des Reduktase-Gens (*thmD*) befindet sich ein weiterer möglicher offener Leserahmen (*orfX*). Interessant ist, daß sich auch im Gencluster der Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) und *M. trichosporium* OB3b stromaufwärts der Reduktase ein möglicher ORF (*orfY* in beiden Fällen) befindet (STAINTHORPE *et al.*, 1990; CARDY *et al.*, 1991b). Deren abgeleitete Aminosäuresequenzen weisen zwar eine signifikante Homologie zueinander (35 % Identität, 60 % Ähnlichkeit) auf, jedoch nicht zur Primärstruktur eines Proteins bekannter Funktion. Mittels Westernblot-Analyse konnte ein durch *orfY* kodiertes Protein nicht nachgewiesen werden (MURRELL *et al.*, 2000). Somit ist die Funktion von *orfY* unklar. Gleches gilt auch für *orfX*, der ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit für kein Protein kodiert, da stromaufwärts keine mögliche Ribosomenbindestelle identifiziert werden konnte, die abgeleitete Aminosäuresequenz keine Homologie zu einem bekannten Protein aufwies und sich innerhalb von *orfX* eine *inverted repeat*-Struktur befindet.

Das aktive Zentrum der MMOs ist auf der α -Untereinheit der Oxygenase lokalisiert und wird durch ein Fe–O–Fe–Zentrum gebildet. Am binuklearen Eisenzentrum erfolgt die Sauerstoffaktivierung und Substratoxidation (PAULSEN *et al.*, 1994). Durch Sequenzvergleich von ThmA mit der Aminosäuresequenz der α -Untereinheit verschiedener MMOs konnte das hoch konservierte Motiv EX₍₂₈₋₃₂₎DEXRH₍₉₁₋₉₄₎EX₍₂₈₋₃₂₎DEXRH, welches für die Bildung des binuklearen Eisenzentrums verantwortlich ist, identifiziert werden (LIBSCOMB, 1994; POWLOWSKI und SHINGLER, 1994; JOHNSON und OLSEN, 1995). Für die Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) und *M. trichosporium* OB3b konnte durch spektroskopische und kristallographische Untersuchungen die Struktur des aktiven Zentrums aufgeklärt werden (LIPSCOMB, 1994; ROSENZWEIG *et al.*, 1997; ELANGO *et al.*, 1997; WESTERHEIDE *et al.*, 2000). Die Koordinierung der beiden Eisenatome im aktiven Zentrum

der Methan-Monoxygenasen, die über ein Sauerstoffatom miteinander verbunden sind, erfolgt über vier Glutamatreste (Glu_{114} , Glu_{144} , Glu_{209} und Glu_{243}) und zwei Histidinreste (His_{147} und His_{246}) (Abb. 33). Am $\text{Fe}(1)$ ist ein Wasser-Moleköl gebunden. Die konservierten Aspartatreste (Asp_{143} und Asp_{242}) bilden jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zum His_{147} bzw. His_{246} . In Analogie zu den hoch konservierten Aminosäuren der Methan-Monoxygenase findet man in der Sequenz der α -Untereinheit der THF-Monoxygenase die Glutamatreste Glu_{105} , Glu_{135} , Glu_{199} und Glu_{233} , die Histidinreste His_{138} und His_{236} sowie die Aspartatreste Asp_{134} und Asp_{232} (Abb. 34), die somit für die Ausbildung eines binuklearen Eisenzentrums verantwortlich sein sollten. Damit würde die Fixierung von $\text{Fe}(1)$ über Glu_{105} , Glu_{135} und His_{138} und von $\text{Fe}(2)$ über Glu_{199} , Glu_{233} und His_{236} erfolgen. Eine Interaktion von His_{138} mit Asp_{232} sowie His_{236} mit Asp_{134} kann ebenso postuliert werden.

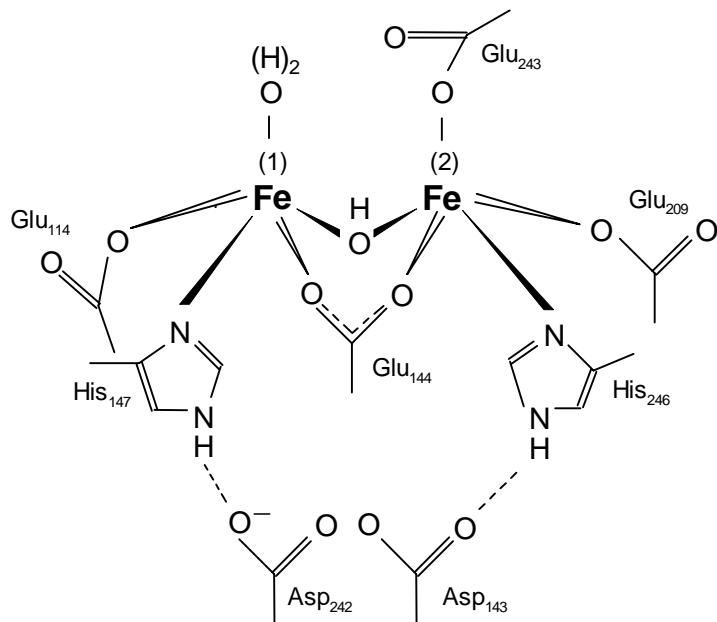


Abbildung 33: Struktur des aktiven Zentrums der Methan-Monoxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (LIPSCOMB, 1994).



Abbildung 14: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmA mit der Sequenz der α -Untereinheit der Methan-Monoxygenase. MmoX: α -Untereinheit der Methan-Monoxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (-). Die konservierten Aminosäure-Reste des Sequenzmotivs des binuklearen Eisenzentrums $EX_{(28-32)}DEXRHX_{(91-94)}EX_{(28-32)}DEXRH$ sind grau unterlegt. Eingerahmt sind die Aminosäuren der hydrophoben Tasche des aktiven Zentrums der Methan-Monoxygenase und die analogen Positionen in ThmA. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

Die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums der Methan-Monoxygenase aus *M. capsulatus* (Bath), in der die Eisenatome und ihre koordinierenden Aminosäuren lokalisiert sind, wird durch Thr_{213} und die hydrophoben Reste Leu_{110} , Ala_{117} , Phe_{188} , Phe_{192} , Leu_{204} , Gly_{208} , Ile_{217} , Phe_{236} und Ile_{239} , gebildet (ROSENZWEIG *et al.*, 1993). Für ThmA findet man in vier analogen Positionen die gleichen Aminosäure-Reste Ala_{108} , Phe_{182} , Leu_{194} und

Thr₂₀₃ (Abb. 34). Die Aminosäuren Leu₁₁₀, Phe₁₈₈, Gly₂₀₈, Ile₂₁₇, Ile₂₃₉ und Phe₂₃₆ der Methan-Monooxygenase sind in ThmA durch Val₁₀₁, Thr₁₇₉, Val₁₉₈, Leu₂₀₇, Met₂₂₆ und Val₂₂₉ ersetzt. Auffallend ist, daß in ThmA in drei analogen Positionen ein Valin als hydrophobe Aminosäure auftritt. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Primärstruktur von ThmA signifikante Ähnlichkeit zur Struktur der α -Untereinheit der Methan-Monooxygenase hat. Somit dürfte auch das aktive Zentrum beider Proteine ähnlich aufgebaut sein. Daß das aktive Zentrum der THF-Monooxygenase gewisse Abweichungen von dem der Methan-Monooxygenase zeigt, wie z.B. den Austausch von Phe₁₈₈ und Phe₂₃₆ durch einen Threonin- bzw. Methionin-Rest, ist aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität plausibel. Während Methan eine hydrophobe, aliphatische Verbindung darstellt, ist THF ein gut wasserlöslicher, zyklischer Ether.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *thmB* zeigte signifikante Homologien zur β -Untereinheit verschiedener MMOs. Die höchsten Homologien bestehen zur β -Untereinheit der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 mit 28 %iger Identität, der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 mit 26 %iger Identität und der Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) mit 27 %iger Identität. Vergleicht man die Primärstruktur der β -Untereinheiten dieser MMOs miteinander, so findet man nur sehr wenige konservierte Reste. Abb. 35 zeigt einen Sequenzvergleich von ThmB mit der β -Untereinheit verschiedener MMOs. Dieser Vergleich macht deutlich, daß nur 19 Aminosäurereste konserviert vorliegen, was bezogen auf die Gesamtsequenz (ca. 350 Aminosäuren) einer Identität von nur 5,4 % entspricht. Für die β -Untereinheit der Methan-Monooxygenase aus *M. trichosporium* OB3b wurde in *cross-linking*-Experimenten eine Vernetzung mit der α -Untereinheit und mit der Reduktase gezeigt (FOX *et al.*, 1991). Aufgrund des gemeinsamen *cross-linked*-Produkts aus β -Untereinheit und Reduktase wird diskutiert, daß sich die Bindestelle der für die Monooxygenase-Aktivität essentiellen Reduktase-Komponente an der β -Untereinheit des Oxygenase-Komplexes befindet.

ThmB	-----MSASAAERRELRELERSQHWFI PERKRSSLYEDVTIDVQPSV	42
AmoA	-----MTTEATVARPVELEGHRTFTWFTPARRKPTEYEELYTVQQSTP	43
DmpL	-----MSVEIKNTVDPIRQTYGNLQRRFGD--KPASRYQEASYDIEAVT	43
MmoY	MSMLGERRRGLTDPEMAAVILKALPEAPLDGNNKMGYFVTPRWKRILTEYEALTVYAQPN	60
	.. : * : ..	
ThmB	HRHTR----FGYPIA FPNGRPSFWDDSTA IQSSDWYAFRDPGGLWERTFFQTGSTHEREI	98
AmoA	DEWLH----VDWPLRFDDGRAPWEEESSAVRTSEWSAYRDPHQLWQRPYVSTCNQDQQAL	99
DmpL	NFHYR-----PLWDPQHELHDPTRTAIRMTDWHKVTDPQFYGGAYVQTRARMQEAT	95
MmoY	DWIAGGLDWGDTQKFHGGRPSWGNETTELRTVDWFKHRDPLRRWHAPYVKDKAEEWRT	120
	.. : : * * : ..	
ThmB	ENDLQVARDNNLFDAVSKEWVD-FLSAQLLPISLTYEGLVAPQSAIRPALGDAIANCLG	157
AmoA	ARLVPVLTMG--SAAITPIWSQKILARSYAAWPFVEYGLFLSLAYAVRQAMSDTVQFSVV	157
DmpL	EHAYGFCEKRELLSRLPAELQA-KLLRCLVPLRHAELGANMNNSSIAGDSIAATVTQMHI	154
MmoY	DRFLQGYSADGQIRAMNPTWRTSSCNRYWGAFLFNEYGLFNAHSQGAREALSDVTRVSLA	180
	* * : ..	
ThmB	YSAGYKLRQAQALVLYGGELEREIPGFSTADGK--RRFLEDPEWQPTRRYLER-LASITD	214
AmoA	FQAVDRMRLLQDIVHHLHDLQ-ESPEFSDAGAR--EAWMSDSTLVPIREVIER-IAASQD	213
DmpL	YQAMDRLLGMQYLSRIGLLLD---GGTGEALDQAKAYWLDDPIWQGLRRYVED-SFVIRD	210
MmoY	FWGFDKIDIAQMIQLERGFLAKIVPGFDESTAVPKAEWTNGEYVKSARLAVEGLWQEVD	240
	: . : * : * . : .. : .. * : * * : ..	
ThmB	WAETIVAA NICFEPLIGSLLRREVLIRLAGSYGDATTPTLGQVAQAEWGWRDWSVALVR	274
AmoA	WVEILVAGTLV FEPPLVGH LAKAELFSRRAPMFGDGTTPAVLASALLDSGRHLESQVALVR	273
DmpL	WFELGLAQNVLVLDGLLQPLMYQRFQDWLT-ENGGSDVAMLTEFMRDWYGESTRWDAMFK	269
MmoY	WNESAFSVH AYVDALFGQFVRR E FQRLAPRFGDNLTPFFINQAQTYFQIAKQGVQDLYY	300
	* * .. : * . : .. : .. : * . .. : ..	
ThmB	-FILNDTTYSEANTQKVQEWLEDWGT MARE AIDALEPVFSSIDPAYSETRQRLNQDHADL	333
AmoA	-LVCQDPVHGDQNQATVRRWIEEWQPRCKAAAQSFLPTFSDCGIDAKESANALSRALAN-	331
DmpL	TVLAEN---DANREQVQAWLEVWEPRAYEALLPLAEEATGIAALDEVR----SAFATR	320
MmoY	NCLGDDPEFSDYNRTVMRNWTGKWL EPTIAALRDFMGLFAKLPAGTTDKEEITASLYRVV	360
	: : : : * : : * * * : ..	
ThmB	LQECGLKSSEVTV-----	346
AmoA	-QRAAVEGAGITA-----	343
DmpL	LQKIGLKSREE-----	331
MmoY	DDGSRTTPAGSTSRTAIRSLKRFWQD	387

Abbildung 35: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmB mit der Sequenz der β -Untereinheit von verschiedenen MMOs. AmoA: Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), DmpL: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), MmoY: Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (-). Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

Die Funktion von ThmC als Kopplungsprotein der THF-Monooxygenase wurde aufgrund der bestehenden Homologie (21 % Identität, 42 % Ähnlichkeit) zum Kopplungsprotein der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 postuliert. Die Ähnlichkeit erstreckt sich über die gesamte Aminosäuresequenz. In Abb. 36 ist ein Sequenzvergleich von ThmC und AmoB gezeigt. Für das Kopplungsprotein der Alken-Monooxygenase konnte gezeigt werden, daß

mit Anwesenheit dieses Proteins im Enzymtest eine Aktivitätssteigerung der Monooxygenase erreicht werden konnte (MIURA und DALTON, 1995). Das gereinigte Protein wies im Gegensatz zur aus *amoB* abgeleiteten Aminosäuresequenz einen um 11 Aminosäuren verkürzten N-Terminus auf (SAEKI, 1998). Dabei erfolgt die N-terminale Abspaltung zwischen Ser₁₁ und Thr₁₂. Eine solche mögliche Schnittstelle im N-terminalen Bereich von ThmC konnte nicht identifiziert werden. ThmC zeigt an der entsprechenden Position im Sequenzvergleich ein Ser₈ und ein Ala₉. Für das regulatorische Protein (Protein B) der Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath) wurde beobachtet, daß dieses in zwei verkürzten Formen (Protein B' und Protein B'') auftritt, die inaktiv sind (LLOYD *et al.*, 1997). Beim aktiven Protein B liegt dagegen nur eine aminotermrale Abspaltung des Methionins vor. Protein B' und Protein B'' werden durch Spaltung von Protein B zwischen Met₁₂ und Gly₁₃ und zwischen Gln₂₉ und Val₃₀ gebildet. Das gleichzeitige Auftreten von aktivem und inaktivem Protein B wurde mit der Regulation der Aktivität in der Zelle erklärt. Man geht davon aus, daß die Spaltung nicht durch Proteasen, sondern autokatalytisch erfolgt. Die Funktion des N-Terminus ist bisher unklar (WALTERS *et al.*, 1999). Die Spaltstellen von Protein B sind in der Aminosäuresequenz von ThmC nicht konserviert.

ThmC	---	MTDATATSAEENGSGDAAYDYVGLVMQRTPEGE-AVGRVCSQTPGVVEVITNTTFLDV	56
AmoB		MTDVKEETTVTSTPSAAVPGTKNRRVGISLISSSDTEAAVEHIAETQPDAKIDFRDCFYKI	60
		: . : * . * * : . . : . : * * : . : . * * : . : . * . : . * . :	
ThmC		RAKDRLIVNFDAVGEELGSDMDGYVLQEHMTTHYGRMAMTDDSFILVADPLELIELINSG	116
AmoB		ERDGQLSFDMALSEIAGRDIIDTDIFLVNMSTYYGRIVVSDGRVDIYAE-IQPARFKD--	117
		. . . : * . . : . * . * * : * . : . * : * : . : . : . : . : . :	
ThmC		S 117	
AmoB		-	

Abbildung 36: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmC mit der Sequenz des Kopplungsproteins der Alken-Monooxygenase. AmoB: Kopplungsprotein der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, konservierte Substitutionen durch Doppelpunkt (:), semi-konservierte durch Punkt (.), eingefügte Lücken durch (-). Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

Obwohl die Primärstruktur von Protein B aus *M. capsulatus* (Bath) und *M. trichosporium* OB3b zueinander eine signifikante Homologie (66 % Identität, 89,4 % Ähnlichkeit) aufweisen, unterscheidet sich deren regulatorische Funktion in bezug auf die Monooxygenaseaktivität (LLOYD *et al.*, 1997). Für Protein B aus *M. capsulatus* (Bath) wurde gezeigt, daß sich in dessen Anwesenheit die katalytische Aktivität der Oxygenase – von einer Oxidase zu einer Oxygenase – ändert (LUND *et al.*, 1985). Ohne Protein B im Enzymtest wurde keine

Substratoxidation beobachtet. Damit reguliert Protein B aus *M. capsulatus* (Bath) wahrscheinlich den Elektronentransfer von der Reduktase auf die Oxygenase und koppelt den NADH–Verbrauch mit der Substratoxidation. Im Gegensatz dazu wird für die Aktivität der Methan–Monooxygenase aus *M. trichosporium* OB3b beschrieben, daß eine Substratumsetzung auch ohne Protein B erfolgt und daß in dessen Anwesenheit eine 150–fache Aktivitätssteigerung zu verzeichnen ist (FOX *et al.*, 1989). Somit spielt Protein B aus *M. trichosporium* OB3b eine Rolle bei der Effizienz der Katalyse. Protein B bindet an die α –Untereinheit des Oxygenase–Komplexes (FOX *et al.*, 1991) und verändert wahrscheinlich die Eigenschaften der Oxygenase bzw. des binuklearen Eisenzentrums (LLOYD *et al.*, 1997).

