

# **Gene der Chinaldin-Degradation in *Arthrobacter ilicis* Rü61a**

---

**Charakterisierung und funktionelle Expression  
der Chinaldin-4-Oxidase Strukturgene**

Katja Parschat  
Oldenburg, 2004

# **Gene der Chinaldin-Degradation in *Arthrobacter ilicis* Rü61a**

---

## **Charakterisierung und funktionelle Expression der Chinaldin-4-Oxidase Strukturgene**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der  
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

von Frau Katja Parschat  
geboren am 21.02.1972 in Wuppertal

Erstreferent: Prof. Dr. S. Fetzner

Korreferent: Prof. Dr. H. Cypionka

Tag der Disputation: 24.03.2004

Aus der vorliegenden Dissertation ist folgende Veröffentlichung hervorgegangen:

PARSCHAT, K., HAUER, B., KAPPL, R., KRAFT, R., HÜTTERMANN, J., FETZNER, S.  
2003

Gene cluster of *Arthrobacter ilicis* Rü61a involved in the degradation of quinaldine to anthranilate: characterization and functional expression of the quinaldine 4-oxidase *qoxLMS* genes.

J. Biol. Chem. **278**(30), 27483-27494

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Susanne Fetzner im Zeitraum von November 1998 bis Oktober 2002 in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des Fachbereiches 7 der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg und von November 2002 bis Januar 2004 am Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster angefertigt.

Frau Prof. Dr. Susanne Fetzner danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft, großzügige Unterstützung und für die gewährte Freiheit bei der Anfertigung der Arbeit.

Für die Anfertigung der ESR-Spektren danke ich R. Kraft, Dr. R. Kappl und Prof. Dr. J. Hüttermann vom Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, Homburg.

Herrn Dr. B. Hauer von der BASF AG, Ludwigshafen danke ich für die Sequenzierung der Plasmidinserts.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis möchte ein großes „Danke schön“ sagen für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und Hilfe bei allen möglichen Problemen und vor allem für die gute Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Frank, Gerd, Birgit und vor allem Ursel, die mich durch ihre ständige Diskussionsbereitschaft im Labor auf Ideen gebracht und unterstützt haben. Außerdem danke ich Sonja, dass ich die von ihr ermittelten Werte für das Wildtyp-Enzym zur vergleichenden Betrachtung in meiner Arbeit verwenden durfte. Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Meinhardt, die mir gerade am Anfang in Münster so freundlich und hilfsbereit zur Seite standen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglichten und mich in allen Lebenslagen unterstützen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Wolf, der mir in den letzten Jahren immer beigestanden hat und mir durch seine Großzügigkeit vieles erleichtert hat.

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungen.....	X
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Plasmidkodierter Aromatenabbau.....	1
1.2. Mononukleare Molybdoenzyme .....	5
1.3. Die Chinaldin-4-Oxidase .....	8
1.4. Aufgabenstellung .....	10
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
2.1. Definitionen .....	11
2.2. Geräte .....	12
2.3. Chemikalien, Enzyme, sonstige Materialien und Dienstleistungen .....	13
2.4. Puffer und Lösungen .....	14
2.5. Kulturmedien .....	18
2.6. Bakterienstämme .....	21
2.7. Vektoren .....	22
2.7.1. Der Plasmidvektor pUC18 .....	22
2.7.2. Der <i>broad-host-range</i> Expressionsvektor pJB653 .....	22
2.7.3. Der Cosmid-Vektor pVK100.....	23
2.7.4. Der mobilisierbare Vektor pSUP202.....	24
2.7.5. Der mobilisierbare Vektor pSUP <i>aacC1</i> .....	25
2.7.6. Das Plasmid pBG2b .....	25
2.7.7. Das Plasmid R202 .....	25
2.8. Kultivierung der Bakterienstämme und Stammhaltung.....	26
2.8.1. Züchtung von <i>A. ilicis</i> Rü61a zur Induktion der Qox-Synthese .....	26
2.8.2. Züchtung von <i>P. putida</i> KT2440 mit rekombinanten pVK100-Cosmiden zum Nachweis der cometabolischen Chinaldin-Degradation .....	26
2.8.2.1. <i>Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Umsetzungsprodukten</i> .....	27
2.8.3. Züchtung von <i>E. coli</i> HB101 pVK55B/5 zur Induktion der Expression der <i>qoxLMS</i> -Gene .....	27
2.8.4. Züchtung von <i>P. putida</i> KT2440 pKP1 zum Nachweis cometabolischer Chinaldin-Umsetzung und zur Synthese aktiver Qox.....	27
2.8.5. Stammhaltung.....	28
2.9. Isolierung genomischer DNA .....	28
2.9.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>A. ilicis</i> Rü61a mit QIAGEN Genomic-tip 20/G.....	28
2.9.2. Isolierung genomischer DNA aus <i>A. ilicis</i> Rü61a nach HOPWOOD <i>et al.</i> (1985).....	29
2.9.3. Isolierung genomischer DNA aus <i>E. coli</i> .....	30
2.10. Isolierung von Plasmid-DNA .....	30
2.10.1. QIAGEN Plasmid Midi Kit.....	30
2.10.2. E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I .....	31
2.10.3. Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse .....	31

<b>2.11. Präzipitation von DNA .....</b>	<b>31</b>
2.11.1. Isopropanolfällung.....	31
2.11.2. Ethanol-fällung .....	32
<b>2.12. Deproteinisierung von DNA-Lösungen mittels Phenol-Chloroform Extraktion.....</b>	<b>32</b>
<b>2.13. Bestimmung der DNA-Reinheit und –Konzentration.....</b>	<b>33</b>
<b>2.14. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....</b>	<b>33</b>
2.14.1. Partielle Restriktion genomischer DNA aus <i>A. ilicis</i> Rü61a .....	34
<b>2.15. Dephosphorylierung von Vektor-DNA .....</b>	<b>34</b>
<b>2.16. Entfernung von 5'- oder 3'-überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase .....</b>	<b>35</b>
<b>2.17. Ligation mit T4-DNA-Ligase .....</b>	<b>35</b>
2.17.1. Ligation des Cosmids pVK100 mit <i>Hind</i> III-Fragmenten genomischer DNA aus <i>A. ilicis</i> Rü61a .....	36
<b>2.18. Agarosegel-Elektrophorese .....</b>	<b>36</b>
<b>2.19. Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....</b>	<b>37</b>
2.19.1. NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit.....	37
2.19.2. Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe von Agarase .....	37
<b>2.20. Herstellung einer Cosmid-Genbank für <i>A. ilicis</i> Rü61a .....</b>	<b>38</b>
2.20.1. <i>In vitro</i> Verpacken von DNA .....	38
2.20.2. Herstellung einer <i>E. coli</i> HB101 Magnesium-Kultur .....	38
2.20.3. Infektion von <i>E. coli</i> HB101 mit $\lambda$ -Phagen, die Cosmid-DNA enthalten.....	38
<b>2.21. Transformation von Bakterienstämmen mit rekombinanten Plasmiden .....</b>	<b>39</b>
2.21.1. Präparation elektrokompeter Zellen.....	39
2.21.2. Elektroporation.....	39
<b>2.22. Selektion rekombinanter Plasmide durch Blau/Weiß-Screening .....</b>	<b>40</b>
<b>2.23. Polymerase-Kettenreaktion (SAIKI <i>et al.</i>, 1985, 1988).....</b>	<b>40</b>
2.23.1. <i>Primer</i> -Auswahl für PCR-Anwendungen.....	40
2.23.2. Amplifikation des <i>goxLMS</i> -Genclusters.....	41
2.23.3. Amplifikation der <i>nptII</i> - und der <i>aacCI</i> -Resistenzkassetten.....	43
2.23.4. PCR zur Kontrolle der Insertionsmutagenese.....	44
2.23.5. Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR .....	45
<b>2.24. Reinigung von PCR-Produkten .....</b>	<b>46</b>
<b>2.25. DNA-Sonden.....</b>	<b>46</b>
2.25.1. Die Oligonukleotidsonde b-DIG .....	47
2.25.2. Die Sonde 1,1 <i>DpnI</i> .....	47
2.25.2.1. Vermehrung des 1,1 kb Fragmentes .....	47
2.25.2.2. Markierung des 1,1 kb <i>DpnI</i> Fragmentes mit Digoxigenin .....	47
<b>2.26. DNA-DNA Hybridisierung.....</b>	<b>48</b>
2.26.1. Kolonieblotting.....	48
2.26.2. Southern-Transfer.....	49
2.26.3. Hybridisierungen .....	50
2.26.4. Detektion .....	50
<b>2.27. Konjugation.....</b>	<b>51</b>
2.27.1. Filter-Mating .....	52
2.27.2. Selektion der Transkonjuganten .....	52

<b>2.28. Analysen von DNA- und Aminosäuresequenzen.....</b>	<b>52</b>
<b>2.29. Reinigung der Chinaldin-4-Oxidase aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III .....</b>	<b>52</b>
2.29.1. Zellaufschluss mit Ultraschall .....	52
2.29.2. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B .....	53
2.29.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B .....	53
2.29.4. Anionenaustauschchromatographie an UNO™-Q 1 .....	53
2.29.5. Gelfiltration an einer HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule.....	53
2.29.6. Lagerung der gereinigten Chinaldin-4-Oxidase .....	54
<b>2.30. Proteinbestimmung.....</b>	<b>54</b>
<b>2.31. Nachweis von Enzymaktivitäten.....</b>	<b>54</b>
2.31.1. Chinaldin-4-Oxidase Test.....	54
2.31.2. Nachweis der 1 <i>H</i> -4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase .....	55
2.31.3. Nachweis der <i>N</i> -Acetylanthranilat-Amidase .....	55
2.31.3.1. Spektrophotometrischer Test .....	55
2.31.3.2. Bestimmung des Umsetzungsproduktes durch Dünnschichtchromatographie .....	55
<b>2.32. Bestimmung von <math>K_m</math> und <math>k_{cat}</math> für Chinaldin und INT für die aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III gereinigte Qox .....</b>	<b>56</b>
<b>2.33. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).....</b>	<b>56</b>
2.33.1. SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).....	57
2.33.2. Native PAGE.....	57
<b>2.34. Lichtabsorptionsspektrum der nativen Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III .....</b>	<b>57</b>
<b>2.35. Nachweis von CMP in Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III.....</b>	<b>57</b>
<b>2.36. Untersuchung des Metallgehaltes der Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III und <i>A. ilicis</i> Rü61a .....</b>	<b>58</b>
<b>2.37. Elektronenspinresonanzspektroskopie .....</b>	<b>58</b>
<b>3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Konstruktion einer angereicherten Genbank von <i>A. ilicis</i> Rü61a .....</b>	<b>59</b>
3.1.1. Hybridisierung vollständig restringierter genomischer DNA und Plasmid-DNA mit der Oligonukleotidsonde „b-DIG“.....	59
3.1.2. Konstruktion einer angereicherten Genbank .....	60
3.1.3. <i>Screening</i> der angereicherten Genbank .....	60
<b>3.2. Analyse des Inserts von pUC4,5 .....</b>	<b>62</b>
3.2.1. Restriktionsanalyse des 4,5 kb Inserts .....	62
3.2.2. Sequenzanalyse des 4,5 kb Inserts.....	62
<b>3.3. Etablierung einer Genbank, die das Genom von <i>A. ilicis</i> Rü61a repräsentiert.....</b>	<b>63</b>
3.3.1. Hybridisierung genomischer DNA mit der Sonde „1,1 <i>DpnI</i> “ .....	63
3.3.2. Konstruktion der Genbank .....	64
3.3.3. <i>Screening</i> der Genbank.....	65
<b>3.4. Untersuchung rekombinanter Cosmide und Synthese aktiver Chinaldin-4-Oxidase durch <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 pVK (Tc<sup>r</sup>, Km<sup>s</sup>).....</b>	<b>65</b>
3.4.1. Umklonierung der rekombinanten Cosmide in <i>P. putida</i> KT2440.....	65
3.4.2. Hybridisierung von Cosmid-DNA aus <i>P. putida</i> KT2440 pVK (Tc <sup>r</sup> , Km <sup>s</sup> ) Klonen mit der Sonde „1,1 <i>DpnI</i> “ .....	66
3.4.3. Synthese aktiver Chinaldin-4-Oxidase und cometabolische Chinaldin-Umsetzung durch <i>P. putida</i> KT2440 pVK (Tc <sup>r</sup> , Km <sup>s</sup> ) Klone .....	67

<b>3.5. Degradative Fähigkeiten von <i>P. putida</i> KT2440 pVK55/11 und Synthese aktiver Qox.....</b>	<b>68</b>
<b>3.6. Versuche zur funktionellen Expression der <i>qox</i>-Gene in <i>E. coli</i> HB101 pVK55B/5 .....</b>	<b>69</b>
<b>3.7. Subklonierung von Fragmenten des 23 kb Inserts und Sequenzierung des Cosmidinserts von pVK55B/5 .....</b>	<b>70</b>
<b>3.8. Sequenz des 23 kb Inserts aus pVK55B/5.....</b>	<b>70</b>
<b>3.9. Analyse der Sequenzen der Chinaldin-4-Oxidase Untereinheiten.....</b>	<b>71</b>
3.9.1. Der Gencluster der Chinaldin-4-Oxidase .....	71
3.9.2. Die Aminosäuresequenz der Chinaldin-4-Oxidase.....	73
3.9.2.1. <i>QoxL</i> : Die große Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase.....	74
3.9.2.2. <i>QoxM</i> : Die mittelgroße Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase.....	81
3.9.2.3. <i>QoxS</i> : Die kleine Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase.....	82
<b>3.10. Identifizierung potentieller Gene auf dem 23 kb Fragment und Sequenzanalyse der daraus abgeleiteten Genprodukte .....</b>	<b>84</b>
3.10.1. ORF1 .....	85
3.10.2. ORF2 .....	85
3.10.3. ORF4 .....	87
3.10.4. ORF5.....	88
3.10.5. ORF6.....	90
3.10.6. ORF7.....	91
3.10.7. ORF8.....	92
3.10.8. ORF9 und ORF14 .....	93
3.10.9. ORF10.....	94
3.10.10. ORF11 .....	95
3.10.11. ORF12 .....	97
3.10.12. ORF13 .....	99
3.10.13. ORF15 .....	99
3.10.14. ORF16.....	101
<b>3.11. Heterologe, funktionelle Expression der Gene der Chinaldin-4-Oxidase .....</b>	<b>103</b>
3.11.1. PCR-Amplifikation des <i>qoxLMS</i> -Clusters.....	103
3.11.2. Konstruktion des Expressionsklons <i>P. putida</i> KT2440 pKP1 .....	104
3.11.3. Cometabolische Chinaldin-Umsetzung und Synthese aktiver Qox durch <i>P. putida</i> KT2440 pKP1 Klone.....	104
<b>3.12. Reinigung der Chinaldin-4-Oxidase aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III .....</b>	<b>105</b>
3.12.1. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B .....	106
3.12.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B .....	106
3.12.3. Anionenaustauschchromatographie an UNO <sup>TM</sup> -Q 1 .....	107
3.12.4. Gelfiltration an einer HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule.....	108
3.12.5. Zusammenfassung der Reinigung und Homogenität der gereinigten Qox .....	109
<b>3.13. Cofaktor-Analyse der Chinaldin-4-Oxidase aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III .....</b>	<b>110</b>
3.13.1. Lichtabsorptionsspektrum .....	110
3.13.2. Nukleotidgehalt .....	110
3.13.3. Metallgehalt.....	111
3.13.4. Elektronenspinresonanz-spektroskopische Untersuchungen an der Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III und Vergleiche mit dem Wildtyp-Enzym.....	111
<b>3.14. Kinetische Parameter der Chinaldin-4-Oxidase aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III.....</b>	<b>114</b>
<b>3.15. Gerichtete Mutagenese an der Chinaldin-4-Oxidase.....</b>	<b>114</b>
3.15.1. Konstruktion von pUC2,5 .....	114
3.15.2. Mutagenese.....	115
3.15.3. Rekonstruktion von pKP1 .....	115
3.15.4. Versuche zur cometabolischen Umsetzung von Chinaldin durch <i>P. putida</i> KT2440 pKP1E736Q .....	115

3.15.5. Versuche zum Nachweis von Chinaldin-4-Oxidase Aktivität in <i>P. putida</i> KT2440 pKP1E736QII.....	116
<b>3.16. Insertionsinaktivierung der potentiellen Gene ORF2, ORF4, ORF5 und ORF7.....</b>	<b>117</b>
3.16.1. Subklonierung der ORFs 2, 4, 5 und 7 in den Vektor pUC18.....	117
3.16.2. Insertion von Kanamycin-Resistenzkassetten.....	118
3.16.3. Konstruktion des Plasmids pSUPaacCI.....	122
3.16.4. Umklonierung der die <i>nptII</i> -Kassette tragenden Sequenzabschnitte in mobilisierbare Vektoren.....	122
3.16.5. Konjugation.....	123
<b>3.17. Auswirkungen der <i>nptII</i>-Insertion in die ORFs 2, 4, 5 und 7 des 23 kb Inserts von pVK55B/5 auf die Chinaldin-Umsetzung.....</b>	<b>124</b>
3.17.1. Nachweis der Fähigkeiten zur cometabolischen Chinaldin-Umsetzung.....	124
3.17.2. Nachweis der Aktivität der 1 <i>H</i> -4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase.....	126
3.17.3. Nachweis der Aktivität der <i>N</i> -Acetylanthranilat-Amidase.....	127
3.17.4. Versuche zur Substrataufnahme durch <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5orf5 <i>nptII</i> (+), <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5orf5 <i>nptII</i> (-) und <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5.....	129
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>131</b>
<b>4.1. Die Chinaldin-4-Oxidase kodierenden Gene.....</b>	<b>131</b>
<b>4.2. Die Aminosäuresequenz der Chinaldin-4-Oxidase.....</b>	<b>135</b>
4.2.1. QoxL: Die große Untereinheit.....	135
4.2.2. QoxM: Die mittelgroße Untereinheit.....	139
4.2.3. QoxS: Die kleine Untereinheit.....	141
<b>4.3. Heterologe Expression der Gene <i>goxLMS</i> und Synthese katalytisch aktiver Chinaldin-4-Oxidase durch <i>P. putida</i> KT2440.....</b>	<b>143</b>
4.3.1. Synthese aktiver Chinaldin-4-Oxidase durch <i>P. putida</i> KT2440.....	143
4.3.2. Expression der <i>gox</i> -Gene in <i>P. putida</i> KT2440 pVK-Cosmidklonen.....	147
4.3.3. Expression der <i>gox</i> -Gene in <i>P. putida</i> KT2440 pKP1.....	148
<b>4.4. Charakterisierung der Chinaldin-4-Oxidase aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III.....</b>	<b>150</b>
<b>4.5. Gerichtete Mutagenese von <i>goxL</i> zum Austausch des potentiell katalytisch essentiellen Glutamarestes 736.....</b>	<b>153</b>
<b>4.6. Chinaldin-Degradation durch <i>Arthrobacter ilicis</i> Rü61a.....</b>	<b>156</b>
4.6.1. Die 1 <i>H</i> -4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase.....	157
4.6.2. Die <i>N</i> -Acetylanthranilat-Amidase.....	158
4.6.3. Ist das Genprodukt von ORF5 an der Chinaldin-Degradation beteiligt?.....	160
4.6.4. Gencluster im Aromatenabbau.....	161
4.6.5. Metabolisierung von Anthranilat durch <i>A. ilicis</i> Rü61a.....	162
<b>4.7. Hypothetische Funktionen der durch die ORFs 6 bis 9, 12 und 14 bis 16 kodierten Proteine.....</b>	<b>163</b>
4.7.1. Das ORF6 Protein: Eine potentielle Aminoacyl-tRNA Synthetase.....	164
4.7.2. Das ORF7 Protein: Eine mit den $\beta$ -Lactamasen verwandte potentielle Esterase.....	165
4.7.3. Das ORF8 Protein: Ein potentieller Transkriptionsregulator der TetR-Familie.....	166
4.7.4. Potentielle <i>short-chain</i> Dehydrogenasen/Reduktasen kodiert durch ORF9 und ORF14.....	167
4.7.5. Das ORF12 Protein: Ein potentielles ATP hydrolysierendes Enzym der AAA <sup>+</sup> ATPase Familie.....	168
4.7.6. Das ORF15 Protein: Ein potentielles Enzym zur Spaltung von C-C-Bindungen.....	168
4.7.7. Das ORF16 Protein: Eine potentielles Mitglied der Enolase-Superfamilie.....	169
<b>4.8. Ausblick.....</b>	<b>171</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>173</b>

