

3. ERGEBNISSE

3.1. MESSUNG DER THF-MONOOXYGENASE 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 Elektronendonator 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 Elektronendonator und/oder anderen Elektronenakzeptoren (2.7.1.) im Enzymtest konnte keine THF-induzierte Aktivität nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

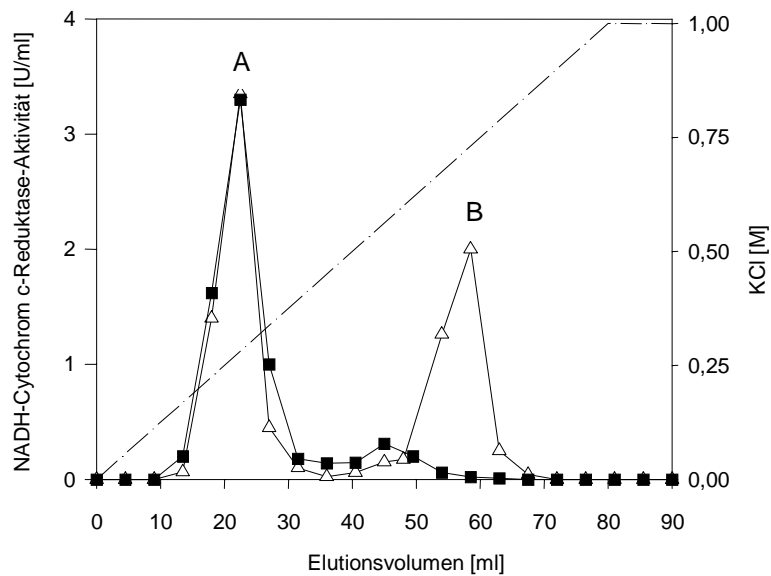


Abbildung 2: Elutionsprofil der NADH-Cytochrom c-Reduktaseaktivitäten im RE von THF- und Succinat-gewachsenen Zellen. (■) RE aus Succinat-gewachsenen Zellen, (Δ) RE aus THF-gewachsenen Zellen.

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, Butyl-Sepharose 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$. Die Reduktaseaktivität eluierte ab 0,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis in den anschließenden Waschschrift mit 50 mM Tris/HCl; pH 7,5. Nach Vereinigung der aktiven Fraktionen wurde die Enzymlösung auf 2 ml eingeeengt (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.

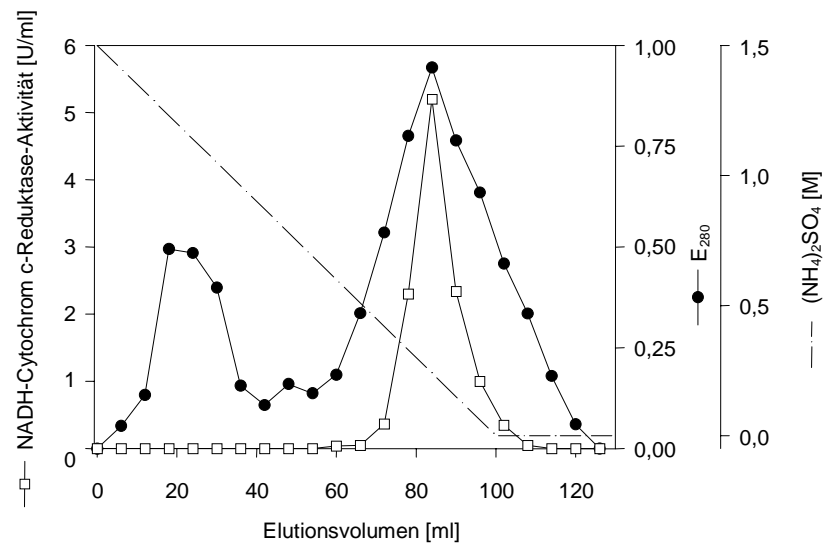


Abbildung 3: Chromatographie der NADH-Cytochrom c-Reduktase an Butyl-Sepharose.

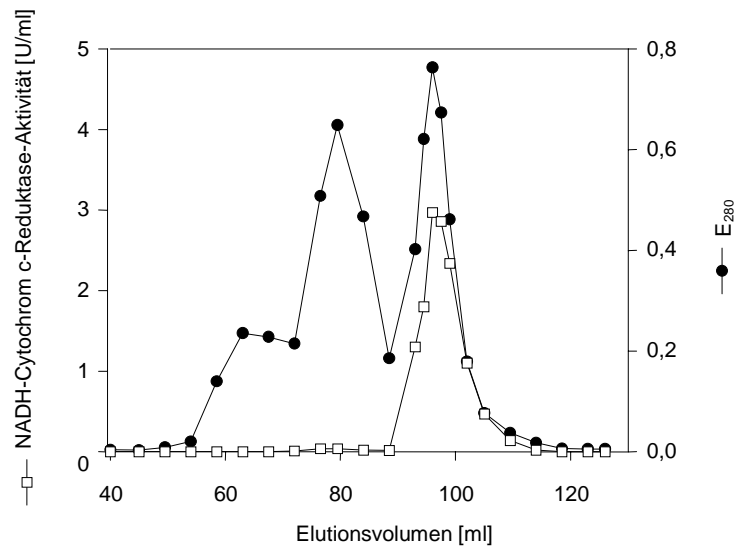


Abbildung 4: Chromatographie der NADH-Cytochrom c-Reduktase an Superdex 200.

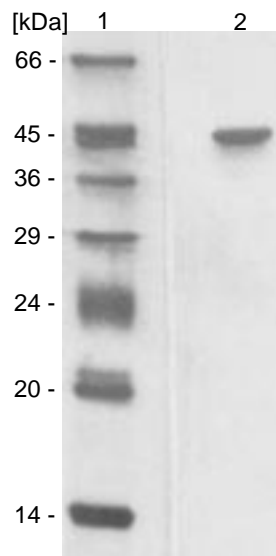


Abbildung 5: SDS-PAGE der homogenen NADH-Cytochrom c-Reduktase. (1) Marker, (2) NADH-Cytochrom c-Reduktase.

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 (HORINOUCI *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).

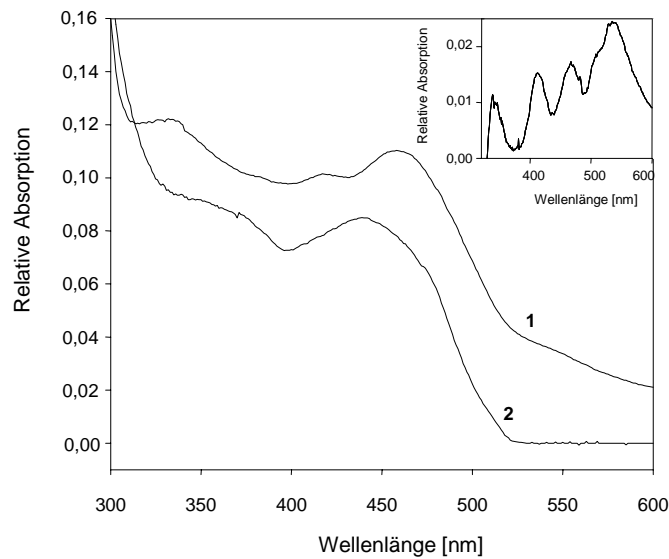


Abbildung 7: Absorptionsspektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase. (1) Spektrum der nativen NADH-Cytochrom c-Reduktase; (2) Spektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase nach 10 min Kochen und anschließender Resuspension in 1 % SDS; Insert: Differenzspektrum von nativem und denaturiertem Enzym. Das Spektrum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