Aufgrund der aufgezeigten Ähnlichkeiten von ThmADBC zur Primärstruktur verschiedener Komponenten von MMOs deutete alles darauf hin, daß *thmADBC* die Strukturgene einer MMO sind. Da für die isolierte Reduktase gezeigt werden konnte, daß diese THF–induziert in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 gebildet wird, sollten auch die Gene *thmABC* spezifisch induzierbar sein. Northern–Hybridisierungs–Experimente zeigten eindeutig, daß die Transkription von *thmADBC* in THF–gewachsenen Zellen erfolgte, aber nicht in Succinat–gewachsenen Zellen. Damit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß *thmADBC* für die THF–Monooxygenase kodieren. Die Auswertung der erhaltenen Transkripte ergab, daß die *thm*–Gene polycistronisch (*thmADBC*), bicistronisch (*thmBC*) und monocistronisch (*thmA*) transkribiert werden. Der Transkriptionsstartpunkt stromaufwärts von *thmA* und *thmB* wurde mittels *primer–extension*–Experimenten bestätigt. Als mögliche Terminationsstrukturen wurden stromabwärts von *thmA* und *thmC* palindromische Sequenzen identifiziert, die eine freie Energie von $-32,7$ kJ/mol bzw. $-162,4$ kJ/mol aufweisen. Ein ähnliches Transkriptionsmuster wurde auch für die Gene der Methan–Monooxygenase aus *M. trichosporium* OB3b beschrieben (NIELSEN *et al.*, 1997). Die *mmo*–Gene der Methan–Monooxygenase werden polycistronisch transkribiert, wobei sich die entsprechende 5,5 kb–mRNA relativ instabil erwies. Weiterhin wurde für das Gen der α –Untereinheit der Oxygenase *mmoX* übereinstimmend zu *thmA* ein monocistronisches Transkript erhalten. Zwei weitere mRNAs umfassen die Gene der β –Untereinheit und γ –Untereinheit der Oxygenase und des regulatorischen Protein B (*mmoYBZ*) bzw. zusätzlich das Gen der Reduktase (*mmoYBZC*). Das erste dieser beiden Transkripte entspricht somit der für *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 gefundenen mRNA *thmBC*, da die Oxygenase der THF–Monooxygenase keine γ –Untereinheit besitzt. Ein gemeinsames Transkript von *thmD* und *thmBC* in Analogie zum Transkript *mmoYBZC* der Methan–Monooxygenase wurde in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 nicht erhalten.

Nach Identifizierung der beiden Transkriptionsstartpunkte stromaufwärts von *thmA* bzw. *thmB* sollte eine Aussage über mögliche Promotor-Sequenzen getroffen werden. Eine Übereinstimmung bzw. Ähnlichkeit zu bekannten Erkennungssequenzen von σ -Faktoren war jedoch nicht vorhanden (WÖSTEN, 1998). Da die Promotor-Struktur in der -24/-12-Region nicht die essentiellen Basen GG und GC für einen σ^{54} -abhängigen Promotor aufwiesen (THÖNY und HENNECKE, 1989), kann dieser Promotor-Typ ausgeschlossen werden. Vielmehr könnte es sich um die Erkennungssequenz eines σ^{70} -Faktors handeln. Der Vergleich von 139 potentiellen σ^{70} -abhängigen Promotorregionen, die in den ebenfalls Gram-positiven Streptomyzeten identifiziert wurden, ließ erkennen, daß nur 29 die typische -35-Region TTGACA und -10-Region TATAAT eines σ^{70} -abhängigen Promotors aufwiesen (STROHL, 1992). Die übrigen Promotor-Sequenzen zeigten meist keinerlei Ähnlichkeit zur Konsensus-Sequenz. Wie im gesamten Chromosom weisen Streptomyzeten, z.B. im Gegensatz zu *E. coli*, auch im Bereich der Promotoren einen hohen G+C-Gehalt auf. Die Promotor-Region stromaufwärts von *thmA* und *thmB* besitzt ebenfalls einen hohen G+C-Gehalt. Eine Übereinstimmung mit den von STROHL (1992) aufgeführten Promotor-Sequenzen konnte nicht gefunden werden, allerdings wiesen die Sequenzen untereinander eine gewisse Ähnlichkeit auf. Dies läßt vermuten, daß die Transkription möglicherweise unter Kontrolle des gleichen σ -Faktors steht. Die Transkription der Gene der Methan-Monooxygenase aus *M. trichosporium* OB3b erfolgt unter Kontrolle von zwei verschiedenen σ -Faktoren. Stromaufwärts des Gens der α -Untereinheit (*mmoX*) wurde die Erkennungssequenz für einen σ^{54} -Faktor, stromaufwärts des Gens der β -Untereinheit (*mmoY*) die Erkennungssequenz eines σ^{70} -Faktors identifiziert (NIELSEN *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu erfolgt die Transkription des Genclusters der Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath), das in seiner Genanordnung dem der Methan-Monooxygenase aus *M. trichosporium* OB3b entspricht, in einem anderen Transkriptionsmuster und steht nur unter Kontrolle eines σ^{70} -Faktors (NIELSEN *et al.*, 1996).

Der letztendliche Nachweis dafür, daß die *thm*-Gene für eine Monooxygenase kodieren, die die initiale Hydroxylierung von THF katalysiert, kann nur über die entsprechende Enzymaktivität der gereinigten Komponenten erfolgen. Ein solcher Aktivitätsnachweis könnte auch durch heterologe Expression der THF-Monooxygenase in einem geeigneten Wirtsstamm und der damit erlangten Fähigkeit zur Umsetzung dieser Verbindung erbracht werden. Versuche zur heterologen Expression einer funktionellen Monooxygenase wurden für die Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 und für die Isopren-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. Stamm AD45 durchgeführt (SMITH *et al.*, 1999;

VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000). In beiden Fällen führte eine beabsichtigte Expression der Monooxygenase in *E. coli* nicht zum Erfolg. Als mögliche Ursache wurde zum einen die unterschiedliche Codon–Nutzung, andererseits die abweichenden Ribosomenbindestellen diskutiert. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wurde die Expression der Alken–Monooxygenase in *Streptomyces lividans* TK24, einem Gram–positiven Bakterium mit ähnlicher Codon–Nutzung wie *R. rhodochrous* B–276, durchgeführt (SMITH *et al.*, 1999). Mit Hilfe dieses Expressionssystems konnte die Alken–Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B–276 mit vergleichbarer Aktivität zum Wildtyp–Stamm in *Streptomyces lividans* TK24 überexprimiert werden. Dieses etablierte Expressionssystem bietet sich ebenfalls für eine heterologe Expression der THF–Monooxygenase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 an. Expressionsversuche in *E. coli* sollten dagegen von vornherein ausgeschlossen werden, da für die THF–Monooxygenase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1, einem Gram–positiven, G+C–reichen Bakterium mit einer ähnlichen Codon–Nutzung wie *R. rhodochrous* B–276 (SAEKI, 1998), gleiche Probleme bei der Expression wie bei der Alken–Monooxygenase zu erwarten sind.

Mit erfolgreicher Expression der THF–Monooxygenase in *Streptomyces lividans* TK24 würden sich weitere interessante Aufgabenstellungen ergeben. Als erstes sollte erneut versucht werden, in aufgeschlossenen Zellen die THF–Monooxygenase–Aktivität zu bestimmen, da so eine Aufreinigung und anschließende Charakterisierung der Enzymkomponenten möglich wäre. Mittels EPR–Analyse könnte das binukleare Eisenzentrum der Oxygenase und das Fe/S–Zentrum der Reduktase nachgewiesen werden (NEWMAN und WACKETT, 1995; PIKUS *et al.*, 1996; GALLAGHER *et al.*, 1997). Auch bei Verlust der Monooxygenase–Aktivität im zellfreien Extrakt könnten eventuell weitere Untersuchungen zur THF–Monooxygenase in ganzen Zellen durchgeführt werden, wie z.B. die Analyse des Substratspektrums. Da die Spaltung einer Etherbindung grundsätzlich ein schwieriges Problem darstellt, wäre es interessant zu untersuchen, ob die THF–Monooxygenase auch andere Ether umsetzt, zumal *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auch Diethylether als Kohlenstoff– und Energiequelle nutzen kann (KOHLWEYER *et al.*, 2000). Denkbar wäre auch, daß Dimethylsulfid ein Substrat der THF–Monooxygenase ist, da 1.) *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 diese Substanz als Co–Substrat in Wachstumsversuchen tolerieren konnte (KOHLWEYER *et al.*, 2000) und 2.) ThmADBC signifikante Homologien zu den Komponenten der Dimethylsulfid–Monooxygenase aus *Acinetobacter* sp. Stamm 20B, die die Spaltung einer Thioetherbindung katalysiert, aufwiesen (HORINOUCHI *et al.*, 1997). Weiterhin könnte bei Erhalt einer aktiven Monooxygenase in *Streptomyces lividans* TK24

durch Deletion der *thm*-Gene gezeigt werden, daß die einzelnen Komponenten essentiell für die Monoxygenase-Aktivität sind.

4.2. WEITERE OFFENE LESERAHMEN DER KLONIERTEN GENREGION

Stromaufwärts von *thmA* wurden zwei ORFs *orfY* und *thmS* identifiziert. Vor dem ATG-Startcodon beider ORFs befindet sich eine mögliche Ribosomenbindestelle, was für eine Translation der Gene spricht. Die von *orfY* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Homologie zu einem hypothetischen Protein (Orf4) unbekannter Funktion aus *Rhodococcus* sp. Stamm NI86/21 (NAGY *et al.*, 1995). Interessanterweise liegt *orf4* zwischen den Strukturgenen einer P450-abhängigen Monoxygenase. Die Expression dieser Gene wird durch Thiocarbamate induziert, und die P450-abhängige Monoxygenase katalysiert die einleitende Reaktion beim Abbau dieser Herbizide. *OrfY* wird THF-induziert transkribiert und bildet mit *thmS* und *thmA* ein gemeinsames Transkript. Aufgrund dieses Transkriptionsmusters kann angenommen werden, daß *OrfY* eine Rolle beim THF-Stoffwechsel spielt. In *OrfY* konnten keine konservierten Sequenzmotive identifiziert werden, die Hinweise auf mögliche Kofaktoren oder katalytische Funktionen geben. Über die Funktion des durch *orfY* kodierten Proteins kann nach derzeitigem Kenntnisstand keine Aussage gemacht werden.

Die von *thmS* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte signifikante Homologien zu verschiedenen ALDHs, die unter anderem in den Abbau von *p*-Isopropyltoluen und Styren involviert sind (EATON, 1997; BELTRAMETTI *et al.*, 1997). Der Katabolismus dieser aromatischen Verbindungen wird ebenfalls durch eine Monoxygenase-Reaktion eingeleitet. Grundsätzlich unterscheiden sich jedoch diese nachfolgend beschriebenen Monoxygenasen von den bisher besprochenen MMOs im Aufbau (zwei Komponenten) und im katalytischen Zentrum der Oxygenase. Während die Styren-Monoxygenase zu den flavinabhängigen Monoxygenasen der TC-FDM-Familie gehört (siehe Einleitung), ist die *p*-Isopropyltoluen-Monoxygenase ein Membran-assoziiertes Enzym mit einem binuklearen Eisenzentrum. Die Fixierung der beiden Eisenatome im aktiven Zentrum der Membran-gebundenen Monoxygenasen unterscheidet sich jedoch von den in Kapitel 4.1. diskutierten MMOs. Dies drückt sich in dem jeweils charakteristischen, hoch konservierten Motiv des binuklearen Eisenzentrums aus. Während die MMOs ein EX₍₂₈₋₃₂₎DEXRH₍₉₁₋₉₄₎-EX₍₂₈₋₃₂₎DEXRH-Motiv besitzen, findet man in den Membran-assozierten Monoxygenasen ein HX₍₃₋₄₎HX₍₂₀₋₅₀₎HX₍₂₋₃₎HHX₍₁₀₀₋₂₀₀₎HX₍₂₋₃₎HH-Motiv (SHANKLIN *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1997). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, daß diese acht, hoch konservierten Histidin-Reste essentiell für die katalytische Aktivität der Monoxygenase sind, und man geht deshalb davon aus, daß die Histidin-Reste die Eisenatome im aktiven

Zentrum der Oxygenase koordinieren. Da *thmS* benachbart zu den Monooxygenase–Genen *thmADBC* lokalisiert ist, wurde angenommen, daß dieses für ein weiteres Enzym des THF–Abbauweges kodiert. Im postulierten THF–Abbauweg wurden zwei mögliche ALDH–Reaktionen vorgeschlagen, für die Oxidation von 4–Hydroxybutyraldehyd und Succinatsemialdehyd (Abb. 1). Northern–Hybridisierungen mit einer spezifischen Sonde gegen *thmS* ergaben, daß die Transkription dieses Gens durch THF, 4–Hydroxybuttersäure und 1,4–Butandiol induziert wird. Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse ließen den Schluß zu, daß *thmS* für eine SSDH kodiert, da beim Abbau aller untersuchten Wachstumssubstrate Succinatsemialdehyd als Intermediat entsteht. Bestätigt wurde diese Hypothese dann durch die Isolierung einer THF–induzierten SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 und Bestimmung deren N–terminalen Aminosäuren (Kapitel 4.3.).

Die Analyse der *thmS*–Transkripte zeigte, daß *thmS* nicht monocistronisch transkribiert wird, sondern nur zusammen mit *thmA* (3,3 kb), *orfY* und *thmA* (3,8 kb) und *thmADBC* (6,3 kb). Dies wurde auch mittels RT–PCR bestätigt. Dem entsprechend war eine Terminator–Struktur in der intergenen Region zwischen *thmS* und *thmA* nicht nachweisbar. Die gemeinsame Transkription von *thmS* und *thmADBC* scheint auf den ersten Blick plausibel, da beide Gene für Enzyme des THF–Abbaus kodieren. Die gleichen Transkripte wurden aber auch bei Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf 1,4–Butandiol oder 4–Hydroxybuttersäure detektiert. Dies würde bedeuten, daß die Gene der THF–Monooxygenase auch bei Wachstum auf diesen Sustraten transkribiert werden, obwohl das Enzym hier nicht erforderlich ist. Diese Tatsache macht aus stoffwechselphysiologischer Sicht keinen Sinn. Gleichermaßen gilt auch für das verkürzte 3,3 kb Transkript von *thmS* und *thmA*. Über die Bedeutung der 3,8 kb–mRNA (*orfYthmSA*) kann keine Aussage getroffen werden, da über die Funktion von *orfY* keine Daten vorliegen und stromaufwärts des ATG–Startcodons keine mögliche Promotor–Sequenz identifiziert werden konnte.

Der Transkriptionsstartpunkt vor *thmS* befindet sich 37 Nukleotide stromaufwärts des ATG–Startcodons. In dem weiter stromaufwärts gelegenen DNA–Bereich wurde eine mögliche Erkennungssequenz für einen σ^{54} –Faktor identifiziert. Die vorhandene -24/-12–Region weist eine signifikante Ähnlichkeit zur Konsensus–Sequenz eines σ^{54} –abhängigen Promotors auf und besitzt vor allem auch die hoch konservierten Basen (-24)GG und (-12)GC, die den essentiellen Abstand von 10 bp aufweisen (THÖNY und HENNECKE, 1989; WÖSTEN, 1998).

Eine σ^{54} –abhängige Transkription findet man häufig für die Gene der Stickstoff–Assimilation und –Fixierung (THÖNY und HENNECKE, 1989; WÖSTEN, 1998), aber auch für Gene

verschiedenster metabolischer Funktionen, die nicht im Zusammenhang mit der Stickstoff-Regulation stehen, z.B. des Transports von Dicarbonsäuren in Rhizobien (RONSON *et al.*, 1987), des Abbaus von Formiat in *E. coli* (BIRKMANN *et al.*, 1987), der Oxidation von molekularem Wasserstoff durch Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha* (RÖMERMANN *et al.*, 1989) und des Katabolismus von Toluenen und Xylenen in *Pseudomonas putida* (DIXON, 1986). Auch die Transkription der *dmp*-Gene der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600, zu denen *thmADBC* signifikante Homologien aufweisen, wird von einem σ^{54} -Faktor initiiert (SHINGLER *et al.*, 1993).

