

5. ZUSAMMENFASSUNG

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

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

3.) Stromaufwärts von *thmA* befindet sich ein offener Leserahmen (*thmS*), der für eine Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase kodiert. Eine Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität wird beim Wachstum von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 auf THF spezifisch induziert. Das entsprechende Protein konnte partiell gereinigt werden und als Genprodukt von *thmS* identifiziert werden. Die Transkriptanalyse von *thmS* zeigte, daß das Gen THF-induziert, bi- und polycistronisch mit *thmA* bzw. mit *thmADBC* transkribiert wird. Stromaufwärts von *thmS* wurde mittels *primer-extension* ein Transkriptionsstartpunkt bestimmt. Die vorgelagerte Promotorstruktur wies signifikante Ähnlichkeit zu σ^{54} -abhängigen Promotoren auf. Aus den für die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase ermittelten Daten kann geschlossen werden, daß es sich um ein weiteres Enzym des THF-Abbaus handelt, welches für die Oxidation des intermediär gebildeten Succinatsemialdehyds verantwortlich ist.

4.) Stromaufwärts von *thmS* befindet sich *orfY*. OrfY zeigte Homologie zu einem hypothetischen Protein mit bisher unbekannter Funktion, dessen Gen in einem *Rhodococcus*-Stamm zwischen den Strukturgenen einer P450-abhängigen Monooxygenase lokalisiert ist. Für *orfY* konnte gezeigt werden, daß dieser THF-induziert in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 transkribiert wird und somit eine Rolle beim THF-Abbau spielen könnte. Eine Aussage über die Funktion konnte anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden.

5.) Stromabwärts von *thmC* wurden zwei weitere offene Leserahmen (*orfZ*, *thmH*) identifiziert. *OrfZ* und *thmH* werden in 1,4-Butandiol-gewachsenen Zellen von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 gemeinsam transkribiert. Die aus *orfZ* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte bei Hydropathie-Analysen das Muster eines Membranproteins, für das sich 6 transmembrane Helices ableiten lassen. Es wurde postuliert, daß OrfZ eine Funktion beim Katabolismus von 1,4-Butandiol besitzt. Für *thmH* wurde aufgrund der spezifischen Transkription in 1,4-Butandiol-gewachsenen Zellen und der signifikanten Sequenzhomologien von ThmH zu Aldehyd-Dehydrogenasen postuliert, daß dieses Gen für eine 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase kodiert.

6.) In *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurden zwei zirkuläre Plasmide identifiziert, die sowohl in THF- als auch in Succinat-gewachsenen Zellen nachweisbar waren. Eines dieser Plasmide (pPSK60) konnte als Träger der *thm*-Gene identifiziert werden. Der G+C-Gehalt der *thm*-Gene lag ca. 10 % niedriger als der der Gesamt-DNA von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1, und es wurde postuliert, daß die Gene bzw. das Plasmid durch lateralen Gentransfer erworben wurden.