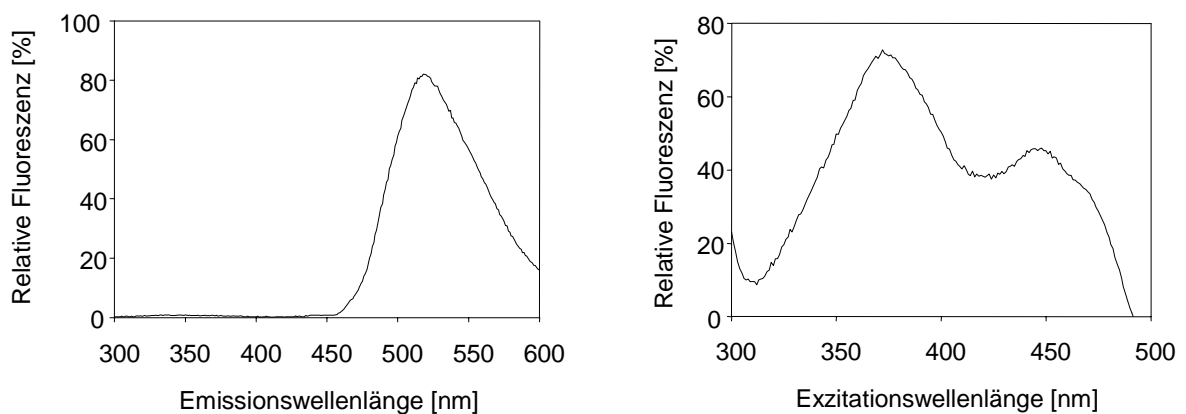


Abbildung 8: Emissions- und Exzitationsspektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase.

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 μ M) 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 Auftrennung 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 Fluoreszenzsignales. Die Fluoreszenz der NADH–Cytochrom c–Reduktase nach Auftrennung im SDS–Gel bestätigte die kovalente Bindung des Flavins an das Protein.

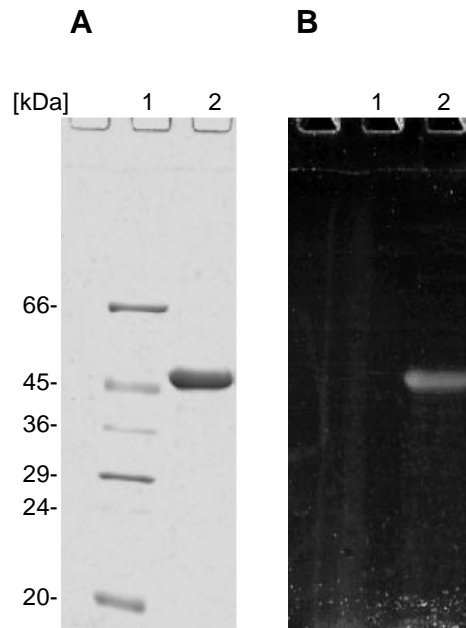


Abbildung 9: Nachweis des kovalent-gebundenen Flavins der NADH–Cytochrom c–Reduktase nach SDS–PAGE. (1) Marker, (2) NADH–Cytochrom c–Reduktase; **A** Gel mit Coomassie Blue gefärbt, **B** zur Fluoreszenz angeregtes SDS–Gel.

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. Bezüglich des Flavins wurden zwei Positionen des Isoalloxazinringes beschrieben, über die eine Bindung am Aminosäure-Rest erfolgen kann. Man unterscheidet deshalb 8α -substituiertes Flavin (His[N₁]- 8α -Flavin, His[N₃]- 8α -Flavin, Cys[S]- 8α -Flavin, Tyr[O]- 8α -Flavin) und 6α -substituiertes Flavin (Cys[S]- 6α -Flavin). Ein Cys(S)- 6α -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 8α -substituierte Flavine mit zwei Absorptionsmaxima (384 nm und 452 nm). Für ein Cys(S)- 6α -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 8α -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 8α -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.

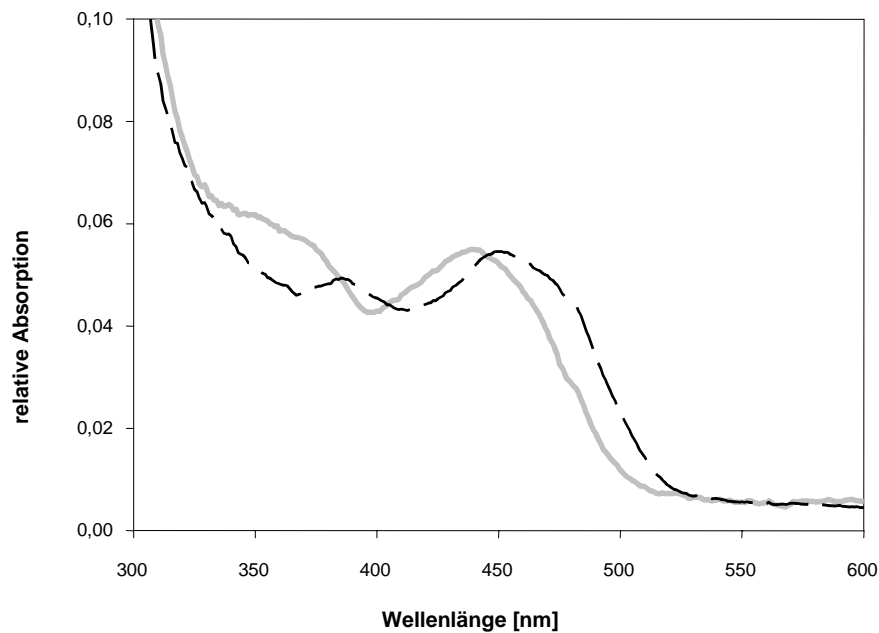


Abbildung 10: Spektrale Verschiebung des Flavinspektrums nach Zugabe von SDS. (---) Spektrum der nativen NADH-Cytochrom c-Reduktase (ohne [2Fe-2S]-Cluster), (—) Spektrum der NADH-Cytochrom c-Reduktase nach Zusatz von 0,5 % [w/v] SDS.

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 *Bam*HI 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 Streptomyceten 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´	GAR	GAR	ATH	GAR	TCI	GGI	GAR	GAY	GAR	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 plasmid-kodierten 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-Pool 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).

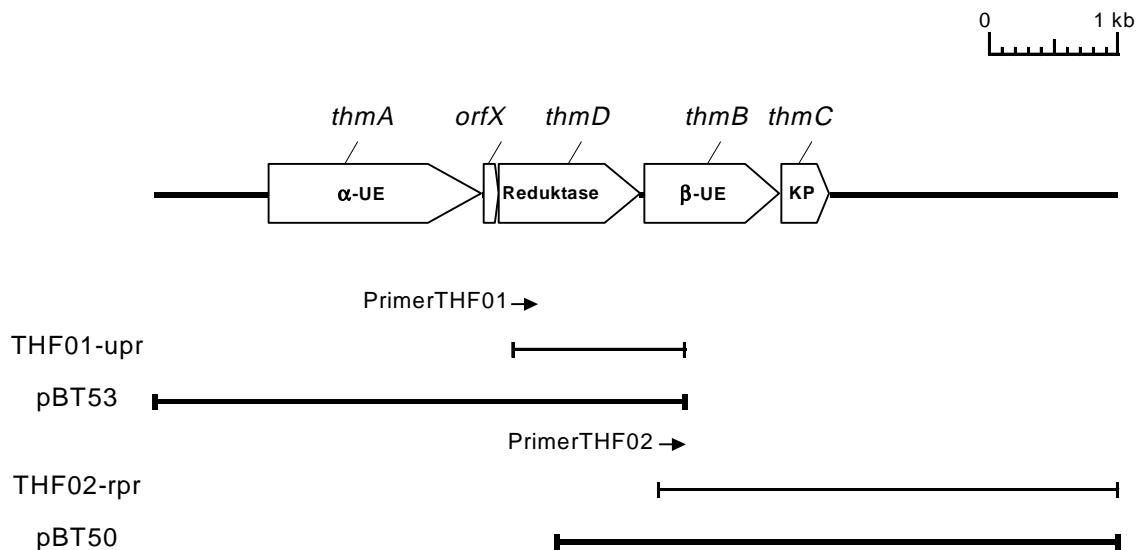


Abbildung 121: Anordnung der Strukturgene *thmADBC* und deren Lokalisation auf den PCR-Produkten THF01-upr, THF02-rpr (ohne vektorkodierten Bereich) und auf den Plasmid-Inserts pBT53, pBT50 sowie die Position der abgeleiteten Primer THF01 und Primer THF02.