Eine σ^{54} -abhängige Transkription erfordert bislang immer ein Aktivatorprotein und wird von diesem stets positiv kontrolliert (THÖNY und HENNECKE, 1989; CANNON *et al.*, 1997; WÖSTEN, 1998). Die Bindung des Aktivators erfolgt im Bereich von *inverted repeat*-Strukturen als regulatorische Sequenzelemente (*upstream activating sequences*, UASs), die sich in der Regel etwa 100 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes befinden, in einigen Fällen aber auch über 1 kb entfernt sein können (COLLADO-VIDES *et al.*, 1991; SHINGLER *et al.*, 1993). Nach Bindung des σ^{54} -RNA-Holoenzyms an den Promotor kommt es zur Bildung eines inaktiven geschlossenen Promotor-Komplexes. Dieser wird erst durch Wechselwirkung mit dem Aktivatorprotein durch partielle Denaturierung der doppelsträngigen DNA und ATP-Spaltung in den offenen Promotor-Komplex umgewandelt, wodurch die Transkription initiiert wird (THÖNY und HENNECKE, 1989; CANNON *et al.*, 1997). Die notwendige Wechselwirkung des Aktivatorproteins mit dem σ^{54} -RNA-Holoenzym wird durch die Aktivität eines *integration host factor* (IHF) ermöglicht, der zwischen den UAS-Elementen und der Promotor-Region bindet und somit ein Verbiegen der DNA induziert (COLLADO-VIDES *et al.*, 1991; DE LORENZO und PEREZ-MARTIN, 1996; CARMONA *et al.*, 1997). Die ermittelte Konsensus-Sequenz für eine IHF-Bindestelle ist 5'[A/T]ATCAANNNNTT[A/G] 3' (FRIEDMAN, 1988).

Stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes von *thmS* konnte weder eine mögliche UAS-Sequenz noch eine mögliche IHF-Bindestelle identifiziert werden. Ebenfalls existieren keine Hinweise auf ein Aktivatorprotein. Da die DNA-Sequenz stromaufwärts von *thmS* zum jetzigen Zeitpunkt nur über einen Bereich von 500 bp bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich diese Elemente weiter stromaufwärts befinden. Andererseits ist bekannt, daß sich vor einigen -24/-12-Promotoren keine regulatorischen Sequenzen dieser Art befinden (COLLADO-VIDES *et al.*, 1991). Die UASs sind nicht essentiell für die Ausbildung des offenen Promotor-Komplexes, sondern bewirken eine maximale Transkriptionsaktivität und werden deshalb auch als *enhancer* bezeichnet. In Abwesenheit von UASs steht das

Aktivatorprotein im direkten Kontakt zum inaktiven geschlossenen Promotor-Komplex (THÖNY und HENNECKE, 1989). Da – wie schon erwähnt – zum momentanen Zeitpunkt kein Hinweis auf das essentielle Aktivatorprotein vorliegt, wäre eine Prognose zur Transkriptionskontrolle durch einen σ^{54} -Faktor sehr spekulativ.

Stromabwärts von *thmC* wurden drei weitere offene Leserahmen in der Reihenfolge *orfQ*, *orfZ* und *thmH* identifiziert. Die von *orfQ* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte keine Homologie zu einem bekannten Protein und stromaufwärts war keine Ribosomenbindestelle vorhanden, so daß davon auszugehen ist, daß *orfQ* nicht für ein Protein kodiert. 45 Nukleotide stromabwärts von *orfQ* befindet sich *orfZ* mit einer vorgelagerten Ribosomenbindestelle. *OrfZ* kodiert für ein 221 Aminosäure großes Protein, dessen Sequenz über Teilbereiche Homologien zu hypothetischen Transmembranproteinen zeigte. Die Hydropathie-Analyse von *OrfZ* deutete ebenfalls darauf hin, daß es sich um ein Transmembranprotein handelt. Mit Hilfe verschiedener Computerprogramme wurden übereinstimmend jeweils 6 transmembrane Helices vorausgesagt. Weiterhin zeigte die computergestützte Auswertung der Sekundärstruktur von *OrfZ*, daß sich der N- und C-Terminus des hypothetischen Transmembranproteins mit hoher Wahrscheinlichkeit im periplasmatischen Raum befindet. Der Nachweis zur Lokalisation der hydrophilen Bereiche *in vivo* könnte durch C-terminale *lacZ*- oder *phoA*-Fusionen geklärt werden (MANOIL, 1990; PRINZ und BECKWITH, 1994; HAARDT und BREMER, 1996). Cytoplasmatisch lokalisierte *lacZ*-Fusionen besitzen eine hohe β -Galaktosidase-Aktivität, da es sich bei der β -Galaktosidase um ein cytoplasmatisches Reporterprotein handelt. Periplasmatische *phoA*-Fusionen besitzen eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität, da das Enzym ins Periplasma transportiert wird, wo es aktiv ist. Im Cytoplasma ist die Alkalische Phosphatase inaktiv, da die für die Aktivität des Enzyms notwendigen Disulfid-Bindungen nicht ausgebildet werden können.

Die Transkription von *orfZ* erfolgt mit dem stromabwärts gelegenen ORF *thmH* auf einer gemeinsamen 4,7 kb großen mRNA, so daß davon auszugehen ist, daß beide funktionell in Zusammenhang stehen. *ThmH* wies signifikante Homologien zu verschiedenen pro- und eukaryotischen ALDHs und eine 32 %ige Identität zu *ThmS* auf. In der Primärstruktur von *ThmH* wurden in Analogie zu anderen ALDHs die konservierten Aminosäurereste Cystein und Glutamat, die an der Katalyse beteiligt sind, und das konservierte GXXXXG-Motiv für die Bindung von NAD(P)^+ identifiziert. Somit sollte auch *thmH* für eine ALDH kodieren.

Die Transkription von *orfZ* und *thmH* wird beim Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf 1,4-Butandiol induziert, nicht aber auf Succinat und THF. BERNHARDT und DIEKMANN (1991) postulierten einen Reaktionsweg für den THF- und 1,4-Butandiol-umsetzenden *Rhodococcus ruber* Stamm 219, nach dem 1,4-Butandiol folgendermaßen umgesetzt wird: 1,4-Butandiol → 4-Hydroxybutyraldehyd → 4-Hydroxybuttersäure → Succinatsemialdehyd → Succinat. Im Abbauschema werden somit zwei mögliche ALDHs postuliert, eine 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase und eine Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase. Das Gen der Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig dem offenen Leserahmen *thmS* zugeordnet werden, so daß *thmH* aufgrund seiner 1,4-Butandiol-induzierten Expression für die 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase kodieren könnte. Der letztendliche Nachweis dieses Enzyms kann nur durch Messung der spezifischen Enzymaktivität erfolgen. Aufgrund der Transkriptionsdaten sollte somit auch OrfZ eine Funktion beim Abbau von 1,4-Butandiol besitzen, über die jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand keine Aussage getroffen werden kann.

Aufgrund der Größe der detektierten mRNA für *orfZ* und *thmH* von 4,7 kb muß davon ausgegangen werden, daß auf diesem Transkript noch weitere ORFs liegen, die stromabwärts von *thmH* lokalisiert sind. Auch die Tatsache, daß stromabwärts von *thmH* keine mögliche Terminator-Struktur gefunden wurde, spricht für diese Annahme. Aufgrund des postulierten Abbaupfades von 1,4-Butandiol wäre denkbar, daß die 4,7 kb große mRNA zusätzlich noch das Gen der 1,4-Butandiol-Dehydrogenase beinhaltet. Dies könnte durch Sequenzierung der DNA stromabwärts von *thmH* geklärt werden. Eine mögliche Promotor-Struktur stromaufwärts von *orfZ* konnte anhand der DNA-Sequenz nicht identifiziert werden, so daß keine Aussage über die Regulation der Transkription getroffen werden kann. Auffällig ist jedoch eine *inverted repeat*-Struktur hoher Energie (−143,1 kJ/mol), die sich in der intergenen Region von *orfZ* und *thmH* befindet. Daß es sich hierbei um eine Terminator-Struktur handelt, scheint aufgrund der Transkriptionsanalyse von *orfZ* und *thmH* als unwahrscheinlich. Vielmehr kann angenommen werden, daß diese Haarnadelstruktur zur Stabilisierung der mRNA beiträgt (EDDY *et al.*, 1991).

4.3. DIE THF-INDUZIERTE SUCCINATSEMALDEHYD-DEHYDROGENASE

Als ein weiteres Enzym des THF-Abbauweges (Abb. 1) wurde eine SSDH postuliert, die die Umsetzung des Intermediates Succinatsemialdehyd zu Succinat katalysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine solche THF-induzierte, NAD⁺-abhängige SSDH im zellfreien Extrakt nachgewiesen und aufgereinigt werden. Ein besonderes Interesse galt diesem Enzym auch deshalb, weil stromaufwärts der *thm*-Gene ein offener Leserahmen (*thmS*) identifiziert wurde, dessen Transkription THF-induziert erfolgte und dessen abgeleitete Sequenz signifikante Homologien zu ALDHs besaß. Diese Tatsachen ließen vermuten, daß *thmS* für eine THF-induzierte SSDH kodieren könnte. Die N-terminale Sequenz der gereinigten SSDH zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung mit ThmS. Damit wurde eindeutig nachgewiesen, daß *thmS* für die SSDH kodiert, die am Abbau von THF beteiligt ist. Damit ist die SSDH das erste gereinigte Enzym des THF-Abbauweges von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Gleichzeitig untermauert dieses Ergebnis auch die Hypothese, daß *thmADBC* für die THF-Monoxygenase kodieren, da – wie schon erwähnt – *thmS* stromaufwärts der hypothetischen THF-Monoxygenase-Gene lokalisiert ist und mit ihnen gemeinsam transkribiert wird.

SSDHs kommen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor und sind vor allem in den Abbau von γ -Aminobuttersäure (GABA) involviert. Nach Transaminierung von GABA entsteht Succinatsemialdehyd, das durch die SSDH zu Succinat umgesetzt wird. In Säugetieren spielt der GABA-Weg eine wesentliche Rolle im Gehirnstoffwechsel, in Pflanzen bei der Kontrolle des cytosolischen pH-Wertes, bei der Adaptation an Streßbedingungen und im Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus (BOWN und SHELP, 1997; BUSCH und FROMM, 1999). In Bakterien sind SSDHs ebenfalls am Abbau von GABA, aber auch am Abbau von 4-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxyphenylacetat und 4-Hydroxyphenylacetat beteiligt (NIRENBERG und JAKOBY, 1960; SPARNINS *et al.*, 1974; COOPER und SKINNER, 1980; DONNELLY und COOPER, 1981). Für SSDHs wurden als Elektronenakzeptoren NAD⁺ und NADP⁺ beschrieben. In einigen Fällen konnten Isoenzyme isoliert werden, wobei das eine NAD⁺- und das andere NADP⁺-abhängig war. Beispiele dafür sind die SSDHs aus *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (SANCHEZ *et al.*, 1989); aus *E. coli* B (DONNELLY und COOPER, 1981) und aus *Pseudomonas* sp. (NIRENBERG und JAKOBY, 1960). Die NAD⁺-abhängige SSDH aus *K. pneumoniae* M5a1 wird durch 3-Hydroxyphenylacetat, 4-Hydroxyphenylacetat und GABA induziert und ist ein Enzym des Katabolismus von 3-Hydroxyphenylacetat und 4-Hydroxyphenylacetat. Diese SSDH kann auch NADP⁺ nutzen, jedoch mit deutlich geringerer Affinität. Auch die einleitende Reaktion

beim Abbau von 4-Hydroxyphenylacetat in *K. pneumoniae* M5a1 wird durch eine Mehrkomponenten-Monoxygenase katalysiert, die aus zwei Komponenten besteht (GIBELLO *et al.*, 1997) und in die TC-FDM-Familie (siehe Einleitung) eingeordnet wurde. Die NADP⁺-abhängige SSDH aus *K. pneumoniae* M5a1 liegt dagegen konstitutiv vor. Die isolierte THF-induzierte SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 ist NAD⁺-abhängig. Eine NADP⁺-abhängige SSDH war weder im RE von THF-gewachsenen noch von Succinat-gewachsenen Zellen meßbar.

Die SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zeigte eine maximale Enzymaktivität bei einem pH-Wert von 9,0 und einer Substratkonzentration von 0,3 mM. Diese Eigenschaften stehen in Einklang mit denen anderer pro- und eukaryotischer SSDHs. Während für bakterielle SSDHs der Wert des pH-Optimums im Bereich zwischen 7,8 und 11,0 liegt, wurde dieser bei eukaryotischen SSDHs immer mit etwa pH 9,0 bestimmt (SANCHEZ *et al.*, 1989; LÜTKE-EVERSLOH und STEINBÜCHEL, 1999; BUSCH und FROMM, 1999). Die optimale Substratkonzentration im Enzymtest liegt bei allen SSDHs zwischen 0,1 und 0,4 mM. Eine niedrige Succinatsemialdehyd-Konzentration ist in der Zelle zu erwarten, da Succinatsemialdehyd für die Zelle toxisch ist. Eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat, wie sie für die SSDHs aus *K. pneumoniae* M5a1 beobachtet wurde, ist somit notwendig, um eine niedrige intrazellulare Konzentration an Succinatsemialdehyd zu gewährleisten (SANCHEZ *et al.*, 1989). Damit sollte auch die isolierte SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 eine hohe Affinität zum Substrat aufweisen, was durch Bestimmung des K_m -Wertes für Succinatsemialdehyd und für NAD⁺ geklärt werden könnte.

Die THF-induzierte SSDH liegt als Homotetramer vor. Eine tetramere Struktur wurde auch für die SSDH aus *K. pneumoniae* M5a1 (SANCHEZ *et al.*, 1989) und *Arabidopsis* (BUSCH und FROMM, 1999) beschrieben. Interessant ist, daß die SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zwar ähnliche Eigenschaften wie andere SSDHs besitzt, deren Aminosäuresequenz (ThmS) aber relativ geringe Ähnlichkeiten zu den Primärstrukturen von SSDHs aufweist. Dies ist erstaunlich, da der Vergleich der Primärstrukturen von pro- und eukaryotischen SSDHs zeigte, daß diese untereinander eine hohe Identität besitzen, vor allem im Bereich des C-Terminus (BUSCH und FROMM, 1999; CHAMBLISS *et al.*, 1995). Der N-Terminus der SSDHs ist dagegen weniger konserviert. Auch die aminotermrale Sequenz der isolierten SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zeigte keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen, so daß allein anhand dieser Aminosäuresequenz keine Zuordnung des Enzyms hätte erfolgen können. Die höchsten Homologien der gesamten Primärstruktur der SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 bestand zu Aldehyd-Dehydrogenasen, die

am Abbau von *p*-Isopropyltoluen (*p*-Isopropylbenzaldehyd–Dehydrogenase) bzw. Styren (Phenylacetaldehyd–Dehydrogenase) beteiligt sind. Besonders interessant ist, daß auch hier der einleitende Schritt des Abbaus jeweils durch eine Mehrkomponenten–Oxygenase katalysiert wird, die sich – wie im Kapitel 4.2. beschrieben – im Aufbau von der THF–Monooxygenase unterscheidet. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die SSDH aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auch aromatische Aldehyde umsetzen kann. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, daß auch die Strukturgene der THF–Monooxygenase Homologien zu MMOs aufwiesen, die aromatische Verbindungen wie Phenol oder Toluol umsetzen. Interessanterweise kann *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auch mit Toluol als einziger Kohlenstoff– und Energiequelle wachsen (KOHLWEYER, 2000). Der Toluol–Abbau in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde bisher nicht untersucht, und es stellt sich die Frage, ob am Abbau dieser aromatischen Verbindung z.B. auch die SSDH beteiligt ist. Die Ermittlung des Substratspektrums der SSDH würde somit eine interessante Aufgabe darstellen. Zu diesem Zweck ist jedoch ein aktives Enzym notwendig. Das in dieser Arbeit entwickelte Anreicherungsschema bedarf dazu einer weiteren Optimierung, da die aufgereinigte SSDH nicht in aktiver Form erhalten wurde. Beispielsweise könnte der Zusatz von DTT, so wie es für die SSDH aus *K. pneumoniae* M5a1 beschrieben wurde (SANCHEZ *et al.*, 1989), zur Stabilisierung des Enzyms führen.