---

<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>175</b>
Anhang 1 .....	i
Anhang 2 .....	xiv

---

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite
<b>Abb. 1:</b> Chinaldin-Abbau über den Anthranilatweg bei <i>A. ilicis</i> Rü61a.	2
<b>Abb. 2:</b> Der Molybdo-Pyranopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor mit einem monooxo-monosulfido Molybdänzentrum.	7
<b>Abb. 3:</b> Der Expressionsvektor pJB653.	23
<b>Abb. 4:</b> Der Cosmidvektor pVK100.	24
<b>Abb. 5:</b> Der mobilisierbare Vektor pSUP202.	25
<b>Abb. 6:</b> Untersuchung der spezifischen Bindung der Oligonukleotidsonde „b-DIG“.	59
<b>Abb. 7:</b> Hybridisierung von DNA rekombinanter Plasmide mit der Sonde „b-DIG“.	61
<b>Abb. 8:</b> Funktionelle Sequenzabschnitte des 4,5 kb großen Inserts von pUC4,5.	62
<b>Abb. 9:</b> Hybridisierung zur Überprüfung der Spezifität der Sonde „1,1 <i>DpnI</i> “.	64
<b>Abb. 10:</b> Hybridisierung von <i>HindIII</i> restringierten rekombinanten Cosmiden mit der <i>goxL</i> -spezifischen Sonde.	66
<b>Abb. 11:</b> Native PA-Gele von Rohextrakten der Stämme <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5 und pVK55/11 und von <i>A. ilicis</i> Rü61a.	69
<b>Abb. 12:</b> Multiples Alignment von Aminosäuresequenzen großer Untereinheiten verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen.	79
<b>Abb. 13:</b> Multiples Alignment von Aminosäuresequenzen mittelgroßer Untereinheiten verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen.	81
<b>Abb. 14:</b> Multiples Alignment von Aminosäuresequenzen kleiner Untereinheiten verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen.	83
<b>Abb. 15:</b> Vergleich der potentiellen FAD-Bindestelle des ORF2 Proteins mit der konservierten ADP-Bindestellen nach WIERENGA <i>et al.</i> (1986).	86
<b>Abb. 16:</b> Alignment des ORF4 Proteins mit der Kynurenin-Formamidase (KFase) aus <i>Mus musculus</i> .	88
<b>Abb. 17:</b> Vorhersage transmembraner Helices des ORF5 Proteins mit dem Programm SOSUI.	90
<b>Abb. 18:</b> Alignment konservierter Motive des ORF7 Proteins mit $\beta$ -Lactamase verwandten Enzymen.	92
<b>Abb. 19:</b> Konservierte Aminosäurereste der SDR-Superfamilie in den Proteinen der ORFs 9 und 14.	94
<b>Abb. 20:</b> Vergleich der Aminosäuresequenz des ORF10 Proteins mit der HD-Domänen Konsensus-Sequenz (ARAVIND & KOONIN, 1998).	95
<b>Abb. 21:</b> Graphische Darstellung der Verteilung hydrophiler und hydrophober Aminosäurereste in dem ORF11 Protein.	96
<b>Abb. 22:</b> Konservierte Motive in der Sequenz des ORF12 Proteins.	98

<b>Abb. 23:</b> Alignment von Sequenzbereichen des ORF15 Proteins mit entsprechenden Bereichen von Mitgliedern der FAA-Hydrolase-Familie.	100
<b>Abb. 24:</b> Alignment des C-terminalen Bereichs des ORF16 Proteins mit den TIM <i>barrel</i> -Domänen der MR und dem MLE aus <i>P. putida</i> .	102
<b>Abb. 25:</b> Native PAGE mit Rohextrakten von <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III, <i>A. ilicis</i> Rü61a und <i>P. putida</i> KT2440 pJB653.	105
<b>Abb. 26:</b> Elutionsdiagramm der Chromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B.	106
<b>Abb. 27:</b> Elutionsdiagramm der Chromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B.	107
<b>Abb. 28:</b> Elutionsdiagramm der Chromatographie an UNO <sup>TM</sup> -Q.	108
<b>Abb. 29:</b> Elutionsdiagramm der Chromatographie an HiLoad 26/60 Superdex 200.	108
<b>Abb. 30:</b> SDS-PAGE (13,4 %ig) der gereinigten Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III.	109
<b>Abb. 31:</b> UV/Vis-Absorptionsspektrum der Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III.	110
<b>Abb. 32:</b> ESR-Spektren der Substrat-reduzierten Qox aus <i>A. ilicis</i> Rü61a und aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III, aufgenommen bei 65 K.	112
<b>Abb. 33:</b> ESR-Spektren der [2Fe2S]-Zentren der Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III und <i>A. ilicis</i> Rü61a, aufgenommen bei 15 K und 25 K.	113
<b>Abb. 34:</b> Native PAGE mit Rohextrakten von <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III und <i>P. putida</i> KT2440 pKP1E736QII, angefärbt auf Qox-Aktivität.	116
<b>Abb. 35:</b>	
<b>A:</b> Darstellung des Plasmids pUCorf2 nach Insertion der <i>nptII</i> -Kassette.	119
<b>B:</b> Darstellung des Plasmids pUCorf4 nach Insertion der <i>nptII</i> -Kassette.	120
<b>C:</b> Darstellung des Plasmids pUCorf5 nach Insertion der <i>nptII</i> -Kassette.	121
<b>D:</b> Darstellung des Plasmids pUCorf7 nach Insertion der <i>nptII</i> -Kassette.	122
<b>Abb. 36:</b> Kontrolle der Insertion einer <i>nptII</i> -Kassette in die ORFs 2, 4, 5 und 7 auf dem 23 kb langen Insert von pVK55B/5 mittels PCR.	124
<b>Abb. 37:</b> Dünnschichtchromatogramme der Kulturüberstände von <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5 und Mutanten.	125
<b>Abb. 38:</b> UV/Vis-Spektren der Kulturüberstände von <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5 Klonen vor und nach Insertion der <i>nptII</i> -Kassette in ORF2 bzw. ORF4.	126
<b>Abb. 39:</b> Umsetzung von 1 <i>H</i> -4-Oxochinaldin durch Rohextrakte von <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5 und <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5orf2 <i>nptII</i> .	127
<b>Abb. 40:</b> <i>N</i> -Acetylanthranilat-Umsetzung durch Rohextrakte von <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5 und <i>P. putida</i> KT2440 pVK55B/5orf4 <i>nptII</i> (+).	128
<b>Abb. 41:</b> Dünnschichtchromatographischer Nachweis des Umsetzungsproduktes der <i>N</i> -Acetylanthranilat-Amidase.	129
<b>Abb. 42:</b> Schematische Darstellung des MCD-Cofaktors und potentiell koordinierende Reste in der Qox.	137

<b>Abb. 43:</b> Regulatorische Elemente im Toluol/Xylol Katabolismus bei <i>P. putida</i> mt-2 pWW0.	148
<b>Abb. 44:</b> Schematische Darstellungen des Molybdänzentrums im substratgebundenen („ <i>very rapid</i> “) bzw. substratassoziierten („ <i>rapid</i> “) Zustand.	152
<b>Abb. 45:</b> Reaktionsmechanismus der Enzymreduktion, wie er für die Aldehyd-Oxidoreduktase aus <i>D. gigas</i> postuliert wird.	154
<b>Abb. 46:</b> Reaktionsmechanismus der Enzymreduktion am Beispiel der Xanthinoxidase.	155
<b>Abb. 47:</b> Gencodierende Bereiche auf dem 23 kb Insert des Cosmids pVK55B/5.	156
<b>Abb. 48:</b> Vergleich der von der Kynurenin-Formamidase bzw. der <i>N</i> -Acetylanthranilat- Amidase katalysierten Reaktionen.	159
<b>Abb. 49:</b> Operatorsequenzen, die von TetR (verwandten)-Repressoren erkannt werden.	167

### Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> <i>N</i> -Heterozyklische Substrate und Produkte der von der Chinaldin-4-Oxidase katalysierten Reaktionen.	9
<b>Tab. 2:</b> PCR- <i>primer</i> .	41
<b>Tab. 3:</b> Spezifische Qox-Aktivität in Rohextrakten von <i>P. putida</i> KT2440 pVK (Tc <sup>r</sup> , Km <sup>s</sup> ) Klonen und Umsetzungsprodukte cometabolischer Chinaldin-Konversion.	68
<b>Tab. 4:</b> Beschreibung der hypothetischen ORFs auf dem 23 kb Fragment aus pVK55B/5.	71
<b>Tab. 5:</b> Vergleich hypothetischer Promotorregionen.	73
<b>Tab. 6:</b> Verteilung von Aminosäuregruppen in der Chinaldin-4-Oxidase.	74
<b>Tab. 7:</b> <i>Codon usage</i> aller (potentiellen) Gene, die auf dem bekannten 23 kb Fragment lokalisiert sind.	84
<b>Tab. 8:</b> Vorhersage transmembraner Helices in dem ORF11 Protein nach HIROKAWA <i>et al.</i> (1998).	97
<b>Tab. 9:</b> Restriktionsanalyse des <i>qoxLMS</i> PCR-Produktes.	104
<b>Tab. 10:</b> Reinigung der Qox aus <i>P. putida</i> KT2440 pKP1/III ausgehend von 22 g feuchter Zellmasse.	109
<b>Tab. 11:</b> Konsensus-Sequenzen von Promotoren unterschiedlicher $\sigma$ -Faktor-Abhängigkeit.	133

---

**Abkürzungen**

A	Absorption
Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
AAA ATPase	<i>ATPase associated with diverse cellular activities</i>
<i>aacC1</i>	Gen für die 3-N-Aminoglycosid-Acetyltransferase AAC(3)-Ia
AARS	Aminoacyl-tRNA Synthetase
AASH	<i>aromatic acid/H<sup>+</sup> symporter</i>
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Acc. Nr.	Accession Number
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphate
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
Cm	Chloramphenicol
CMP	Cytidinmonophosphat
COG	<i>cluster of orthologous groups</i>
Cox	CO-Dehydrogenase aus <i>Oligotropha carboxidovorans</i>
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl-
ddeion.	doppelt deionisiert
deion.	deionisiert
DIG	Digoxigenin
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ds/esDNA	doppelsträngige/einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(N,N,N',N'-aminoethyltetraacetat)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
FAA	Fumarylacetoacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
g	Erdbeschleunigung
Gm	Gentamycin
GMP	Guanosinmonophosphat
h	Stunde(n)
HHDD	<i>2-hydroxy-hept-2,4-diene-1,7-dioic acid</i> (1-Hydroxy-penta-1,3-dien-1,5-dicarbonsäure)
Hod	<i>1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase</i> aus <i>Arthrobacter ilicis</i> Rü61a
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICAP-ES	<i>inductively coupled argon plasma-emission spectrometry</i>
IMP	Inosinmonophosphat
INT	Iodnitrotetrazoliumviolett (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
(k)V	(Kilo)Volt
LB	Luria-Bertani
$\lambda$	Wellenlänge des Lichtes
(m)M	(Milli)mol/Liter
MCD	Molybdo-Pyranopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
min	Minute(n)
MGD	Molybdo-Pyranopterin-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor
MLE	Muconat-lactonisierendes Enzym
MoCo	Molybdän-Cofaktor
MOD	Aldehyd-Oxidoreduktase aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
MOP	Aldehyd-Oxidoreduktase aus <i>Desulfovibrio gigas</i>
MPT	Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor
MR	Mandelat-Racemase

---

N	Normal
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid (3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylen)-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumchlorid])
<i>nptII</i>	Gen für die Neomycin/Kanamycin-Phosphotransferase-(Typ II)
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
OPET	5-Oxo-penta-3-en-1,2,5-tricarbonsäure
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pfam	<i>protein families</i> (Datenbank)
PHBH	<i>p</i> -Hydroxybenzoat-Hydroxylase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Qor	Chinolin-2-Oxidoreduktase aus <i>Pseudomonas putida</i> 86
<i>qorMSL</i>	Gencluster der Chinolin-2-Oxidoreduktase
Qox	Chinaldin-4-Oxidase aus <i>Arthrobacter ilicis</i> Rü61a
<i>qoxLMS</i>	Gencluster der Chinaldin-4-Oxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDR	<i>short chain</i> Dehydrogenasen/Reduktasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
(m)T	(Milli)Tesla
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Triose-Phosphat-Isomerase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan

---

U	Unit(s)
UE	Untereinheit(en)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
w/w	Gewichtsanteil am Gesamtgewicht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

### Abkürzungen für Aminosäuren

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Glu	E	Glutaminsäure	Ser	S	Serin
Gln	Q	Glutamin	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin
Ile	I	Isoleucin	Val	V	Valin

## Summary

Quinaldine 4-oxidase (Qox) from *Arthrobacter ilicis* R 61a belongs to the molybdenum hydroxylases, which are a subgroup of the mononuclear molybdenum enzymes, and harbours a molybdopterin cytosine dinucleotide (MCD) cofactor. Compared to other molybdenum hydroxylases, a unique feature of Qox is its broad substrate specificity. It catalyzes the regiospecific hydroxylation of a wide range of *N*-heteroaromatic compounds and the oxidation of various aldehydes.

A genomic library for the *A. ilicis* R 61a genome was generated. The genes coding for Qox were found in a gene cluster comprising 3783 bp; they are arranged in the transcriptional order *qoxLMS*. Comparison of the amino acid sequences of the Qox subunits with amino acid sequences of structurally known molybdenum hydroxylases showed that QoxL exhibits some well conserved amino acid residues involved in MCD binding and in catalysis. In QoxM, the FAD cofactor is presumed to be bound by amino acid residues corresponding to FAD cofactor binding residues of known molybdenum hydroxylases. Eight strictly conserved cysteine residues detected in the sequence of QoxS are postulated to be involved in binding the two [2Fe2S]-clusters Fe/SI and Fe/SII, which are discernible by EPR spectroscopy.

Construction of an expression clone is a prerequisite for genetic manipulation of the *qox* genes. The plasmid pKP1 was constructed by inserting the PCR amplified *qoxLMS* gene cluster into the expression vector pJB653. Qox was synthesized by *Pseudomonas putida* KT2440 pKP1 in a catalytically competent form. Qox from the expression clone was purified chromatographically in a four-step procedure to electrophoretic homogeneity. Its catalytic properties as well as the UV/Vis- and EPR-spectra corresponded to those of the wild-type enzyme. The release of cytidine monophosphate upon acidic hydrolysis of the enzyme indicated that the molybdenum cofactor in the recombinant enzyme is indeed an MCD cofactor. The available expression system allows the genetic manipulation of the *qox* genes. In order to investigate the involvement of distinct amino acids in catalysis, protein variants of Qox can be generated by site-directed mutagenesis.

Glutamate 736 in QoxL corresponds to a strictly conserved glutamate residue in molybdenum hydroxylases that has been predicted to be involved in the catalytic mechanism. Replacement of E736 by glutamine led to nearly complete loss of Qox activity, supporting the hypothesis that the carboxylate group of the glutamate is essential for catalysis. The activity of the protein variant QoxE736Q was below the detection limit of the spectrophotometrical enzyme assay, but it was detected after incubation of the enzyme with the artificial electron acceptor iodinitrotetrazolium chloride for 12 hours. In the functional enzyme, the carboxylate of the glutamate is assumed to activate the cosubstrate, a water molecule, by proton abstraction, followed by a nucleophilic attack of the hydroxide leading to the oxidation of the substrate.

## Summary

---

However, the result of the QoxE736Q replacement suggested that minor activity is also possible without activation of the water molecule.

A 10.8 kb fragment of the *A. ilicis* R61a genome was cloned in the cosmid vector pVK100, yielding pVK55/11. This cosmid conferred to *P. putida* KT2440 the ability to cometabolically convert quinaldine to anthranilate. Besides *qoxLMS* the genes encoding the enzymes catalyzing the three subsequent steps in quinaldine degradation are located on this fragment, namely, 1*H*-4-oxoquinaldine 3-monooxygenase, 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase, and *N*-acetylanthranilate amidase. The identity of the monooxygenase and the amidase were verified by gene knock-out. Disruption of the monooxygenase and the amidase gene by insertion of a kanamycin resistance cassette led to accumulation of the intermediates 1*H*-4-oxoquinaldine and *N*-acetylanthranilate, respectively, when *P. putida* KT2440 pVK55/11 was grown for cometabolic quinaldine conversion. Besides the catabolic genes, genes encoding a hypothetical transport protein and a potential molybdenum cofactor-inserting chaperone have been found.

On another 12.2 kb fragment of the *A. ilicis* R61a genome, eleven open reading frames were identified. They are assumed to encode a fragment of a glutamyl tRNA synthetase, an esterase, two oxidoreductases of the short-chain dehydrogenases/reductases family, a TetR-related transcriptional regulator, and an ATPase belonging to the AAA<sup>+</sup> superfamily. Further genes may code for an enzyme of the fumarylacetoacetate hydrolase family, for an enzyme showing similarity to the mandelate racemase group of enzymes, for a potential phosphohydrolase, for a hypothetical transmembrane protein and for a protein of unknown function. These proteins seem not to be involved in quinaldine degradation.

---

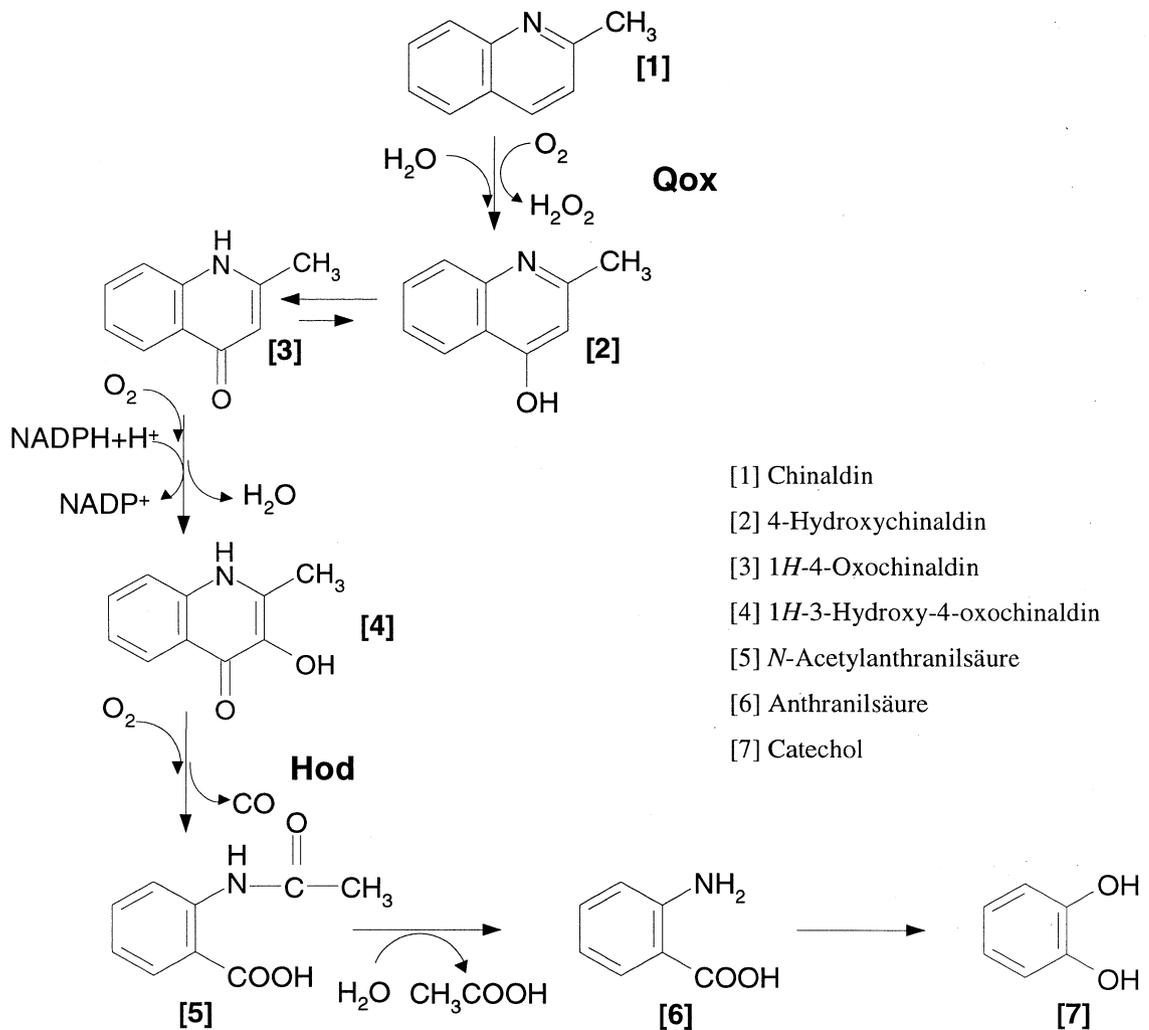
## 1. Einleitung

### 1.1. Plasmidkodierter Aromatenabbau

Aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sind in der Natur ubiquitär vorhanden. Xenobiotische, aromatische Verbindungen finden sich als Produkte der Ölindustrie und der chemischen Industrie, als Bestandteile von Farbstoffen und Arzneimitteln, als Pestizide, in Veraschungsprozessen oder in der Aufbereitung von Stein- und Braunkohleteer. Häufig fallen die zum Teil toxischen, mutagenen und kanzerogenen Verbindungen in Abwässern oder als Nebenprodukte in Produktionsprozessen an.