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

posttranslationale 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 stromaufwärts von *orfX* konnte auch durch Vergleich mit den für Streptomycceten beschriebenen Shine–Dalgarno-Sequenzen (STROHL, 1992) nicht zugeordnet werden. Im Gencluster der Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STAINTHORPE *et al.*, 1990) und aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (CARDY *et al.*, 1991b) befindet sich ebenfalls ein kleiner ORF stromaufwärts 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 Monooxygenase handeln. Dies konnte durch Transkriptionsanalyse der Gene bestätigt werden (3.6.1.).

3.5.5. Charakterisierung der Komponenten der THF-Monooxygenase

Die Komponenten ThmADBC der THF-Monooxygenase wurden anhand ihrer Aminosäuresequenz charakterisiert. *ThmA* ist das Strukturgen 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-Monooxygenasen, 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 Monooxygenase erfolgt über konservierte Aminosäuren, was sich im zweimaligen Auftreten des Sequenzmotives 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	-----MTAPPMKRPRRSITASHAKIGELGWDRTYYIPHERGKYPSRYKLPNKP-	47
AmoC	-----MASNPTQLHEKSKSYDWDFTSV-ERRPKFETKYKMPKK--	37
DmpN	-----MATHNKKRLNLKDKYRYLTRDLAWETTYQ-KKEDVFPLEHFEGIKIT	46
MmoX	MALSTATKAATDALAANRAPTSVNAQEVHRWLQSFNWDFK---NNRTKYATKYKMANE--	55
	: . * : . . . : . :	
ThmA	----GRDPMKQIMGDYLMQNEKDDRVHGGDLDAAVRAE-VPGKAPLRWLELLKPYLLTVI	102
AmoC	----GKDPFRVLIRDYMKMEAEKDDRTHGFLDGAVRTR-EATRIEPRFAEAMKIMVPQLT	92
DmpN	DWDKWEDPFRLTMDTYWKYQAEKEKKLYAIFDAFAQNNGHQNISDARYVNALKLFLTAVS	106
MmoX	----TKEQFKLIAKEYARMEAVKDERQFQSLQVALTRLNAGVRVHPKWNEMTKVVSNFLE	111
	. : :: * : : * : . . : : : : * :	
ThmA	SAFAAATRCMGLVDALDDPELQNAYYIQQLDEQRHTAMQMNLRYWYMKNMPEPVGWNLG	162
AmoC	NAEYQAVAGCGMIISAVENQELRQGYAAQMLDEVREHAQLEMTLRNYAKHWCDPSGFDIG	152
DmpN	PLLEYQAFQGFSRVGRQFSGAGARVACQMQAIDELREHVQTQVHAMSHYKHFHFDG----	162
MmoX	VGFEYNAIAATGMLWDSAQAAEQKNGYLAQVLDREIRHTHCAYVNYFYAKNGQDPAGHNDA	171
	* * . : . . . * : * * * * . : * :	
ThmA	-LQAVGGDSILVAAQNLTGSFMTGDPFQAAVALQVVVEAFTNTIILVAFPDVAVRNHDF	221
AmoC	QRGLYQHPAGLVSIGEFQH-FNTGDPLDVIIDLNIVAEFTNTNILLVATPQVAVANGDNA	211
DmpN	FAHMYDRVWYLSVPKSYMDDARTAGPFEFLLTAVSFSFEYVLTNLLFVPMFSGAAYNMGDA	222
MmoX	RRTRTIGPLWKGMRVFSDFGISGDAVECSLNLQLVGEACFTNPLIVAVTEWAAAANGDEI	231
	: . . . : : . * : * * : * . * * *	
ThmA	LPTVMNSVQSDAERHINNGYATLLYLLQEPEN-APLLEQDIQQMFVTVHAFVDAFMGILV	280
AmoC	MASVFLSIQSDAERHMANGYGSVMALLEENEDN-LPLLNQSLDRHFWRRAHKALDNAVWCS	270
DmpN	TVTFFGSAQSDAERHMTLGLLEVIKFMLEQHEDNVP I IQRWIDKWFWRGYRLLT-LIGMMM	281
MmoX	TPTVFLSIETDELREHMANGYQTVVSIANDPAS-AKYLNLDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLF	290
	: . * : * * * * : * : : : . : : : . * * . : *	
ThmA	EYAPTDATDPESWTTKWDRVWVNDYYRSYIVNLGKLGKIPDSIFKRARERIAADYHHKV	340
AmoC	EYG--ARKRPWSYKAQWEEVVDDFVGGYIDRLSEFGVQAPACLGAADEVKWS--HHTL	326
DmpN	DYM--LPNKVMSWSEAWG-VYFEQAGGALFKDLERYGIRPPKYVEQTTIGKEHIT--HQV	336
MmoX	EYG--SKFKVEPVVKTWNRWVYEDWGGIWIWIRLGGYGVESPRSLKDAKQDAYWA--HHD	346
	:* . : * : : : * . * : . * : *	
ThmA	AVGVWASWPFHYKYGNLEQKDYDWFESKYPGWNEKFGAFWRGYADVR--YPGSGPLQLP	398
AmoC	GQVLSAVWPLNFWRSDAMGPADFWEFENHYPGWSAAYQGYWEGYKAL--ADPAGGRIMLQ	384
DmpN	WGALYQYSKATSFHTWIPGDEELNWLSEKYP--DTFDKYRPRFEFWRQQAQGERFYN	393
MmoX	YLLAYALWPTGFFRLALPDQEEWFEANYPGWYDHYGKIYEEWRARGCEDPSSGFIPLM	406
	: : : * : . * * : : . : *	
ThmA	GLLEG--AGPICWTCQLG--CLRPE--EQCHRIVDEHTR--FYCSPECKWIDMTNPGRY	449
AmoC	ELPG---LPPMCQVCQVP-CVMPLD--MNAARIEFEGQKIALCSEPCQRIFTNWPEAY	438
DmpN	DTLP----HLCQVCQLPVIFTEPDDPTKLSLRSLVHEGERYQFCSDGCCDFKNEPVKY	448
MmoX	WFIENNHPIYIDRVSQVPPFCPSLAG--ASTLRVHEYNGQMHTFSDQWGERMWLAEPERY	464
	: . * : * . . . : * *	
ThmA	VGDRV-----WFDRYHGWEYSEIVRDLGFLRPDGTLTGQPHVDPDPKQWTIDDLRELG	504
AmoC	RHRKQ-----YWARYHGWDLADVIIDLGYIRPDGKTLIGQPLEME--RLWTIDDIRALQ	491
DmpN	IQAWLPVHQIYQGNCEGGDVETVVQKYHYHIKSGVDNLEYLGSPEHQ--RWLALKGQTPPT	506
MmoX	ECQN-----IFEQYEGRELSEVIAELHGLRSDGKTLIAQPHVRGD--KLWTLDDIKRLN	516
	. * : : . : . . * : : : . .	
ThmA	HIMQSPNILTAEERLGLPYKRVEYTGTKPGDMPPTIPPLFGV	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 konservierten 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 CXXXXCXXCX₍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.