4.4. DIE UMSETZUNG VON THF IN *PSEUDONOCARDIA* SP. STAMM K1

Mittels proteinchemischer und molekularbiologischer Methoden konnten in dieser Arbeit Enzyme des THF–Katabolismus in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 identifiziert und charakterisiert werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann – in Anlehnung an BERNHARDT und DIEKMANN (1991) – ein THF–Abbauweg in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 abgeleitet werden, der in Abb. 37 wiedergegeben ist.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird angenommen, daß die einleitende Reaktion beim THF–Abbau durch eine Dreikomponenten–Monooxygenase (ThmADBC) erfolgt und daß die Katalyse der Monooxygenase–Reaktion an einem binuklearen Eisenzentrum stattfindet. Nach dem von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) postulierten Abbauweg kann das entstehende 2–Hydroxy–THF entweder durch spontane Ringöffnung in 4–Hydroxybutyraldehyd umgesetzt oder zu γ –Butyrolacton oxidiert werden, das dann zu 4–Hydroxybuttersäure umgewandelt wird. Letzterer Weg wird wahrscheinlich in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 beschritten. Stromabwärts der THF–Monooxygenase–Gene wurde ein ORF (*thmH*) identifiziert, der wahrscheinlich für eine 4–Hydroxybutyraldehyd–Dehydrogenase (ThmH) kodiert. Da *thmH* nicht durch THF induzierbar war, kann eine Ringöffnung von

2-Hydroxy-THF zu 4-Hydroxybutyraldehyd, der durch eine 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase zu 4-Hydroxybuttersäure umgesetzt werden müßte, ausgeschlossen werden. Die entstehende 4-Hydroxybuttersäure kann durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu Succinatsemialdehyd überführt werden. Hinweise auf ein solches Enzym liegen derzeit noch nicht vor. Die Oxidation von Succinatsemialdehyd zu Succinat wird durch eine THF-induzierte, NAD^+ -abhängige Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (ThmS) katalysiert, die in dieser Arbeit isoliert und charakterisiert wurde. Succinat kann dann zur Endoxidation und Energiekonservierung in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden.

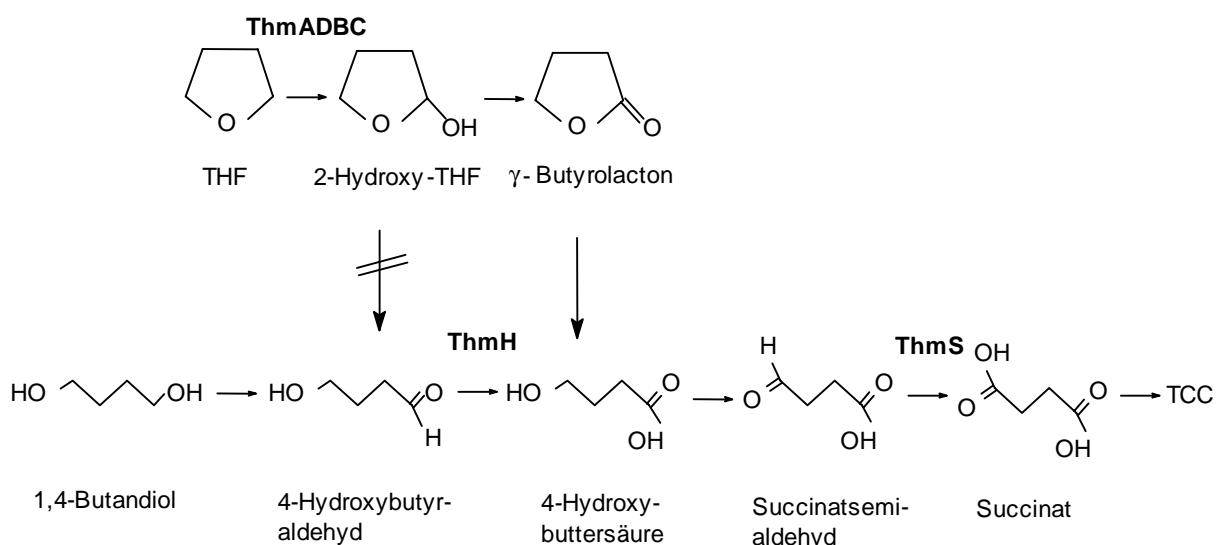


Abbildung 37: Postulierter THF-Abbauweg in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 und die daran beteiligten Enzyme. ThmADBC: THF-Monoxygenase, ThmH: 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase, ThmS: Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es in dieser Arbeit erstmals gelang, Enzyme des THF-Abbauweges zu identifizieren und zu charakterisieren. Anhand der erhaltenen Daten ist es wahrscheinlich, daß der THF-Abbau in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 über den in Abb. 37 dargestellten Weg verläuft.

4.5. DIE *thm*–GENE AUS *PSEUDONOCARDIA* SP. STAMM K1 SIND AUF EINEM ZIRKULÄREN PLASMID KODIERT

Die zum Abbau von xenobiotischen Verbindungen notwendigen Enzyme sind häufig auf Plasmiden kodiert (DUETZ und VAN ANDEL, 1991). Aus diesem Grund sollte auch für die identifizierten *thm*–Gene geklärt werden, ob diese chromosomal– oder plasmidkodiert sind. Untersuchungen zur Stabilität der Abbaufähigkeit von THF in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zeigten, daß das Abbaupotential auch nach Wachstum über mehrere Generationen (220 Generationen) auf Succinat konstant vererbt wird (KOHLWEYER, 2000). Dies deutete zunächst darauf hin, daß die zum THF–Abbau notwendigen Enzyme chromosomal kodiert sind.

Ein grundsätzliches Problem bei der Isolierung von Nukleinsäuren aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 war die effektive Lyse der Zellen. Diese Tatsache kann durch den komplexen Zellwandaufbau von Gram–positiven Bakterien erklärt werden. Charakteristisch für Gram–positive Bakterien ist ein mehrschichtiges Peptidoglykan–Netzwerk, dessen Muraminsäureglieder mit Aminosäuren peptidisch verknüpft sind (SCHLEGEL, 1992). Die Zellwand von *Pseudonocardien* ist nicht mykolsäurehaltig und das Peptidoglykan beinhaltet *meso*–Diaminopimelinsäure, Arabinose und Galaktose (LEE *et al.*, 2000). Ein Zellaufschluß von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 konnte durch eine Lysozym–Behandlung erreicht werden. Lysozym spaltet die glykosidische Bindung des Mureins zwischen dem C–1 von *N*–Acetylglucosamin und dem C–4 von *N*–Acetylmuraminsäure (SCHLEGEL, 1992) und kann so zur Lyse der Zelle führen. Einen positiven Effekt auf die Zelllyse von Actinomyceten hat auch die Endopeptidase *Achromobacter* Peptidase (SAEKI, 1998). SAEKI *et al.* (1999) beschreiben, daß der Nachweis der linearen Plasmide in *R. rhodochrous* B–276 abhängig von einer *Achromobacter* Peptidase–Behandlung war. Drei der vier linearen Plasmide waren erst nach Endopeptidase–Verdau detektierbar. Der Zusatz von *Achromobacter* Peptidase beim Zellaufschluß von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 brachte dagegen keinen erkennbar positiven Effekt in Bezug auf die Zelllyse und die detektierbaren Plasmide.

Sowohl in THF– als auch in Succinat–gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurden jeweils zwei Plasmide nachgewiesen. Eines dieser Plasmide (pPSK60) konnte als Träger der *thm*–Gene identifiziert werden. Die nähere Charakterisierung dieses Plasmides ließ zunächst vermuten, daß es sich um ein lineares Plasmid handeln könnte, die in Actinomyceten in letzter Zeit häufig gefunden wurden (LARKIN *et al.*, 1998; SAEKI *et al.*, 1999). Neben Antibiotika– oder Metallresistenzen vermitteln lineare Plasmide auch katabole Stoffwechselleistungen (MEINHARDT *et al.*, 1997; LARKIN *et al.*, 1998). Das Vorkommen

von linearen Plasmiden in Streptomyzeten ist häufig mit der Fähigkeit der Antibiotikasynthese und/oder der Resistenz gegen das entsprechende Antibiotikum verbunden (SCHRÜNDER *et al.*, 1994). Beispielsweise kodiert das Plasmid pSLA2 (17 kb) aus *Streptomyces rochei* für die Lankicidinsynthese (HAYAKAWA *et al.*, 1979) und das Plasmid SCP1 (350 kb) aus *Streptomyces coelicolor* für die Methylenomycinsynthese (KINASHI *et al.*, 1987). Das erste beschriebene lineare, katabole Plasmid ist das Plasmid pBD2 aus *Rhodococcus erythropolis* BD2 (210 kb), das Enzyme des Isopropylbenzen- bzw. Trichlorethylen-Abbaus kodiert (DABROCK, 1993; DABROCK *et al.*, 1994). Weiterhin vermittelt pBD2 eine Resistenz gegen Arsenit (AsO_2^-) und Quecksilber (Hg^{++}). Für die Gene der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276, zu der die in dieser Arbeit identifizierten *thm*-Gene der THF-Monooxygenase die höchsten Homologien aufweisen, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß diese auf einem linearen Plasmid (pNC30, 185 kb) kodiert sind (SAEKI *et al.*, 1999).

Anhand von Untersuchungen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde pPSK60 letztendlich als zirkuläres Plasmid identifiziert. Aufgrund des ungewöhnlichen Laufverhaltens in der Standard-Gelelektrophorese war eine Bestimmung der genauen Größe nicht möglich. Die Ursache für die retardierte Mobilität des Plasmides im elektrischen Feld konnte nicht geklärt werden, da dieser Effekt auch bei methodisch unterschiedlich gewonnener Plasmid-DNA auftrat und die Ergebnisse nach Behandlung der Plasmid-Präparation keine eindeutige Aussage zuließen. Als mögliche Ursache wurde in Erwägung gezogen, daß in der Plasmid-Präparation Kontaminationen, z.B. durch Proteine oder eingesetzte Chemikalien, vorliegen, da eine mehrmalige Phenol/Chloroform-Extraktion einen positiven Effekt auf das Laufverhalten bewirkte. Gegen Kontaminationen sprechen, daß 1.) das Plasmid mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig gespalten werden konnte und 2.) nach proteolytischen Verdau keine Änderung des Laufverhaltens des Plasmides erreicht werden konnte.

Für einige Mehrkomponenten-Monooxygenasen mit einem binuklearen Eisenzentrum wurde gezeigt, daß sie auf einem Plasmid kodiert sind, in anderen Fällen waren die Gene auf dem Chromosom lokalisiert. Beispiele für die Plasmid-Kodierung sind die Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 auf dem Plasmid pVI150 und die Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* Stamm H auf dem Plasmid pPGH1 (SHINGLER *et al.*, 1989; HERRMANN *et al.*, 1995). Das zirkuläre Plasmid pVI150 kodiert neben der Phenol-Hydroxylase auch die weiteren Enzyme des Abbauweges und stellt somit ein kataboles Plasmid dar (SHINGLER *et al.*, 1992). Da auf dem Plasmid pPSK60 aus *Pseudonocardia* sp.

Stamm K1 sowohl die Gene der THF-induzierten Monooxygenase als auch das Gen der THF-induzierten Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase lokalisiert sind, kann angenommen werden, daß auch die weiteren Enzyme des THF-Abbauweges auf diesem Plasmid kodiert sind. Chromosomal kodierte MMOs sind die lösliche Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) und aus *Methylosinus trichosporium* OB3b, die Phenol-Hydroxylase aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 und die Toluol/o-Xylen-Monooxygenase aus *Pseudomonas stutzeri* OX1 (MURRELL, 1994; SCHIRMER *et al.*, 1997; BERTONI *et al.*, 1998).

Für katabole Plasmide ist weiterhin bekannt, daß diese auf andere Spezies übertragen werden können und somit der Empfänger-Zelle zusätzliche Stoffwechselleistungen vermitteln (BURLAGE *et al.*, 1990; VAN DER MEER *et al.*, 1992). Für *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 kann ebenfalls angenommen werden, daß die identifizierten *thm*-Gene bzw. das Plasmid pPSK60 durch lateralen Gentransfer erworben wurden. Die Berechnung des G+C-Gehalts der plasmidkodierten *thm*-Gene aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 ergab Werte im Bereich von 56–63 %. Im Gegensatz dazu wurde der G+C-Gehalt der Gesamt-DNA von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf 71,3 % bestimmt (KOHLWEYER *et al.*, 2000). Damit ergibt sich eine Differenz im G+C-Gehalt von etwa 10 %, die durch einen Gentransfer des Plasmides aus einem Stamm niedrigeren G+C-Gehalts erklärt werden könnte. Mechanismen des Gentransfers sind Konjugation, Transformation und Transduktion (VAN DER MEER *et al.*, 1992). Sowohl für zirkuläre Plasmide, z.B. pVI150 aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600, als auch für lineare Plasmide, z.B. pBD2 aus *Rhodococcus erythropolis* BD2, wurde beschrieben, daß diese konjugativ übertragbar sind (SHINGLER *et al.*, 1989; DABROCK *et al.*, 1994). Eine Konjugation erfolgt durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt, so daß die DNA zu keinem Zeitpunkt frei im Medium vorliegt. Im Gegensatz dazu erfolgt die Transformation ohne jeden Zellkontakt, so daß dieser Prozeß durch Anwesenheit von DNasen im Konjugationsgemisch negativ beeinflußt werden kann. Für das Plasmid pBD2 aus *R. erythropolis* BD2 wurde gezeigt, daß dieses auf verschiedene Stämme von *R. erythropolis* transferiert werden kann und der Zusatz von DNase I im Konjugationsansatz keinen Einfluß auf die Transferfrequenz hat. Auf diese Weise wurde pBD2 als konjugatives Plasmid charakterisiert. Der Transfer auf andere *Rhodococcus*-Arten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, daß der Gentransfer nicht auf Organismen außerhalb der Spezies erfolgt (DABROCK, 1993). SAEKI *et al.* (1999) zeigten mittels heterologer DNA-DNA-Hybridisierung, daß die in *R. rhodochrous* B-276 plasmidkodierte Alken-Monooxygenase auch in zwei Propen-oxidierenden *Rhodococcus ruber*-Stämmen auf einem Plasmid nachweisbar war und

schlußfolgerten daraus, daß ein Gentransfer zwischen den *Rhodococcus*–Arten erfolgen kann. Nach MEINHARDT *et al.* (1997) ist ein DNA–Transfer auch zwischen unterschiedlichen Spezies möglich. KESSELER *et al.* (1996) stellten fest, daß die auf dem Plasmid pBD2 kodierten Gene der Isopropylbenzen–Dioxygenase aus *R. erythropolis* BD2 hohe Sequenzidentitäten zu Enzymen aus verschiedenen *Pseudomonas*–Stämmen aufwiesen und die ermittelte Codonnutzung nicht *Rhodococcus*–typisch ist. Aufgrund dessen wird diskutiert, daß die Gene der ringaktivierenden Dioxygenasen aus *Rhodococcus* und *Pseudomonas* phylogenetisch einen gemeinsamen, nicht von *Rhodococcus* abstammenden Ursprung haben. Nach Transfer von katabolischen Plasmiden sind noch Mutationen in der Transkonjugante notwendig, um so eine Anpassung in bezug auf Regulation und erforderlicher Stoffwechselleistung zu gewährleisten (VAN DER MEER *et al.*, 1992). Die in dieser Arbeit identifizierten *thm*–Gene auf dem Plasmid pPSK60 zeigten überwiegend Homologien zu Genen aus Gram–negativen Bakterien, die teilweise plasmidkodiert sind, so daß auch ein Gentransfer aus einem nicht verwandten Organismus denkbar wäre.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Eine THF-abhängige Enzymaktivität konnte im zellfreien Extrakt aus THF-gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 nicht nachgewiesen werden. Es wurde jedoch postuliert, daß die initiale Reaktion des THF-Abbaus durch eine Oxygenase katalysiert wird. Da viele Oxygenasen die Teilaktivität einer separat zu reinigenden NAD(P)H-abhängigen Reduktase besitzen, wurde im zellfreien Extrakt aus THF-gewachsenen Zellen nach einer solchen THF-induzierten Aktivität gesucht. In THF-gewachsenen Zellen konnte eine spezifisch durch THF induzierte NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivität nachgewiesen werden. Diese Reduktase wurde bis zur Homogenität gereinigt. Bei der Charakterisierung des homogenen Enzyms ergaben sich signifikante Übereinstimmungen zu den Reduktase-Komponenten verschiedener Nicht-Häm Eisen Oxygenasen. Die isolierte Reduktase besitzt eine monomere Struktur mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Als Kofaktoren wurden FAD und ein [2Fe-2S]-Cluster nachgewiesen. Der Flavin-Kofaktor ist kovalent im Enzym gebunden, wobei die Bindung über die 8 α -Position des Isoalloxazinringes erfolgt. Das Gen der NADH-Cytochrom c-Reduktase (*thmD*) wurde identifiziert und sequenziert. *ThmD* kodiert für ein Protein von 360 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz von ThmD besitzt konservierte Motive, die für die Bindung des Flavins und des NADH's sowie für die Bildung des [2Fe-2S]-Clusters vom Chloroplasten-Typ Ferredoxin verantwortlich sind.