*Arthrobacter ilicis* Rü61a ist fähig, mit Chinaldin (2-Methylchinolin), das aus Stein- oder Braunkohleteer isoliert werden kann, als einziger Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu wachsen (DEMBEK *et al.*, 1989). Anhand der identifizierten Abbau-Intermediate: 1H-4-Oxochinaldin, 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin, N-Acetylanthranilat, Anthranilat und Catechol, wurde der so genannte Anthranilatweg als Chinaldin-Abbauweg für *A. ilicis* Rü61a postuliert (HUND *et al.*, 1990) (Abb. 1). Die Chinaldin-4-Oxidase (Qox) katalysiert in diesem Weg den ersten Schritt: die oxidative Hydroxylierung des Chinaldins zu 1H-4-Oxochinaldin.

Wie erst vor kurzem festgestellt wurde, sind die Gene zur Chinaldin-Degradation in *A. ilicis* Rü61a auf einem ca. 90-100 kb großen linearen Plasmid (pAIL) kodiert (HOMBURG, 2002). Dieses Plasmid gehört zu der Klasse linearer Plasmide, die an den 5'-Enden kovalent gebundene Proteine besitzen, wie durch Versuche mit verschiedenen Nukleasen gezeigt werden konnte (persönliche Mitteilung von S. Sielker). Während eine Plasmid-freie Mutante von *A. ilicis* Rü61a die Fähigkeit zum Wachstum auf Chinaldin und einigen Intermediaten des Anthranilatweges (Abb. 1) (1H-4-Oxochinaldin, N-Acetylanthranilat) verloren hatte, war das Wachstum mit Anthranilat als Substrat nicht beeinträchtigt (HOMBURG, 2002), woraus geschlossen werden kann, dass die Enzyme der ersten vier Schritte zum Chinaldin-Abbau auf pAIL kodiert sind. In verschiedenen Stämmen der Gattung *Arthrobacter*, die aus Bodenproben unterschiedlicher Standorte isoliert wurden und die die Fähigkeit zur Chinaldin-Degradation haben, konnten Plasmide identifiziert werden, die wahrscheinlich eine vergleichbare Größe haben wie pAIL. Vermutlich sind auch auf diesen Plasmiden die katabolen Enzyme zum Abbau von Chinaldin kodiert (persönliche Mitteilungen von S. Sielker und Dr. J. Overhage).

**Abb. 1**

Chinaldin-Abbau über den Anthranilatweg bei *A. ilicis* Rü61a.

ergänzt nach HUND *et al.*, 1990

bekannte Enzyme: Qox: Chinaldin-4-Oxidase, Hod: 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase

Die Fähigkeit, natürliche aromatische Kohlenwasserstoffe wie Ligninmetabolite zu mineralisieren, wird als evolutionärer Ursprung für die heute beobachtete mikrobielle Fähigkeit xenobiotische Aromaten zu degradieren, betrachtet (OHKUMA *et al.*, 2001). Eine Voraussetzung für die schnelle Entwicklung der Diversität und Flexibilität mikrobieller Mineralisationsfähigkeiten sind bewegliche genetische Elemente wie Transposons oder konjugative Plasmide, auf denen Gene für katabole Enzyme lokalisiert sind. Häufig sind die Gene für Enzyme von Abbauwegen oder Teilen von Abbauwegen in Transkriptionsmodulen organisiert, die durch neue Kombination den Bakterien verschiedenste Abbaufähigkeiten verleihen (VAN DER MEER *et al.*, 1992; WYNDHAM *et al.*, 1994; TAN 1999; MISHRA *et al.*, 2001).

---

Zu den am Besten untersuchten katabolen Plasmiden gehört das TOL Plasmid pWW0 aus *Pseudomonas putida* mt-2. Unter anderem sind auf diesem Plasmid katabole und regulatorische Gene lokalisiert, die für Enzyme der Metabolisierung von Toluol, Xylol und Derivaten dieser Substanzen kodieren (GREATED *et al.*, 2002, RAMOS *et al.*, 1997). Die Organisation der Gene dieser degradativen Enzyme ist in zwei Operons gegliedert: das *upper-pathway* Operon (*xylUWCMABN*) codiert für Enzyme, die an der oxidativen Umsetzung von Toluol, Xylol und deren Derivaten zu den entsprechenden aromatischen Carbonsäuren beteiligt sind. Enzyme, die im so genannten *meta-pathway* Operon (*xylXYZLTEGFJQKIH*) kodiert werden, katalysieren die Umsetzung dieser Zwischenprodukte zu Intermediaten des Tricarbonsäurezyklus. Die genetische Struktur des TOL Plasmids erscheint als Mosaik verschiedener Transposons, die ineinander verschachtelt in ein „Urplasmid“ inseriert sind; auch die Funktionen zum Aromatenabbau sind auf einem Transposon lokalisiert (GREATED *et al.*, 2002). Zudem kodieren einige Gene auf pWW0 für Transfer-Funktionen; in Konjugationsexperimenten konnten die selbsttransmissiblen Eigenschaften des Plasmids verifiziert werden (CHRISTENSEN *et al.*, 1998).

Enzyme zum Abbau von einkernigen Aromaten sind häufig Plasmid-kodiert. Plasmide, die Gene zur Degradation von Salicylat enthalten, wie z. B. das 165 kb große Plasmid pMWD-1 aus *P. putida* PMD-1 (ZUNIGA *et al.*, 1981), finden sich auch in weiteren Pseudomonaden (YEN & SERDAR, 1988). Gene, die für Enzyme zur Mineralisierung chlorierter Benzolverbindungen kodieren, sind in *Pseudomonas* sp. P51 auf einem 110 kb großen Plasmid in den zwei Operons *tcbAB* und *tcbCDEF* organisiert. Sie ermöglichen es dem Stamm auf 1,2- bzw. 1,4-Dichlorbenzol und 1,2,4-Trichlorbenzol als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen (VAN DER MEER *et al.*, 1991). Bei *Rhodococcus* sp. DK17, der zwei Megaplasme enthält, ist zumindest die Oxygenase, die den einleitenden Schritt zur Umsetzung von verschiedenen Alkylbenzolen in diesem Stamm katalysiert, auf einem der Plasmide lokalisiert (KIM *et al.*, 2002).

Auf einem konjugativen 184 kb großen Plasmid aus *Sphingomonas aromaticivorans* F199 sind Enzyme kodiert, die dem Stamm die Fähigkeit zur Degradation von Naphthalin, *m*-Xylol und Biphenyl verleihen (ROMINE *et al.*, 1999). Erstaunlicherweise finden sich auf dem Plasmid die katabolen Gene zur Umsetzung dieser Substrate nicht in Clustern den Abbauwegen entsprechend. Es existieren z. B. keine *bph*- oder *nah*-Operons, in denen die Enzyme zur Umsetzung polyzyklischer Aromaten zu monozyklischen Aromaten kodiert werden, wie es in anderen Bakterienstämmen zu beobachten ist (YEN & SERDAR, 1988; WATANABE *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass durch Erwerb, Modifikation und Umorganisation der Gene (Gencluster) neue Operons geschaffen wurden, die dem Stamm die Nutzung einer Vielzahl aromatischer Verbindungen erlauben. Interessanterweise findet man einen nahezu identischen DNA-Abschnitt, in dem die Gene zur Aromatendegradation in derselben Reihenfolge und

Transkriptionsrichtung vorliegen, bei dem Stamm *S. yanoikuyae* B1 chromosomal lokalisiert (KIM & ZYLSTRA, 1999).

Katabole Plasmide, die dem Wirt die Nutzung von Naphthalin als Wachstumssubstrat erlauben, wurden in mehreren Stämmen der Gattung *Pseudomonas* detektiert (YEN & SERDAR, 1988). Das 63 kb große Plasmid pLP6a aus *P. fluorescens* LP6a befähigt den Stamm darüber hinaus zum Wachstum auf Phenanthren und Anthracen. Die katabolen Gene liegen hier auf einem 38 kb Fragment, welches durch spontane Exision aus dem Plasmid entfernt wird, wenn der Stamm mit Benzoat als Kohlenstoffquelle gezüchtet wird (FOGHT & WESTLAKE, 1996).

In verschiedenen Vertretern der Gattung *Rhodococcus* wurden Plasmide entdeckt, die jeweils Teile der genetischen Ausstattung zum Abbau von polychlorierten Biphenylen enthalten. In *R. erythropolis* TA421 und *R. globerulus* sind *bphC*-Gene, die für 2,3-Dihydroxybiphenyl-Dioxygenasen kodieren, auf Plasmiden lokalisiert (KOSONO *et al.*, 1997). Auf den 1100 kb bzw. 450 kb großen, linearen Plasmiden pRHL1 und pRHL2 des Stammes *Rhodococcus* sp. RHA1 sind ebenfalls Teile des *bph*-Operons zur Umsetzung von Biphenyl-Verbindungen zu finden (SHIMIZU *et al.*, 2001).

Dioxin-artige Verbindungen, wie polychloriertes Dibenzofuran oder Dibenzo-*p*-Dioxin, die bei der Müllverbrennung, der Herstellung von Herbiziden oder auch bei Waldbränden anfallen, sind besonders wenn sie an Partikel absorbiert vorliegen in der Umwelt persistent und bergen ein hohes gesundheitliches Gefahrenpotential für den Menschen. Einige Bakterien, die polychlorierte Dibenzo-*p*-Dioxine umsetzen oder nicht-halogenierte Dioxin-Verbindungen mineralisieren, konnten bereits isoliert werden (WITTICH, 1998), unter ihnen *Terrabacter* sp. YK3. In diesem Stamm liegen die Gene, die für Enzyme zur Umsetzung von Dibenzofuran zu Salicylsäure benötigt werden, auf dem ca. 100 kb großen Plasmid pYK3 (IIDA *et al.*, 2002).

Stämme der Gattung *Arthrobacter* gehören zu den häufigsten Bodenbakterien. Sie zeichnen sich durch eine ausgeprägte Vielseitigkeit bei der Nutzung von Wachstumssubstraten aus, was ihnen einen Vorteil bei der Besiedelung verschiedenster Habitate verleiht. Sie weisen ebenfalls ein hohes Potential an Umsetzungsfähigkeiten gegenüber mono- oder polyzyklischen aromatischen Verbindungen auf, welches häufig an das Vorhandensein von Plasmiden geknüpft ist. Identische Plasmide wurden in *Arthrobacter* sp. M5 und *Arthrobacter* sp. P6 detektiert, die in beiden Stämmen für Enzyme zur Umsetzung von chlorierten Biphenylen zu Chlorbenzoaten kodieren (FURUKAWA & CHAKRABARTY, 1982). Gene, die für die Dehalogenierung von 4-Chlorbenzoat zu 4-Hydroxybenzoat notwendig sind, sind bei den Stämmen *Arthrobacter* sp. SU und *A. globiformis* KZT1 auf den Plasmiden pASU1 bzw. pBS1501 lokalisiert (SCHMITZ *et al.*, 1992; ZAITSEV *et al.*, 1991). *A. protophormiae* RKJ100 ist in der Lage, auf *ortho*-Nitrobenzoat, *para*-Nitrophenol und *para*-Nitrocatechol als einziger Kohlenstoff-, Stickstoff und Energiequelle zu wachsen. Die für den Abbau der Nitroaromaten essentiellen Gene

befinden sich in diesem Stamm auf einem etwa 65 kb großen Plasmid (CHAUHAN & JAIN, 2000; CHAUHAN *et al.*, 2000).

Die Degradation des Pestizides Carbaryl wird in *Arthrobacter* sp. RC100 durch zwei Plasmide vermittelt. Während Enzyme zur Umsetzung von Carbaryl zu 1-Naphthol durch das Plasmid pRC1 kodiert werden, sind die Gene des Abbauweges von 1-Naphthol zu Gentisat auf dem Plasmid pRC2 lokalisiert. Die vollständige Mineralisation des Gentisat wird durch chromosomal transkribierte Gene gewährleistet (HAYATSU *et al.*, 1999).

Das 165 kb große, selbsttransmissible Plasmid pAO1 ermöglicht es *A. nicotinovorans*, mit L-Nikotin als einziger C- und N-Quelle zu wachsen (BRANDSCH & DECKER, 1984). Innerhalb eines 27,7 kb langen Abschnitts des Plasmids wurden die Gene detektiert, die an der Umsetzung des Substrates und an der Assemblierung der benötigten Enzyme beteiligt sind. Dieser so genannte *nic*-Gencluster zeichnet sich durch einen auffällig geringen G + C-Gehalt innerhalb des Plasmids aus, zudem wird er von einer potentiellen Transposase und einem IS-Element flankiert (BAITSCH *et al.*, 2001, IGLOI & BRANDSCH, 2003). Zwei der an der Nikotin-Degradation beteiligten Enzyme, die Nikotin-Dehydrogenase und die Keton-Dehydrogenase, gehören wie die Qox aus *A. ilicis* Rü61a zu der Familie der molybdänhaltigen Hydroxylasen. Gene für Enzyme, die zur Biosynthese des Molybdo-Pyranopterin-Cofaktors essentiell sind, finden sich auf pAO1 auf einem weiteren 41 Gene umfassenden hypothetischen Transposon. Das Vorhandensein von Genen für potentielle Transposasen und deutliche Unterschiede im G + C-Gehalt verschiedener Abschnitte des Plasmids, lassen den Schluss zu, dass der *nic*-Gencluster und das DNA-Fragment, welches die Gene zur Biosynthese des Molybdo-Pyranopterin-Cofaktors enthält, durch Transpositionseignisse in ein ursprünglich kleineres Plasmid eingefügt wurden.

## 1.2. Mononukleare Molybdoenzyme

Während das Metall in der molybdänhaltigen Nitrogenase in einem multinuklearen MoFe<sub>7</sub>S<sub>9</sub>-Homocitrat-Cluster vorliegt (LAWSON & SMITH, 2002), sind mononukleare Molybdoenzyme dadurch definiert, dass das Molybdänatom an einen oder zwei identische Pyranopterin-Cofaktoren gebunden ist (HILLE, 2002). Der Begriff der „mononuklearen“ Molybdoenzyme soll in dieser Arbeit die CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* mit einschließen, obwohl dieses Enzym aufgrund neuer Daten bezüglich seines aktiven Zentrums einer neuen Familie, den „binuklearen“ Molybdoenzymen zugeordnet werden soll (GNIDA *et al.*, 2003).

Mononukleare Molybdoenzyme sind sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten weit verbreitet. In höheren Pflanzen, Algen und Pilzen katalysiert z. B. die assimilatorische Nitratreduktase die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und ist damit essentiell für die Nutzung von Nitrat als Stickstoffquelle in diesen Organismen. Bei Säugern sind besonders die Xanthindehydrogenase, welche die Umsetzung von Xanthin zu Harnsäure katalysiert, die

Aldehyd-Oxidase, wichtig z. B. im Metabolismus verschiedener Neurotransmitter (TERAO *et al.*, 1998), und die Sulfit-Oxidase von Bedeutung. Defekte in diesen Enzymen können zu schweren neurologischen Schäden führen (PAI & NISHINO, 2002). In Prokaryoten katalysieren mononukleare Molybdoenzyme unter anderem den einleitenden Schritt in der Degradation aromatischer Verbindungen oder in der Nutzung von CO als Kohlenstoffquelle bzw. als Elektronendonator. Andere Enzyme sind in die finale Elektronenübertragung in anaeroben Atmungsprozessen involviert.

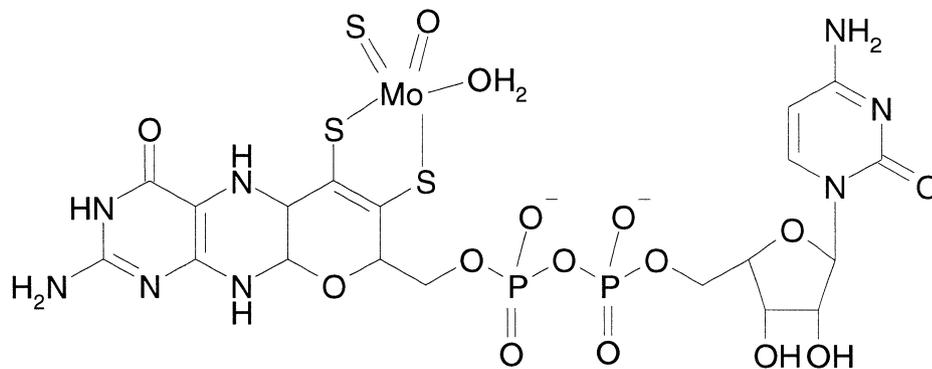
Ebenso divers wie die physiologischen Funktionen der Enzyme ist auch die Untereinheitenarchitektur der mononuklearen Molybdoenzyme. Während die Sulfit-Oxidase und die assimilatorische Nitratreduktase aus einer Untereinheit bestehen, die meistens dupliziert vorliegt, ist die Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktase aus *Rhodobacter capsulatus* ein monomeres Protein (SCHNEIDER *et al.*, 1996). Viele Xanthin-Oxidasen (HILLE, 1996) und auch die prokaryotischen Aldehyd-Oxidoreduktasen (ROMÃO *et al.*, 1995, REBELO *et al.*, 2000) zeigen ebenfalls eine  $\alpha_2$  Untereinheitenstruktur. Bei prokaryotischen Xanthindehydrogenasen wurden heterodimere Enzyme gefunden, bei denen die Untereinheiten dupliziert ( $\alpha_2\beta_2$ ) (XIANG & EDMUNDSON, 1996) oder in vierfacher Ausführung ( $\alpha_4\beta_4$ ) (HETTRICH & LINGENS, 1991) vorliegen. Eine einfache heterodimere Struktur ( $\alpha\beta$ ) wurde bei der Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* 7 detektiert (LEHMANN *et al.*, 1994). Daneben ist eine ganze Reihe von Enzymen bekannt, die eine heterotrimere Untereinheitenstruktur aufweisen. Auch hier findet man die Variationen eines einfachen ( $\alpha\beta\gamma$ ) (z. B. Nikotin-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAO1 (GRETHER-BECK *et al.*, 1994)) oder duplizierten ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) (z. B. Chinolin-2-Oxidoreduktase (Qor) aus *P. putida* 86 (BAUDER *et al.*, 1990)) Vorkommens der einzelnen Untereinheiten.