ThmD	----MGTFNVRFEPIGEEIECGEDETILDAAFRSGLNLVHGCREGRCSAKAFVLDEGWI	56
AmoD	----MTTINV--QPFSEHYSCEDGESLLDGLRNSLLKYGCKHGGCTCKVRLLD-GDV	53
DmpP	- ---MS-YNVTIEPTGEVIEVEDGQTILQAALRQGVWLPFACGHGTATCKVQVVE-GEV	54
MmoC	MQRVHTITAVTEDGESLRFECRSDDEVITAALRQNIFLMSSCREGGATCKALCSE-GDY	59
	* : : : . * * . : * . * * . * * . : *	
ThmD	YLKKYSSFALSDQEEEGGYTLRCRAVPESDVTELLNYDPDHYRLEHAITDGVG---QVV	113
AmoD	E-EPGSSFALTPEDRENDVILACASVPLEPCTIDVE--PSGLTEEEFFSGDTSREFQTV	109
DmpP	DIGEASPFALMDIERDERKVLACCAIPLSDLVIEAD-VDADPDFLGHVVEDYRG---VV	109
MmoC	DLKGC SVQALPPEEEEEGLVLLCRTPYKTDLEIELP-----YTHCRISFGEVG-SFEAE	112
	* ** : : * * : * * :	
ThmD	E--VEALTHDIRRLELQIESPQG----FGFLPGQFVDIWIWPGTEQRSSFSMANLPSD-GR	166
AmoD	VGGVEFLTADIARVRLRLEPGEE----IAFTAGQFVNVEVPGTGLLRTFSLANAPDDPSV	165
DmpP	SALVD-LSPTIKGLHIKLRP-----MPFQAGQYVNLALPGIDGTRAFSLANPPSRNDE	162
MmoC	VVGLNWSNTVQFLQLKRPDECGNRGVKFEPGQFMDLTIPGTDVSRYSYSPANLNPENGR	172
	: : : . : : . * . * * : : : * * * * * * . . .	
ThmD	LEFIKQYPGGRFGALLDDGLAVGDPVKFTGPGYGTICYLRDTGGSRSALLIAGGSGMAPIL	226
AmoD	VELICKLYPDGLFSRFLRDEAAGTPVRVFGPYGQLKIRLS--HRPILMIAGGSGLAPLL	223
DmpP	VELHVRLVEGGAATGF IHKQLKVGDAVELSGPYGQFFVRDSQ-AGDLIFIAGGSGLSSPQ	221
MmoC	LEFLIRVLPENGRFSDYLRNDARVGOVLSVKGPLGVFGLKERG-MAPRYFVAGGTGLAPVV	231
	: * : * : . * : . * * * : : : * * * * * : .	
ThmD	SLLRQMSDDGQGRTVSVFYGGRTRRDLFYTELVSQSLGKRIEQFEFIQVVSDEPDS-DGDD	285
AmoD	SMLRDLAAKCDRPMVSMFFGARSVDLYLIEEIREIGESLADFEFIPVLSSESPA-DWHG	282
DmpP	SMILDLLERGDTRRITLFGQARNRAELYNCELFEELAAARHPNFSYVPALNQANDDPEWQG	281
MmoC	SMVRQMGEWTAPNETRIYFGVNHEPELFYIDELKSLERSMRNLTVKACVWHPSGD--WEG	289
	* : : : . : : * . * * : : : : : : : :	
ThmD	VRYGFVHDAVDQWIETSGFRLDACDVYMGPPPMVDAVNDVLTLRHQVEQNRIFVVDKFTS	345
AmoD	-ETGMVTDALLRWRAEL-----AHDVYLCGPPPMIDAAPLLVERG-VRPRNIYYDAFT-	334
DmpP	-FKGFVHDAAKAHFDGR---FGGQKAYLCGPPPMIDAAITTLMQGR-LFERDIFMERFYT	336
MmoC	-EQGSPIDALREDLESS---DANPDIYLCGPPGMIDAACELVRSRG-IPGEQVFFFEKFLP	344
	* ** . * : . * * * * * : : : . : : : *	
ThmD	TGPEDSADSDSVSSL-----	360
AmoD	--P--AAQVVVV-----	342
DmpP	--AADGAGESRSALFKRI	353
MmoC	----SGAA-----	348
	. *	

Abbildung 14: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmD mit der Sequenz der Reduktase-Komponente von verschiedenen MMOs. AmoD: Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), DmpP: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), MmoC: 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 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 Oligoprimern, 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.

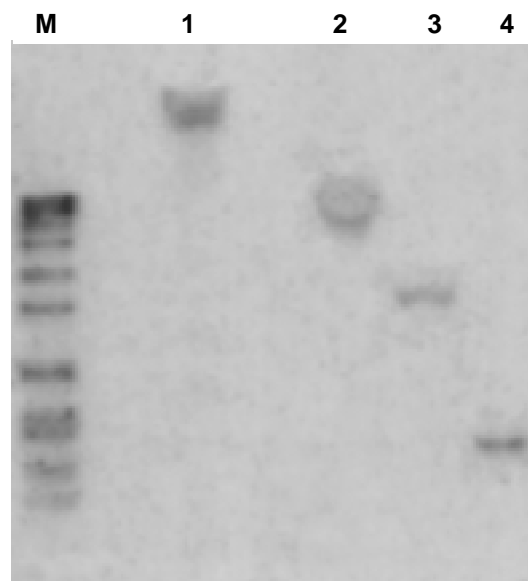


Abbildung 15: Southern-Hybridisierungen der Gesamt-DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Die Gesamt-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III (1), *Not*I (2), *Pst*I (3) und *Bam*HI (4) geschnitten. (M) DIG-markierter DNA-Größenstandard VII. Als Hybridisierungssonde wurde der DIG-markierte Primer 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 erhaltener Northern-Blot gezeigt.

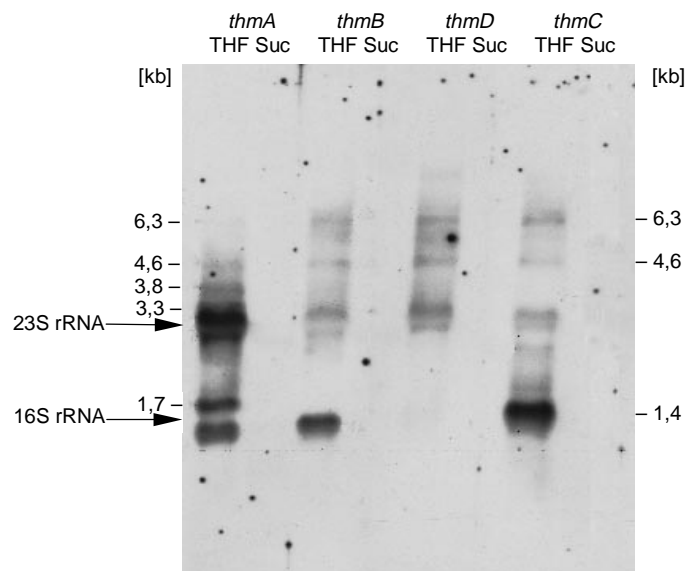


Abbildung 16: Transkriptionsanalyse der *thm*-Gene. Analyse der Gesamt-RNA aus THF-gewachsenen Zellen (THF), Analyse der Gesamt-RNA aus Succinat-gewachsenen Zellen (Suc). Als Hybridisierungssonden wurden die PCR-Produkte THF19-THF5 homolog zu *thmA*, THF16-THF26 homolog zu *thmB*, THF01-THF03 homolog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

