

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^q</i> , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^r), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk⁻mK⁺</i>), <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	0,2 g/l	0,09
MnSO ₄ × H ₂ O	0,2 g/l	0,06
MgSO ₄	10,0 g/l	2,0
NH ₄ Cl	6,0 g/l	5,6
NaCl	1,0 g/l	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	2,000 g/l	1,0 × 10 ⁻⁵
ZnCl ₂	0,070 g/l	5,0 × 10 ⁻⁷
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,100 g/l	5,0 × 10 ⁻⁷
H ₃ BO ₃	0,006 g/l	1,0 × 10 ⁻⁸
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,190 g/l	8,0 × 10 ⁻⁷
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	0,003 g/l	2,0 × 10 ⁻⁸
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,024 g/l	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 H₂O 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 H₂O 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 ₂ O dest.	125 µg/ml
Tetracyclin	25 mg/ml in 70 % Ethanol	12,5 µg/ml
X–Gal	2 % (w/v) in DMF	40 µg/ml
IPTG	0,1 M in H ₂ O dest.	40 µg/ml

2.3. ZELLANZUCHT UND –ERNT

***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 (OD₆₀₀) 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 Zweistrahlenspektrophotometer 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-Press (SLM AMINCO™, 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:

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

$\Delta E/\text{min}$ = 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 μ l im Test eingesetzt

Die Messung der THF-induzierten NADH-Cytochrom c-Reduktase erfolgte mit dem genannten Me β ansatz 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.

Me β ansatz:

Endkonzentration im Test

Probe	10 – 25 μ l
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 Me β einheit 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 Trenngelen 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 Färbeprozedur 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 Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	1 min
4. Spülen	H ₂ O	3 × 20 s
5. Imprägnieren	2 g/l AgNO ₃ 75 ml/l 37 % Formaldehyd	2 × 20 s
6. Spülen	H ₂ O	2 × 20 s
7. Entwickeln	60 g/l Na ₂ CO ₃ 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd 4 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	≤ 10 min
8. Waschen	H ₂ O	2 × 10 s
9. Stoppen	50 % Essigsäure	100 min
10. Waschen	H ₂ O	≥ 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 Säulendurchmesser und Gelmaterial wurde die Flußrate gewählt. Alle Proteinaufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Folgende Laufpuffer 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 (NH ₄) ₂ SO ₄

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

2.11.1. Anionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie an Q–Sephacel 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–Sephacel. 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 Waschschrift eluiert und danach ein linearer Salzgradient von 1,5–0 M (NH₄)₂SO₄ 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 Superdex™ 200 Hiload™ (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 Rühren. 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 Zweistrahlsspektralphotometer 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 Ethanol-fällung (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 Zellyse 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*-Transformanten wurde die Methode von AKADA (1994) angewendet. Dazu wurden zu 100 µl einer Übernachtskultur 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 Übernachtskultur (5 ml) eingesetzt und nach Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die DNA wurde mit 50 µl 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 µl 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 µg/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 µl 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 µl 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 µl 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (40 min, 5.000 Upm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde die DNA sedimentiert (20 min, 12.000 Upm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 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 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 RNeasyTM 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 100 μl TE-Puffer (enthält 20 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min. Die folgenden Schritte der Reinigung entsprachen der Herstellervorschrift. Die RNA wurde von der Säule mit $2 \times 30\text{ } \mu\text{l}$ auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 Laufpuffer 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 μ g) 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 \times 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 μ l RNA mit 12,5 μ l Formamid, 4 μ l Formaldehyd und 2 μ l 10 \times MOPS–Puffer versetzt und 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden danach auf Eis gestellt und 3 μ l Probenpuffer (0,1 M EDTA, 50 % [v/v] Glycerin, 0,1 % [w/v] SDS, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) sowie 2 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugegeben. Als Laufpuffer diente 1 \times 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 μ g/ml) zugesetzt. PFGE–Gele wurden nach dem Gellauf für 15–30 min in einem Ethidiumbromid–Bad (1 μ g/ml) angefärbt, da Ethidium bromid 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 MgCl₂
- 0,2 µM Primer 1 (in H₂O bidest.)
- 0,2 µM Primer 2 (in H₂O 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-Gelelektrophorese (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
			Position der Basen (Abb. A, Anhang)
THF01 ^{a)}	→	GARGARATHGARTCIGGIGARGAYGARAC	4031 – 4059
THF02	→	TTCCAGACGGGCTCAACTCAT	5369 – 5389
THF03	←	ATACAGAATCGGAATCGGCAG	5046 – 5066
THF04	←	TATCCACCCTCTTCTCTTG	4199 – 4218
THF05	←	TGTATTCCAACCTCGCTTGTAGG	3796 – 3816
THF06	→	GGCTCTCCCGATTGGTCACG	1570 – 1589
THF07	→	ATCACGGACTGGGCGGAGACC	5741 – 5761
THF08	←	AGTCGTAGTCCTTCTGCTCAA	3307 – 3327
THF09	→	CCACCATTCCGCCCTCTTCG	3844 – 3864
THF10	→	GCGGCTCAAGGCTGGGACGAT	1927 – 1947
THF11	→	TCAGGAATGCGGTCTCAAGTC	6109 – 6129
THF12	←	TCAAGAATAAGGTGCTCCATC	8300 – 8320
THF13	←	ATGACAGTGGGCAGAGCGAAG	2891 – 2911
THF14	→	GTCCCAGAGTCAGATGTTACG	4238 – 4258
THF15	→	AGTCTCGGATGAACCTGATAG	4816 – 4836