Auf der Basis der katalysierten Reaktionen können die Enzyme mit einigen Ausnahmen in zwei Kategorien unterteilt werden: erstens solche, die eine oxidative Hydroxylierung katalysieren und zweitens solche Enzyme, die ein Sauerstoffatom auf ein Substrat übertragen oder davon abstrahieren (HILLE, 1996; HILLE, 2002). Eine Besonderheit stellen die 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktasen aus *Thauera aromatica* und *Rhodopseudomonas palustris* dar. Diese Enzyme sind an der anaeroben Aromatendegradation beteiligt und katalysieren die reduktive Entfernung einer Hydroxylgruppe von 4-Hydroxybenzoyl-CoA unter Bildung von Benzoyl-CoA und Wasser. Der natürliche Elektronendonator der Reaktion ist ein Ferredoxin (GIBSON *et al.*, 1997; BOLL *et al.*, 2001).

Eine Klassifikation der mononuklearen Molybdoenzyme in drei Familien (molybdänhaltige Hydroxylasen, eukaryotische Oxotransferasen und prokaryotische Oxotransferasen) wird jedoch anhand der Strukturen der Molybdänzentren vorgenommen. In allen Familien wird das Molybdän durch eine Dithiolen-Seitenkette des Pyranopterin-Cofaktors koordiniert (Abb. 2). Während der organische Cofaktor in eukaryotischen und einigen prokaryotischen Enzymen als

Molybdo-Pyranopterin (MPT) vorliegt, wurden in vielen anderen prokaryotischen Enzymen Dinukleotid-Formen des MPT entdeckt. Dabei sind die Nukleosid-Monophosphate AMP, CMP, GMP, IMP oder Hypoxanthin-Monophosphat an die Phosphatgruppe des MPT gebunden (FISCHER & NIETER BURGMEYER, 2002) (Abb. 2).

Bei den molybdänhaltigen Hydroxylasen koordiniert das Metall neben dem Pyranopterin-Cofaktor in einer pyramidalen Anordnung einen Sauerstoff-, einen Sulfido- und einen Hydroxy- (oder Wasser-) liganden (Abb. 2). Es besteht keine direkte Bindung zwischen dem Molybdän und dem Protein, wobei die CO-Dehydrogenase mit einer Mo-S-Cu-S(Cys)-Brücke eine einmalige Ausnahme darstellt (GNIDA *et al.*, 2003; DOBBEK *et al.*, 2002). Neben dem Molybdän enthalten molybdänhaltige Hydroxylasen weitere Redoxzentren; verschiedene [2Fe2S]- und [4Fe4S]-Cluster und häufig FAD (LOWE, 2002). Der organische Cofaktor liegt bei Enzymen dieser Familie entweder als MPT oder in einer Dinukleotid-Form vor.



**Abb. 2**

Der Molybdo-Pyranopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor mit einem monooxo-monosulfido Molybdänzentrum.

Das Zentrum der eukaryotischen Oxotransferasen unterscheidet sich von dem molybdänhaltiger Hydroxylasen durch die Art der Molybdänliganden. Neben den Dithiolen-Schwefelatomen des MPT-Cofaktors ist ein Oxoligand und ein Hydroxyligand in der Struktur der Sulfid-Oxidase detektiert worden (KISKER *et al.*, 1997). Die fünfte Bindung besteht in diesen Zentren zwischen dem Metall und dem Schwefel eines Cysteinrestes des Proteins. Als zusätzliche redoxaktive Zentren treten in dieser Familie *b*-Typ Cytochrome und FAD auf (CANNONS *et al.*, 1993).

Das katalytische Zentrum der prokaryotischen Oxotransferasen enthält zwei Äquivalente des Pyranopterin-Cofaktors in einem so genannten Bis-Molybdo-Pyranopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD)-Cofaktor. Vier der Molybdän-Bindungen werden durch die Dithiolen-Schwefel der Pyranringe eingenommen, eine fünfte ist mit einem Oxoliganden besetzt. Über ein

Sauerstoffatom der Seitenkette eines Serinrestes besteht bei den DMSO-Reduktasen eine Verknüpfung mit dem Protein (SCHINDELIN *et al.*, 1996; SCHNEIDER *et al.*, 1996). Als alternative Proteinliganden des Metalls finden sich ein Schwefelatom eines Cysteinrestes oder das Selen eines Selenocysteinrestes in der dissimilatorischen Nitrat Reduktase aus *Desulfovibrio desulfuricans* bzw. der Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli* (FISCHER & NIETERBURGMAYER, 2002). Bei der Arsenit-Oxidoreduktase aus *Alcaligenes faecalis* besteht keine Bindung zum Protein; im reduzierten Enzym wurden nur fünf Mo-Liganden detektiert (ELLIS *et al.*, 2001). Neben dem Molybdänzentrum sind bei Enzymen dieser Familie unterschiedliche FeS-Cluster und verschiedene Cytochrome als weitere Redoxzentren bekannt (HILLE, 2002). Eine neue Familie von Enzymen, die einen Pyranopterin-Cofaktor enthalten, ist nach der Wolfram-abhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase benannt. Bei Enzymen dieser Familie ist ein Wolframatom anstelle des Molybdäns im aktiven Zentrum zu finden. Sie katalysieren einen Sauerstofftransfer bei gleichzeitiger Oxidation oder Reduktion des Substrats (ROY & ADAMS, 2002). Die Art der Pyranopterin-Cofaktoren ist innerhalb der Familie unterschiedlich. Während z. B. die Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* einen Pyranopterin-Cofaktor enthält (CHAN *et al.*, 1995), findet man in der Formiat-Dehydrogenase aus *D. gigas* einen Bis-Pyranopterin-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor (ALMENDRA *et al.*, 1999).

### 1.3. Die Chinaldin-4-Oxidase

Die Chinaldin-4-Oxidase katalysiert die Hydroxylierung von Chinaldin zu 1H-4-Oxochinaldin und leitet damit den Abbau des Chinaldins in *A. ilicis* Rü61a ein (Abb. 1). Das induzierbare Enzym hat eine Molekularmasse von 340 kDa; unter denaturierenden Bedingungen konnten drei Untereinheiten mit molekularen Massen von 82 kDa, 35 kDa und 22 kDa detektiert werden. Daraus wurde für die Qox eine  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  Untereinheitenstruktur abgeleitet (DE BEYER & LINGENS, 1993).

Pro mol Enzym wurde 1,6 mol Mo, 1,8 mol FAD, 7,6 mol Fe und 7,6 mol säurelabiler Schwefel gefunden. Diese Erkenntnisse, zusammen mit ESR-spektroskopischen Untersuchungen und dem Vergleich von UV/Vis-Spektren der gereinigten Qox mit denen bekannter Molybdo-Eisen/Schwefel-Flavoproteinen, führten zu der Annahme, dass die Qox als Redoxzentren zwei FAD-Cofaktoren, zwei mal zwei unterschiedliche [2Fe2S]-Zentren und zwei Molybdänatome, welche in Pyranopterin-Cofaktoren inseriert sind, enthält. Die Freisetzung von CMP aus der Qox nach einer Säurebehandlung führte zu dem Schluss, dass der Pyranopterin-Cofaktor als Molybdo-Pyranopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD)-Cofaktor vorliegt (DE BEYER & LINGENS, 1993). Die Inhibition des Enzyms durch Cyanid lässt darauf schließen, dass einer der Mo-Liganden ein Schwefelatom ist. Cyanid ist ein charakteristischer Inhibitor für molybdänhaltige Hydroxylasen, der durch Abstraktion des so genannten cyanolysierbaren

Sulfidoliganden die Bildung der inaktiven „desulfo“ Form des Enzyms herbeiführt (GUTTERIDGE *et al.*, 1978).

Der natürliche Elektronenakzeptor der Qox ist molekularer Sauerstoff, aber auch andere artifizielle Elektronenakzeptoren mit einem Standard-Redoxpotential von -8 mV oder höher können von dem Enzym reduziert werden (STEPHAN *et al.*, 1996). Während andere molybdänhaltige Hydroxylasen, die *N*-Heteroaromaten als Substrate nutzen, die Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms, welches benachbart zum *N*-Heteroatom liegt, katalysieren (LEHMANN *et al.*, 1994; BLÄSE *et al.*, 1996; FREUDENBERG *et al.*, 1988), wird Chinaldin durch die Qox in *para*-Stellung zu dem Stickstoffatom hydroxyliert. Neben Chinaldin kann die Qox eine Reihe weiterer *N*-Heteroaromaten mit zum Teil höheren Aktivitäten als Substrate nutzen (Tab.1) (STEPHAN *et al.*, 1996). Der nukleophile Angriff, der die Reaktion einleitet, kann bei verschiedenen Substraten regiospezifisch entweder in *para*-, oder auch in *ortho*-Position zu dem Heteroatom stattfinden. Dabei ist es irrelevant, ob die *ortho*-Position wie beim Chinaldin durch einen Substituenten besetzt ist oder nicht; so wird z. B. auch Chinolin in *para*-Position zu 1*H*-4-Oxochinolin hydroxyliert (Tab.1).

**Tab. 1**

*N*-Heterozyklische Substrate und Produkte der von der Chinaldin-4-Oxidase katalysierten Reaktionen.

nach STEPHAN *et al.*, 1996

Substrat	Produkt	relative Aktivität [%]
Chinaldin	1 <i>H</i> -4-Oxochinaldin	100
Chinolin	1 <i>H</i> -4-Oxochinolin	301
Chinazolin	3 <i>H</i> -4-Oxochinazolin	208
8-Chlorchinaldin	1 <i>H</i> -4-Oxo-8-Chlorchinaldin	746
2-Chlorchinolin	1 <i>H</i> -4-Oxo-2-Chlorchinolin	515
8-Chlorchinolin	1 <i>H</i> -4-Oxo-8-Chlorchinolin	169
Cinnolin	1 <i>H</i> -4-Oxocinnolin	132
Isochinolin	2 <i>H</i> -1-Oxoisochinolin	202
Phthalazin	2 <i>H</i> -1-Oxophthalazin	58

Neben den heterozyklischen Substraten vermag die Qox auch verschiedene Aldehyde zu den korrespondierenden Carbonsäuren zu oxidieren. Bevorzugt werden aromatische Aldehyde wie Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin oder Zimtaldehyd als Substrate genutzt. Die Reaktion an kurzkettigen, aliphatischen Aldehyden wird nicht katalysiert und auch gegenüber Butyraldehyd wurde nur geringe Aktivität registriert (STEPHAN *et al.*, 1996).

#### 1.4. Aufgabenstellung

Die Chinaldin-4-Oxidase stellt in Bezug auf die Flexibilität der Hydroxylierungsposition an heteroaromatischen Substraten und durch die Fähigkeit, die Oxidation von Aldehyden zu katalysieren, eine Besonderheit unter den molybdänhaltigen Hydroxylasen dar. Darum ist die Untersuchung katalytisch relevanter und solcher Aminosäurereste, die sowohl am Substratzugang zum katalytischen Zentrum als auch an der Substratpositionierung beteiligt sein könnten, bei diesem Enzym von besonderem Interesse.

Obwohl aufgrund der Röntgenstrukturanalyse der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *D. gigas* (ROMÃO *et al.*, 1995), einer molybdänhaltigen Hydroxylase mit MCD-Cofaktor, die Beteiligung bestimmter konservierter Aminosäurereste an der Substratbindung und der Katalyse postuliert wurde, konnte bis heute nur für Xanthindehydrogenasen, die einen MPT-Cofaktor enthalten, durch gerichteten Aminosäureaustausch die Relevanz einiger Aminosäurereste für die Substratpositionierung bzw. den Elektronentransfer verifiziert werden (GLATIGNY *et al.*, 1998, HUGHES *et al.*, 1992).

Eine Voraussetzung für die ortsspezifische Mutagenese ist jedoch die Verfügbarkeit eines Systems zur funktionellen, regulierten Expression der Enzym-kodierenden Gene. Während die Synthese aktiver Molybdoenzyme mit MPT- oder MGD-Cofaktor in Expressionssystemen mit *Escherichia coli* als heterologem Wirtstamm erfolgreich war (GARRETT & RAJAGOPALAN, 1994, TEMPLE *et al.*, 2000, POLLOCK & BARBER, 1997), erwies sich die funktionelle Expression von Genen, die für molybdänhaltige Hydroxylasen mit MCD-Cofaktor kodieren, bisher als schwierig. Versuche, die Gene der Chinolin-2-Oxidoreduktase (Qor) aus *P. putida* 86 (BLÄSE *et al.*, 1996) oder der CO-Dehydrogenase aus *P. thermocarboxydovorans* (BLACK *et al.*, 1990) funktionell in *E. coli* zu exprimieren, waren erfolglos. Die regulierte Expression der *qor*-Gene und die Synthese vollständig katalytisch aktiver Qor war erst vor kurzem erfolgreich. Sie war nur in einem System möglich, bei dem die Gene in einen *broad-host-range* Vektor kloniert wurden und dieses Konstrukt in einer *P. putida* 86-Mutante mit *qor*-Deletion etabliert wurde (FRERICHS-DEEKEN *et al.*, 2003).

Zur Herstellung eines Expressionssystems für die Qox sollten die *qox*-Gene auf dem Genom von *A. ilicis* Rü61a identifiziert und in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Das von einem heterologen Wirtstamm synthetisierte Enzym sollte gereinigt und durch kinetische, spektroskopische und biophysikalische Untersuchungen mit dem Wildtyp-Protein verglichen werden.

Anhand der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz können eventuell nach Vergleichen mit Sequenzen bekannter molybdänhaltiger Hydroxylasen potentiell katalytisch relevante Aminosäurereste in der Qox-Sequenz identifiziert werden. Zur Bestätigung der vermuteten Beteiligung an der Katalyse oder an der Substratbindung sollten diese Reste durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Definitionen

#### Enzymaktivität (Unit):

Zur Bestimmung der Aktivität kataboler Enzyme:

Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Enzymmenge, die bei 25 °C die Umsetzung von 1 µmol Substrat bzw. die Bildung von 1 µmol Produkt pro Minute katalysiert.

Für Restriktionsendonukleasen:

Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Enzymmenge, die bei den für das jeweilige Enzym optimalen Bedingungen 1 µg λ-Phagen-DNA in einer Stunde vollständig spaltet.

Für Ligasen:

Eine Weiss Unit (1 WU) ist die Enzymmenge, die notwendig ist, um in 20 Minuten 1 nmol <sup>32</sup>P aus Pyrophosphat zu [γ, β-<sup>32</sup>P]ATP bei 37 °C umzusetzen.

Für Polymerasen:

Eine Enzymeinheit (1 U) ist die Enzymmenge, die bei den für das Enzym optimalen Bedingungen innerhalb von 30 Minuten 10 nmol dNTP in eine säureunlösliche Substanz überführt.

#### Spezifische Aktivität:

U/mg Protein

#### g-Wert:

Der g-Wert charakterisiert die Lage eines Signals im ESR-Spektrum und ist ein Maß für die Größe der Aufspaltung der Energieniveaus im äußeren Magnetfeld. Er ergibt sich aus der Resonanzbedingung, bei der die Frequenz des angelegten Magnetfeldes gleich der Übergangsfrequenz des Elektronenspins sein muss:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot H$$

mit: ΔE: Energiedifferenz, die durch die Mikrowellen aufgebracht wird; h: Planck'sches Wirkungsquantum; ν: Frequenz der Mikrowellen; μ<sub>B</sub>: Bohr'sches Magneton, H: Feldstärke des äußeren, homogenen Magnetfeldes.

Dalton:

$$1 \text{ Da} = 1,66018 \times 10^{-24} \text{ g}$$

Kilobasen(paare):

$$1 \text{ kb} = 1000 \text{ Basen(paare)}$$

## 2.2. Geräte

Chromatographie: Biologic HR System mit Workstation, AV7-3 Sample Inject Valve, SV5-4 Select Valve, SV3-2 Diverter Valve, UV- und Leifähigkeitsdetektoren, Fraction Collector Model 2128: Bio-Rad, München; UNO Q-1, Bio-Scale MT5 und MT10 Säulen: Bio-Rad, München; HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade column, Pharmacia, Freiburg

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie: Bruker ESP300 Spektrometer, ESR900 Kryostat: Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe; Stickstoff-Dewar

Elektrophorese: Agarosegel-Elektrophorese: Horizontalgelkammern: Bio-Rad, München; Polyacrylamidgel-Elektrophorese: Vertikalgelkammern: lft-Labortechnik, Wasserburg; Netzgeräte: PowerPac PP3000: Biometra GmbH, Göttingen; PowerPac 300: Bio-Rad, München

Elektroporation: Elektroporator 2510: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg; Elektroporationsküvetten 2 mm: peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Fotodokumentation: Digitalkamera DC 120 Zoom: Kodak, New York/USA; Transilluminator TFP-M/WL: lft-Labortechnik, Wasserburg

HPLC: Waters 600, Controller 717, Autosampler 996, Photodioden-Array Detektor, Säule: Lichrosorb C-RP-18, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 4  $\times$  250 mm

ICAP-ES: Thermo Jarrell-Ash Enviro 36 Inductively Coupled Argon Plasm (ICAP)

Inkubation: Tischschüttler Typ 3020: GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel; Inkubationsschüttelmaschine Pilot Shake, B. Braun, Melsungen

PCR: T-Gradient: Biometra GmbH, Göttingen; Mastercycler gradient: Eppendorf AG, Hamburg

pH-Messgerät: pH 535 MultiCal<sup>®</sup>: WTW, Weilheim

Photometer: UV-160: Shimadzu Corporation, Kyoto/Japan; Pharmacia LKB Autofill III UV/Vis Spectrophotometer: Pharmacia GmbH, Freiburg

Sterilbank: Holten Safe 2000: Heto-Holten AS, Allerød/Dänemark

Ultrafiltration: VIVASPIN 4 (MW 10000 Da): Vivascience Ltd., Stonehouse/England

Ultraschallbad: Branson Typ 5210: G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Vakuumblotter: Vacu-Blot, Biometra GmbH, Göttingen

Vakuumpkonzentrator: Speed Vac<sup>®</sup> Plus SC110A: Savant Global Medical Instruments, Minnesota/USA

Vakuumpumpe: Vacuubrand MZ2C/2,4: Jürgens Laborbedarf, Bremen

Waagen: Analysenwaage Sartorius 2462: Sartorius AG, Göttingen

Wärmeschrank: Heraeus ET 504: Heraeus Instruments, Hanau

Wasseraufbereitungsanlage: ELGA STAT® UHQ PS: KSN Wassertechnik, Nistertal

Wasserbäder: Typ 1002 und Typ 1089: GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zellaufschluss: Branson Ultraschall Desintegrator Sonifier 250: G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Zentrifugen: Tischzentrifuge: 5417 C/R: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg; Beckman J2-21 M/E mit den Rotoren JA-10 und JA-20: Beckman Instruments, München; Kontron-Kühlzentrifuge Hermle ZK 400 mit dem Rotor A6-14: Hermle KG, Eichingen

### 2.3. Chemikalien, Enzyme, sonstige Materialien und Dienstleistungen

Aldrich, Steinheim: 4-Hydroxychinaldin, *N*-Acetylanthranilsäure, *N*-Laurylsarcosin

Bio-Rad, München: Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Bisacrylamid, TEMED

Biozym, Hessisch Oldendorf: Agarose large DNA Low Melt

Difco, Detroit/USA: Bacto Trypton, Bacto Hefeextrakt

Diagonal, Münster: Filterpapier Whatman 3MM

Eppendorf, Hamburg: 0,2 ml dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße, IPTG, X-Gal

Eurogentech, Seraing/Belgien: DNA-Größenstandard Smart ladder

Fluka Chemie AG, Neu-Ulm: Chinaldin, DTT, Diethylpyrocarbonat, EGTA, INT, Lysozym (aus Hühnereiweiß), 2-Methylbenzoat, Maleinsäure, Natriumbenzoat, Ribonuclease A

Interactiva, Ulm: 5'-Digoxigenin markierte Oligonukleotidsonde „b-DIG“

Macherey-Nagel GmbH, Düren: NucleoSpin® 2 in 1 Kit, Nylonmembran Porablot NYplus, DC-Kieselgel Platten Polygram® SIL/UV<sub>254</sub>

MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth: Agarase, DNA-Größenstandard  $\lambda$ -DNA/*Hind*III, PEG 8000, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Polymerase, *Taq*-Polymerase

Merck-AG, Darmstadt: Anthranilsäure, Benzonase, Bromphenolblau, PMSF, Proteinase K, RSA, SDS, Triton® X-100, Tween® 20

MWG-Biotech, Ebersberg: PCR-Primer, Kommerzielle DNA-Sequenzierung

peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen: E.Z.N.A.® Plasmid Mini Prep Kit I, peqGold Protein Standard

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg: DEAE-Sepharose CL-6B, Phenyl-Sepharose CL-4B, PCR dNTP-Set

Promega Corporation, Madison/USA: *Pfu*-Polymerase

Qiagen GmbH, Hilden: QIAprep Spin Miniprep Kit (Puffer 1-3), QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN Genomic-tip system, Genomic DNA Buffer Set

Roche Diagnostics, Mannheim: Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP), Anti-DIG-AP Fab Fragment, Blocking-Reagenz, DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Kit, DNA-Packaging Extract, High Pure PCR Product Purification Kit, T4-DNA Ligase

Roth, Karlsruhe: Agar-Agar, Agarose, Ampicillin, BCIP, EDTA, Ethidiumbromid, Kanamycin, NBT, Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Tris

Sartorius AG, Göttingen: Cellulose Acetat Filter (Porengröße 0,2 µm und 0,45 µm)

Scharlau, Barcelona/Spanien: Glycin, Trichloressigsäure

Schleicher & Schüll, Dassel: OE66 Nitrocellulose-Membranfilter 0,2 µm

Serva Feinbiochemika, Heidelberg: Chloramphenicol, Coomassie Brilliant Blue G-250, Gentamycin, Tetracyclin

Alle übrigen Chemikalien wurden ebenfalls in der handelsüblichen Form mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* verwendet.