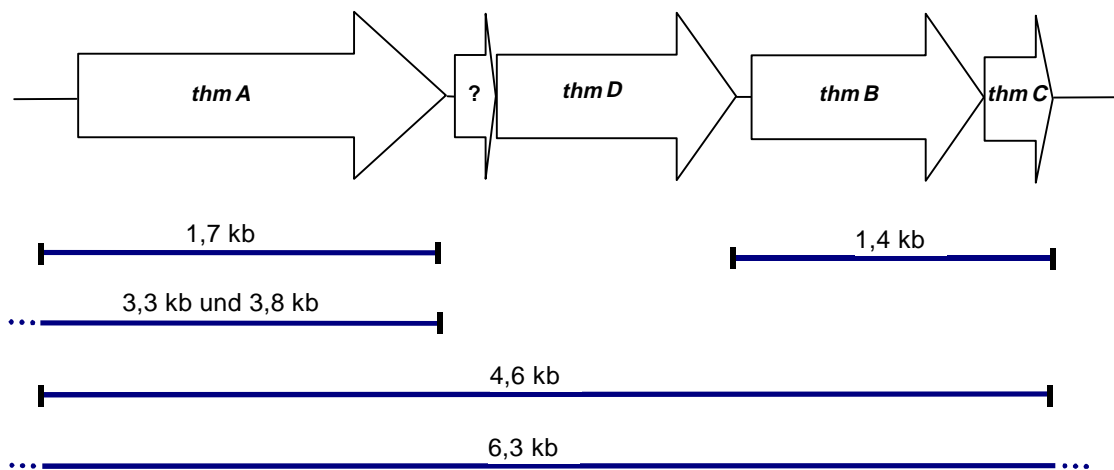


Abbildung 17: Nachgewiesene Transkripte der *thm*-Gene.

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.

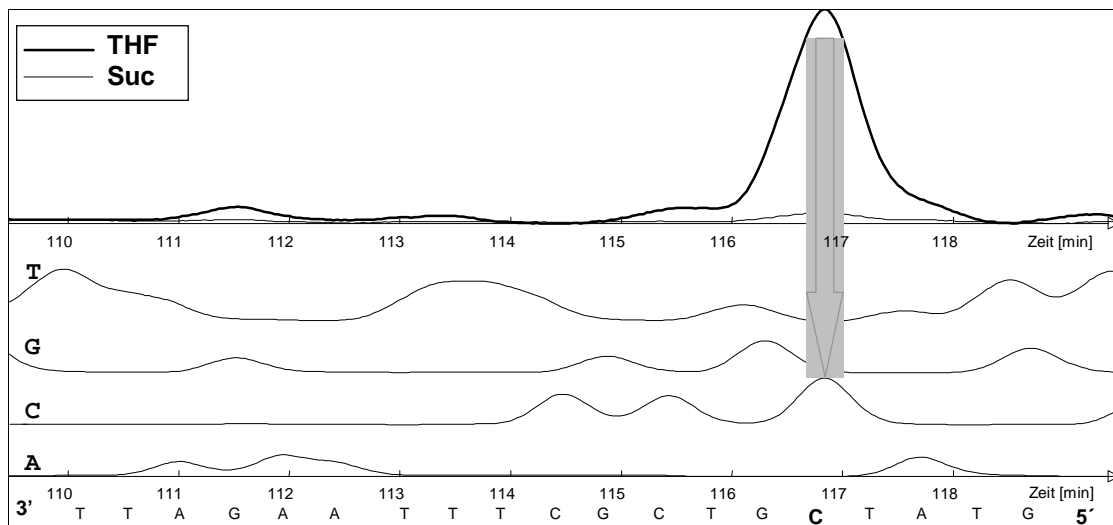


Abbildung 18: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes stromaufwärts von *thmB* mittels *primer extension*. Im oberen Teil der Abb. ist das erhaltene Fluorogramm der *primer extension*-Reaktion mit RNA aus THF- und Succinat-gewachsenen Zellen dargestellt, im unteren Teil der Abb. die entsprechende Sequenzierungsreaktion. 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>	TGG	TACCCCGG	TAAGCA	ACGATA	CCTCGACTCGATATC	CCCCGCA	
<i>thmB</i>	ACC	TCGACCGG	CCCCG	AGGACT	CTGCGGATTC	CGATTC	TGTATC

Abbildung 19: Vergleich der Promotor-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 Streptomycceten 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.).

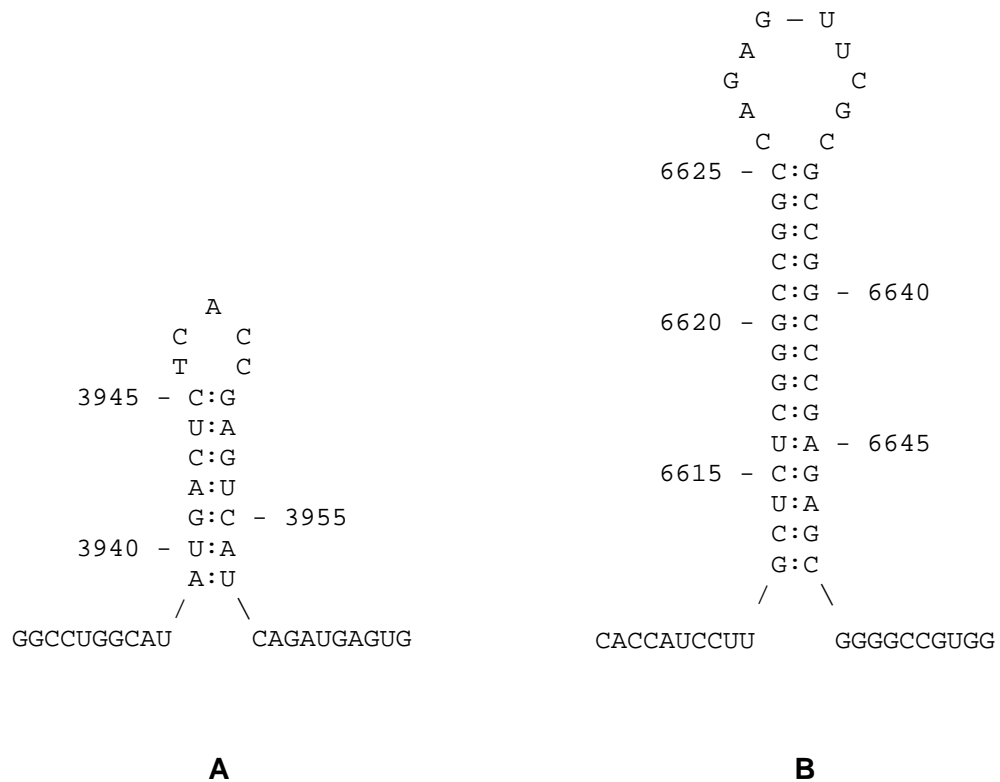


Abbildung 20: Postulierte Terminatorstrukturen des *thm*-Clusters. A Terminatorstruktur nach *thmA* mit einer freien Energie von $-32,7$ kJ/mol, **B** Terminatorstruktur nach *thmC* mit einer freien Energie von $-162,4$ kJ/mol.