Fortsetzung nächste Seite

THF16	→	GTCCAGCCGAGCGTCCACCG	5219 – 5238
THF17	→	ACTCATTCATCCTGGTCGCCG	6440 – 6460
THF18	←	CACTTGATGGGCTTACCGCTC	7934 – 7954
THF19	→	CACGATGACTGCCCCACCGA	2231 – 2250
THF20	←	AGCAACTCCAGCCACCGAAG	2496 – 2515
THF21	←	GCACAAAATGATGGATACTA	7608 – 7627
THF22	→	CGCCACAACCCGAGGAGAGTC	6731 – 6751
THF23	→	ATGCTTGTTGATGCTCTCG	2574 – 2592
THF24	←	TCCACCGTAGAACACCGAAAC	4715 – 4735
THF25	←	CGGCGACCAGGATGAATGAGT	6440 – 6460
THF26	←	GACTTGAGACCGCATTCCTGA	6109 – 6129
THF27	←	GGTCTCCGCCAGTCCGTGAT	5741 – 5761
THF28	→	AGAACGCTCCCCCTGCTTGA	2989 – 3007
THF29	→	TTGAGCAGAAGGACTACGACT	3307 – 3327
THF30	←	GAGTTCCAAGCGTCTAATA	4357 – 4375
THF31	←	GAACTCCAGCCAGAACAAGCG	7254 – 7274
THF32	←	GGATGGTGTGGGGGAGCGAC	6590 – 6609
THF33	→	CCCTGGTCGCTATGTCGGTG	3569 – 3588
THF34	←	CGTGACCAATCGGGAGAGCC	1570 – 1589
THF35	→	GATGGAGCACCTTATTCTTGA	8300 – 8320
THF36	→	CTTTGGATTCTTACTGACCTC	9129 – 9149
THF37	→	CGTCGGCGGCTGAGAATGGGA	6167 – 6187
THF38	→	GCTCTGCTGACGGGGCTCGG	244 – 264
THF39	←	GGTGTCTGCTCGGCGGGCTTG	1165 – 1185
THF40	→	CAAGCCC GCCGAGCAGACACC	1165 – 1185
THF42	←	ATCGTCCCAGCCTTGAGCCGC	1927 – 1947
THF43	←	ATCACGGTCATTCTATTTCTC	571 – 591
THF44	→	GAGAAATAGAATGACCGTGAT	571 – 591
THF45	←	CGAGCCGCCAAACCAGCCT	842 – 860
THF46	→	AGGCTGGTTTGGCGGCTCG	842 – 860
THF47	←	CCTCTTCATCGGTGGGGCAGT	2238 – 2258
THF48	←	CGGACGCAAAGAAGACACTCG	6936 – 6956
THF49	→	CGAGTGTCTTCTTTGCGTCCG	6936 – 6956
THF50	→	CGCTTGTTCTGGCTGGAGTTC	7254 – 7274
THF51	→	TAGTATCCATCATTTTGTGC	7608 – 7627
THF52	→	GAGCGGTAAGCCCATCAAGTG	7934 – 7954
THF54	→	AGGCTCTGCGTTATTGGC	157 – 174
THF55	←	GGGAGATGCCGTTGCCT	319 – 335
THF56	←	CGTGCGTCTGAGCGTAATAAC	217 – 237
THF57	←	ATCCTTCATTCACCATACGG	9003 – 9023
THF58	→	CCGTATGGTGAATGAAGGAT	9003 – 9023
THF59	→	GAATCCGAATGACGACGCAAC	8615 – 8635
Cy5PE1 ^{b)}	←	ATCTTCGTCCCAACCGCAGG	713 – 732
Cy5PE2 ^{b)}	←	GCTTGTATCGGCTGGGGTA	2343 – 2361
Cy5PE3 ^{b)}	←	CGGTGGACGCTCGGCTGGAC	5219 – 5338
upr		TGTA AACGACGGCCAGT	<i>universal</i> Primer pUC18
rpr		CAGGAAACAGCTATGAC	<i>reverse</i> Primer pUC18
fD1		AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG <i>et al.</i> , 1991
rP2		ACGGCTACCTTGTTACGACTT	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 (Qiabrane, 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 ($5 \times \text{SSC}$, 1 % [w/v] Blocking-Reagent [Roche, Mannheim], 0,1 % [w/v] N-Lauroylsarcosin, 0,02 % [w/v] SDS) im Hybridisierungssofen (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 ($2 \times \text{SSC}$, 0,1 % [w/v] SDS) und 2×15 min bei 68 °C mit Waschlösung 2 ($0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 % [w/v] SDS) gewaschen.