## 2.4. Puffer und Lösungen

Inkubationspuffer für Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase, Polymerasen und die Ligase:

Es wurde der für das jeweilige Enzym von der Herstellerfirma bereitgestellte Puffer in der empfohlenen Konzentration verwendet.

Alle Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> hergestellt.

Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese:

TBE-Puffer (10-fach):           0,89 M Tris  
  0,89 M Borsäure  
  0,02 M EDTA, pH 8,0

Probenpuffer (10-fach):   25 % (w/v) Saccharose  
  0,05 % (w/v) Bromphenolblau  
  0,1 M EDTA, pH 8,0

Ethidiumbromidlösung:    0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE (1-fach)

Puffer für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

Sammelgelpuffer:           0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Trenngelpuffer:            3,0 M Tris/HCl, pH 8,8

---

nativer Tankpuffer (10-fach):	0,25 M Tris 1,92 M Glycin pH 8,3
SDS-Tankpuffer (10-fach):	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,3
nativer Probenpuffer:	gesättigte Bromphenolblau-Lösung in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
SDS-Probenpuffer:	0,3 M Tris 5 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,8
SDS-DTT-Lösung:	10 % (v/v) 1 M DTT (in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> ) 90 % (v/v) SDS-Probenpuffer

Lösungen für die Polyacrylamidgel-Färbung:

Färbelösung:	0,1 % (w/w) Coomassie Brilliant Blue R250 50 % (w/w) Trichloressigsäure 49,9 % (w/w) H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
--------------	---

Die Färbelösung wurde vor Gebrauch filtriert.

Entfärbelösung:	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig 60 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
-----------------	---

Puffer für die Proteinreinigung:

Puffer A:	100 mM Tris/HCl, pH 7,0
Puffer B:	50 mM Tris/HCl, pH 7,0
Puffer C:	50 mM Tris/HCl, pH 7,0 1 M NaCl

Puffer D: 100 mM Tris/HCl, pH 7,0  
0,75 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Puffer E: 50 mM Tris/HCl, pH 7,0  
0,25 M NaCl

Alle Puffer für die Chromatographie wurden vor Gebrauch durch Cellulose-Acetat Filter (0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert und entgast.

Bradford-Reagenz (BRADFORD, 1976):

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250  
50 ml Ethanol (96 %ig)  
100 ml Phosphorsäure (85 % (w/v))  
850 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$

Die Lösung wurde filtriert und vor Licht geschützt bei 4°C gelagert.

Puffer für DNA-Analysen:

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

Puffer und Lösungen für Hybridisierungsexperimente:

SSC-Puffer (20-fach): 3 M NaCl  
0,3 M Natriumcitrat  
pH 7,0

Maleinsäurepuffer: 100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl  
pH 7,5

Blocking-Lösung (10-fach): 10 % (w/v) Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) in Maleinsäurepuffer.

Die Blocking-Lösung wurde autoklaviert und bei -20°C gelagert.

---

Prähybridisierungslösung:	5 × SSC-Puffer 1 × Blocking-Lösung 0,1 % (w/v) <i>N</i> -Laurylsarcosin 0,02 % (w/v) SDS
Blockingpuffer:	10 % (v/v) Blocking-Lösung in Maleinsäurepuffer
Waschpuffer:	0,3 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20 in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl
Denaturierungslösung:	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1 M Tris/HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl

#### Stammlösungen und Antibiotika:

BCIP:	50 mg/ml in 100 % (v/v) DMF
NBT:	50 mg/ml in 70 % (v/v) DMF in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
IPTG:	200 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
X-Gal:	20 mg/ml in 100 % (v/v) DMF
Lysozym:	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
Proteinase K I:	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
Proteinase K II:	2 mg/ml in 2 × SSC
RNase A:	10 mg/ml in 10 mM Natriumacetat, pH 5,2

Die RNase A Lösung wurde für 15 min auf 100°C erhitzt. Nach langsamen Abkühlen wurde 0,1 Volumen Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 zugegeben.

#### Substratstammlösungen:

4-Hydroxychinaldin	750 mM in 50 % Isopropanol in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>
<i>N</i> -Acetylanthransäure	750 mM in Ethanol
Anthransäure	750 mM in Ethanol
Catechol	750 mM in H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>

			Endkonzentration im Medium für:	
Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	<i>P. putida</i> KT2440	<i>E. coli</i>
<b>Ampicillin</b>	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	500 µg/ml	60 µg/ml
<b>Chloramphenicol</b>	50 mg/ml	Ethanol (96 %ig)	300 µg/ml	50 µg/ml
<b>Gentamycin</b>	10 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	50 µg/ml	50 µg/ml
<b>Kanamycin</b>	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	50 µg/ml	50 µg/ml
<b>Tetracyclin</b>	5 mg/ml	Ethanol (96 %ig)	10 µg/ml	10 µg/ml

Alle wässrigen Lösungen wurden sterilfiltriert. Die BCIP- und NBT-Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Alle übrigen Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie:

I: Toluol/1,4-Dioxan/Eisessig, 60/16/1,6 (v/v/v)

II: Chloroform/Aceton, 1/1 (v/v)

Weitere Puffer und Lösungen sind bei der Beschreibung der einzelnen Methoden aufgeführt. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Standardmethoden, die nicht näher beschrieben werden, wurden nach SAMBROOK *et al.*, (1989) hergestellt.

## 2.5. Kulturmedien

LB-(Luria-Bertani-)Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989):

10,0 g Bacto Trypton  
 5,0 g Bacto Hefeextrakt  
 10,0 g NaCl  
 ad 1 l, pH 7,3

TB-(Terrific-Broth-) Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989):

12,0 g Bacto Trypton  
 24,0 g Bacto Hefeextrakt  
 4 ml Glycerin  
 ad 1 l

Direkt vor Gebrauch wurden 0,1 Volumen 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) zugeben.

Minimalmedium I:

- 1 g  $K_2HPO_4$
- 0,5 g  $KH_2PO_4$
- 0,2 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$
- 1 g NaCl
- 0,1 g  $FeSO_4 \times 7 H_2O$
- 1 ml Spurenelementlösung
- 1 ml Molybdatlösung
- ad 1 l, pH 7,3

Spurenelementlösung:

- 0,5 g  $H_3BO_3$
- 0,04 g  $CuSO_4 \times 7 H_2O$
- 0,2 g  $FeCl_3 \times 7 H_2O$
- 0,4 g  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
- 0,4 g  $MnSO_4 \times 7 H_2O$
- ad 1 l

Molybdatlösung: 10 g/l  $Na_2MoO_4 \times 7 H_2O$

Chinaldin-Minimalmedium (STEPHAN *et al.*, 1996):

Dem Minimalmedium I wurden nach dem Autoklavieren 0,5 ml/l Chinaldin insteril zugesetzt.

Succinat-Chinaldin-Minimalmedium:

Minimalmedium I mit:

- 8,1 g/l Natriumsuccinat  $\times 6 H_2O$
- 1 g/l  $(NH_4)_2SO_4$
- 1 ml/l Vitaminlösung

Die Vitaminlösung wurde dem autoklavierten Medium steril zugesetzt. Chinaldin wurde während des Wachstums insteril zugegeben.

Vitaminlösung:

- 20 mg Biotin
- 200 mg Niacin
- 100 mg Thiamin
- 50 mg *p*-Aminobenzoensäure
- 100 mg Panthothensäure
- 100 mg Pyridoxal-5-Phosphat
- 20 mg Cyanocobalamin

100 mg Riboflavin

10 mg Folsäure

ad 1 l

Die Vitaminlösung wurde vor Gebrauch sterilfiltriert.

Benzoat-Minimalmedium: 4,33 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
2,65 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1 g NaCl  
0,1 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
1,15 g Natriumbenzoat  
1 ml Molybdatlösung  
ad 1 l, pH 7,3

*E. coli*-Minimalmedium: 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
5,25 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
2,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2,7 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
8 g Glukose  
15 µg L-Prolin  
15 µg L-Leucin  
2 ml Vitaminlösung  
ad 1 l, pH 7,4

Von L-Prolin und L-Leucin wurden Stammlösungen (5 mg/l) hergestellt und sterilfiltriert. Die Aminosäuren und die Vitaminlösung wurden dem autoklavierten Medium steril zugegeben.

Alle Nährmedien wurden durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung fester Nährböden wurden 16 g/l Agar-Agar zugesetzt.

## 2.6. Bakterienstämme

### Arthrobacter ilicis Rü61a

(DEMBEK *et al.*, 1989)

*A. ilicis* Rü61a, der aus Teerraffinerieabwässern isoliert wurde, ist fähig, auf Chinaldin als einziger Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu wachsen. Der Stamm wurde von Herrn Dr. H. Höke, Rütgerswerke AG, Castrop-Rauxel, isoliert und von der DSMZ (Braunschweig) identifiziert.

### E. coli HB101

(BOYER & ROULLAND-DUSSOIX, 1969)

Genotyp: F,  $\Delta(gpt-proA)62$ , *leuB6*, *glnV44*, *ara-14*, *galK2*, *LacY1*,  $\Delta(mcrC-mrr)$ , *rpsL20* (Str<sup>r</sup>), *xyl-5*, *mtl-1*, *recA 13*

*E. coli* HB101 wurde sowohl als Spender für das Cosmid pVK100 genutzt, als auch als Empfänger der rekombinanten Cosmide zur Etablierung der Genbank von *A. ilicis* Rü61a.

### E. coli XL1-Blue MRF'

(JERPSETH *et al.*, 1992)

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183$   $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$  *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F'*proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15* Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

In *E. coli* XL1-Blue MRF' wurde die angereicherte Genbank für die Chinaldin-4-Oxidase aus *A. ilicis* Rü61a etabliert. Der Stamm diente außerdem als Spender des Plasmids pUC18.

### E. coli DH5 $\alpha$ F'

(WOODCOCK *et al.*, 1989)

Genotyp: F' *endA1*, *hsdR17*, (*r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA* (Nal<sup>r</sup>), *relA1*,  $\Delta(lacIZYA-argF)$ , *U169*, *deoR*, ( $\phi$  80*dlac* $\Delta(lacZ)M15$ )

*E. coli* DH5 $\alpha$ F' wurde als Wirtstamm für alle rekombinanten pUC18 Plasmide und für die Cosmide pVK55/11 bzw. pVK55/12 eingesetzt.

### E. coli S17-1

(SIMON *et al.*, 1983)

Genotyp: RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7): im Chromosom integriert, Tp<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, *Pro*, *res*, *mod*

*E. coli* S17-1 wurde als Donorstamm sowohl für das unveränderte Plasmid pSUP202, als auch für rekombinante pSUP202 Plasmide in Konjugationsexperimenten verwandt.

### *Pseudomonas putida* KT2440

(BAGDASARIAN *et al.*, 1981)

Genotyp: pWW0<sup>-</sup>, r<sup>-</sup>, m<sup>+</sup> (Spontane restriktionsdefiziente Mutante des Stammes *P. putida* mt-2). *P. putida* KT2440 wurde als Wirtstamm für das Plasmid pKP1 und für rekombinante Cosmide eingesetzt. In diesem Stamm wurden die *goxLMS*-Gene heterolog expremiert.

## 2.7. Vektoren

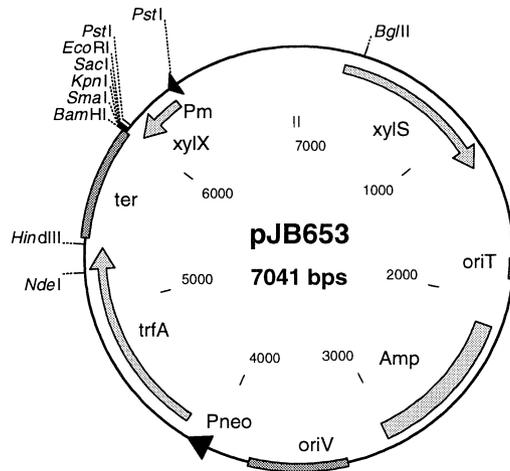
### 2.7.1. Der Plasmidvektor pUC18

Der von VIEIRA & MESSING (1982) entwickelte 2686 bp große *high-copy number* Vektor trägt ein ColE1-*origin* und vermittelt einem Wirtstamm durch Expression des  $\beta$ -Lactamasegens eine Ampicillinresistenz. Das Plasmid enthält ein *lacZ*-Genfragment des *lac*-Operons (*lacI'OPZ'*). Die Expression des *lacZ*-Genfragmentes führt zur Synthese der N-terminalen Aminosäuren des  $\alpha$ -Peptides der  $\beta$ -Galactosidase. Einige in der Molekularbiologie genutzte *E. coli* Stämme enthalten ein mutiertes *lac*-Operon ( $\Delta$ (*lacZ*)M15-Deletion), dessen Expression zur Synthese inaktiver  $\beta$ -Galactosidase führt. Dieses inaktive Enzym kann durch Expression des *lacZ*-Fragmentes von pUC18 komplementiert werden. Nach Induktion mit Allolactose oder dem Substratanalogon IPTG kann die Enzymaktivität der  $\beta$ -Galactosidase mit Hilfe des Substrates X-Gal, welches unter Bildung des blauen 5-Brom-4-chlorindigos gespalten wird, colorimetrisch nachgewiesen werden. Bei dem Plasmid pUC18 ist eine *multiple cloning site* (MCS) in das *lacZ*-Genfragment eingefügt (NORRANDER *et al.*, 1983). Insertion von DNA in die MCS führt dazu, dass von einem entsprechenden Wirtstamm keine aktive  $\beta$ -Galactosidase synthetisiert werden kann.

### 2.7.2. Der *broad-host-range* Expressionsvektor pJB653

Der 7041 bp große Vektor pJB653 (Abb. 3) wurde von BLATNY *et al.* (1997a, b) aus Teilen des selbst-transmissiblen Plasmids RK2 und regulativen Elementen des TOL Plasmids pWW0 aus *P. putida* mt-2 konstruiert. Aus dem 60 kb großen RK2 Plasmid der Inkompatibilitätsgruppe P1 (THOMAS, 1981) wurden der *oriV* (*origin of replication*) und das *trfA* Gen verwendet. Das RK2-Replikon liegt in einer Anzahl von vier bis sieben Kopien pro Chromosomenäquivalent vor, wobei das Genprodukt von *trfA* einen Regulationsfaktor darstellt, der durch Bindung an den *oriV* die Initiation und die Regulation der Replikation beeinflusst (DURLAND *et al.*, 1990). Die Transkription des *trfA* Gens wird von dem Tn5-Promotor *neo* initiiert. Funktionelle RK2-Replikons wurden in einer großen Anzahl Gram-negativer und einer Reihe Gram-positiver Bakterien etabliert. Die Stabilität dieser Plasmide über ein weites Wirtsspektrum wird auf den Einfluss der Operons *parCBA* und *parDE* zurückgeführt, wobei die Bedeutung der einzelnen

Operons von Wirt zu Wirt variiert (ROBERTS & HELINSKI, 1992; SIA *et al.*, 1995). Der Vektor pJB653 enthält keines der beiden Operons; hier wurden jedoch außerdem der *oriT* (*origin of transfer*) und das  $\beta$ -Lactamasegen aus dem RK2 Plasmid übernommen.



**Abb. 3** Der Expressionsvektor pJB653 (BLATNY *et al.*, 1997a, b).

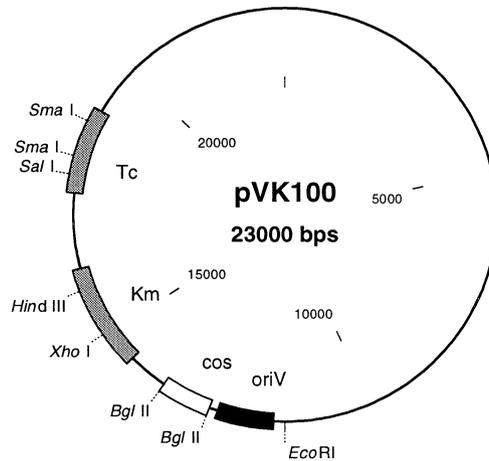
Elemente, die zur Regulation des inserierten Gens benötigt werden, entstammen dem TOL Plasmid. Das konstitutiv von dem  $\sigma^{70}$ -abhängigen *Ps2* Promotor transkribierte *xylS*-Gen (GALLEGOS *et al.*, 1996) und der *Pm* Promotor, die in pJB653 Anwendung finden, entstammen dem „*meta-pathway*“-Operon des Toluatabbaus. Die Transkription eines inserierten Gens wird durch Bindung eines aktiven XylS von dem  $\sigma^{32}$ - bzw.  $\sigma^{38}$ -abhängigen (MARQUÉS *et al.*, 1999) *Pm* Promotor aus stimuliert. Die Generierung von aktivem XylS, das *in vivo* im Gleichgewicht mit einer inaktiven Form vorliegt (bezogen auf die Fähigkeit der Transkriptionsstimulation), kann durch Zugabe eines positiven Effektors, Benzoat oder bestimmte substituierte Benzoatderivate (RAMOS *et al.*, 1986; RAMOS *et al.*, 1990), erreicht werden.

Ein bidirektionaler Terminator stoppt die Transkriptionen, die an dem *Pneo* Promotor einerseits und an dem *Pm* Promotor andererseits initiiert werden. Stromabwärts des *Pm* Promotors befindet sich ein 277 bp langes Fragment des *xylX*-Gens, welches auf dem Plasmid pWW0 für die Toluat-1,2-Dioxygenase codiert. Stromabwärts davon wurde durch gezielte Manipulationen eine *multiple cloning site* generiert, in die das zu exprimierende Gen inseriert werden kann.

### 2.7.3. Der Cosmid-Vektor pVK100

Die Replikationselemente (*oriV* und *trfA/trfB*) des von KNAUF & NESTER (1982) konstruierten Cosmid-Vektors pVK100 entstammen dem RK2 Replikon (s. 2.7.2.). Das 23 kb große Cosmid ist nicht selbst-transmissibel. Es enthält zwei Gene, deren Genprodukte

Resistenzen gegen Tetracyclin und Kanamycin vermitteln (Abb. 4). Restriktionsschnittstellen innerhalb dieser Gene erlauben es, diese Resistenzausprägungen bei Klonierungen als selektierbare Marker zu verwenden.