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.

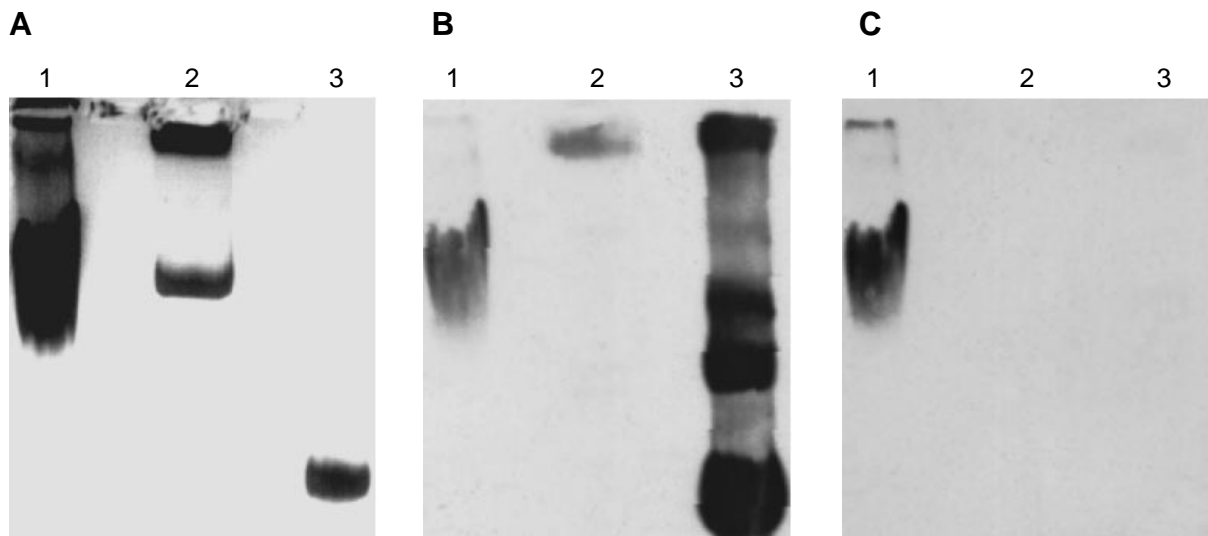


Abbildung 21: Nachweis von Plasmiden in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. **A** Auftrennung der Gesamt-DNA aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (1), der isolierten Plasmid-Präparation aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 (2) und des Plasmides pBT50 (3) in einem 0,7 %igen Agarosegel. Erhaltene Autoradiogramme 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 chromosomale 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 *Pst*I-Verdau nach Auftrennung im Agarosegel dargestellt. Zum Vergleich wurde die nicht geschnittene Plasmid-Präparation aufgetragen.

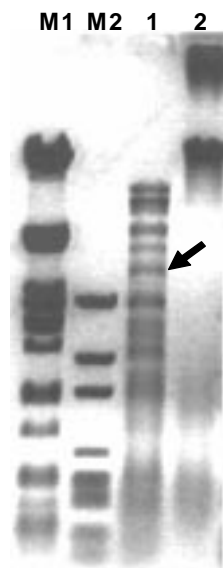


Abbildung 22: *Pst*I-Verdau der Plasmid-Präparation aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. Plasmid-Präparation geschnitten mit *Pst*I (1) und unbehandelt (2), Größenmarker λ -DNA geschnitten mit *Pst*I (M1) und pGEM™ DNA Marker (M2). Mit Pfeil ist das erhaltene Hybridisierungssignal mit der *thm*-spezifischen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

Der Verdau der Plasmid-Präparation mit *Pst*I führte zu einem definierten Restriktionsmuster, und die in der unbehandelten 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 *Pst*I-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 Auftrennung 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 Auftrage tasche des Gels zurückgehalten wurde. Eine Auftrennung 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-Monooxygenase 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.

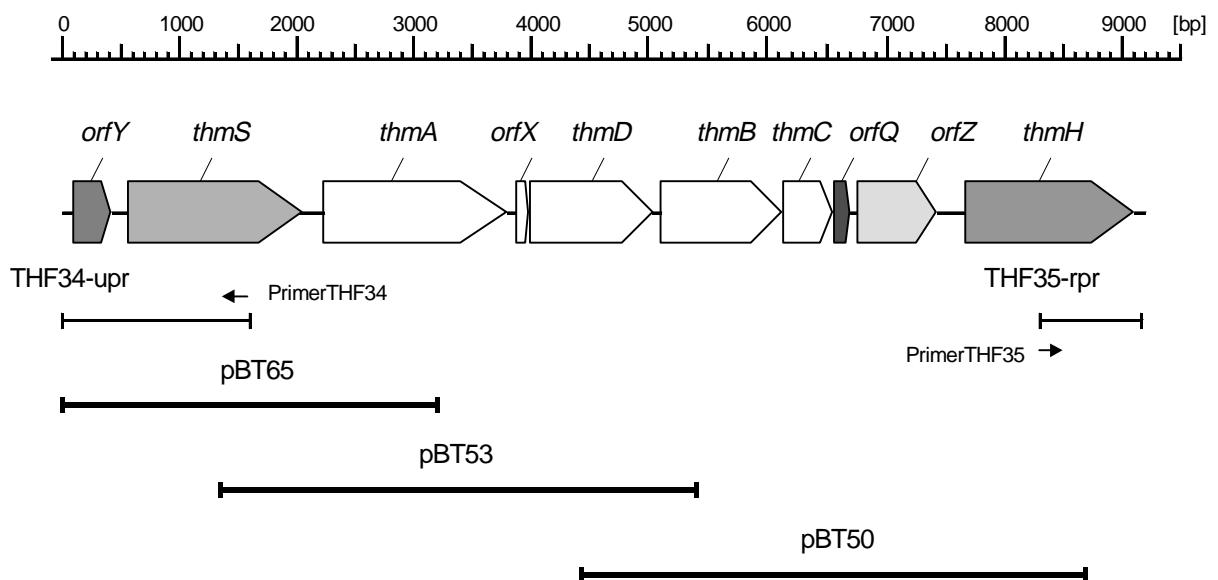


Abbildung 23: Anordnung aller identifizierten ORFs und deren Lokalisation auf den Plasmid-Inserts (pBT65, pBT53, pBT50) und den amplifizierten PCR-Produkten (THF34-upr, THF35-rpr). Die Lokalisation und Orientierung der verwendeten Primer THF34 und THF35 sind mit der Pfeilrichtung gekennzeichnet.

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 Streptomyceten 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 Argenin 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		GCA	40	17,5
	TTG	18	8,9		GCG	81	35,4
	CTT	48	23,8	Tyr	TAT	31	40,3
	CTC	67	33,1		TAC	46	59,7
	CTA	7	3,5	His	CAT	19	38,0
	CTG	62	30,7		CAC	31	62,0
Ile	ATT	33	27,0	Gln	CAA	7	7,9
	ATC	86	70,5		CAG	82	92,1
	ATA	3	2,5	Asn	AAT	18	29,0
Met	ATG	39	100		AAC	44	71,0
	Val	GTT	33	17,9	Lys	AAA	7
GTC		82	44,6	AAG		62	89,9
GTA		13	7,1	Asp	GAT	65	38,7
GTG		56	30,4		GAC	103	61,3
Ser	TCT	17	12,4	Glu	GAA	22	14,7
	TCC	20	14,6		GAG	128	85,3
	TCA	15	11,0	Cys	TGT	4	16,7
	TCG	44	32,1		TGC	20	83,3
	AGT	10	7,3	Trp	TGG	48	100
	AGC	31	22,6		Arg	CGT	31
Pro	CCT	24	18,6	CGC		46	30,3
	CCC	30	23,2	CGA		22	14,5
	CCA	17	13,2	CGG		38	25,0
	CCG	58	45,0	AGA	4	2,6	
Thr	ACT	22	17,6	AGG	11	7,2	
	ACC	52	41,6	Start	ATG	5	83,3
	ACA	17	13,6		GTG	1	16,6
	ACG	34	27,2	Stop	TAA	1	16,6
Gly	GGT	52	26,5		TAG	1	16,6
	GGC	77	39,3		TGA	4	66,7
	GGA	27	13,8				
	GGG	40	20,4				

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 geschlossen 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.