2.) In Nachbarschaft zu *thmD* befinden sich stromaufwärts *thmA* und stromabwärts *thmBC*, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen signifikante Homologien zu den Untereinheiten verschiedener Mehrkomponenten-Monoxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum aufweisen. Diese Dreikomponenten-Monoxygenase besteht aus einer heterodimeren Oxygenase (*thmAB*), der Reduktase (*thmD*) und dem Kopplungsprotein (*thmC*). In ThmA konnte das Sequenzmotiv identifiziert werden, das für die Bildung des binuklearen Eisenzentrums verantwortlich ist. Die Transkription der *thm*-Gene wird in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 spezifisch durch THF induziert. Die Analyse der erhaltenen mRNAs zeigte, daß die *thm*-Gene polycistronisch (*thmADBC*), bicistronisch (*thmBC*) und monocistronisch (*thmA*) transkribiert werden. Stromaufwärts von *thmA* und *thmB* wurden mittels *primer extension*-Experimenten die Transkriptionsstartpunkte bestimmt. Die Sequenzen stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte wiesen signifikante Homologien zueinander auf, so daß postuliert wurde, daß diese vom selben σ -Faktor erkannt werden. Die resultierende Konsensus-Sequenz konnte keinem bekannten Promotor-Typ zugeordnet werden. Aus den molekularbiologischen Daten wurde geschlußfolgert, daß *thmADBC* die Strukturgene der THF-Monoxygenase sind, die die initiale Hydroxylierung des Ethers katalysiert.

- 3.) Stromaufwärts von *thmA* befindet sich ein offener Leserahmen (*thmS*), der für eine Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase kodiert. Eine Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase–Aktivität wird beim Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf THF spezifisch induziert. Das entsprechende Protein konnte partiell gereinigt werden und als Genprodukt von *thmS* identifiziert werden. Die Transkriptanalyse von *thmS* zeigte, daß das Gen THF–induziert, bi– und polycistronisch mit *thmA* bzw. mit *thmADBC* transkribiert wird. Stromaufwärts von *thmS* wurde mittels *primer–extension* ein Transkriptionsstartpunkt bestimmt. Die vorgelagerte Promotorstruktur wies signifikante Ähnlichkeit zu σ^{54} –abhängigen Promotoren auf. Aus den für die Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase ermittelten Daten kann geschlossen werden, daß es sich um ein weiteres Enzym des THF–Abbaus handelt, welches für die Oxidation des intermediär gebildeten Succinatsemialdehyds verantwortlich ist.
- 4.) Stromaufwärts von *thmS* befindet sich *orfY*. *OrfY* zeigte Homologie zu einem hypothetischen Protein mit bisher unbekannter Funktion, dessen Gen in einem *Rhodococcus*–Stamm zwischen den Strukturgenen einer P450–abhängigen Monooxygenase lokalisiert ist. Für *orfY* konnte gezeigt werden, daß dieser THF–induziert in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 transkribiert wird und somit eine Rolle beim THF–Abbau spielen könnte. Eine Aussage über die Funktion konnte anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden.
- 5.) Stromabwärts von *thmC* wurden zwei weitere offene Leserahmen (*orfZ*, *thmH*) identifiziert. *OrfZ* und *thmH* werden in 1,4–Butandiol–gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 gemeinsam transkribiert. Die aus *orfZ* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte bei Hydropathie–Analysen das Muster eines Membranproteins, für das sich 6 transmembrane Helices ableiten lassen. Es wurde postuliert, daß *OrfZ* eine Funktion beim Katabolismus von 1,4–Butandiol besitzt. Für *thmH* wurde aufgrund der spezifischen Transkription in 1,4–Butandiol–gewachsenen Zellen und der signifikanten Sequenzhomologien von *ThmH* zu Aldehyd–Dehydrogenasen postuliert, daß dieses Gen für eine 4–Hydroxybutyraldehyd–Dehydrogenase kodiert.
- 6.) In *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurden zwei zirkuläre Plasmide identifiziert, die sowohl in THF– als auch in Succinat–gewachsenen Zellen nachweisbar waren. Eines dieser Plasmide (pPSK60) konnte als Träger der *thm*–Gene identifiziert werden. Der G+C–Gehalt der *thm*–Gene lag ca. 10 % niedriger als der der Gesamt–DNA von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1, und es wurde postuliert, daß die Gene bzw. das Plasmid durch lateralen Gentransfer erworben wurden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AKADA R., 1994: Quick–check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *BioTechniques* **17**: 58.

ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J., 1997: Gapped BLAST and PSI–BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.

ARMSTRONG J.M.C.D., 1964: The molar extinction coefficient of 2,6–dichlorphenol–indophenol. *Biochim. Biophys. Acta* **86**: 194–197.

BATIE C. J., LaHAIE E., BALLOU D.P., 1987: Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biol. Chem.* **262**: 1510–1518.

BATIE C.J., BALLOU D.P., CORREL C.C., 1991: Phthalate dioxygenase reductase and related flavin–iron–sulfur containing electron transferases. In F. Müller (ed.), *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 543–556.

BECKER D., SCHRÄDER T., ANDREESEN J.R., 1997: Two–component flavin–dependent pyrrole–2–carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp.. *Eur. J. Biochem.* **249**: 739–747.

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.

BERNHARDT D., DIEKMANN H., 1991: Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 120–123.

BERNHARDT F.-H., PACHOWSKY H., STAUDINGER H., 1975: A 4–Methoxybenzoate O–demethylase from *Pseudomonas putida*. A new type of monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.* **57**: 241–251.

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.

BIRKMANN A., SAWERS R.G., BÖCK A., 1987: Involvement of the *ntrA* gene product in the anaerobic metabolism of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 535–542.

- BIRNBOIM J.C., DOLY J., 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513–1523.
- BLUM H., BEIER H., GROSS H.J., 1987: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.
- BOCK C., 1994: Untersuchungen zum Abbau von Tetrahydrofuran und anderen cyclischen Ethern, zur initialen C–Hydroxylierung und zur Charakterisierung von *Rhodococcus ruber* Stamm 219. Dissertation. Universität Hannover.
- BOCK C., KROPPIENSTEDT R.M., DIEKMANN H., 1996: Degradation and bioconversion of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Rhodococcus ruber* 219. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 408–410.
- BOWN A.W., SHELP B.J., 1997: The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**: 1–5.
- 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.
- BRUNEL F., DAVISON J., 1988: Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* **170**: 4924–4930.
- BULLOCK W.O., FERNANDEZ J.M., SHORT J.M., 1987: XL 1–Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta–galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376–378.
- BÜNZ P.V., COOK A.M., 1993: Dibenzofuran 4,4a–dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: Angular dioxygenation by a three–component enzyme system. *J. Bacteriol.* **175**: 6467–6475.
- BURLAGE R.S., BEMIS L.A., LAYTON A.C., SAYLER G.S., LARIMER F., 1990: Comparative genetic organization of incompatibility group P degradative plasmids. *J. Bacteriol.* **172**: 6818–6825.
- BUSCH K.B., FROMM H., 1999: Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiol.* **121**: 589–597.
- BUSCH U., PREAC–MURSIC V., WILSKE B., 1996: Strain typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by linear plasmid profile analysis. *QIAGEN News* **5**: 18–19.
- BYRNE A.M., KUKOR J.J., OLSEN R.H., 1995: Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene–3–monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *Gene* **154**: 65–70.
- CANNON W.V., CHANEY M.K., WANG X.–Y., BUCK M., 1997: Two domains within σ^N (σ^{54}) cooperate for DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5006–5011.

- CARDY D.L.N., LAIDLER V., SALMOND G.P.C., MURRELL J.C., 1991a: Molecular analysis of the methane monooxygenase (MMO) gene cluster of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Mol. Microbiol.* **5**: 335–342.
- CARDY D.L.N., LAIDLER V., SALMOND G.P.C., MURRELL J.C., 1991b: The methane monooxygenase gene cluster of *Methylosinus trichosporium*: cloning and sequencing of the *mmoC* gene. *Arch. Microbiol.* **156**: 477–483.
- CARMONA M. CLAVERIE–MARTIN F., MAGASANIK B., 1997: DNA bending and the initiation of transcription at σ^{54} –dependent bacterial promotors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9568–9572.
- CHAMBLISS K.L., CAUDLE D.L., HINSON D.D., MOOMAW C.R., SLAUGHTER C.A., JAKOBS C., GIBSON K.M., 1995: Molecular cloning of the mature NAD⁺–dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. *J. Biol. Chem.* **270**: 461–467.
- COLBY J., DALTON H., 1978: Resolution of the methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) into three components. *Biochem. J.* **171**: 461–468.
- COLBY J., DALTON H., 1979: Characterization of the second prosthetic group of the flavoenzyme NADH–acceptor reductase (component C) of the methane mono–oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochem. J.* **177**: 903–908.
- COLLADO–VIDES J., MAGASANIK B., GRALLA J.D., 1991: Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**: 371–394.
- COOPER R.A., SKINNER M.A., 1980: Catabolism of 3– and 4–hydroxyphenylacetate by the 3,4–dihydroxyphenylacetate pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **143**: 302–306.
- CSERZO M., WALLIN E., SIMON I., VON HEIJNE G., ELOFSSON A., 1997: Prediction of transmembrane alpha–helices in procariotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot. Eng.* **10**: 673–676.
- DABROCK B., 1993: Der cumolinduzierte aerobe Abbau von Trichlorethenen durch *Rhodococcus erythropolis* und seine Lokalisation auf einem linearen Megaplasmid. Dissertation. Universität Göttingen.
- DABROCK B., KEßELER M., AVERHOFF B., GOTTSCHALK G., 1994: Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 853–860.
- DAWSON R.M.C., ELLIOTT D.C., ELLIOTT W.H., JONES K.M., 1986: Data for Biochemical Research. Clarendon Press, Oxford. 3. Auflage.

- DE JONG E., VAN BERKEL W.J.H., VAN DER ZWAN R.P., DE BONT J.A.M., 1992: Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur. J. Biochem.* **208**: 651–657.
- DE LORENZO V., PEREZ-MARTIN J., 1996: Regulatory noise in prokaryotic promotors: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol Microbiol.* **19**: 1177–1184.
- DECKER K., BRANDSCH R., 1997: Determining covalent flavinylation. *Methods Enzymol.* **280**: 413–423.
- DECKER K.F., 1993: Biosynthesis and function of enzymes with covalently bound flavin. *Annu. Rev. Nutr.* **13**: 17–41.
- DIXON R., 1986: The *xylABC* promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 129–136.
- DMITRENKO G.N., GVOZDYAK P.I., UDOD V.M., 1987: Selection of destructor microorganisms for heterocyclic xenobiotics. *Khim. Tekhnol. Vody.* **9**: 442–445.
- DONNELLY M.I., COOPER R.A., 1981: Succinic semialdehyde dehydrogenases of *Escherichia coli*. Their role in the degradation of *p*-hydroxyphenylacetate und γ -aminobutyrate. *Eur. J. Biochem.* **113**: 555–561.
- DOWER W.J., MILLER J.F., RAGSDALE C.W., 1988: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 387–395.
- DUETZ W.A., VAN ANDEL J.G., 1991: Stability of TOL plasmid pWWO in *Pseudomonas putida* mt-2 under non-selective conditions in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1369–1374.
- EATON R.W., 1997: *P*-cumene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cumene to *p*-cumarate. *J. Bacteriol.* **179**: 3171–3180.
- EDDY C.K., KESHAV K.F., HAEJUNG AN, UTT, E.A., MEJIA J.P., INGRAM L.O., 1991: Segmental message stabilization as a mechanism for differential expression from the *Zymomonas mobilis* gap operon. *J. Bacteriol.* **173**: 245–254.
- EDMONDSON D.E., KENNEY W.C., SINGER T.P., 1978: Synthesis and isolation of 8 α -substituted flavins and flavin peptides. *Methods Enzymol.* **53**: 449–465.
- EHRT S., SCHIRMER F., Hillen W., 1995: Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol. Microbiol.* **18**: 13–20.

- ELANGO N., RADHAKRISHNAN R., FROLAND W.A., WALLAR B.J., EARHART C.A., LIPSCOMB J.D., OHLENDORF D.H., 1997: Crystal structure of the hydroxylase component of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Prot. Sci.* **6**: 556–568.
- ERICSON A., HEDMAN B., HODGSON K.O., GREEN J., DALTON H., BENTSON J.G., BERR R.H., LIPPARD S.J., 1988: Structural characterization by EXAFS spectroscopy of the binuclear iron centre in protein A of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 2330–2332.
- FALBE J., REGITZ M., 1992: Römpf Chemie Lexikon. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 9. Auflage.
- FOX B.G., FROLAND W.A., DEGE J.E., LIPSCOMB J.D., 1989: Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Biol. Chem.* **264**: 10023–10033.
- FOX B.G., LIU Y., DEGE J.E., LIPSCOMB J.D., 1991: Complex formation between the protein components of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Biol. Chem.* **266**: 540–550.
- FOX B.G., SHANKLIN J., AI J., LOEHR T.M., SANDERS-LOEHR J., 1994: Resonance Raman evidence for an Fe–O–Fe center in stearoyl–ACD desaturase. Primary sequence identity with other diiron–oxo proteins. *Biochemistry* **33**: 12776–12786.
- FOX B.G., SURERUS K.K., MÜNCK E., LIPSCOMB J.D., 1988: Evidence for a μ -oxo-bridged binuclear iron cluster in the hydroxylase component of methane monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **263**: 10553–10556.
- FRAAIJE M.W., PIKKEMAAT M., VAN BERKEL W.J.H., 1997: Enigmatic gratuitous induction of the covalent flavoprotein vanillyl–alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 435–439.
- FRIEDMAN D.I., 1988: Integration host factor: a protein for all reason. *Cell* **55**: 545–554.
- FRINGS J., SCHINK B., 1994: Fermentation of phenoxyethanol to phenol and acetate by a homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **162**: 199–204.
- 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.
- GALLAGHER S.C., CAMMACK R., DALTON H., 1997: Alkene monooxygenase from *Nocardia corallina* B-276 is a member of the class of dinuclear iron proteins capable of stereospecific epoxidation reaction. *Eur. J. Biochem.* **247**: 635–641.

- GIBELLO A., SUAREZ M., ALLENDE J.L., MARTIN M., 1997: Molecular cloning and analysis of the genes encoding the 4-hydroxyphenylacetate hydroxylase from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **167**: 160–166.
- GROßE C., GRASS G., ANTON A., FRANKE S., NAVARRETTE-SANTOS A., LAWLEY B., BROWN N.L., NIES D.H., 1999: Transcriptional organization of the *czc* heavy–metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **181**: 2385–2393.
- GROSSE S., LARAMEE L., WENDLANDT K.–D., McDONALD I.R., MIGUEZ C.B., KLEBER H.–P., 1999: Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase of the typ II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp. strain WI 14. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3929–3935.
- GVOZDYAK P.I., UDOD V.M., DIMITRENKO G.N., 1988: *Xanthomonas* bacterial strain for removing tetrahydrofuran from wastewater. USSR patent no. SU 1375646.23.2.1988. (CA 108: 192259).
- HAARDT M., BREMER E., 1996: Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 5370–5381.
- HARAYAMA S., KOK M., NEIDLE E.L., 1992: Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 565–601.
- HARAYAMA S., REKIK M., BAIROCH A., NEIDLE E.L., ORNSTON L.N., 1991: Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWWO plasmid *xylXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenase. *J. Bacteriol.* **173**: 7540–7548.
- HARTMANS S., WEBER F.J., SOMHORST D.P.M., DE BONT J.A.M., 1991: Alkene monooxygenase from *Mycobacterium*: a multicomponent enzyme. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2555–2560.
- HAYAKAWA T., TANAKA T., SAKAGUCHI K., ÖTAKE N., YONEHARA H., 1979: A linear plasmid–like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**: 255–260.
- HERRMANN H., MÜLLER C., SCHMIDT I., MAHNKE J., PETRUSCHKA L., HAHNKE K., 1995: Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 240–246.
- HIGGINS T.P., DAVEY M., TRICKETT J., KELLY D.P., MURRELL J.C., 1996: Metabolism of methanesulfonic acid involves a multicomponent monooxygenase enzyme. *Microbiology* **142**: 251–260.

- HINO S., WATANABE K., TAKAHASHI N., 1998: Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiology* **144**: 1765–1772.
- HORINOUCHI M., KASUGA K., NOJIRI H., YAMANE H., OMORI T., 1997: Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**: 99–105.
- HORMANN K., 1991: Untersuchungen zum aeroben Abbau von Pyrrol-2-carboxylat und Charakterisierung einer Flavin abhängigen Pyrrol-2-carboxylat Oxygenase. Dissertation. Universität Göttingen.
- HUR H.-G., NEWMAN L.M., WACKETT L.P., SADOWSKY M.J., 1997: Toluene 2-monooxygenase-dependent growth of *Burkholderia cepacia* G4/PR1 on diethyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1606–1609.
- HYMAN M.R., PAGE C.L., ARP D.J., 1994: Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3033–3035.
- ISKEN S., DERKS A., WOLFFS P.F.G., DE BONT J.A.M., 1999: Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2631–2635.
- IWABUCHI T., HARAYAMA S., 1997: Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. *J. Bacteriol.* **179**: 6488–6494.
- 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.
- KALKUS J., 1992: Untersuchungen zum Aufbau der Enden des linearen Plasmids pHG207 aus *Nocardia opaca*. Dissertation. Universität Göttingen.
- KALKUS J., REH M., SCHLEGEL H.G., 1990: Hydrogen autotrophy of *Nocardia opaca* strains is encoded by linear megaplasmids. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1145–1151.
- KARLSON U., DWYER D.F., HOOPER S.W., MOORE E.R.B., TIMMIS K.N., ELTIS L.D., 1993: Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. *J. Bacteriol.* **175**: 1467–1474.
- KAUFMANN F., WOHLFARTH G., DIEKERT G., 1997: Isolation of O-demethylase, an ether-cleaving enzyme system of the homoacetogenic strain MC. *Arch. Microbiol.* **168**: 126–142.

