

4. DISKUSSION

4.1. DIE THF-MONOOXYGENASE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

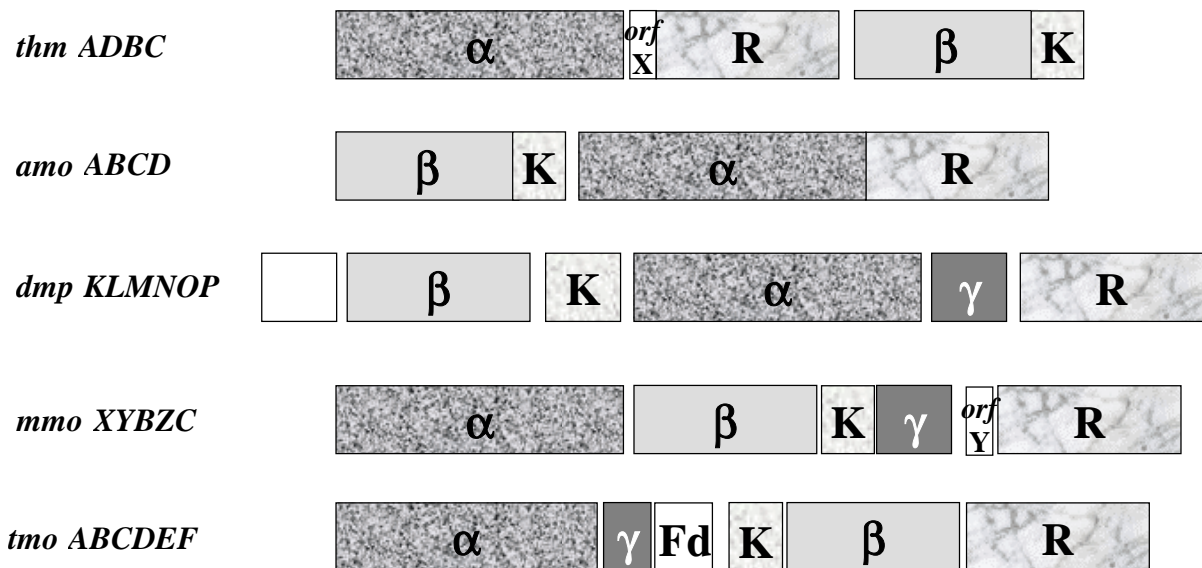


Abbildung 32: Anordnung der Strukturgene verschiedener MMOs. *thm*: THF-Monooxygenase aus *Pseudonocardia* sp. Stamm K1; *amo*: Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994), *dmp*: Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (NORDLUND *et al.*, 1990), *mmo*: Methan-Monooxygenase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

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

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

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

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

der Methan-Monooxygenasen, die über ein Sauerstoffatom miteinander verbunden sind, erfolgt über vier Glutamatreste (Glu₁₁₄, Glu₁₄₄, Glu₂₀₉ und Glu₂₄₃) und zwei Histidinreste (His₁₄₇ und His₂₄₆) (Abb. 33). Am Fe(1) ist ein Wasser-Molekül gebunden. Die konservierten Aspartatreste (Asp₁₄₃ und Asp₂₄₂) bilden jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zum His₁₄₇ bzw. His₂₄₆. In Analogie zu den hoch konservierten Aminosäuren der Methan-Monooxygenase findet man in der Sequenz der α -Untereinheit der THF-Monooxygenase die Glutamatreste Glu₁₀₅, Glu₁₃₅, Glu₁₉₉ und Glu₂₃₃, die Histidinreste His₁₃₈ und His₂₃₆ sowie die Aspartatreste Asp₁₃₄ und Asp₂₃₂ (Abb. 34), die somit für die Ausbildung eines binuklearen Eisenzentrums verantwortlich sein sollten. Damit würde die Fixierung von Fe(1) über Glu₁₀₅, Glu₁₃₅ und His₁₃₈ und von Fe(2) über Glu₁₉₉, Glu₂₃₃ und His₂₃₆ erfolgen. Eine Interaktion von His₁₃₈ mit Asp₂₃₂ sowie His₂₃₆ mit Asp₁₃₄ kann ebenso postuliert werden.

