

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Material und Methoden</b> .....	8
<b>2.1. Organismen und Vektoren</b> .....	8
<b>2.2. Nährmedien</b> .....	9
2.2.1. Medium für <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1 .....	9
2.2.2. Medium für <i>E. coli</i> .....	10
<b>2.3. Zellanzucht und –ernte</b> .....	10
<b>2.4. Stammhaltung</b> .....	11
<b>2.5. Herstellung von Rohextrakten</b> .....	11
<b>2.6. Proteinbestimmung</b> .....	12
2.6.1. Proteinbestimmung durch Färbung mit Coomassie Blue .....	12
2.6.2. Relative Proteinbestimmung durch Messung bei 280 nm .....	12
<b>2.7. Bestimmung der Enzymaktivitäten</b> .....	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
<b>2.8. Einengen von Proteinlösungen</b> .....	15
<b>2.9. Elektrophoretische Methoden</b> .....	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
<b>2.10. Färbung und Trocknung von Gelen</b> .....	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
<b>2.11. Methoden zur Proteinreinigung</b> .....	17
2.11.1. Anionenaustauschchromatographie .....	18
2.11.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	18
2.11.3. Gelfiltration.....	18
2.11.4. Ammoniumsulfatfällung .....	19
<b>2.12. Methoden zur Enzymcharakterisierung</b> .....	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

<b>2.13. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren</b> .....	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
<b>2.14. Isolierung von Nukleinsäuren</b> .....	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
<b>2.15. Agarose–Gelelektrophorese von Nukleinsäuren</b> .....	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
<b>2.16. Isolierung von DNA–Fragmenten aus dem Agarosegel</b> .....	27
<b>2.17. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen</b> .....	28
<b>2.18. Dephosphorylierung von DNA–Fragmenten</b> .....	28
<b>2.19. Ligation von DNA–Fragmenten</b> .....	28
<b>2.20. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation (DOWER <i>et al.</i>, 1988)</b> .....	28
2.20.1. Herstellung von kompetenten Zellen .....	28
2.20.2. Elektroporation.....	29
<b>2.21. X–Gal–Test zur Selektion rekombinanter Klone</b> .....	29
<b>2.22. Polymerase–Ketten–Reaktion (PCR)</b> .....	29
<b>2.23. Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung</b> .....	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

<b>2.24. RNA-Analyse</b> .....	35
2.24.1. <i>Primer extension</i> .....	35
2.24.2. <i>Reverse transcription</i> –Polymerase–Ketten–Reaktion (RT-PCR).....	35
<b>2.25. DNA-Sequenzierung</b> .....	36
2.25.1. Sequenzierung am ABI–Sequencer 377 .....	36
2.25.2. Sequenzierung am A.L.F. <sup>TM</sup> –Sequencer .....	37
2.25.3. Das Sequenzierungsgel .....	37
<b>2.26. Auswertung der Sequenzdaten</b> .....	38
<b>2.27. Bezugsquellen</b> .....	38
<b>3. Ergebnisse</b> .....	40
<b>3.1. Messung der THF–Monooxygenase nach Zellaufschluß</b> .....	40
<b>3.2. Nachweis einer THF–induzierten Reduktase</b> .....	41
<b>3.3. Reinigung der NADH–Cytochrom c–Reduktase</b> .....	42
<b>3.4. Charakterisierung der NADH–Cytochrom c–Reduktase</b> .....	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
<b>3.5. Klonierung und Charakterisierung der Gene der THF–Monooxygenase</b> .....	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
<b>3.6. Transkriptionsanalyse der <i>thm</i>–Gene</b> .....	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
<b>3.7. Lokalisation der <i>thm</i>–Gene</b> .....	67
3.7.1. Nachweis der Plasmid–Kodierung von <i>thmADBC</i> .....	67
3.7.2. Charakterisierung des Plasmides pPSK60 als zirkuläres Plasmid .....	70
<b>3.8. Auswertung der den <i>thm</i>–Genen benachbarten Sequenzbereiche</b> .....	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
<b>3.9. Reinigung der Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase</b> .....	83

---

<b>4. Diskussion</b> .....	87
<b>4.1. Die THF–Monooxygenase</b> .....	87
<b>4.2. Weitere offene Leserahmen der klonierten Genregion</b> .....	109
<b>4.3. Die THF–induzierte Succinatsemialdehyd–Dehydrogenase</b> .....	114
<b>4.4. Die Umsetzung von THF in <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1</b> .....	116
<b>4.5. Die <i>thm</i>–Gene aus <i>Pseudonocardia</i> sp. Stamm K1 sind auf einem zirkulären Plasmid kodierte</b> .....	118
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	122
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	124
<b>7. Anhang</b> .....	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	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	EDTA-EGTA-Tris
EGTA	Ethylenglycolbis-(2-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HMW	High Molecular Weight
I	Desoxyinosin
IHF	<i>integration host factor</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K.	<i>Klebsiella</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
konz.	konzentriert
KP-Puffer	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
$\mu$	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) <sup>+</sup>	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 $\mu$ 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- $\beta$ -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