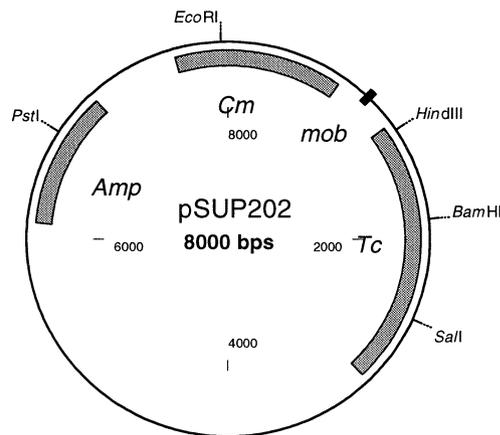
**Abb. 4** Der Cosmid-Vektor pVK100 (KNAUF & NESTER, 1982).

Eine aus dem Phagen- $\lambda$  stammende *cos*-Region erlaubt die Klonierung von DNA-Fragmenten von bis zu 29 kb Länge und eine Einbringung des rekombinanten Cosmids in einen Wirtstamm mit einem  $\lambda$ -*packaging* System.

#### 2.7.4. Der mobilisierbare Vektor pSUP202

Der Vektor pSUP202 wurde von SIMON *et al.* (1983) zusammen mit dem Stamm *E. coli* S17-1 entwickelt, um über Konjugation fremde DNA in das Genom Gram-negativer Bakterien außer *E. coli* zu integrieren. Der Vektor, der als pBR325 Derivat ein ColE1-Replikon trägt, enthält außerdem die *mob*-Region aus dem IncP1 Plasmid RP4 (BURKARDT *et al.*, 1979). Diese *mob*-Region enthält einen *oriT* und Erkennungssequenzen für *trans*-aktive Genprodukte der Transferegene des RP4 Replikons (SAMUELS *et al.*, 2000). Die benötigten *tra*-Gene wurden in das Chromosom von *E. coli* S17-1 integriert (s. 2.6.), so dass pSUP202 von diesem Stamm aus auf andere Stämme durch Konjugation übertragen werden kann, sich dort (außer in *E. coli*) aber nicht repliziert.

Das ca. 8 kb große Plasmid enthält zudem Resistenzdeterminanten für Ampicillin, Chloramphenicol und Tetracyclin (Abb. 5), die durch singuläre Schnittstellen auch als selektierbare Marker verwandt werden können.



**Abb. 5** Der mobilisierbare Vektor pSUP202 (SIMON *et al.*, 1983).

### 2.7.5. Der mobilisierbare Vektor pSUP*aacC1*

Da für Konjugationsexperimente zur Disruption der offenen Leserahmen 4 und 7 auf dem Cosmid pVK55B/5 der Tetracyclinresistenzmarker des Plasmids pSUP202 (Abb. 5) unerwünscht war, wurde das *tet*-Gen durch Insertion eines *aacC1*-Gens (Gentamycinresistenz) in die *HindIII*-Schnittstelle unterbrochen.

### 2.7.6. Das Plasmid pBG2b

Das Plasmid pBG2b wurde durch Insertion der Gene der Chinolin-2-Oxidoreduktase plus flankierender Bereiche in den Vektor pUC18 konstruiert. Die *qorMSL*-Gene wurden durch die Kanamycin-Resistenzkassette *nptII* ersetzt (FRERICHS-DEEKEN *et al.*, 2003). Plasmid-DNA von pBG2b diente als Matrize zur Amplifikation der *nptII*-Kassette mittels PCR.

### 2.7.7. Das Plasmid R202

Das Plasmid R202 (W. Klipp, Universität Bochum) trägt Gene, die Resistenzen gegen Chloramphenicol, Kanamycin und Gentamycin vermitteln. DNA von R202 wurde als Matrize zur PCR-Amplifikation der Gentamycin-Resistenzkassette *aacC1* genutzt.

## 2.8. Kultivierung der Bakterienstämme und Stammhaltung

### 2.8.1. Züchtung von *A. ilicis* Rü61a zur Induktion der Qox-Synthese

*A. ilicis* Rü61a wurde in Chinaldin-Minimalmedium (2.5.) bei 30°C aerob unter Schütteln (110 Upm) inkubiert. Der Chinaldin-Verbrauch wurde spektrophotometrisch im Kulturüberstand beobachtet; wenn das Substrat vollständig abgebaut war, wurde erneut Chinaldin (0,5 ml/l) zugesetzt. Der Stamm wurde wöchentlich in frisches Chinaldin-Minimalmedium überimpft. So gezüchtete Zellen wurden zum Nachweis der Qox-Aktivität im Wildtyp und zur Isolierung genomischer DNA verwandt.

### 2.8.2. Züchtung von *P. putida* KT2440 mit rekombinanten pVK100-Cosmiden zum Nachweis der cometabolischen Chinaldin-Degradation

Die *P. putida* KT2440 pVK-Klone wurden in Succinat-Chinaldin-Minimalmedium (2.5.) mit den entsprechenden Antibiotika bei 30°C aerob unter Schütteln (110 Upm) inkubiert. Kulturen von 500 ml wurden mit 50 ml Übernacht-Vorkulturen inokuliert. Zur Induktion der Expression der *qox*-Gene wurde den Hauptkulturen 0,1 ml/l Chinaldin zugesetzt, nachdem die Zelldichte ( $OD_{600nm}$ ) um 0,6-0,8 angestiegen war. Weiteres Wachstum wurde photometrisch über die Änderung der  $OD_{600nm}$  verfolgt; der Abbau des Chinaldins wurde spektrophotometrisch im abzentrifugierten Kulturüberstand beobachtet. Die erhaltenen Spektren wurden mit denen von originalen Referenzsubstanzen (2.4.) verglichen. Als Referenzen wurden bekannte Abbauprodukte des Anthranilatwegs von *A. ilicis* Rü61a (4-Hydroxychinaldin, *N*-Acetylanthranilat, Anthranilat, Catechol) eingesetzt (HUND *et al.*, 1990).

Zur Gewinnung von Zellmasse wurden die Klone mehrfach mit jeweils 30 mM Succinat nachgefüttert und es wurde nach sichtbarem Abbau des Chinaldins erneut Chinaldin zugesetzt. Die Zellen wurden bei einer  $OD_{600nm}$  von ca. 2,5-3 durch Zentrifugation (4°C, 5000 × g) geerntet.

Zur Untersuchung der konstitutiven Qox-Synthese wurden *P. putida* KT2440 pVK-Klone in Succinat-Chinaldin-Minimalmedium ohne Zusatz von Chinaldin bis zu einer  $OD_{600nm}$  von ca. 2,5-3 gezüchtet und geerntet.

Zur Kontrolle, ob *P. putida* KT2440 pVK100 ohne inserierte, fremde DNA in der Lage ist, Chinaldin oder eines der Abbaufolgeprodukte (HUND *et al.*, 1990) umzusetzen, wurden den wachsenden Kulturen die Substrate in einer Konzentration von 7,5 mM (Chinaldin 0,8 mM) zugesetzt. Mögliche Umsetzung der Substanzen wurde im Spektrum des Kulturüberstandes verfolgt.

### 2.8.2.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Umsetzungsprodukten

Um Produkte der cometabolischen Umsetzung von Chinaldin im Kulturüberstand von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 bzw. Derivaten nachzuweisen, wurden während des Wachstums in geeigneten Zeitintervallen 1 ml Proben entnommen und abzentrifugiert (2 min, 20000 × g, 4 °C), der Kulturüberstand wurde mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure angesäuert. Die protonierten Substanzen gingen durch Ausschütteln mit 100 µl Essigsäureethylester von der wässrigen Phase in die Lösungsmittelphase über. Das Chromatogramm wurde auf Kieselgelplatten mit UV-Indikator in Laufmittel I oder II (2.4.) entwickelt. Unter UV-Licht (254 nm) konnten die aufgetrennten Substanzen sichtbar gemacht werden.

### 2.8.3. Züchtung von *E. coli* HB101 pVK55B/5 zur Induktion der Expression der *qoxLMS*-Gene

*E. coli* HB101 pVK55B/5 wurde in *E. coli*-Minimalmedium mit Tetracyclin bei 37°C aerob unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1 kultiviert und dann mit 0,1 ml/l Chinaldin induziert. Das Wachstum wurde über die Änderung der OD<sub>600nm</sub> photometrisch verfolgt, der Abbau des Chinaldins im UV/Vis-Spektrum des abzentrifugierten Kulturüberstand sichtbar gemacht. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von ca. 2 wurden die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 5000 × g, 20 min) geerntet. Zum direkten Vergleich wurde *P. putida* KT2440 pVK55B/5 unter denselben Bedingungen gezüchtet.

### 2.8.4. Züchtung von *P. putida* KT2440 pKP1 zum Nachweis cometabolischer Chinaldin-Umsetzung und zur Synthese aktiver Qox

Zum Nachweis der cometabolischen Chinaldin-Umsetzung wurden *P. putida* KT2440 pKP1 Klone in Benzoat-Minimalmedium (2.5.) bei 30°C aerob in 500 ml Kulturen gezüchtet, die mit 50 ml Vorkulturen angeimpft wurden. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 wurde 2 mM 2-Methylbenzoat als zusätzlicher XylS-Induktor (vergl. 2.7.2. und 4.3.3.) zugesetzt, und bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,2 wurde 0,1 ml/l Chinaldin in die Kultur gegeben. Die Umsetzung des Chinaldins wurde spektrophotometrisch im Kulturüberstand verfolgt. Benzoat (8 mM) wurde mehrmals als Wachstumssubstrat nachgefüttert.

Die Chinaldinkonzentration im Kulturüberstand wurde wie bei STEPHAN (1993) beschrieben errechnet.

Zur XylS-induzierten Synthese aktiver Qox wurden die Zellen wie oben beschrieben in 500 ml Benzoat-Minimalmedium jedoch ohne Zusatz von Chinaldin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 3 gezüchtet und durch Zentrifugieren geerntet (4 °C, 5000 × g, 20 min).

Zur Gewinnung von größeren Mengen Zellmasse erfolgte die Züchtung von *P. putida* KT2440 pKP1/III in 4 l Glasfermentoren. Die Zellen wurden in zwei aufeinander folgenden Vorkulturen

(100 ml und 500 ml) angezüchtet; die zweite Vorkultur diente bei einer  $OD_{600nm}$  von ca. 3 dazu, 3,5 l Medium in dem Fermentor anzupfen. Der Verbrauch des Substrates Benzoat wurde im Kulturüberstand spektrophotometrisch verfolgt (FRERICHS-DEEKEN, 2000). Bei Bedarf wurde mit 8 mM Benzoat nachgefüttert. Wenn die Kulturen eine  $OD_{600nm}$  von 1,5 erreicht hatten, wurde die Expression der *qox*-Gene zusätzlich durch die Zugabe von 2 mM 2-Methylbenzoat induziert. Nach ca. 12 h Inkubationsdauer wurden die Kulturen bei einer  $OD_{600nm}$  von 3,5–4 durch Zentrifugation bei 4°C und  $5000 \times g$  geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 2.8.5. Stammhaltung

*A. ilicis* Rü61a wurde in flüssigem Chinaldin-Minimalmedium kultiviert (2.8.1.) sowie auf festem Chinaldin-Minimalmedium angezogen. Nach einer Bebrütungsdauer von 3-4 Tagen bei 30°C wurden die Platten bei 4°C gelagert.

*P. putida* KT2440-Klone wurden auf festem LB-Selektionsmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. *E. coli*-Klone wurden den Resistenzen verleihenden Plasmiden entsprechend auf LB-Selektionsplatten bei 37°C inkubiert. Alle Stammhaltungsplatten wurden vier Wochen bei 4°C gelagert, bevor sie erneut überimpft wurden.

Zur dauerhaften Konservierung aller Wildtyp-Stämme und Klone wurden Übernachtskulturen in den entsprechenden Medien angelegt. Nach dem Abzentrifugieren von jeweils 2 ml der Kulturen wurden die Zellpellets in 200 µl LB-Medium plus 200 µl einer sterilen Glycerinlösung (65 % (v/v) Glycerin, 0,1 M  $MgSO_4$ , 25 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

## 2.9. Isolierung genomischer DNA

### 2.9.1. Isolierung genomischer DNA aus *A. ilicis* Rü61a mit QIAGEN Genomic-tip 20/G

Zur Erstellung einer Genbank wurde genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a über Säulen der Firma QIAGEN gereinigt. Das Prinzip der Reinigung besteht aus der selektiven Bindung der DNA in einem Puffer niedriger Salzkonzentration an eine Anionen-Austauschmatrix, während z. B. Proteine oder RNA nicht gebunden werden. In einem Waschschrift mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration und geringer Ethanolkonzentration werden schwach gebundene Verunreinigungen von der Säule entfernt, während die DNA in einem letzten Schritt mit einem Puffer hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert wird (QIAGEN, 1999). Alle hier verwendeten Puffer und Lösungen entstammten dem „Genomic DNA Buffer Set“ (QIAGEN). Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das vom Hersteller vorgegebene Protokoll variiert.

Verwendete Lösungen:

- B1 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA  
B2 3 M Guanidin-HCl; 20% Tween®20  
QBT 50 mM MOPS, pH 7,0; 750 mM NaCl  
QC 50 mM MOPS, pH 7,0; 1 M NaCl  
QF 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 1,25 M NaCl

*A. ilicis* Rü61a wurde zur Gewinnung genomischer DNA nach 2.8.1. gezüchtet. Drei Milliliter einer drei Tage alten Kultur wurden für 5 min bei RT zentrifugiert ( $5000 \times g$ ); das Zellpellet wurde in 1 ml Puffer B1 (mit 200 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Stammlösung (100 mg/ml) und 45 µl Pronase-Stammlösung (20 mg/ml) folgte eine zweieinhalbstündige Zellwandlyse bei 37°C. Anschließend wurden 350 µl Lösung B2 zugesetzt und es wurde mehrere Male vorsichtig durch Invertieren des Gefäßes gemischt. Während einer einstündigen Inkubation bei 50°C wurden Proteine vollständig denaturiert. Das Lysat wurde für 10 min bei  $5000 \times g$  und 4°C zentrifugiert, der Überstand mit einer äquivalenten Menge Puffer QBT verdünnt und auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Anionen-Austauschsäule gegeben. Die Säule wurde zwei Mal mit 3 ml Puffer QC gewaschen, um im letzten Schritt die genomische DNA mit zwei Mal 1 ml Puffer QF von der Säule zu eluieren.

Die DNA wurde mit einer Isopropanol Fällung präzipitiert (2.11.1.) und in TE-Puffer resuspendiert.

### 2.9.2. Isolierung genomischer DNA aus *A. ilicis* Rü61a nach HOPWOOD *et al.* (1985)

Nach HOPWOOD *et al.* (1985) isolierte genomische DNA wurde für Hybridisierungsexperimente und zur Erstellung einer angereicherten Genbank eingesetzt. Diese Methode wurde zur Isolierung genomischer DNA aus Streptomycceten entwickelt, hat sich jedoch auch bei *A. ilicis* Rü61a bewährt.

50 ml einer drei Tage alten nach 2.8.1. gezüchteten *A. ilicis* Rü61a Kultur wurden bei 4°C für 10 min ( $5000 \times g$ ) abzentrifugiert und in 25 ml sterilem  $H_2O_{\text{ddeion.}}$  gewaschen. Die Zellen wurden in 5 ml TE-Puffer, der 2 mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert und während einer 60minütigen Inkubation bei 30°C lysiert. Zum Nachweis der Lyse wurde ein Tropfen der Suspension mit einem Tropfen 10 %igem (w/v) SDS gemischt; die Lyse war vollständig, wenn sich die vorher trübe Suspension aufklärte. Nach Zugabe von 1,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8) und 130 µl Proteinase K-Stammlösung I (2.4.) wurde für 10 min bei 37°C inkubiert; nach Zugabe von 700 µl 10 %igem SDS erfolgte die Inkubation für weitere 2 h bei gleicher Temperatur. Es wurde in regelmäßigen Abständen vorsichtig durch Invertieren gemischt. Die Abtrennung der Proteinfraction erfolgte durch eine Extraktion mit Phenol (2.12.). Die DNA in der wässrigen Phase wurde mittels Isopropanolfällung (2.11.1.) entsalzen und aufkonzentriert. Die in 1 ml TE-Puffer resuspendierte DNA wurden dann 1 h bei 37°C mit RNase A (40 µg/ml) behandelt. Zur

Inaktivierung und Entfernung des Enzyms wurde eine Phenolextraktion (2.12.) mit nachfolgender Isopropanolfällung (2.11.1.) durchgeführt. Die genomische DNA wurde in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### 2.9.3. Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*

Die in Hybridisierungsexperimenten benötigte genomische DNA aus *E. coli*-Stämmen wurde nach DAVIS *et al.* (1980) isoliert.

1 ml einer LB-Übernachtskultur (2.5.) des entsprechenden *E. coli*-Stammes wurde bei 4°C für 5 min abzentrifugiert ( $11000 \times g$ ) und in 0,5 ml sterilem  $H_2O_{\text{deion.}}$  gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 0,5 ml frisch angesetzter Lysozym-Lösung (50 mM Tris/HCl (pH 8,5), 50 mM EDTA, 50 % (w/v) Saccharose, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l Diethylpyrocarbonat (DNase Inhibitor) und 10  $\mu$ l 10 %igem SDS wurde für 5 min bei 70°C inkubiert. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l 5 M Kaliumacetat, gründlicher Durchmischung und einer Inkubation auf Eis (30 min) wurden die Protein-SDS-Komplexe ausgefällt und in einer anschließenden Zentrifugation (30 min,  $11000 \times g$ , 4°C) sedimentiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mittels Isopropanolfällung (2.11.1.) präzipitiert. Die genomische DNA wurde in 50  $\mu$ l TE-Puffer mit 10  $\mu$ g/ml RNase A resuspendiert und bei -20°C gelagert.

## 2.10. Isolierung von Plasmid-DNA

### 2.10.1. QIAGEN Plasmid Midi Kit

Um Plasmide bzw. Cosmide im größeren Maßstab zu präparieren, wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet. Die Gewinnung reiner Plasmid-DNA beruht dabei auf der Abtrennung der genomischen DNA aufgrund deren Präzipitation mit gebundenen Zellwandkomplexen und der selektiven Bindung von Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauschmatrix unter niedrigen Salzkonzentrationen (QIAGEN, 1997). Alle verwendeten Puffer wurden dem Kit entnommen.

10 ml LB-Selektionsmedium (2.4.) wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert. Nach achtstündiger Inkubation bei 37°C wurden 0,2 ml der Zellsuspension in 100 ml frisches LB-Selektionsmedium überführt; es wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Die Plasmidpräparation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die von den Säulen eluierte DNA wurde mittels Isopropanolfällung (2.11.1.) entsalzen und aufkonzentriert, um in 0,2-0,5 ml TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert zu werden.

### 2.10.2. E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I

Diese Methode der Plasmidreinigung beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979) und einer selektiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Silicamembran. Die Präparation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Präparation von *high-copy number* Plasmiden wurden 1,5-3 ml einer 10 ml Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes eingesetzt, zur Präparation von *low-copy number* Plasmiden 8 ml. Die Plasmid-DNA wurde mit 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) oder sterilem H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>, wenn die DNA für Sequenzierungen genutzt werden sollte, von den Säulen eluiert.

### 2.10.3. Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Zur Analyse von Transformanten wurde deren Plasmid-DNA durch alkalische Lyse isoliert.

Verwandte Lösungen:

P1 50 mM Tris/Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA

P2 200 mM NaOH, 1% SDS

P3 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

1,5 ml Zellsuspension einer 10 ml Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes in LB-Selektionsmedium wurden nach dem Sedimentieren (RT, 10000 × g, 10 min) in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lösung P2 und kurze Inkubation bei RT. Proteine und andere Kontaminationen wurden durch Zugabe von 350 µl Lösung P3 präzipitiert. Der DNA-haltige, klare Überstand der nachfolgenden Zentrifugation (4°C, 11000 × g, 10-15 min) wurde in ein sauberes Gefäß überführt und einer Isopropanolfällung (2.11.1.) unterzogen. Die Plasmid-DNA wurde in 40-50 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) resuspendiert. Sollten DNA-Fragmente nachgewiesen werden, die kleiner als 1,5 kb groß waren, wurden der DNA-Lösung 0,2 µl einer RNase A-Stammlösung (2.4.) zugesetzt.