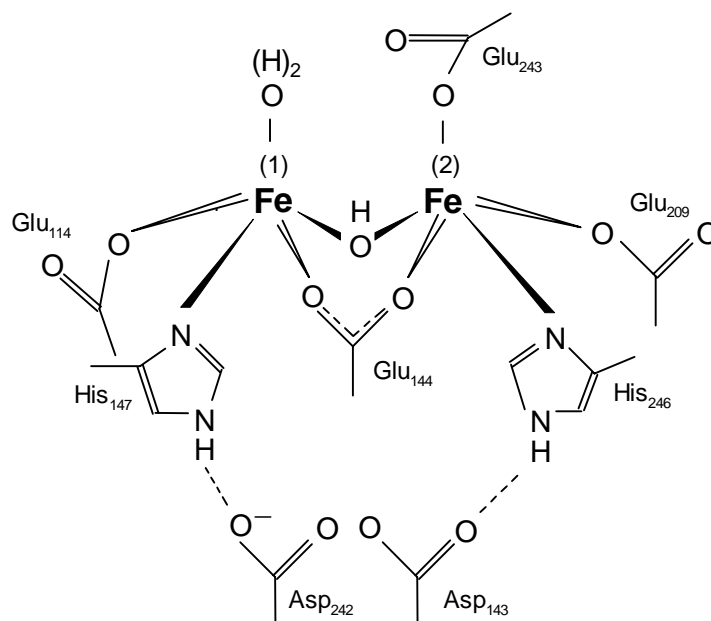


Abbildung 33: Struktur des aktiven Zentrums der Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (LIPSCOMB, 1994).

ThmA	-----MTAPPMKRPRRSITASHAKIGELGWDRTYYPHERGKYPSRYKLPNKPGRD	50
MmoX	MALSTATKAATDALAANRAPTSVNAQEVHRLWQSFNWDKF--NNRTKYATKYKMAN-ETKE	58
	* . :*. **.*...: .: : : ** **::**:* : :	
ThmA	PMKQIMGDYLHMQNEKDDRVDHGGLDAAVR-AEVPGKAPLRWLELLKPYLLTIVISA-BAAT	109
MmoX	QFKLIAKEYARMEAVKDERQFGSLOVALTRLNAGVRVHPKWNETMKVVSNFLVGVGEYNAI	118
	: * * : * : : * : * . * . * : : . : . : * * : * : : * * *	
ThmA	RCMGLVDALDDPELQNAYYIQQLDEQRHTAMQMNLRYWYMKNMPEPVGWNLGLQAVGGD	169
MmoX	AATGMLWDSAQAAEQKNGYLAQVLDERTHTQCAVYVNYFFAKNGQDPAGHNDARRTRTIG	178
	. * * * * : : . * : * . * * * * * * : : : * * : * . * . : :	
ThmA	SILVAAQNITGS-FMTGDPFQAVALQVVVETAFINTILVAFPDVAVRNHDFALPTVMNS	228
MmoX	PLWKGMRVFSDFISGDAVECSLNLQLVGEACFTINPLIVAVTEWAAAANGDEITPTVFLS	238
	. : . : : . : * : * . * . * : : * * * * * : * : * * * * * : *	
ThmA	VQSDIARHINNGYATLLYLLQEPENAPLLEQDIQQMFWTVHAFVDAFMGILVEYAPTDAT	288
MmoX	IETDELRRHMANGYQTVVSIANDPASAKYLNLDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLFEYGSKFV	298
	: : * * * * : * * * * : : : * . * * : * : : * * * : : . : : * * . * . . .	
ThmA	DPESWTTKWRVWVNDYYSYIVNLGKLGKIPDSIFKRARERIAADYHHKVAVGVWASW	348
MmoX	EP--VWKTWNRVWYEDWGGIWIWIRLGLKYGVESPRSLKDAKQD--AYWAHHDLYLLAYALW	354
	: * * . . * : * * * : * : * * * * * : * * : . : : * * * : : . : * *	
ThmA	PFHYKYGNLEQKDYDWFESKYPGWNEKFGAFWRGYAD--VRYPGSGPLQLPGLLEGAGP	406
MmoX	PTGFFRLLALPDQEEMEWFEANYPGWYDHYGKIYEEWRARGCEDPSSGFIPLMWFIENHNP	414
	* : : : . : * : : : * * * : * * * : * * : : . * . * * : * : * . *	
ThmA	ICWTCQLGCLRPEEQCHRIVDEHTRFYCSPECKWIDMTNPGRYVGDR-----VWFDRYH	460
MmoX	IYIDRVSQVPFCPSLAKGASTLRVHEYNGQMHTFSDQWGERMWLAEPERYEQNIFEQYE	474
	* . : . : : * . : * . : : : * : * .	
ThmA	GWEYSEIVRDLGFLRPDGTKTLTGQPHVDPDPKQWTIDDLRELGHIMQSPNILTAERLGL	520
MmoX	GRELSEVIAELHGLRSDGKTLIAQPHVRGD--KLWTLDDIKRLNCFKPNVKAFN-----	527
	* * * * : : * * . * * * * . * * * * * * * * * * : * . : : . *	
ThmA	PYKRVEYTGTKPGDMPPTIPPLFGV	545
MmoX	-----	

Abbildung 14: Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenz von ThmA mit der Sequenz der α -Untereinheit der Methan-Monooxygenase. MmoX: α -Untereinheit der 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. Eingerahmt sind die Aminosäuren der hydrophoben Tasche des aktiven Zentrums der Methan-Monooxygenase und die analogen Positionen in ThmA. Der Sequenzvergleich wurde unter Verwendung des Programms CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) erstellt.