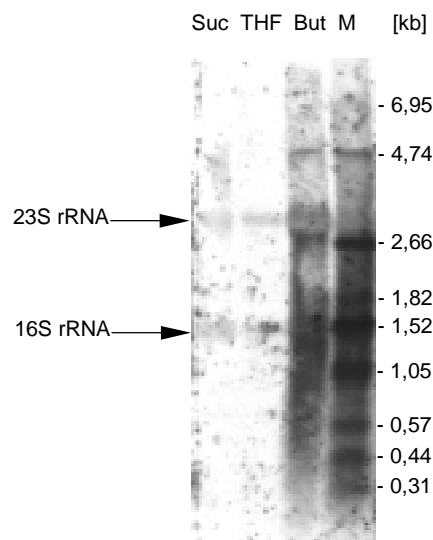


Abbildung 24: Transkriptanalyse von *thmH*. Analyse der Gesamt-RNA aus Succinat-gewachsenen Zellen (Suc), THF-gewachsenen Zellen (THF) und 1,4-Butandiol-gewachsenen Zellen (But) von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1. (M) DIG-markierter RNA-Größenstandard I. Als Hybridisierungssonde wurde das PCR-Produkt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

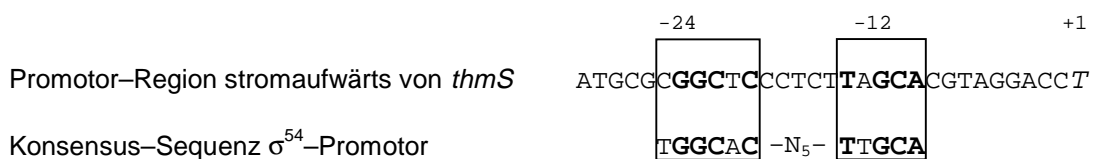


Abbildung 25: Vergleich der DNA-Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes von *thmS* mit der Konsensus-Sequenz eines σ^{54} -Faktors (WÖSTEN, 1998). Identische Nukleotide sind fett gedruckt.

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.

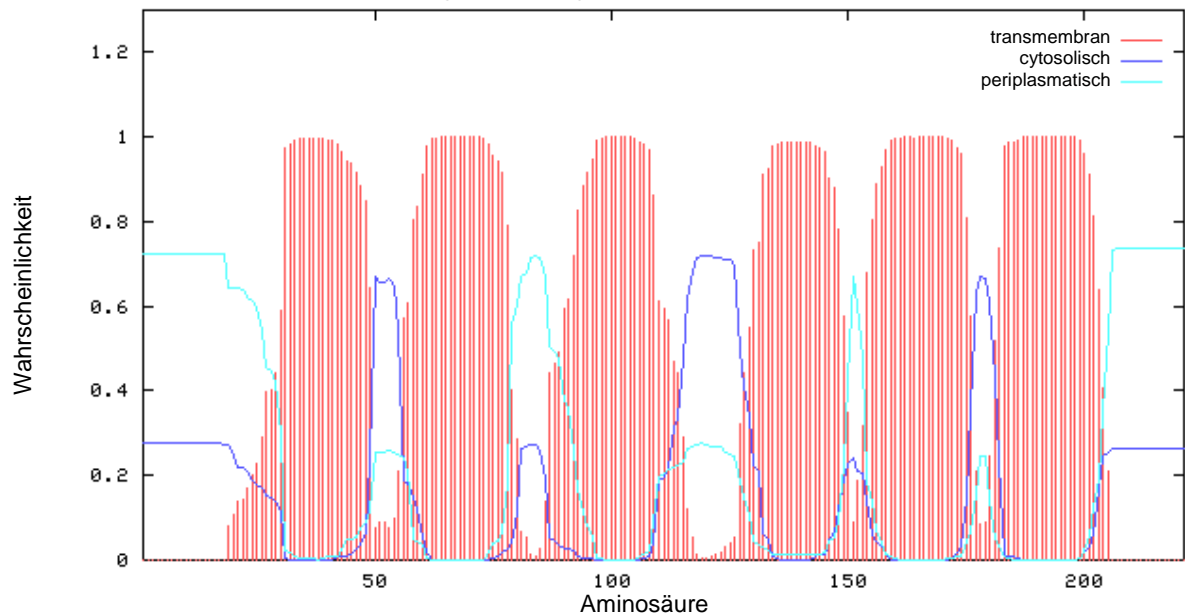


Abbildung 26: Putative Topologie von OrfZ. Die Topologievoraussage wurde unter Verwendung des Programms TMHMM1.0 (SONNHAMMER *et al.*, 1998) erstellt.