Wiederverwendung von Nylonmembranen

Um Nylonmembranen für weitere Hybridisierungen zu verwenden, mußte die Sonde durch „strippen“ von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die Membran kurz in H_2O 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 $2 \times \text{SSC}$ 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 $2 \times \text{SSC}$ 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 $2 \times \text{SSC}$) auf der Membran verteilt, 1 h bei 37 °C inkubiert und mit H_2O 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 $20 \times$ SSC äquilibriert. Die Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey–Nagel, Düren) wurde vorbereitet, indem sie 20 min in H_2O bidest. und 10 min in $20 \times$ SSC geschwenkt wurde. Das Blotting 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, $5 \times$ 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 ($2 \times$ SSC, 0,1 % [w/v] SDS) und 2×15 min bei 68 °C mit Waschlösung 2 ($0,5 \times$ 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 eingengt und 4 µl A.L.F. Stopplösung (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 μl 0,1 M DTT und 0,5 μl dNTP-Lösung (20 mM) zugegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 50 °C wurde 0,5 μl Superscript™ II (200 U/ μl , 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 μl 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 μg 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:

- × μg DNA
- 8 pmol Primer
- 4 μl ABI-*Sequencing Mix*
- ad 20 μl 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 Ethanol-fällung bei RT zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide. Dazu wurde der Ansatz mit 2 μl 3 M Na-Acetat; pH 5,2 und 60 μl

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.TM–Sequencer

Die Sequenzierungsreaktion wurde im MastercyclerTMpersonal (Eppendorf, Hamburg) mit Hilfe des SequiTherm EXCELTMII Long–ReadTMPremix DNA Sequencing Kit–ALFTM (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.TMDNA–*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 Prosite 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 EXEL™ II Long–Read™ Premix DNA Sequencing Kit–ALF™, 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 Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Gene Ruler™ 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 Ionenaustauchmaterialien 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–Gelelektrophorese, 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.