Die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums der Methan-Monooxygenase aus *M. capsulatus* (Bath), in der die Eisenatome und ihre koordinierenden Aminosäuren lokalisiert sind, wird durch Thr₂₁₃ und die hydrophoben Reste Leu₁₁₀, Ala₁₁₇, Phe₁₈₈, Phe₁₉₂, Leu₂₀₄, Gly₂₀₈, Ile₂₁₇, Phe₂₃₆ und Ile₂₃₉, gebildet (ROSENZWEIG *et al.*, 1993). Für ThmA findet man in vier analogen Positionen die gleichen Aminosäure-Reste Ala₁₀₈, Phe₁₈₂, Leu₁₉₄ und

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

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

ThmB	-----MSASAAERRELRELEERSQHWFI PERKRSSLYEDVTIDVQPSV	42
AmoA	-----MTTEATVARPVELEGHRTFTWFTPARRKPT EYELYTVGQQSTP	43
DmpL	-----MSVEIKTNTVDPIRQTYGNLQRRFGD--KPASRYQEASYDIEAVT	43
MmoY	MSMLGERRRGLTDPEMAAVILKALPEAPLDGNNKMGYFVTPRWKRLTEYEALTVYAQPNA	60
	. . . : : * : : .	
ThmB	HRHTR----FGYPIAFPNGRPSFWDSTAIQSSDWYAFRDPGGLWERTFFQTGSTHEREI	98
AmoA	DEWLH----VDWPLRFDDGRAPWEEESSAVRTSEWSAYRDPHQLWQRPVYSTCNQDQQAL	99
DmpL	NFHYS-----PLWDPQHELHDPTRTAIRMTDWHKVTDP RQFYYGAYVQTRARMQEAT	95
MmoY	DWIAGGLDWGDWTQKFHGGRP SWGNETTELRTVDWFKHRDPLRRWHAPYVKDKAE EWRYT	120
	. : : : : * ** : . : . .	
ThmB	ENDLQVARDNNLFDVAVSKIEWD-FLSAQLLPISL TEYGLVAPQSAALRPALGDAIANCLG	157
AmoA	ARLVPVLTMG--SAAITPIWSQKILARSYAAWPFVEYGLFSLAYAVRQAMSDTVQFSVV	157
DmpL	EHAYGFCEKRELLSRLPAELQA-KLLRCLVPLRHAELGANMNNSS IAGDSIAATVTQMHI	154
MmoY	DRFLQGY SADGQIRAMNPTWRTSSCNRYWGAFLFNEYGLFNAHSQGAREALSDVTRVSLA	180
	. : : . * * : : . . .	
ThmB	YSAGYKLRQAQALVLYGGELEREIPGFSTADGK--RRFLEDPEWQPTRRYLER-LASITD	214
AmoA	FQAVDRMRLQLD I VHHLDHLQ-ESPEFSDAGAR--EAWMSDSTLVP IREVIER-IAASQD	213
DmpL	YQAMDRLGMGQYLSRIGLLLD---GGTGEALDQAKAYWLD DDP I WQGLRRYVED-SFVIRD	210
MmoY	FWGFDKIDIAQMIQLERGF LAKIVPGFDESTAVPKAEWTNGEVYKSARLAVEGLWQEVFD	240
	: . : : * : * : . : : . . * : * *	
ThmB	WAETIVAANICFEPLIGSLLRREVLIRLAGSYGDATPTPLGQVAQAEWGWVRDWSVALVR	274
AmoA	WVEILVAGTLVFEPLVGH LAKAELFSRRAPMFGDGTTPAVLASALLDSGRHLESVQALVR	273
DmpL	WFELGLAQNVLVDGLLQPLMYQRFDQWLT-ENGGS DVAMLTEFMRD WYGESTRWVDAMFK	269
MmoY	WNE SAFSVHAVYDALFGQFVRREFFORLAPRFGDNLTPFFINQAQTYFQIAKQGVQDLYY	300
	* * . : : * . : . . : *	
ThmB	-FILNDTTYSEANTQKVQEWLEDWGMTMARE AIDALEPVFSSIDPAYSETRQRLNQDHADL	333
AmoA	-LVCQDPVHGDQNQATVRRWIEEQPRCKAAAQSFLPTFSDCGIDAKE SANALSRLAN-	331
DmpL	TVLAEN----DANREQVQAWLEVWEPRAYEALLPLAE EATGIAALDEV R-----SAFATR	320
MmoY	NCLGDDPEFSDYNRTVMRNWTGK WLEPTIAALRDFMGLFAKLPA GTTDKKEITASLYRVV	360
	: : : : * : : * * * * : : :	
ThmB	LQECGLKSSEVTV-----	346
AmoA	-QRAAVEGAGITA-----	343
DmpL	LQKIGLKSREE-----	331
MmoY	DDGSRTTPAGSTSRRRTAIRSLKRFWQD	387