## 2.11. Präzipitation von DNA

Nukleinsäuren bilden in Gegenwart von monovalenten Kationen und Alkoholen ein unlösliches Präzipitat. Durch Zentrifugation kann dieser Niederschlag sedimentiert werden, die Nukleinsäuren werden so aufkonzentriert und von Salzen gereinigt.

### 2.11.1. Isopropanolfällung

Die Isopropanolfällung mit Natriumacetat wurde bis auf wenige Ausnahmen (s. u.) für alle Anwendungen eingesetzt.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) angesalzen (Endkonzentration 0,3 M) und mit 0,8-1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde der

Ansatz für 30 min bei RT inkubiert, worauf eine Zentrifugation für 30 min bei 11°C (20000 × g) folgte. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem, 70 %igem Ethanol gespült. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 20000 × g, 4°C) und Entfernung des Überstandes wurde die DNA im Vakuum getrocknet. Anschließend konnte die DNA in einem adäquaten Volumen 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) oder H<sub>2</sub>O<sub>ddeion.</sub> aufgenommen werden.

### 2.11.2. Ethanolfällung

Sollten geringe Mengen an DNA konzentriert werden, so wurden der DNA-Lösung 2,5 Volumina eiskaltes, 96 %iges Ethanol zugesetzt. Als präzipitierendes Salz wurde entweder Natriumacetat (Endkonzentration 0,3 M) oder LiCl (Endkonzentration 0,8 M) verwandt. LiCl löst sich besser in Ethanol als andere Salze, so dass die aufkonzentrierte DNA weniger Salz enthält (SAMBROOK *et al.*, 1989). Außerdem wurde dem Ansatz 1 µl Glycogen (20 mg/ml) zugesetzt, bevor er für 30 min bei -80°C inkubiert wurde. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 20000 × g. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet, um dann in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) oder H<sub>2</sub>O<sub>ddeion.</sub> aufgenommen zu werden.

Aus *low melt*-Agarosegelen extrahierte große DNA-Fragmente (2.19.2.) wurden in Gegenwart von Ammoniumsulfat (Endkonzentration 2,5 M) präzipitiert, da Oligosaccharide, die nach einer Agarasebehandlung noch in dem Ansatz vorhanden waren, in Anwesenheit von Ammoniumsulfat nicht kopräzipitieren. Dem Ansatz wurden neben dem Salz 2,5 Volumina eiskaltes, 96 %iges Ethanol zugesetzt. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 4°C, Zentrifugation (30 min, 20000 × g, 4°C), Waschen der DNA in 70 %igem Ethanol und Trocknen der DNA unter Vakuum.

### 2.12. Deproteinisierung von DNA-Lösungen mittels Phenol-Chloroform Extraktion

Aufgrund der denaturierenden Wirkung von organischen Lösungsmitteln auf Proteine können DNA-haltige Lösungen durch Extraktion mit einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) von Proteinkontaminationen befreit werden.

Der DNA-haltigen Lösung wurde ein äquivalentes Volumen der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung zugesetzt und es wurde geschüttelt, bis sich eine Emulsion ausgebildet. Zur Trennung der Phasen erfolgte eine Zentrifugation bei RT und 6000 × g für 5 min. Die denaturierten Proteine befanden sich in der Interphase zwischen der organischen Phase und der DNA enthaltenen, wässrigen Phase. Letztere wurde vorsichtig in ein

neues Gefäß überführt und erneut mit dem Lösungsmittelgemisch extrahiert. Dieses wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Danach wurde die DNA-haltige Phase zwei Mal mit äquivalenten Volumina Chloroform extrahiert, um Phenolrückstände aus der DNA-Präparation zu beseitigen. Um die DNA von allen organischen Lösungsmitteln zu reinigen und um die DNA-Konzentration zu erhöhen, wurde eine Isopropanolfällung (2.11.1.) angeschlossen.

### **2.13. Bestimmung der DNA-Reinheit und –Konzentration**

Die Konzentration genomischer DNA wurde nach der Präparation spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg dsDNA/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Reinheit der Präparation wurde über den Quotienten  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  bestimmt. Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0, während Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol den Quotienten erniedrigen.

Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA und kleineren DNA-Fragmenten wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese (2.18.) aufgetrennt, wobei Plasmide zuvor durch Restriktion (2.14.) in die lineare Form gebracht wurden. Ein Vergleich der durch das Ethidiumbromid hervorgerufenen Fluoreszenzintensivität dieser Banden mit einem quantifizierbaren Größenstandard (2.3.) ermöglichte das Abschätzen der DNA-Konzentration.

### **2.14. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Erfolgt die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in doppelsträngiger DNA durch Restriktionsendonukleasen symmetrisch innerhalb der Sequenz, entstehen „glatte Enden“, erfolgt sie asymmetrisch, entstehen entweder 5'-überhängende oder 3'-überhängende Enden, die als „kohäsive Enden“ bezeichnet werden.

Zur Analyse rekombinanter Plasmide wurden ca. 0,5 µg nach 2.10.3. isolierter DNA eingesetzt. Diese wurde in einem Ansatz von 10-15 µl mit einem vom Enzymhersteller mitgelieferten Inkubationspuffer (Endkonzentration wie vom Hersteller empfohlen) gemischt und durch 1 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA in einer einstündigen Inkubation gespalten. Die optimale Inkubationstemperatur variierte abhängig vom verwendeten Enzym zwischen 30°C und 37°C. Zur Inaktivierung des Restriktionsenzym wurden die Ansätze für 20 min auf 65°C bzw. 80°C (je nach Enzym) erhitzt.

Restriktionsansätze zur Präparation von DNA-Fragmenten für nachfolgende Klonierungen oder zur vollständigen Restriktion genomischer DNA enthielten bei einem Volumen von 50-100 µl 2-5 µg DNA. Neben dem Inkubationspuffer wurden 2 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 3 h oder über Nacht bei entsprechender

Temperatur. Vor einer weiteren Verwendung der DNA wurde das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert.

Wurde ein DNA-Fragment mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen behandelt, die nicht in demselben Inkubationspuffer aktiv sind, wurde erst mit einem Enzym geschnitten, dieses inaktiviert, und der Reaktionsansatz wurde mittels einer Isopropanolfällung (2.11.1.) von den Salzen des Inkubationspuffers gereinigt. Nach Resuspension der DNA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddeion.}}$  wurde dann das zweite Restriktionsenzym in dem entsprechenden Puffer eingesetzt.

#### **2.14.1. Partielle Restriktion genomischer DNA aus *A. ilicis* Rü61a**

Zur Konstruktion einer Genbank von *A. ilicis* Rü61a wurde genomische DNA, die nach 2.9.1. isoliert worden war, partiell mit dem Restriktionsenzym *Hind*III gespalten, um Fragmente in der Größe von 15-25 kb zu erhalten, die in der Summe das gesamte Genom des Stammes repräsentieren. 4,2  $\mu\text{g}$  genomische DNA wurden dazu mit 0,3 U *Hind*III pro 1  $\mu\text{g}$  DNA in einem Ansatz von 120  $\mu\text{l}$  für 13 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 20 min inaktiviert.

#### **2.15. Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Wurden Vektoren, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, mit nur einem Restriktionsenzym behandelt, so wurden die Phosphatgruppen an den terminalen 5'-Enden durch Behandlung der linearen dsDNA mit alkalischer Phosphatase hydrolytisch abgespalten. Dadurch wurde eine Rezirkularisierung des Plasmids bei der Ligasebehandlung unterbunden, wodurch in einem späteren Klonierungsexperiment die Möglichkeit der Insertion eines fremden DNA-Fragmentes in den Vektor favorisiert wird.

Zur Dephosphorylierung wurde eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) verwendet (2.3.). Eine Unit CIP dephosphoryliert 1 pmol 5'-Enden in 60 min bei einer Inkubationstemperatur von 37°C in dem optimierten, vom Hersteller bereitgestellten Puffer. Um einer unvollständigen Dephosphorylierung entgegenzuwirken, wurde die CIP immer im Überschuss eingesetzt und die Inkubationsdauer auf bis zu 12 h verlängert.

Zur Inaktivierung des Enzyms, welches eine spätere Ligation der DNA-Fragmente verhindert hätte, wurden dem Dephosphorylierungsansatz zusätzlich zu einer Hitzeinaktivierung (20 min, 65°C) 0,1 Vol. 0,2 M EGTA zugesetzt. Zur vollständigen Entfernung der CIP wurde entweder eine Phenolextraktion (2.12.) angeschlossen oder die Vektor-DNA wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt (2.19.).

Zur Überprüfung der vollständigen Dephosphorylierung wurde 1  $\mu\text{l}$  der nach 2.15. behandelten Plasmid-DNA einer Ligation (2.17.) unterzogen. 1  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes wurde genutzt, um

damit elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen zu transformieren (2.21.); bei vollständiger Dephosphorylierung wurden keine Transformanten erwartet.

## 2.16. Entfernung von 5'- oder 3'-überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase

War es nicht möglich kompatible Enden an der Vektor-DNA und dem zu klonierenden DNA-Fragment zu erzeugen, da eine der beiden Nukleinsäuren auch intern Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen enthielt, mussten die zu ligierenden Enden geglättet werden. Danach konnten Vektor und Insert, die nun glatte Enden hatten, in einer Ligation (2.17.) verknüpft werden.

Die T4-DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität, mit der 5'-Überhänge aufgefüllt werden können. Außerdem zeichnet sich das Enzym durch hohe 3'-5'-Exonukleaseaktivität aus, die es erlaubt, 3'-Überhänge abzuspalten.

Der T4-DNA-Polymerase-Reaktionsansatz enthielt:

restringierte DNA	x $\mu$ l (1 $\mu$ g)
Inkubationspuffer (5 $\times$ )	4 $\mu$ l
dNTP-Mix (2 mM)	1 $\mu$ l
T4-DNA-Polymerase	0,2 $\mu$ l (1 U)
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	ad 20 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 11°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C (10 min). Der mit H<sub>2</sub>O<sub>ddeion.</sub> auf 50  $\mu$ l aufgefüllte Ansatz wurde einer Ethanolfällung (2.11.2.) unterzogen.

## 2.17. Ligation mit T4-DNA-Ligase

Die Ligase aus dem Bakteriophagen T4 katalysiert in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen die Phosphodiesterbildung von 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden zweier DNA-Moleküle unter ATP-Verbrauch.

Um die Bildung von rekombinanten Plasmiden zu favorisieren, wurde versucht, ein molares Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 einzustellen. Die eingesetzten DNA-Mengen wurden nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{\text{Masse Vektor [ng]} \times \text{Länge Insert [kb]}}{\text{Länge Vektor [kb]}} \times [\text{molares Verhältnis}] \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Um die Volumina der Ligationsansätze möglichst klein zu halten, wurde die dafür vorgesehene DNA zuvor mittels einer Fällung (2.11.) aufkonzentriert und in 6-10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddeion}}$  resuspendiert. 1  $\mu\text{l}$  dieser DNA-Lösungen wurde dazu genutzt, die DNA-Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese zu bestimmen (2.18.).

Die ermittelten Mengen an Vektor- und Insert-DNA sowie eine errechnete Menge an  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddeion}}$  wurden gemeinsam für 5 min auf 68°C erhitzt (bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden), um Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen den Basen der überhängenden Enden entwickelt haben könnten, zu lösen. Nachdem der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt war, wurden der Ligase-Puffer (Endkonzentration 1-fach) und das Enzym (2-4 WU) zugesetzt. Bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit glatten Enden enthielt der Ligationsansatz außerdem 15 % (v/v) PEG 8000, welches die Kondensation von DNA zu Aggregaten bewirkt (PHEIFFER & ZIMMERMAN, 1983) und dadurch die Effizienz der Ligasereaktion steigert. Die Ligationsansätze hatten Volumina zwischen 10  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$ . Die Ligationsreaktionen wurden über Nacht bei 16°C durchgeführt. Bevor die ligierte DNA zur Transformation eingesetzt wurde, wurde der Reaktionsansatz für mindestens 1 h bei -80°C eingefroren.

### **2.17.1. Ligation des Cosmids pVK100 mit *Hind*III-Fragmenten genomischer DNA aus *A. ilicis* Rü61a**

Um DNA *in vitro* effizient in  $\lambda$ -Phagen-Partikel verpacken zu können, muss sie zwei *cos*-Regionen im Abstand von 38-52 kb haben und als Concatemer von DNA-Fragmenten der entsprechenden Länge vorliegen (HOHN, 1979). Um die Bildung dieser Strukturen zu begünstigen, sollte der Ligationsansatz, der das *Hind*III restringierte Cosmid pVK100 und die *Hind*III-Fragmente der genomischen DNA aus *A. ilicis* Rü61a enthielt, eine DNA-Konzentration von mindestens 200 ng/ $\mu\text{l}$  und ein molares Vektor:Insert-Verhältnis von 1:2 aufweisen. In einem Reaktionsansatz von 14  $\mu\text{l}$  wurden 1200 ng *Hind*III restringierter (2.14.), dephosphorylierter (2.15.) Vektor pVK100 und 1350 ng *Hind*III-Fragmente (2.14.1.) mit 4 WU T4-Ligase in 1  $\times$  Ligase-Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor der *in vitro packaging*-Reaktion wurde der Ligationsansatz für 1 h bei -80°C eingefroren.

## **2.18. Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde zu deren Identifizierung und Reinigung eingesetzt. Es kamen Agarosegele in der Konzentration von 0,6 % bis 1,6 % (w/v) und 0,5  $\times$  TBE als Elektrophoresepuffer zum Einsatz.

Zur Auftrennung und Extraktion von Fragmenten über 10 kb wurde eine *low-melt* Agarose für große DNA-Fragmente in einer Konzentration von 0,6 % (w/v) eingesetzt.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. Probenpuffer (2.4.) versetzt. Neben den zu analysierenden DNA-Proben wurden verschiedene Längenstandards (2.3.) aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in Ethidiumbromid-Lösung (2.4.) bei RT gefärbt. Ethidiumbromid, welches nicht in der DNA interkalierte, wurde durch Spülen des Gels mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  entfernt. Zur Auswertung wurde ein Foto der mit UV-Licht sichtbar gemachten DNA-Banden mittels einer Digitalkamera aufgenommen.

## 2.19. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

### 2.19.1. NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit

Das Prinzip der Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit diesem Kit beruht auf der Verflüssigung der Agarose in einem speziellen Puffer und der selektiven Bindung der DNA an eine Silicamembran in Puffern, die chaotrope Salze enthalten. Alle verwendeten Puffer wurden dem Kit entnommen.

Die Präparation der in Agarosegelen aufgetrennten und aus den Gelen ausgeschnittenen DNA erfolgte entsprechend den Angaben des Kit-Herstellers (MACHEREY-NAGEL, 2001).

Die DNA wurde mit 50-100  $\mu\text{l}$  5 mM Tris/HCl (pH 8,5) durch Zentrifugieren (1 min,  $11000 \times g$ , RT) von der Säule eluiert. Wurden DNA-Fragmente von 5-10 kb extrahiert, wurde der Elutionspuffer vorher auf 70°C erwärmt.

Sollte die DNA zur Ligation verwandt werden, wurde sie durch eine Fällung (2.11.) aufkonzentriert.

### 2.19.2. Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe von Agarase

Lineare DNA-Fragmente mit einer Länge von über 10 kb wurden durch schonende Agarase-katalysierte Spaltung des Agarosepolymers zurückgewonnen, um eine Scherung der DNA zu vermeiden.

Die DNA wurde in Gelen aus *low-melt* Agarose (2.18.) aufgetrennt und unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden durch eine ca. 10minütige Inkubation bei 70°C aufgeschmolzen. Nachdem die Lösung eine Temperatur von 42°C hatte, wurden pro 100 mg 0,6 %ige Agarose 0,6 U Agarase zugegeben. (1U Agarase hydrolysiert 100 mg geschmolzener 1 %iger *low-melt* Agarose in 30 min bei 42 °C). Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 1 h bei 42°C inkubiert. Dem Reaktionsansatz wurde dann Ammoniumacetat zugesetzt (Endkonzentration 2,5 M); durch 5 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation für 10 min bei  $20000 \times g$  und 4°C wurden die Oligosaccharide der hydrolysierten Agarose abgetrennt. Der DNA-haltige Überstand wurde einer Ethanolfällung (2.11.2.) unterzogen.

## 2.20. Herstellung einer Cosmid-Genbank für *A. ilicis* Rü61a

Die Erstellung einer Genbank, die das komplette Genom von *A. ilicis* Rü61a repräsentiert, erforderte die Klonierung von DNA-Fragmente von 15-25 kb Länge. Als Vektor wurde das Cosmid pVK100 (2.7.3.) ausgewählt. Die Nutzung eines Cosmid-Vektors hat den Vorteil, dass der rekombinante Vektor höchst effizient durch ein *in vitro packaging* System in die Wirtszellen eingebracht werden kann.

Das hier genutzte DNA Packaging Kit (2.3.) enthielt fertige Zellextrakte (*packaging extracts*) von mit Phage- $\lambda$  infizierten *E. coli*-Stämmen, die Phagenkopf-Vorstufen und Enzyme, die zum „Verpacken“ von  $\lambda$ -Phagen-DNA benötigt werden, beinhalten.

### 2.20.1. *In vitro* Verpacken von DNA

Vier  $\mu\text{l}$  des nach 2.17.1. hergestellten Ligationsansatzes wurden mit einem *packaging extract*-Ansatz gemischt und nach kurzem Zentrifugieren für 2 h bei RT (20°C-22°C) inkubiert. Dem Ansatz wurden dann 300  $\mu\text{l}$  steriler SM-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 100 mM NaCl, 0,01 % (w/v) Gelatine) und 20  $\mu\text{l}$  Chloroform zugesetzt. Nach 30 sec Zentrifugation bei  $20000 \times g$  und RT konnte der Phagenüberstand direkt zur Infektion eingesetzt oder bei 4°C gelagert werden.

### 2.20.2. Herstellung einer *E. coli* HB101 Magnesium-Kultur

$\lambda$ -Phagen adsorbieren effizienter an *E. coli* Zellen, die in Gegenwart von Maltose gezüchtet wurden, da die Transkription des  $\lambda$ -Phagen-Rezeptors-Gens im Maltose-Operon induziert wird. 20 ml LB-Medium mit 0,2 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$  und 0,2 ml 20 % (w/v) Maltose wurden mit einer einzelnen Kolonie *E. coli* HB101, die von einer frischen über Nacht inkubierten LB-Platte genommen wurde, inokuliert. Die Inkubation erfolgt aerob bei 37°C unter Schütteln, bis eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,8 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min,  $2000 \times g$ , 4°C) geerntet und es wurde mit einer eiskalten 10 mM  $\text{MgSO}_4$ -Lösung eine Zellsuspension mit einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1 eingestellt. Diese Zellsuspension wurde sofort für die Infektion mit dem  $\lambda$ -Phagenüberstand (2.20.1.) eingesetzt.

### 2.20.3. Infektion von *E. coli* HB101 mit $\lambda$ -Phagen, die Cosmid-DNA enthalten

Der Phagenüberstand wurde in SM-Puffer (2.20.1.) 1:10, 1:100 und 1:200 verdünnt. 50  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnungen wurden mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  der *E. coli* HB101-Magnesiumkultur (2.20.2.) gemischt und bei RT für 30 min inkubiert. In dieser Zeit adsorbieren die Phagen an die Bakterien und infizieren diese. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die infizierten Zellen für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Sie wurden dann durch Zentrifugation (5 min,

8000  $\times$  g, 4°C) sedimentiert und in 50  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf LB-Platten mit 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der *E. coli* HB101-Klone, die rekombinante Cosmide enthielten, wurden die auf LB-Tc-Medium gewachsenen Kolonien auf ein 56-er Raster übertragen, um mit Hilfe eines Stempels von einer LB-Tc-Selektionsplatte auf eine LB-Km-Selektionsplatte übertragen werden zu können. Solche Kolonien, die auf LB-Tc-Medium aber nicht auf LB-Km-Medium wuchsen, wurden zur Etablierung der Genbank weiterkultiviert.