- KESSELER M., DABBS E.R., AVERHOFF B., GOTTSCHALK G., 1996: Studies on the isopropylbenzene 2,3-dioxygenase and the 3-isopropylcatechol 2,3-dioxygenase genes encoded by the linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2. *Microbiology* **142**: 3241–3251.
- KIEBOOM J., DENNIS J.J., ZYLSTRA G.J., DE BONT J.A.M., 1998: Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J. Bacteriol.* **180**: 6769–6772.
- KINASHI H., SHIMAYI M., SAKAI A., 1987: Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature* **328**: 454–456.
- KOENIG K., ANDREESEN J. R., 1989: Molybdenum involvement in aerobic degradation of 2-furoic acid by *Pseudomonas putida* Fu1. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1829–1843.
- KOHLWEYER U., 2000: Isolierung und Charakterisierung eines Tetrahydrofuran abbauenden Stamms *Pseudonocardia* sp.. Dissertation. Universität Halle.
- KOHLWEYER U., THIEMER B., SCHRÄDER T., ANDREESEN J.R., 2000: Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 301–306.
- KREFT J.-U., SCHINK B., 1993: Demethylation and degradation of phenylmethylethers by the sulfide–methylating homoacetogenic bacterium strain TMBS 4. *Arch. Microbiol.* **159**: 308–315.
- LAEMMLI U.K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- LARKIN M.J., DE MOT R., KULAKOV L.A., NAGY I., 1998: Applied aspects of *Rhodococcus* genetics. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 133–153.
- LEE S.D., KIM E.S., HAH Y.C., 2000: Phylogenetic analysis of the genera *Pseudonocardia* and *Actinobispora* based on 16S ribosomal DNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**: 125–129.
- LIPSCOMB J.D., 1994: Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 371–399.
- LLOYD J.S., BHAMBRA A., MURRELL J.C., DALTON H., 1997: Inactivation of the regulatory protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) by proteolysis can be overcome by a Gly to Gln modification. *Eur. J. Biochem.* **248**: 72–79.
- LOCHER H.H., LEISINGER T., COOK A.M., 1991a: 4-Toluene sulfonate methyl–monooxygenase from *Comamonas testosteroni* T–2: Purification and some properties of the oxygenase component. *J. Bacteriol.* **173**: 3741–3748.

- LOCHER H.H., LEISINGER T., COOK A.M., 1991b: 4–Sulphobenzoate 3,4–dioxygenase: Purification and properties of a desulphonative two–component enzyme system from *Comamonas testosteroni* T–2. *Biochem. J.* **274**: 833–842.
- LUND J., WOODLAND M.P., DALTON H., 1985: Electron transfer reactions in the soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur. J. Biochem.* **147**: 297–305.
- LÜTKE–EVERSLOH T., STEINBÜCHEL A., 1999: Biochemical and molecular characterization of a succinate semialdehyde dehydrogenase involved in the catabolism of 4–hydroxybutyric acid in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**: 63–71.
- MANOIL C., 1990: Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.* **172**: 1035–1042.
- MASON J.R., CAMMACK R., 1992: The electron–transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 277–305.
- MCINTIRE W., EDMONDSON D.E., HOPPER D.J. SINGER T.P., 1981: 8 α –(O–Tyrosyl) flavin adenine dinucleotide, the prosthetic group of bacterial *p*–cresol methylhydroxylase. *Biochemistry* **20**: 3068–3075.
- MEINHARDT F., SCHAFFRATH R., LARSEN M., 1997: Microbial linear plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 329–336.
- MEWIES M., MCINTIRE W.S., SCRUTTON N.S., 1998: Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. *Protein Sci.* **7**: 7–20.
- MIURA A., DALTON H., 1995: Purification and characterization of the alkene monooxygenase from *Nocardia corallina* B–276. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 853–859.
- MO K., LORA C.O., WANKEN A.E., JAVANMARDIAN M., YANG X., KULPA C.F., 1997: Biodegradation of methyl t–butyl ether by pure bacterial cultures. *App. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 69–72.
- MUNRO A.W., LINDSAY J.G., 1996: Bacterial cytochromes P–450. *Mol. Microbiol.* **20**: 1115–1125.
- MURRELL J.C., 1994: Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation* **5**: 145–159.
- MURRELL J.C., GILBERT B., McDONALD I.R., 2000: Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* **173**: 325–332.

- NAGY I., SCHOOPS G., COMPERNOLLE F., PROOST P., VANDERLEYDEN J., DE MOT R., 1995: Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**: 676–687.
- NAKAYAMA Y., YASUI M., SUGAHARA K., HAYASHI M., UNEMOTO T., 2000: Covalently bound flavin in the NqrB and NqrC subunit of Na^+ -translocating NADH-quinone reductase from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* **474**: 165–168.
- NEIDLE E.L., HARTNETT C., ORNSTON L.N., BAIROCH A., REKIK M., HARAYAMA S., 1991: Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC genes for the benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationship among multicomponent oxygenases. *J. Bacteriol.* **173**: 5385–5395.
- NEWMAN L.M., WACKETT L.P., 1995: Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* **34**: 14066–14076.
- NGUYEN H.H.T., ELLIOTT S.J., YIP J.H.K., CHAN S.I., 1998: The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**: 7957–7966.
- NIELSEN A.K., GERDES K., DEGN H., MURREL J.C., 1996: Regulation of methane oxidation: transcription of the soluble methane monooxygenase operon of *Methylococcus capsulatus* (Bath) is repressed by copper ions. *Microbiology* **142**: 1289–1296.
- NIELSEN A.K., GERDES K., MURRELL J.C., 1997: Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol. Microbiol.* **25**: 399–409.
- NIES D., MERGEAY M., FRIEDRICH B., SCHLEGEL H.G., 1987: Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **169**: 4865–4868.
- NIRENBERG M.W., JAKOBY W.B., 1960: Enzymatic utilization of γ -hydroxybutyric acid. *J. Biol. Chem.* **235**: 954–960.
- 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.
- OHE T., WATANABE V., 1979: Purification and properties of xanthine dehydrogenase from *Streptomyces cyanogenus*. *J. Biochem.* **86**: 45–53.

- OTAKA E., OOI T., 1989: Examination of protein sequences homologies. V. New perspectives on evolution between bacterial and chloroplast-type ferredoxins inferred from sequence evidence. *J. Mol. Evol.* **29**: 246–254.
- 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.
- PALMER G., 1975: Iron–sulfur proteins. In P.D. Boyer, *The enzymes* vol. XII; pp. 1–56. Academic Press, New York. 3. Auflage.
- PARALES R.E., ADAMUS J.E., WHITE N., MAY H.D., 1994: Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4527–4530.
- PAULSEN K.E., LIU Y., FOX B.G., LIBSCOMB J.D., MÜNCK E., STANKOVICH M.T., 1994: Oxidation–reduction potentials of the methane–monooxygenase hydroxylase component from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry* **33**: 713–722.
- PESSIONE E., DIVARI S., GRIVA E., CAVALETTO M., ROSSI G.L., GILARDI G., GIUNTA C., 1999: Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* is a multicomponent enzyme. *Eur. J. Biochem.* **265**: 548–555.
- PIKUS J.D., STUDTS J.M., ACHIM C., KAUFFMANN K.E., MÜNCK E., STEFFAN R.J., McCLAY K., FOX B.G., 1996: Recombinant toluene–4–monooxygenase: Catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four–protein complex. *Biochemistry* **35**: 9106–9119.
- POUPIN P., TRUFFAUT N., COMBOURIEU B., BESSE P., SANCELME M., VESCHAMBRE H., DELORT A.M., 1998: Degradation of morpholine by an environmental *Mycobacterium* strain involves a cytochrome P–450. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 159–165.
- 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.
- POWLOWSKI J., SHINGLER V., 1994: Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* **5**: 219–236.
- PRINZ W.A., BECKWITH J., 1994: Gene fusion analysis of membrane protein topology: a direct comparison of alkaline phosphatase and β -lactamase fusions. *J. Bacteriol.* **176**: 6410–6413.
- RÖMERmann D., WARRELMANN J., BENDER A., FRIEDRICH B., 1989: An *rpoN*-like gene of *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas facilis* controls expression of diverse metabolic pathways. *J. Bacteriol.* **171**: 1093–1099.

- RONSON C.W., NIXON B.T., ALBRIGHT L.M., AUSUBEL F.M., 1987: *Rhizobium meliloti ntrA (rpoN)* gene is required for diverse metabolic functions. *J. Bacteriol.* **169**: 2424–2430.
- ROSCHE B., TSHISUAKA B., HAUER B., LINGENS F., FETZNER S., 1997: 2-Oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase: Phylogenetic relationship to other multicomponent nonheme iron oxygenase. *J. Bacteriol.* **179**: 3549–3554.
- ROSENBERG M., COURT D., 1979: Regulatory sequences involved in the promotion and determination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**: 319–353.
- ROSENZWEIG A.C., BRANDSTETTER H., WHITTINGTON D.A., NORDLUND P., LIPPARD S.J., FREDERICK C.A., 1997: Crystal structures of the methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): Implication for substrate gating and component interactions. *Proteins* **29**: 141–152.
- ROSENZWEIG A.C., FREDERICK C.A., LIPPARD S.J., NORDLUND P., 1993: Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **366**: 537–543.
- SAEKI H., 1998: Molecular and functional analysis of genes involved in propene degradation of *Nocardia corallina* B-276. Dissertation. Universität Göttingen.
- SAEKI H., AKIRA M., FURUHASHI K., AVERHOFF B., GOTTSCHALK G., 1999: Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallina* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology* **145**: 1721–1730.
- SAEKI H., FURUHASHI K., 1994: Cloning and characterization of a *Nocardia corallina* B-276 gene cluster encoding alkene monooxygenase. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 399–406.
- SAITO H., MIURA K.I., 1963: Preparation of transforming desoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**: 619–629.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T., 1989: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2. Auflage.
- SANCHEZ M., FERNANDEZ J., GIBELLO A., GARRIDO-PERTIERRA A., 1989: Purification and properties of two succinic semialdehyde dehydrogenases from *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta* **990**: 225–231.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467.

- SARIASLANI F.S., 1991: Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.* **36**: 133–178.
- SAYLER G.S., HOOPER S.W., LAYTON A.C., KING J.M.H., 1990: Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. *Microb. Ecol.* **19**: 1–20.
- SCHIRMER F., EHRT S., HILLEN W., 1997: Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J. Bacteriol.* **179**: 1329–1336.
- SCHLEGEI H.G., 1992: Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 7. Auflage.
- SCHREUDER H.A., HOL W.G.J., DRENTH J., 1990: Analysis of the active site of the flavoprotein ρ -hydroxybenzoate hydroxylase and some ideas with respect to its reaction mechanism. *Biochemistry* **29**: 3101–3108.
- SCHRÜNDER J., MEINHARDT F., ROHE M., KÄMPER J., 1994: Lineare Plasmide bei Mikroorganismen – Genetische Grundlagen und potentielle Anwendungen. *BioEngineering* **10**: 29–39.
- SCHULTZ J., COPLEY R.R., DOERKS T., PONTING C.P., BORK P., 2000: SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* **28**: 231–234.
- SCHULTZ J., MILPETZ F., BORK P., PONTING C.P., 1998: SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5857–5864.
- SHANKLIN J., ACHIM C., SCHMIDT H., FOX B.G., MÜNCK E., 1997: Mössbauer studies of alkane ω -hydroxylase: Evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2981–2986.
- SHANKLIN J., WHITTLE E., FOX B.G., 1994: Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-coenzyme A desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**: 12787–12794.
- SHINE J., DALGARNO L., 1974: The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosomal binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342–1346.
- SHINGLER V., BARTILSON M., MOORE T., 1993: Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **175**: 1596–1604.

- SHINGLER V., FRANKLIN C.H., TSUDA M., HOLROYD D., BAGDASARIAN M., 1989: Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1083–1092.
- SHINGLER V., POWLOWSKI J., MARKLUND U., 1992: Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**: 711–724.
- SIELAFF B., ANDREESEN J.R., SCHRÄDER T., 2001: A cytochrome P450 and a 3Fe–4S–ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Im Druck.
- SINGER T.P., EDMONDSON D.E., 1980: Structure, properties, and determination of covalently bound flavins. *Methods Enzymol.* **66**: 253–264.
- SINGER T.P., McINTIRE W., 1984: Covalent attachment of flavin to flavoproteins: Occurrence, assay, and synthesis. *Methods Enzymol.* **106**: 369–378.
- SMALL F.J., ENSIGN S.A., 1997: Alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2. *J. Biol. Chem.* **272**: 24913–24920.
- SMITH T.S., LLOYD J.S., GALLAGHER S.C., FOSDIKE W.L.J., MURRELL J.C., DALTON H., 1999: Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* B-276. *Eur. J. Biochem.* **260**: 446–452.
- SONNHAMMER E.L.L., VON HEIJNE G., KROGH A., 1998: A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 175–182. Ed J. GLASGOW , LITTLEJOHN T., MAJOR F., LATHROP R., SANNKOFF D., SENSEN C., Menlo Park, CA: AAAI Press.
- SPALLEK R., 1998: Charakterisierung der Tetrahydrofuran–Monooxygenase aus *Rhodococcus ruber* 219. Dissertation. Universität Hannover.
- SPARNINS V.L., CHAPMAN P.J., DAGLEY S., 1974: Bacterial degradation of 4-hydroxyphenylacetic acid and homoprotocatechic acid. *J. Bacteriol.* **120**: 159–167.
- STAINTHORPE A.C., LEES V., SALMOND G.P.C., DALTON H., MURRELL J.C., 1990: The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Gene* **91**: 27–34.
- STIRLING D.I., DALTON H., 1980: Oxidation of dimethyl ether, methyl formate and bromomethane by *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* **116**: 277–283.

- STRIJEWSKI A., 1982: The steroid-9 α -hydroxylation system from *Nocardia* species. *Eur. J. Biochem.* **128**: 125–135.
- STROHL W.R., 1992: Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**: 961–974.
- SUTHERLAND J.B., 1986: Demethylation of veratrole by cytochrome P-450 in *Streptomyces setonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 98–100.
- SUZUKI M., HAYAKAWA T., SHAW J.P., REKIK M., HARAYAMA S., 1991: Primary structure of xylene monooxygenase: Similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *J. Bacteriol.* **173**: 1690–1695.
- TAN H.-M., JOANNOU C.L., COOPER C.E., BUTLER C.S., CAMMACK R., MASON J.R., 1994: The effect of ferredoxin_{BED} overexpression on benzene dioxygenase activity in *Pseudomonas putida* ML2. *J. Bacteriol.* **176**: 2507–2512.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., 1994: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- THÖNY B., HENNECKE H., 1989: The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 341–358.
- TROWER M.K., SARIASLANI F.S., O'KEEFE D.P., 1989: Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P-450 from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**: 1781–1787.
- TSITKO I.V., ZAITSEV G.M., LOBANOK A.G., SALKINOJA-SALONEN M.S., 1999: Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 853–855.
- VAN DER MEER J.R., DE VOS W.M., HARAYAMA S., ZEHNDER A.J.B., 1992: Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**: 677–694.
- VAN HYLCKAMA VLIEG J.E.T., LEEMHUIS H., LUTJE SPELBERG J.H., JANSSEN D.B., 2000: Characterization of the gene cluster involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus* sp. strain AD45. *J. Bacteriol.* **182**: 1956–1963.
- VEDADI M., VRIELINK A., MEIGHEN E., 1997: Involvement of conserved glycine residues, 229 and 234, of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase in activity and nucleotide binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**: 448–451.

- VELASCO A., ALONSO S., GARCIA J.L., PERERA J., DIAZ E., 1998: Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J. Bacteriol.* **180**: 106–1071.
- WALSH C.T., CHEN Y.-C.J., 1988: Enzymatische Baeyer–Villiger–Oxidationen durch flavinabhängige Monooxygenasen. *Angew. Chem.* **100**: 342–352.
- WALTERS K.J., GASSNER G.T., LIPPARD S.J., WAGNER G., 1999: Structure of the soluble methane monooxygenase regulatory protein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7877–7882.
- WARBURG O., CHRISTIAN W., 1942: Isolierung und Charakterisierung des Gärungsfermentes Enolase. *Biochem. Z.* **310**: 384–421.
- WEBER F.J., VAN BERKEL W.J.H., HARTMANN S., DE BONT J.A.M., 1992: Purification and properties of the NADH reductase component of alkene monooxygenase from *Mycobacterium* strain E3. *J. Bacteriol.* **174**: 3275–3281.
- WEBER K., OSBORN M., 1969: The reliability of the molecular weight determinations by dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406–4412.
- WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A., LANE D.J., 1991: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697–703.
- WESTERHEIDE L., PASCALY M., KREBS B., 2000: Methane monooxygenase and its related biomimetic models. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 235–241.
- WHITE G.F., RUSSELL N.J., TIDSWELL E.C., 1996: Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* **60**: 216–232.
- WHITED G.M., GIBSON D.T., 1991: Toluene–4–monooxygenase, a three–component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*–cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**: 3010–3016.
- WIDDEL F.G., KOHRING G.W., MAYER F., 1983: Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **134**: 286–294.
- WILLIE A., EDMONDSON D.E., SCHUMAN JORNS M., 1996: Sarcosine oxidase contains a novel covalently bound FMN. *Biochemistry* **35**: 5292–5299.
- WÖSTEN M.M.S.M., 1998: Eubacterial sigma–factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127–150.
- XUN L., 1996: Purification and characterization of chlorophenol 4–monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* **178**: 2645–2649.