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

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

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

```

ThmC      ---MTDATATSAAENGSGDAAYDYVGLVMQRTPEGE-AVGRVCSQTPGVEVITNTTFLDV 56
AmoB      MTDVKETTIVTSTPAAVPGTKNRRVGLISLISSDTEAAVEHIAETQPDAKIDFRDCFYKI 60
           .:::*.***.. . .:      **: :   .: * ** :... *...: . * .:

ThmC      RAKDRLIVNFDVAVGEEELGSDMDGYVLQEHMTTHYGRMAMTDDSFILVADPLELIELINSG 116
AmoB      ERDGLSFDMAELSEIAGRDIIDTIFLVNMSTYYGRIVVSDGRVDIYAE-IQPARFKD-- 117
           . .:* .: :.* * ** : : **:*:*:..:* . : * : : . :

ThmC      S 117
AmoB      -

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2. WEITERE OFFENE LESERAHMEN DER KLONierten GENREGION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3. DIE THF-INDUZIERTE SUCCINATSEMIALDEHYD-DEHYDROGENASE

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

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

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

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

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

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

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

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

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird angenommen, daß die einleitende Reaktion beim THF-Abbau durch eine Dreikomponenten-Monooxygenase (ThmA₃BC) erfolgt und daß die Katalyse der Monooxygenase-Reaktion an einem binuklearen Eisenzentrum stattfindet. Nach dem von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) postulierten Abbaupfad kann das entstehende 2-Hydroxy-THF entweder durch spontane Ringöffnung in 4-Hydroxybutyraldehyd umgesetzt oder zu γ -Butyrolacton oxidiert werden, das dann zu 4-Hydroxybuttersäure umgewandelt wird. Letzterer Weg wird wahrscheinlich in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 besprochen. Stromabwärts der THF-Monooxygenase-Gene wurde ein ORF (*thmH*) identifiziert, der wahrscheinlich für eine 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase (ThmH) kodiert. Da *thmH* nicht durch THF induzierbar war, kann eine Ringöffnung von

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

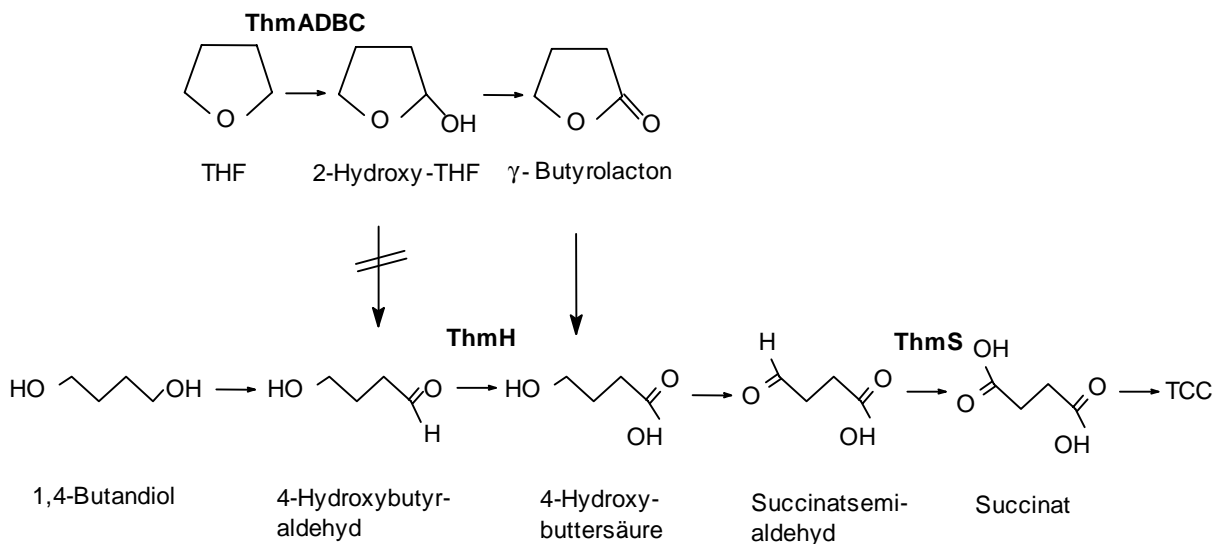


Abbildung 37: Postulierter THF-Abbauweg in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 und die daran beteiligten Enzyme. ThmADBC: THF-Monooxygenase, ThmH: 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase, ThmS: Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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