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	MTVIAKPDHLLRDDVQKFIDRPKLFINGQWHDSEIKGETLEVYDPAVGTGICTVAAGDAE	60
CymC	MSASSK----FNVDPAEFRNRN---LIGGQWKGSISGETITVENPATEEIIAHIPOQRHE	53
StyD	MTRSLTMN--SSLPAIDGLRLPHQMLIGGQWVNAQSDKTLNVYNPATGDTLTDVDPGDVE	58
	: . :.*** .: .:***: * :***. : :. * *	
ThmS	DVDRAVAAARHAFDEGPWSKLNPSERGRILVWRLADLLEEHAEDEFAQIDALDNGKPVTDAR	120
CymC	DIDEAVRVARATFESPWRKIRPIDRGRILENVARKIEEHADELAYLESLDTGKALTFK	113
StyD	DVNAAVESAAATLQSDAWRRMPPSARERILLRLADLLEAHGDELARLETLNNGKLLIYSK	118
	*:: ** * :::. . * :: * * *:: .:* : * *.***: * ::*:.* * : ::	
ThmS	AVDVAFSIELLLRYMAGWSNKIYGETIPLTN----PADFHAYTLREPVGVVQIVPWNFPL	176
CymC	AIDLPTIDVFRYMGWCSKLGTTPIISFD---GREYHTYTRREPIGVVGAITPWNYP	170
StyD	MMEVGASAQWLRYMAGWATKLTGSTLDLPLPPDVRSRASTQRPVGVVAAIIPWNFPL	178
	: : : :***.***.***: * * : : : : * * * :***. * ***:***	
ThmS	MMAVWKVAPALAAGCTVILKPAEQTPLSALRLAELTEEAGFPFPGVFNVTGFGETAGAAI	236
CymC	ALGSWKIASALAAGCTMVLKPTLPLSTLRLAELCLEAGLPEGALNIVNGHGHEAGEAL	230
StyD	LMAVWKIAPALACGNTVVLKPAEETPLTALRLAELAMEAGLPAGALNVVTGRGETAGDAL	238
	: . ***:*.***. * * : :***: * * * : :***:*** * * : : * * * * *	
ThmS	AAHDNIDKVAFT*STEV*RLIAQAASGNLKKVSL*ELGGKSPVIVFGSDIEQAVAGASSA	296
CymC	ARHPGVDKITFT*STVVG*KKIVEYALGNMKRVTL*ELGGKSPSIVFADADLDQVGLGAALA	290
StyD	VRHPKVAKVAFT*STEV*RIIGSACGRSLKAVSL*ELGGKSPVIVLADCDPQEAEEGAAAA	298
	. * : :***:*** * * : . . . : * * : * * * * * * * * * * * * * * * *	
ThmS	IFYNNGQTCTAGSRLYVHRKVYDKVVEGIASEASALPIGHGLDPATRIGPLISAEQRDRV	356
CymC	VFFNSGQICFAASRLFVQDSVYDQVVEAVAAAAAQFVGNGLDPDTPLLGPLVSRKQQERV	350
StyD	IFFNHGQVCTAGSRLYVHESIYEDVIQRLAVIGESIVVGSGLQGVHMGPMVSKKHENV	358
	: : *	
ThmS	TGYIAQGREAGAEEVIVGG-DTVGDGGYFIQPTILTKTDP-SMSVVREEIFGPVLCAMAFD	414
CymC	MGYVQSGIEQGARLVCGG-KSVGEKGYFLQPTVFADAAP-SMRIAQEEIFGPVSVIRFK	408
StyD	LRHIRNGIEDGADLICGGTEAPCAQGFVVKPTIFANREKKDIRLLSQEVFGPVLVATPFS	418
	: : . * * * * * : : * * : : * : : * * * * * : : : : * : * * * * : . *	
ThmS	EDTIDSVVREANNSVYGLAASIYTRDISVAHRVAKRLKAGTIGINTHHVVDVALPFGGFK	474
CymC	DEAEA--IRMANDTAYGLAANIWRDIKKAHRVAHRLQAGSVWINCHGVIPDPAAPFGGFK	466
StyD	DIAEV--VNEANRSVYGLGASITWDLAALRINDELEAGTVVWVNTNMVDPNLPFGGFK	476
	: : : . * * : .***.***:***.***: * * : . . * : * * * * * * * * * *	
ThmS	QSGYGRDMGRDAIDQYTEVKSIGIAL--	500
CymC	QSGWGREVSEEGLSAYTETKTVCALLDD	494
StyD	DSGVGREHGAAAIEHYTTTTRSLVIAY--	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	MTVIAKPDHLLRDDVQKFDIDRPPKLFINGQWHDSIKGETLEVYDPAVGTKICTVAAGDAE	60
ThmH	-----VQAEFPWIAG--RPATGSTVIDVQYPYDGRTVASVFPVSAE	39
	:. :.* * : : . .:* * * .:.* . .**	
ThmS	DVDRAVAAARHAFDEGFPWSKLNPSERGLVWRLADLLEHHADEFQAQIDALDNGKPVTDAR	120
ThmH	QVEEAVAAMHAARD--VVGATSAHRRASALSHVADRLEQRSEEAQVIVLESGKPIKWAR	97
	:*:.**** : * * . . .*. : :.* * * : : * * : . : .**** : **	
ThmS	AVDVAFSIELLRYMAGWSNKIYGETIPLTNPAD---FHAYTLREPVGVVQIVPWNFPLM	177
ThmH	-VEVARAASTFRWAAEEARRWSGTLQRLDLDAGGAGRLALVRRFPRGSLLAITPFNFPLN	156
	: * : . :.* * : : * * . * . * . * * * * : * : .****	
ThmS	MAVWKVAPALAAGCTVILKPAEQTPLSALRLAELTEEAGFPVGVNVTGFGETAGAAIA	237
ThmH	LVAHKVAPAIAGVPVVIKPAKSTPLSSLFLGQLLAETDLHQGSWSVLP-VPNSQMEHLI	215
	:. . *****:* * . ** : * * . * * * * * * : * : * : * : . . : :	
ThmS	AHDNIDKVAFTGSTEVGRLIAQAASGNLKKVSLLELGGKSPVIVFGDS---DIEQAVAGA	293
ThmH	LDPRLP IISFTGSGPVCWDIKSLVPR--KHVTLELGGNAAVVCSWSSEQDLEWAAQRI	273
	. . : : .**** * * * . . . * : * : * ↑ * * : : . : * * * * *	
ThmS	SSAIFYNNGQTC TAGSRRLYVHRKVYDKVVEGIASEASALPIGHGLDPATRIGPLISAEQR	353
ThmH	ALFANYQAGQSCISVQRVYVPRELYEVFTVLLSRHIGALRQGNPNDDATDVGVPINEASA	333
	: * : * : ↑ : . : * * * * : : . . : . . * * * : * * * * : * : *	
ThmS	DRVTGYIAQGREAGAEVIVGGDTVGGGYFIQPTILTCTDPSMSVREEIFGPVLCAMAF	413
ThmH	IRIEQWIDDAVHAGAKILVGGRRNGTS---LEPTLLADVPLAARILRDEAFGPVVSITPF	390
	* : * : . . .**** : * * * * * * * : * * * * : . : : * * * * * . *	
ThmS	DEDTIDSVREANNSVYGLAASIYTRDISVAHRVAKRLKAG-TIGINTHHVVDVALPFGG	472
ThmH	DS--LDSFAAVNDSDFGLQTVFTRDIRTAFRAHRDLEVGVIIGDVPSYRADQMPYGG	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 SUCCINATSEMIALDEHYD-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 Substratüberschuß-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.

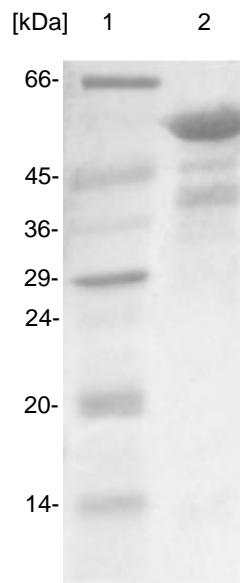


Abbildung 29: SDS-PAGE der partiell gereinigten SSDH. (1) Marker, (2) SSDH-Präparation.

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.

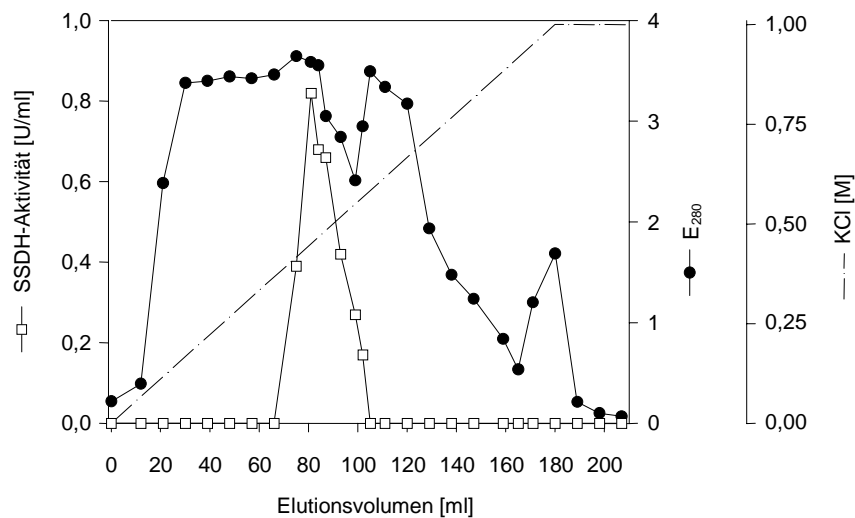


Abbildung 30: Chromatographie der SSDH an Q-Sepharose.

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 Protein-elutionsprofils 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 <i>ThmS</i>	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.