- YANISH-PERRON C., VIEIRA J., MESSING J., 1985: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 und pUC vectors. *Gene* **33**: 103–115.
- YEN K.M., KARL M.R., 1992: Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monoxygenase. *J. Bacteriol.* **174**: 7253–7261.
- YEN K.-M., KARL M.R., BLATT L.M., SIMON M.J., WINTER R.B., FAUSSET P.R., LU H.S., HARCOURT A.A., CHEN K.K., 1991: Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monoxygenase. *J. Bacteriol.* **173**: 5315–5327.
- ZHOU N.Y., JENKINS A., CHAN KWO CHION C.K.N., 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.

7. ANHANG

Abbildung A: DNA-Sequenz des plasmidkodierten 9179 bp *Sau3A*-Fragments aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Gezeigt ist der nicht-kodierende DNA-Strang in 5' → 3' Richtung. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Sterne symbolisieren Stopcodons. Mögliche Ribosomenbindestellen sind unterstrichen, die Startcodons durch Fettschrift hervorgehoben. Pfeile oberhalb der DNA-Sequenz kennzeichnen palindromische Sequenzen.

```

1  GCGGTTGCC AGGAAGTTCT AAGCGTGGCC TGCCAACGGA TTTTGGTCTA AGAAAGTGTG
61  GCATGTTACA TGCCACGTCG CAGTGGAGAC TCGGAGGCTG AACTATGTTC AAGATCATGT
OrfY> M F K I M

121 TTGTCGTCTA CGAGCGCGAG GGTATCGATC GGGATGAGGC TCTGCGTTAT TGGCGCGAGC
F V V Y E R E G I D R D E A L R Y W R E

181 AGCATGGTCC GCTCGCGTCG AAGGTTCCCG GCCTGCGTTA TTACGCTCAG ACGCACGCC
Q H G P L A S K V P G L R Y Y A Q T H A

241 TCAGCTCTGC TGACGGGGGC TCGGCCCCGT ACCTCGGATC CGCTGAGATG GCGTTCGACA
L S S A D G G S A P Y L G S A E M A F D

301 GCCAGGGGGC TTTTGTGAG GCAACGGCAT CTCCCGAGTT CGATGCGGTT CTGAAGGACG
S Q G A F V E A T A S P E F D A V L K D

361 TGGTCAACTT TGCAGATCCT GACAACGTT CGACGGCAGT TGTCCAAGAT TACGTCTTCG
V V N F A D P D N V P T A V V Q D Y V F

421 TCGACTGACC TCTATTCGG TGACTGACTG AGTTTCATCT GCATTCAAA TTGAGGTGCT
V D *

481 TGGTTTCGTT TGCGCGCTG GCCACACCTT TGAATGCGCG GCTCCCTCTT AGCACGTAGG

541 ACCTATTCAAG CCTACCCCTC GCCGCTGAAG GAGAAATAGA ATGACCGTGA TCGCCAAGCC
ThmS> M T V I A K

601 TGATCATCTA TTGCGTGACG ATGTGCAGAA GTTCATTGAT CGCCCGAAGA AACTTTCAT
P D H L L R D D V Q K F I D R P K K L F

661 TAATGGTCAG TGGCACGACT CGATCAAGGG TGAGACTCTC GAGGTTTATG ACCCTGCGGT
I N G Q W H D S I K G E T L E V Y D P A

721 TGGGACGAAG ATCTGTACCG TTGCTGCGGG CGATGCGGAG GATGTCGACC GAGCTGTGGC
V G T K I C T V A A G D A E D V D R A V

781 GGCGCGCGC CACCGCGTCG ACGAGGGGCC GTGGTCCAAG CTAAATCCTT CGGAGCGCGG
A A A R H A F D E G P W S K L N P S E R

```

841 CAGGCTGGTT TGGCGGCTCG CGGACCTTCT CGAGGAGCAC GCGGACGAGT TCGCACAGAT
 G R L V W R L A D L L E E H A D E F A Q

 901 CGATGCGCTT GACAATGGCA AACCGGTACAC GGACGCGCGT GCGGTAGACG TGGCGTTCTC
 I D A L D N G K P V T D A R A V D V A F

 961 GATCGAATTG CTGCGCTACA TGGCTGGTTG GTCGAACAAA ATCTATGGTG AGACGATTCC
 S I E L L R Y M A G W S N K I Y G E T I

 1021 GCTCACTAAC CCGGCTGACT TCCATGCATA CACGCTTCGC GAGCCGGTCG GCGTGGTCGG
 P L T N P A D F H A Y T L R E P V G V V

 1081 GCAGATCGTT CCTTGGAACT TCCCCCTTAT GATGGCGGTC TGGAAGGTAG CTCCTGCCCT
 G Q I V P W N F P L M M A V W K V A P A

 1141 GGCTGCAGGC TGCACCGTGA TCCTCAAGCC CGCCGAGCAG ACACCGCTGA GCGCACTTCG
 L A A G C T V I L K P A E Q T P L S A L

 1201 CCTGGCCGAG CTCACCGAGG AGGCCGGCTT CCCGCCAGGT GTCTTCAACG TCATCACTGG
 R L A E L T E E A G F P P G V F N V I T

 1261 CTTTGGCGAG ACTGCAGGTG CGGCGATCGC CGCCCACGAC AACATCGACA AGTCGCGTT
 G F G E T A G A A I A A H D N I D K V A

 1321 CACCGGCTCG ACCGAGGTGG GCGGGTTGAT CGCCCAGGCG GCGAGCGGAA ACCTGAAGAA
 F T G S T E V G R L I A Q A A S G N L K

 1381 GGTCTCTCTC GAGCTTGGCG GAAAGTCTCC CGTGATCGT TTCGGTGATT CTGACATCGA
 K V S L E L G G K S P V I V F G D S D I

 1441 GCAGGCTGTC GCTGGTGCTT CCAGGCCAT TTTCTACAAC AACGGGCAGA CCTGCACGGC
 E Q A V A G A S S A I F Y N N G Q T C T

 1501 GGGCTCTCGT CTTTATGTGC ACCGGAAGGT CTACGACAAG GTCGTGGAGG GTATGCCAG
 A G S R L Y V H R K V Y D K V V E G I A

 1561 TGAGGCGTCG GCTCTCCCGA TTGGTCACGG TCTCGACCCG GCGACCCCGCA TCGGGCCGCT
 S E A S A L P I G H G L D P A T R I G P

 1621 GATCTCGGCG GAGCAGCGCG ACCGTGTCAC TGGCTACATC GCACAGGGCC GTGAGGCCGG
 L I S A E Q R D R V T G Y I A Q G R E A

 1681 TGCAGAGGTG ATCGTGGCG GGGACACTGT CGGTGATGGG GGCTACTTCA TTCAGCCGAC
 G A E V I V G G D T V G D G G Y F I Q P

 1741 CATCCTTACC AAGACTGATC CGAGCATGAG CGTGGTGCAG GAGGAGATCT TCGGCCAGT
 T I L T K T D P S M S V V R E E I F G P

 1801 GCTGTGCGCC ATGGCCTTTG ACGAAGACAC CATTGATAGC GTCGTGCGTG AGGCGAACAA
 V L C A M A F D E D T I D S V V R E A N

 1861 CTCAGTGTAT GGTTGGCCG CGAGTATCTA CACCCGCGAC ATCAGCGTCG CCCATCGAGT
 N S V Y G L A A S I Y T R D I S V A H R

 1921 CGCGAAGCGG CTCAAGGCTG GGACGATCGG TATCAATACC CACCATGTGG TCGATGTCGC
 V A K R L K A G T I G I N T H H V V D V

1981 GCTCCCATTG GCGGGATTCA AGCAGTCCGG ATATGGCCGG GACATGGGCC GCGACGCGAT
 A L P F G G F K Q S G Y G R D M G R D A

 2041 CGACCAGTAC ACCGAGGTCA AGTCGATCGG TATCGCACTC TGACGCTACT GCGCTCATCA
 I D Q Y T E V K S I G I A L *

 2101 CGGGGGGAGC ACTCTCATTG AAGAGAAGCT TGGTACCCCG GTAAGCACGA TACCTCGAC

 2161 TCGATATCCC CGCATCGTCT GGCGCTCCAC CCACCATATG AAGGCGCCAT CAATGGGAAA

 2221 GGCTTAAGAT CACGATGACT GCCCCCACCGA TGAAGAGGCC GCGTCGAAGC ATTACGGCGA
 ThmA> M T A P P M K R P R R S I T A

 2281 GCCATGCCAA GATCGGCGAG CTGGGCTGGG ACCGGACATA CTACCCGCAT GAGCGCGGGA
 S H A K I G E L G W D R T Y Y P H E R G

 2341 AGTACCCCAG CCGATACAAG CTGCCAATA AGCCAGGCCG GGATCCCATG AAGCAGATCA
 K Y P S R Y K L P N K P G R D P M K Q I

 2401 TGGCGACTA CCTGCACATG CAGAACGAGA AGGATGATCG AGTCCACGGT GGCCCTCGATG
 M G D Y L H M Q N E K D D R V H G G L D

 2461 CAGCCGTCCG CGCAGAGGTC CCCGGCAAGG CCCCCTTCG GTGGCTGGAG TTGCTCAAGC
 A A V R A E V P G K A P L R W L E L L K

 2521 CTTACCTGCT GACCGTCATT AGCGCCGAGG CCGCTGCTAC CCGCTGCATG GGCATGCTTG
 P Y L L T V I S A E A A A T R C M G M L

 2581 TTGATGCTCT CGACGACCCT GAGCTGCAGA ACGCTATTAA CATCCAGCAG CTCGACGAGC
 V D A L D D P E L Q N A Y Y I Q Q L D E

 2641 AGCGTCACAC CGCGATGCAG ATGAACCTGT ATCGCTGGTA CATGAAGAAC ATGCCCGAGC
 Q R H T A M Q M N L Y R W Y M K N M P E

 2701 CGGTCGGCTG GAACCTCGGG CTCCAGGCAG TCGGGGGCGA CTCCATCCTG GTCGCCGCC
 P V G W N L G L Q A V G G D S I L V A A

 2761 AGAACCTCAC CGGAAGCTTC ATGACCGGTG ACCCCTTCCA GGCCGCGGTG GCGCTCCAGG
 Q N L T G S F M T G D P F Q A A V A L Q

 2821 TCGTCGTTGA GACAGCCTTC ACGAACACCA TCCTGGTCGC GTTCCCTGAC GTGGCAGTCC
 V V V E T A F T N T I L V A F P D V A V

 2881 GGAACCATGA CTTCGCTCTG CCCACTGTCA TGAACTCCGT GCAGTCGGAC GAGGCGCGCC
 R N H D F A L P T V M N S V Q S D E A R

 2941 ACATCAACAA CGGCTACGCG ACACTCTGT ACCTCCTGCA GGAGCCGGAG AACGCTCCCC
 H I N N G Y A T L L Y L L Q E P E N A P

 3001 TGCTTGAGCA GGACATCCAG CAGATGTTCT GGACCGTGCA TGCATTGTC GACGCCTTCA
 L L E Q D I Q Q M F W T V H A F V D A F

 3061 TGGGCATCCT CGTCGAGTAC GCCCCCACGG ATGCGACCGA CCCGGAAAGC TGGACCACGA
 M G I L V E Y A P T D A T D P E S W T T

 3121 AGTGGGACCG GTGGGTAAAT GACGACTATT ACCGTTCCCTA CATCGTCAAC CTCGGCAAGC
 K W D R W V N D D Y Y R S Y I V N L G K

3181 TGGGCTTGAA GATTCCCGAC TCGATCTTCA AGCGCGCGCG CGAGCGGATC GCTGCTGACT
 L G L K I P D S I F K R A R E R I A A D

 3241 ACCACCACAA GGTGCTGTC GGCCTCTGGG CCTCGTGGCC CTTCCACTAC TACAAGTACG
 Y H H K V A V G V W A S W P F H Y Y K Y

 3301 GCAACCTTGA GCAGAAGGAC TACGACTGGT TCGAGAGCAA GTACCCGGGC TGGAACGAGA
 G N L E Q K D Y D W F E S K Y P G W N E

 3361 AGTCGGCGC ATTCTGGCGC GGTTACGCCG ACGTCGCTA CCCCCGGCTCG GGTCCCTTGC
 K F G A F W R G Y A D V R Y P G S G P L

 3421 AGCTGCCCGG CCTACTCGAG GGAGCCGGCC CGATCTGCTG GACCTGCCAG CTCGGATGCC
 Q L P G L L E G A G P I C W T C Q L G C

 3481 TGCGGCCCGA GGAGCAGTGC CACCGCATTG TCGACGAGCA CACCGGGTTC TACTGCTCGC
 L R P E E Q C H R I V D E H T R F Y C S

 3541 CGGAGTCAA GTGGATCGAC ATGACCAACC CTGGTCGCTA TGTCGGTGAC CGTGTGGT
 P E C K W I D M T N P G R Y V G D R V W

 3601 TCGACCGCTA CCACGGCTGG GAGTACTCCG AGATCGTGGC TGACCTCGGA TTCCCTCCGCC
 F D R Y H G W E Y S E I V R D L G F L R

 3661 CAGACGGTAA GACGCTCACA GGGCAGCCGC ACGTCGATCC CGACCCCTGCC AAGCAGTGGA
 P D G K T L T G Q P H V D P D P A K Q W

 3721 CTATCGATGA TCTCCGAGAG CTCGGCCACA TCATGCAGAG CCCGAACATC CTCACCGCGG
 T I D D L R E L G H I M Q S P N I L T A

 3781 AGCGCCTCGG CCTGCCCTAC AAGCGAGTGG AATACACCGG CACCAAGCCC GGTGACATGC
 E R L G L P Y K R V E Y T G T K P G D M

 3841 CCCCCACCAT TCCGCCGCTC TTCGGGGTCT GAGTAAGTCC **CATGTCTCGT** CCCGGCAGGC
 P P T I P P L F G V * OrfX> M S R P G R
 >> >>>> <<<<<

 3901 TGCCACTCTT GATCTGGCAA CCTGCCGGGG CCTGGCATAT GACTCTCACC GAGTCATCAG
 L P L L I W Q P A G A W H M T L T E S S

 3961 ATGAGTGGTC GCAGGTTCGG AAGGTGGCGA GCAG**ATGGGA** ACCTCAACG TAAGGTTCGA
 D E W S Q V R K V A S R W E P S T *
 ThmD> M G T F N V R F

 4021 GCCGATTGGC GAAGAGATCG AGTGCAGCGA GGACGAGACA ATTCTCGATG CAGCGTTCG
 E P I G E E I E C G E D E T I L D A A F

 4081 ATCTGGTTTG AACCTTGTGC ACGGTTGCCG CGAGGGGCCG TGCTCGCGT GCAAGGCATT
 R S G L N L V H G C R E G R C S A C K A

 4141 CGTCCTCGAT GAAGGATGGA TATATCTAAA GAAGTATTCA AGCTTCGCC TTTCCGACCA
 F V L D E G W I Y L K K Y S S F A L S D

 4201 AGAGGAAGAG GGTGGATATA CACTTCTGTG CCGGGCAGTC CCAGAGTCAG ATGTTACGAT
 Q E E E G G Y T L L C R A V P E S D V T

 4261 TGAGCTGCTC AACTACGATC CTGACCACTA TCGGCTAGAG CATGCAATT A CCGATGGAGT
 I E L L N Y D P D H Y R L E H A I T D G

4321 TGGCCAAGTG GTCGAGGTGG AGGCCTTGAC GCACGATATT AGACGCTTGG AACTCCAGAT
 V G Q V V E V E A L T H D I R R L E L Q

 4381 CGAGTCACCT CAGGGCTTCG GATTTCTTCC TGGTCAGTTC GTCGACATCT GGATCCCCGG
 I E S P Q G F G F L P G Q F V D I W I P

 4441 GACAGAGCAG CGACGGTCGT TCTCGATGGC AACACCTCCT AGCGACGGGC GCCTCGAGTT
 G T E Q R R S F S M A N L P S D G R L E

 4501 CATCATCAAG CAGTATCCGG GCGGCCGATT CGGGGCGCTG CTCGACGACG GCCTGGCGGT
 F I I K Q Y P G G R F G A L L D D G L A

 4561 GGGTGATCCA GTGAAGTTCA CCGGGCCTTA TGGTACATGC TATCTCCGTG ATACCGGCGG
 V G D P V K F T G P Y G T C Y L R D T G

 4621 GAGTCGTTCG GCGCTACTCA TCGCCGGCGG TTCGGGTATG GCGCCGATTC TTTCTCTGCT
 G S R S A L L I A G G S G M A P I L S L

 4681 GCGTCAGATG TCAGACGACG GTCAGGGCG CACCGTTCG GTGTTCTACG GTGGACGTAC
 L R Q M S D D G Q G R T V S V F Y G G R

 4741 GAGACCGAT CTCTTCTATA CCGAGCTCGT ACAGTCCCTC GGAAAGCGAA TCGAGCAGTT
 T R R D L F Y T E L V Q S L G K R I E Q

 4801 CGAGTTCATC CAGGTAGTCT CGGATGAACC TGATAGTGAC GGTGACGATG TGCGATAACGG
 F E F I Q V V S D E P D S D G D D V R Y

 4861 ATTCTGTACAT GATGCCGTTG ATCAATGGAT AGAGACTTCC GGGTTCCGCT TGGACGCGTG
 G F V H D A V D Q W I E T S G F R L D A

 4921 TGACGTCTAT ATGGCAGGTC CACCACCGAT GGTGATGCG GTGAACGATG TTCTGACGCT
 C D V Y M A G P P P M V D A V N D V L T

 4981 CAGACATCAG GTGGAGCAGA ACCGAATCTT CGTAGACAAG TTCACCTCGA CCGGCCCCGA
 L R H Q V E Q N R I F V D K F T S T G P

 5041 GGACTCTGCC GATTCCGATT CTGTATCGTC GCTTTAAGAT TTGTTCTCCA GAGAGGAGAT
 E D S A D S D S V S S L *

 5101 CTGCGCA**ATG** AGTGCATCAG CTGCCGAGCG GCGCGAGCTG CGAGAGCTTG AGCGGTCACA
 ThmB> M S A S A A E R R E L R E L E R S

 5161 GCACTGGTTC ATCCCGGAGC GGAAACGTTG GTCGCTCTAT GAGGACGTCA CTATCGACGT
 Q H W F I P E R K R S S L Y E D V T I D

 5221 CCAGCCGAGC GTCCACCGGC ACACCCAGGTT TGGCTATCCT ATCGCATTCC CAAACGGCG
 V Q P S V H R H T R F G Y P I A F P N G

 5281 TCCGTCATTC TGGGATGACT CCACTGCGAT CCAGTCCAGC GACTGGTATG CATTCTGTGA
 R P S F W D D S T A I Q S S D W Y A F R

 5341 TCCGGGCGGC CTCTGGGAGC GCACCTTCTT CCAGACGGGC TCAACTCATG AGCGCGAGAT
 D P G G L W E R T F F Q T G S T H E R E

 5401 CGAGAATGAT CTCCAGGTGG CGCGGGACAA TAATCTGTTC GATGCGGTAA GCAAGGAGTG
 I E N D L Q V A R D N N L F D A V S K E

5461 GGTTGACTTC TTGTCTGCTC AGCTTCTGCC GATCAGCCTT ACCGAGTACG GTCTGGTTGC
 W V D F L S A Q L L P I S L T E Y G L V

 5521 CCCGCAGTCG GCGGCACTCC GGCCTGCCCT GGGTGTGCCC ATCGCGAACT GCCTCGGCTA
 A P Q S A A L R P A L G D A I A N C L G

 5581 CAGCGCCGGT TACAAACTTC GGCAGGCTCA GGCCTTGTGTT CTCTACGGGG GAGAACTGGA
 Y S A G Y K L R Q A Q A L V L Y G G E L

 5641 GCGGGAGATC CCCGGATTTT CGACCGCCGA CGGGAAAGCGC CGTTTCTTGG AGGATCCGGA
 E R E I P G F S T A D G K R R F L E D P

 5701 ATGGCAGCCG ACACGTCGCT ATCTTGAGCG GCTGGCGTCG ATCACGGACT GGGCGGAGAC
 E W Q P T R R Y L E R L A S I T D W A E

 5761 CATCGTCGCC GCCAACATCT GCTTCGAGCC GCTCATTGGA TCTTGCTGC GCCGCGAGGT
 T I V A A N I C F E P L I G S L L R R E

 5821 GCTGATCCGA CTCGCCGGAT CCTACGGCGA CGCCACCACA CCGACCCCTCG GCCAGGTTGC
 V L I R L A G S Y G D A T T P T L G Q V

 5881 CCAAGCCGAG TGGGGGTGGG TGGGTGACTG GTCCGTCGCT CTCGTCGCT TCATTCTGAA
 A Q A E W G W V R D W S V A L V R F I L

 5941 TGACACTACC TATTCCGAGG CCAACACCCA GAAGGTCCAG GAGTGGCTGG AGGACTGGGG
 N D T T Y S E A N T Q K V Q E W L E D W

 6001 AACGATGGCT CGCGAGGCGA TCGATGCGCT GGAACCCGTT TTCAGCTCAA TCGACCCCGC
 G T M A R E A I D A L E P V F S S I D P

 6061 TTACTCCGAA ACCCGTCAGC GTCTTAACCA AGATCATGCC GACCTGCTTC AGGAATGCGG
 A Y S E T R Q R L N Q D H A D L L Q E C

 6121 TCTCAAGTCG AGCGAGGTGA CGGTCTGATG ACGGATGCC CGGCTACGTC GGCGCTGAG
 G L K S S E V T V *
 ThmA> M T D A T A T S A A E

 6181 AATGGGAGCG GCGACGCCGC TTATGACTAT GTGGGGCTGG TTATGCAGCG CACTCCGAA
 N G S G D A A Y D Y V G L V M Q R T P E

 6241 GGCAGAGCGG TCGGCCGGGT GTGCTCGCAG ACTCCTGGTG TCGAGGTCAT CACGAACACA
 G E A V G R V C S Q T P G V E V I T N T

 6301 ACGTTTCTTG ATGTCAGGGC CAAGGATCGG CTGATCGTCA ACTTCGACGC GGTCGGCGAA
 T F L D V R A K D R L I V N F D A V G E

 6361 GAGCTCGGCA GCGACATGGA CGGTTACGTT CTTCAGGAAC ACATGACCAC TCACTATGGC
 E L G S D M D G Y V L Q E H M T T H Y G

 6421 CGGATGGCAA TGACCGATGA CTCATTATC CTGGTCGCCG ATCCCCTCGA GCTGATCGAG
 R M A M T D D S F I L V A D P L E L I E

 6481 CTGATCAACT CTGGTCGTA GGAAGAGATC ATCAAGGTGA TCTCGCCCT CGGGTGAGTG
 L I N S G S *

 6541 ATTGTTGTTT TCACTCCTTG ATATGTGGGA AGCCCTATCT GGGTGGTGTG TCGCTCCCCC
 OrfQ> M W E A L S G W C V A P

>>> >>> <<<<<<

>>>>>> >>>> <<<<<<<<

6601 ACACCATCCT TGCTCTCGGG CCGGCCAGAG TTTCGCGCCGG CCCGAGAGCG GGGCCGTGGT
P H H P C S R A G Q S S R R P E S G A V

6661 ATTTGGGAGG CTTCGCGGTA TTGGATTGAT GCTATCTGTT CACTAGGCAG TGTTTCGCTC
V F G R L R G I G L M L S V H *

6721 GGACGAATGC CGCCACAACC CGAGGGAGGT **CATGGTTGTT** GAGAATTCTG AGGCACCGGA
OrfZ> M V V E N S E A P

6781 AACGACGCC CCGGCAAGCG ACAGCACTGC AGCACAAAGTT CTTGCTGTGG GCAACCCAAT
E T T P P A S D S T A A Q V L A V G N P

6841 GCTCGTGGCT CTTCCGACCT TTCTCGTGGG TAGTATCACT CTAGGTCTTT GGCTTGTAGA
M L V A L P T F L V G S I T L G L W L V

6901 CTATCTGCCG GTAGCTCTTC CCGGTGGACT GGTGCGAGT GTCTTCTTTG CGTCCGGGGT
D Y L P V A L P G G L V A S V F F A S G

6961 CGGCGTGATT CTCGGAGCGG TGTGGGCTGC ACCGCTGGGC CAGAGTGCAGG TTGCGGGCGT
V G V I L G A V W A A R L G Q S A V A G

7021 TCTGGCCACA TTTGGCACAT TCTGGCTTAG CTTTGGTGTG TTGGTCTTCG GACTAGTGAA
V L A T F G T F W L S F G V L V F G L V

7081 CGGGCTTTTT GGGGTATCCA CAACAGATGC GGCAGCAGCT GGTAGCCAGG TGCAGTCGGT
N G L F G V S T T D A A A A G S Q V Q S

7141 GCAGGCTACG TTCCTCTTGT CGTGGCTGAT TGTGCTTGTG GTGATGACGC TGGCAACTAC
V Q A T F L L S W L I V L V V M T L A

7201 GAGATTGCCG CTCGCCTACA CGGTGCTCTT CGTGCTCGTT GACATTGCTC TCGCGCTTGT
T R L P L A Y T V L F V L V D I A L A L

7261 TCTGGCTGGA GTTCTCGCGG CTTCTCGGC ACTTCTAGTT TGGGGCGGAA TCGCCGTGTT
V L A G V L A A S S A L L V W G G I A V

7321 CGGCTTCTGC CTTGTCGGGG CTTATCTGTT CTATGGGGCC ATGGCGGAGG AACTCGGAGG
F G F C L V G A Y L F Y G A M A E E L G

7381 ATCATCAGCA CCGCTCGCGC CCCCTTGAC AAAGTAGTTT TAAGAACAC GGATTCCCTA
G S S A P L G A P L T K *

>>>

7441 CGGCTCCCGC GCGGCTATTG GGCTGGGATG CCGTCATTGA CGGGCTCCCC CGTTGGGAAC
>>>>>>> >> <<<<<<<<

7501 TCCGGGAGAC TCTCCGCTCC GAGTCTCCCG GAGTTCTGC GGAGGTGCTC GACCTGCACG

7561 AGTAATGAAA TCGTTACGGT CGTGCAGGCC GAAGTCGGGC CCGCGCATAG TATCCATCAT

7621 TTTGTGCAAT CTGGTGCAGAG ATATGATAGA GGAAAGAAGC GAACCGACTA **GTGCAAGCTG**
ThmH> V Q A

7681 AACCATCTG GATCGCAGGT CGTCCGGCGA CTGGCAGCAC GGTGATTGAT GTCCAGTATC
E P F W I A G R P A T G S T V I D V Q Y

7741 CCTATGATGG TCGAACAGTC GCCTCGGTAT TTGTTCCATC CGCTGAGCAG GTTGAAGAGG
P Y D G R T V A S V F V P S A E Q V E E

7801 CCGTCGCTGC GATGCACGCG GCGAGGGATG TTGTCGGGGC AACATCGGCT CATCGCGAG
 A V A A M H A A R D V V G A T S A H R R

 7861 CATCTGCACT GTCGCATGTC GCAGACAGGC TTGAGCAGCG TTCAGAGGAG GCCGCTCAGG
 A S A L S H V A D R L E Q R S E E A A Q

 7921 TCATCGTGCT CGAGAGCGGT AAGCCCATCA AGTGGGCCAG GGTGGAGGTA GCGCGAGCAG
 V I V L E S G K P I K W A R V E V A R A

 7981 CCTCCACGTT CCGATGGCG GCAGAGGAGG CGCGGCCGTT GTCGGGAACC CTGCAGCGAT
 A S T F R W A A E E A R R W S G T L Q R

 8041 TGGATACCGA CGCCGGCGGA GCTGGACGGC TTGCGCTTGT TCGGCGTTT CCACGAGGTT
 L D T D A G G A G R L A L V R R F P R G

 8101 CTCTGCTCGC AATTACGCCG TTCAACTTTC CACTTAATCT CGTCGCGCAC AAAGTGGCGC
 S L L A I T P F N F P L N L V A H K V A

 8161 CGGCGATCGC GGTCGGAGTG CCGGTTATCA TCAAACCTGC CCCGTCGACT CCGCTCTCAT
 P A I A V G V P V I I K P A P S T P L S

 8221 CGTTGTTCTT GGGTCAGCTC CTCGCTGAAA CGGATCTGCA CCAGGGCAGC TGGTCTGTGC
 S L F L G Q L L A E T D L H Q G S W S V

 8281 TGCCGGTTCC AAATAGTCAG ATGGAGCACC TTATTCTTGA TCCGAGGCTT CCTATTATCT
 L P V P N S Q M E H L I L D P R L P I I

 8341 CTTTCACAGG GTCGGGGCCG GTGGGCTGGG ATATTAAGAG CCTTGCCCT CGTAAGCATG
 S F T G S G P V G W D I K S L V P R K H

 8401 TGACGCTTGA GCTTGGCGGG AATGCGCGG CCGTTGTATG TTCCGACTGG TCGAGTGAGC
 V T L E L G G N A A A V V C S D W S S E

 8461 AAGATCTGGA GTGGGCAGCT CAGCGGATCG CTCTCTTGC GAACTATCAG GCAGGGCCAGT
 Q D L E W A A Q R I A L F A N Y Q A G Q

 8521 CGTGTATCTC GGTGCAGCGA GTCTATGTGC CACGTGAGCT GTACGAGGTG TTTACCGTGC
 S C I S V Q R V Y V P R E L Y E V F T V

 8581 TGCTTCGCG GCATATTGGC GCACCTAGGC AGGGGAATCC GAATGACGAC GCAACTGATG
 L L S R H I G A L R Q G N P N D D A T D

 8641 TCGGTCTGT CATTAATGAG GCATCAGCCA TCAGGATCGA GCAGTGGATC GATGACGCAG
 V G P V I N E A S A I R I E Q W I D D A

 8701 TCCATGCTGG GGCGAAGATT CTGGTCGGGG GCCGCCGGAA CGGGACAAGT CTTGAGCCGA
 V H A G A K I L V G G R R N G T S L E P

 8761 CGCTTTGGC TGACGTTCCG CTCGCCAC GGATTCTTCG TGACGAGGCA TTCGGCCCGG
 T L L A D V P L A A R I L R D E A F G P

 8821 TGGTAAGTAT TACGCCCTTC GACAGTCTAG ACTCGGCGTT TGCTGCCGTT AATGATTCTG
 V V S I T P F D S L D S A F A A V N D S

 8881 ACTTCGGTCT GCAGACAGGT GTCTTACGC GTGATATTCG GACTGCATTC CGCGCGCATC
 D F G L Q T G V F T R D I R T A F R A H

8941 GCGACCTTGA GGTGGGTGGG GTCATTATTG GAGATGTTCC GAGCTACCGT GC GG ACCAGA
R D L E V G G V I I G D V P S Y R A D Q

9001 TGCCGTATGG TGGAATGAAG GATTCTGGTA TAGGCAGAGA AGGC GTCCGC TCAGCTATGG
M P Y G G M K D S G I G R E G V R S A M

9061 ACGACTTCAC GGTGGAGAAG GTTCTCGTGC TTGCCGGGT CGCGCTGTGA AAAGCGTTGC
D D F T V E K V L V L A G V A L *

9121 TCTGTGCCCT TTGGATTCTT ACTGACCTCC CCGGTGCCGG CCGGTGCCCA ACAGTGATC

Danksagung

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

Bei Dr. Thomas Schräder bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und für 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 und Bernhard Sielaff. Die Messungen der Reduktaseaktivitäten erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrike Kohlweyer.

Bei Dr. Katrin Fritsche, Grit Schleuder und Ute Lindenstrauß möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzierungsarbeiten bedanken.

Bei allen Mitgliedern des Instituts, die mir mit Rat und Tat behilflich waren, möchte ich mich an dieser Stelle ebenfalls bedanken.

Herrn Dr. P. Rücknagel danke ich für die N-terminale Sequenzierung der Proteine und die zahlreichen Versuche zum Peptid-Mapping der Reduktase.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Adaptative physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ angefertigt. Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß danke ich für das begleitende und vielseitig gestaltete Studienprogramm sowie der DFG für die gewährte finanzielle Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinem Mann und meinen Eltern bedanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Barbara Thiemer, geb. Prescher

Geburtstag und Geburtsort: 01.05.1971 Halle/Saale

Schulbildung: 1978 - 1988 POS (Polytechnische Oberschule)
1988 - 1990 EOS (Erweiterte Oberschule)

Schulabschluß: 1990 Abitur

Studium: Sept. 1990 - Sept. 1991 Technische Hochschule Köthen
Studiengang Lebensmitteltechnik / Biotechnologie
Okt. 1991 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang Biochemie / Biotechnologie
Juli 1993 Vordiplom
Juli 1996 Abschluß als Diplombiochemikerin
Sept. 1996 - Aug. 1997 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sept. 1997 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Betreuer: Prof. Dr. J.R. Andreesen)

Halle/S., den 19. Juni 2001

Barbara Thiemer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Barbara Thiemer, 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 11.03.01

Barbara Thiemer