## 2.21. Transformation von Bakterienstämmen mit rekombinanten Plasmiden

Die Transformation der Bakterienstämme *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* XL1-Blue MRF', *E. coli* S17-1 und *P. putida* KT2440 erfolgte mittels Elektroporation nach DOWER *et al.* (1988) und IWASAKI *et al.* (1994).

### 2.21.1. Präparation elektrokompetenter Zellen

Eine 10 ml TB-Übernacht-Kultur des entsprechenden Stammes wurde genutzt, um damit 500 ml TB-Medium (2.4.) anzupfen; die Kultur wurde unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Zellsuspension eine OD<sub>600nm</sub> von 1-1,2 erreicht hatte, wurden die Zellen sofort in Eiswasser abgekühlt, um dann durch Zentrifugation (10 min, 5000  $\times$  g, 4°C) pelletiert zu werden. Die Zellen wurden in 500 ml eiskalter 0,3 M Saccharoselösung resuspendiert und durch erneutes Zentrifugieren sedimentiert. Die Zellen wurden wiederholt in 500 ml, 50 ml und 5 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>ddion</sub> gewaschen und erneut zentrifugiert. Das in der letzten Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml 10 %iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellen wurden in 40  $\mu$ l Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.21.2. Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein 40  $\mu$ l Aliquot elektrokompetenter Zellen (2.21.1.) aufgetaut und mit 1-2  $\mu$ l DNA-haltiger Lösung (Plasmid-DNA oder Ligationsansatz) versetzt. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation durchgeführt (Parameter: 2,5 kV, 25  $\mu$ FD, 200  $\Omega$ ). Mit 1 ml sterilem LB-Medium wurden die Zellen aus der Küvette gespült und für 1 h bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*P. putida*) unter Schütteln inkubiert. Aliquots der Ansätze wurden auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei geeigneter Temperatur bebrütet.

## 2.22. Selektion rekombinanter Plasmide durch Blau/Weiß-Screening

*E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* XL1-Blue MRF' Klone, die nach einer Transformation rekombinante pUC18-Plasmide enthielten, konnten nach einer Behandlung mit IPTG und X-Gal anhand des Ausbleibens einer blauen Färbung von solchen unterschieden werden, die unveränderte, religierte pUC-Plasmide enthielten (vergl. 2.7.1.).

40  $\mu$ l X-Gal-Stammlösung und 4  $\mu$ l IPTG-Stammlösung (2.4.) wurden gleichmäßig auf den Agarplatten verteilt, bevor Zellen eines Transformationsansatzes darauf ausplattiert wurden. Nach einer Bebrütung der Bakterienzellen von ca. 20 h konnte eine deutlichere Ausprägung der Färbung von Kolonien durch eine zusätzliche Inkubation der Platten bei 4°C für 1-2 h erreicht werden.

## 2.23. Polymerase-Kettenreaktion (SAIKI *et al.*, 1985, 1988)

### 2.23.1. Primer-Auswahl für PCR-Anwendungen

PCR-*primer* sollten mehrere Kriterien erfüllen, damit eine PCR-Reaktion erfolgreich verläuft. Die *primer* sollten nur zu den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes komplementär sein und nicht innerhalb dieses Abschnittes mit einem DNA-Strang hybridisieren. Außerdem dürfen die *primer* nicht komplementär zu sich selbst oder zueinander sein, um die Bildung von Dimeren zu unterbinden. Innerhalb der *primer* sollten sich keine Polypurin- oder Polypyrimidinsequenzen befinden, genauso wenig wie solche Sequenzen, die die Bildung von Sekundärstrukturen begünstigen. Am 3'-Ende sollten sich ein oder zwei Guanin- oder Cytosin-Nukleotide befinden, um ein stabiles *annealing* und eine erfolgreiche Elongation zu gewährleisten. Aus demselben Grund sollten *mismatches*, wie zur Generierung von Restriktionsschnittstellen, am 5'-Ende eingefügt werden. Der G + C-Gehalt der Sequenz der *primer* sollte 50 % nicht weit übersteigen, damit die Schmelztemperatur, die bei beiden *primern* etwa identisch sein sollte, nicht zu hoch ist. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wurde nach der *Nearest-Neighbour*-Methode in Anlehnung an BRESLAUER *et al.* (1986) ermittelt.

**Tab. 2****PCR-primer**

Erklärungen zur Verwendung der *primer* findet sich unter 2.23.2. bis 2.23.5.. Nukleotide, die fett gedruckt sind, entsprechen oder sind komplementär zu der EMBL Sequenz mit der Acc. Nr. AJ537472 (Anhang 1). Unterstrichene Sequenzabschnitte sind Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die für spätere Klonierungsexperimente eingefügt wurden. Der kursiv gesetzte Sequenzabschnitt ist eine mögliche Ribosomen-Bindestelle vor *qoxL*. Das unterstrichene Nukleotid in den Sequenzen von Gln-for und Gln-rev kennzeichnet eine Fehlpaarung, durch die eine Punktmutation eingeführt wurde.

Name	Primer-Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub>
<i>qox</i> -for	ACGCGAATTC <u>GTGACG</u> AAGTTAAGGAGACC	67,3 °C
<i>qox</i> -rev	TTTGGAAATGCGCAGTGAGGAGATTTGC	66,5 °C
<i>nptAge</i> -for	TATAACCGGTGCGAACCGGAATTGCCAGCTG	73,5 °C
<i>nptAge</i> -rev	TATATA <u>CCGGTTCGA</u> ACCCAGAGTCCCGCT	69,9 °C
<i>nptEco</i> -for	TATAGATATCGCGAACCGGAATTGCCAGCTG	68,8 °C
<i>nptEco</i> -rev	TATATGATATCTCGAACCCAGAGTCCCGCT	65,9 °C
<i>aacC1</i> -for	ACGAACCCAGTTGACATAAGC	50,9 °C
<i>aacC1</i> -rev	CGATCTCGGCTTGAACGAATT	55,8 °C
orf2-for	TTAGCCAGTCCATGATGATGCC	56,3 °C
orf2-rev	TAGATTGACGAGCTAGAGCACC	50,8 °C
orf4-for	AAGGATGCTAAGCGAAGTGCTC	54,6 °C
orf4-rev	TGATGGCAAACCTCACCAAGAC	56,3 °C
orf5-for	AGACATATCACCGACACGACAG	51,5 °C
orf5-rev	GTCTTCCTCGATCTTGCTAATCC	53,0 °C
orf7-for	ATAACTTCCCTTACTGCCGAGC	53,6 °C
orf7-rev	TTGAAGGCAAGTCCTCCATCAC	55,5 °C
Gln-for	TTCCAAGGGTGCAGGACAGACGGCAACAGG	74 °C
Gln-rev	ACCTGTTGCCGTCTG <u>T</u> CCTGCACCCTTGG	72,7 °C
mutseq	GCAAACCTGCTCAATGCCAGC	55,7 °C

**2.23.2. Amplifikation des *qoxLMS*-Genclusters**

Zur Klonierung der Gene, die für die Chinaldin-4-Oxidase kodieren, wurde der *qoxLMS*-Gencluster mittels PCR amplifiziert und in den *broad-host-range* Vektor pJB653 (2.7.2.) inseriert.

Die verwendeten *primer* (2.23.2.) (Tab. 2) sind komplementär zu den Nukleotiden 17492-17511 (*qox*-for) bzw. 21401-21375 (*qox*-rev) der bei EMBL hinterlegten Sequenz mit der Acc. Nr. AJ537472. Der *forward-primer* enthält eine mögliche Ribosomen-Bindestelle (SHINE &

DALGARNO, 1974), die 14 Nukleotide vor dem Startcodon beginnt. Stromabwärts des *Pm*-Promotors auf dem Plasmid pJB653 befindet sich ein Fragment des *xylX*-Gens (2.7.2.), das nicht durch ein Stopcodon beendet wird. Um die Synthese eines XylX-QoxL-Fusionsproteins zu vermeiden, wurde durch Austausch eines Guanins gegen ein Adenin (Position 14 in *qox*-for) ein Stopcodon im Leseraster von *xylX* generiert. Zur Klonierung des Genclusters in die *Sma*I und *Eco*RI Schnittstellen innerhalb der MCS von pJB653 wurde am 5'-Ende von *qox*-for außerdem die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Eco*RI integriert. Da viele Restriktionsenzyme ihre Erkennungssequenz nicht erkennen, wenn sie direkt am Ende des DNA-Moleküls liegt, wurden noch vier weitere Nukleotide an das 5'-Ende angehängt.

Zur Amplifikation der *qox*-Gene wurde die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt. Diese Polymerase besitzt neben der 5'-3'-Polymerase-Aktivität eine 3'-5'-Exonuclease (Korrekturlese)-Aktivität (CLINE *et al.*, 1996). Die Rate der falsch eingebauten Nukleotide liegt dadurch bei der *Pfu*-Polymerase ca. 10 Mal niedriger als bei einer *Taq*-Polymerase, die keine Korrekturlese-Aktivität besitzt. Außerdem erzeugt die *Pfu*-Polymerase glatte Enden an den PCR-Amplifikaten.

Als Matrizen-DNA wurde nach 2.10.1. isolierte Plasmid-DNA des Cosmids pVK55B/5 (3.4.3.) verwendet.

Die Reaktionsansätze von 20 µl Volumen wurden zu gleichen Teilen aus zwei Master Mix-Ansätzen zusammenpipettiert.

<b>Master Mix 1</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
dNTP-Mix	1 µl	500 µM jedes dNTP's
<i>qox</i> -for	0,4 µl	2 µM
<i>qox</i> -rev	0,4 µl	2 µM
Matrizen-DNA	2 µl	2-4 ng/µl
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	6,2 µl	

<b>Master Mix 2</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	2 µl	1-fach
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,2 µl	0,6 U
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	7,8 µl	

Nach Mischen der zwei Master Mix-Ansätze in 0,2 ml PCR-Gefäßen wurden diese in einen auf 95°C vorgeheizten Thermocycler mit beheizbarem Deckel (105°C) gestellt und die PCR-Reaktion wurde sofort gestartet.

Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil:

Reaktion	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	3 min
Denaturierung		95°C	1 min
<i>annealing</i>	10	64,5°C	1 min
Elongation		72°C	7 min 10 sec
Denaturierung		95°C	1 min
<i>annealing</i>	20	66,5°C	30 sec
Elongation		72°C	7 min 10 sec + 10 sec pro Zyklus
Elongation	1	72°C	5 min

### 2.23.3. Amplifikation der *nptII*- und der *aacCI*-Resistenzkassetten

Antibiotika-Resistenzkassetten, die in Insertionsmutagenese-Experimenten verwendet wurden, wurden durch PCR-Amplifikation erzeugt. Zur Anwendung kamen die dem *Tn5*-Transposon entstammende Kanamycin-Resistenzkassette (*nptII*) und die Gentamycin-Resistenzkassette (*aacCI*) aus dem Transposon *Tn1696*.

Als Matrize wurde DNA der Plasmide pBG2b (2.7.6.) (*nptII*) bzw. R102 (2.7.7.) (*aacCI*) eingesetzt. Die verwendeten *primer* finden sich unter 2.23.1. (*nptAge*-for, -rev; *nptEco*-for, -rev; *aacCI*-for, -rev) (Tab. 2). Die Amplifikation erfolgte mit der *Pfu*-Polymerase.

Die Reaktionsansätze wurden zu gleichen Teilen aus Master Mix 1 und Master Mix 2 gemischt. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile entsprachen exakt den unter 2.23.2. beschriebenen.

Die Amplifikation der 978 bp (*nptII*) bzw. 783 bp (*aacCI*) großen DNA-Segmente erfolgte nach folgenden Zeit- und Temperaturprofilen:

#### 1) *nptII*

Die PCR wurde wie unter 2.23.2. beschrieben durchgeführt; folgende Parameter wurden verändert: Annealingtemperatur in den ersten 10 Zyklen: 68°C, in den weiteren 20 Zyklen: 70°C. Die Elongationsdauer betrug 2 min und wurde wiederum in den letzten 19 Zyklen um je 10 sec pro Zyklus verlängert.

2) *aacC1*

Reaktion	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	3 min
Denaturierung		95°C	1 min
<i>annealing</i>	30	57°C	1 min
Elongation		72°C	2 min
Elongation	1	72°C	4 min

**2.23.4. PCR zur Kontrolle der Insertionsmutagenese**

Zur Disruption der ORFs 2, 4, 5 und 7 in dem Cosmid pVK55B/5 (3.8.) wurden Kanamycin-Resistenzkassetten in die ORFs inseriert (3.16.). Um zu kontrollieren, ob die Insertion der Kanamycin-Resistenzkassetten durch homologe Rekombination erfolgreich war, wurde jeweils ein DNA-Fragment, welches die Resistenzkassette und flankierende Bereiche zu beiden Seiten der Kassette umfasste, mittels PCR amplifiziert. Zum Vergleich wurde jeweils auch DNA mit dem nicht-mutierten Ausgangsgen als Matrize eingesetzt. Matrizen-DNA war DNA folgender Plasmide: pVK55B/5orf2*nptII*(+) bzw. (-), pVK55B/5orf4*nptII*(+) bzw. (-), pVK55B/5orf5*nptII*(+) bzw. (-), pVK55B/5orf7*nptII*(+) bzw. (-) und pVK55B/5.

Die eingesetzten *primer* waren vollständig komplementär zu folgenden Nukleotiden der bei EMBL hinterlegten Sequenz AJ537472 (Anhang 1): orf2-for/orf2-rev: 15175-15196/16855-16876; orf4-for/orf4-rev: 13788-13809/14925-14946; orf5-for/orf5-rev: 12589-12610/13895-13917; orf7-for/orf7-rev: 9890-9911/10691-10712.

Zur Amplifikation wurde eine *Taq*-Polymerase eingesetzt.

Die Reaktionsansätze umfassten 10 µl und wurden aus zwei Master Mix-Ansätzen zu gleichen Teilen zusammengesetzt.

Master Mix 1	Volumen	Endkonzentration
dNTP-Mix	1 µl	250 µM jedes dNTP's
Primer-for	0,2 µl	2 µM
Primer-rev	0,2 µl	2 µM
Matrizen-DNA	1 µl	2-4 ng/µl
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	2,6 µl	
Master Mix 2	Volumen	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Polymerase Puffer	1 µl	1-fach
MgCl <sub>2</sub>	0,8 µl	2 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl	0,5 U
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	3,1 µl	

Die Amplifikation der DNA-Segmente erfolgte in 25 Zyklen.

Reaktion	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	3 min
Denaturierung		95°C	1 min
<i>annealing</i>		ORF2 und 7: 62°C	1 min
	25	ORF4 und 5: 59,8°C	
Elongation		72°C	ORF (2 bis 7) <i>nptII</i> : 2 min ORF (2 bis 7): 1 min
Elongation	1	72°C	4 min

### 2.23.5. Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese ist es möglich, die Beteiligung einzelner Aminosäurereste an der Katalysefunktion von Enzymen nachzuweisen. Durch Einführung einer Punktmutation wird ein bestimmtes Codon so verändert, dass es zu einer von der ursprünglichen Aminosäure verschiedenen Aminosäure translatiert wird.

Bei der hier angewendeten Methode zur ortsspezifischen Mutagenese wird doppelsträngige Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt (BRAMAN *et al.*, 1996). Die Mutation wird durch ein komplementäres Paar *primer* eingefügt, welches den Basenaustausch in zentraler Position trägt. Bei der hier vorgenommenen Mutagenese soll der Glutamatrest 736 (Codon: GAG) in QoxL gegen einen Glutaminrest (Codon: CAG) ausgetauscht werden.

Um die parentale, nichtmutierte DNA nach der Reaktion zu entfernen, wurden die PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* behandelt. Bei einer 5'-GA<sup>m6</sup>TC-3' Erkennungssequenz verdaut dieses Enzym nur DNA, die mit einer *dam*-Methylase methyliert worden war, so dass die in der PCR synthetisierte Nukleinsäure unangetastet bleibt.

Als Matrize diente Plasmid-DNA des Konstruktes pUC2,5 (3.15.1.), die *primer* (Gln-for/Gln-rev) sind unter 2.23.1. aufgeführt. Die Amplifikation wurde mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt.

Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 10 µl und wurden aus je 5 µl Master Mix 1 und Master Mix 2 zusammengesetzt.

<b>Master Mix 1</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
dNTP-Mix	1 $\mu$ l	250 $\mu$ M jedes dNTP's
<i>qox</i> -fore	0,2 $\mu$ l	2 $\mu$ M
<i>qox</i> -rev	0,2 $\mu$ l	2 $\mu$ M
Matrizen-DNA	1 $\mu$ l	1-2 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	2,6 $\mu$ l	

<b>Master Mix 2</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	1 $\mu$ l	1-fach
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,2 $\mu$ l	0,6 U
H <sub>2</sub> O <sub>ddeion.</sub>	3,8 $\mu$ l	

Das Temperatur- und Zeitprofil der PCR entsprach dem unter 2.23.3. (2) beschriebenen. Die Annealingtemperatur betrug 65°C und die Elongationszeit 11 min. Um die Fehlerrate während der Amplifikation gering zu halten, wurde die Zyklenanzahl auf 20 reduziert.

#### 2.24. Reinigung von PCR-Produkten

Um *primer*, Nukleotide, Polymerase und Puffersalze aus den PCR-Ansätzen zu beseitigen, erfolgte eine Aufreinigung mittels des „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche Diagnostics GmbH. Dabei wird die amplifizierte DNA in Gegenwart des chaotropen Salzes Guanidinthiocyanat an eine Glasfaser Zentrifugationssäule gebunden. Die Bindung erfolgt spezifisch aufgrund der Länge der DNA-Moleküle.

Nachdem 100  $\mu$ l PCR-Produkte mit 500  $\mu$ l Guanidinthiocyanat-haltigem Bindepuffer gemischt und auf die Säule aufgetragen wurden, erfolgte die Bindung der DNA an die Säule durch Zentrifugation (RT, 20000  $\times$  g, 1 min). Nach zweimaligem Waschen mit Ethanol-haltigem Waschpuffer wurde die saubere DNA mit 50-100  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) von der Säule eluiert. Die Zentrifugation zwischen den Schritten wurde jeweils bei RT und 13000  $\times$  g für 1 min betrieben (Anleitung zu dem Kit unter [<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1732668a.pdf>]).

#### 2.25. DNA-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden waren nicht-radioaktiv mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin markiert. Sondenmoleküle, die mit der Ziel-DNA hybridisierten, wurden mit spezifischen anti-DIG-Antikörpern, an die eine Alkalische Phosphatase gebunden sind, detektiert. Die hier verwendete colorimetrische Detektion beruht auf der von der Alkalischen Phosphatase katalysierten Dephosphorylierung des Substrates BCIP, welches anschließend von

dem zweiten Substrat NBT zu einem blauen Indigo-Farbstoff oxidiert wird. Das NBT wechselt durch die Reduktion ebenfalls die Farbe von gelb zu blau.

### 2.25.1. Die Oligonukleotidsonde b-DIG

Von den bekannten N-terminalen Aminosäuren der mittelgroßen Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase (DE BEYER & LINGENS, 1993) wurde die Sequenz für ein 29 bp langes Oligonukleotid abgeleitet. Aufgrund des genetischen Codes war das Oligonukleotid 2<sup>13</sup>-fach degeneriert.

N-terminale AS-Sequenz:	F	M	H	P	F	Q	F	I	T	P		
Oligonukleotidsequenz:	5'	TTC	ATG	CAC	CCA	TTC	CAA	TTC	ATA	ACA	CC	3'
		T		T	G	T	G	T	C	G		
					T				T	T		
					C					C		

Das Oligonukleotid, welches am 5'-Ende mit einem Digoxigeninmolekül markiert war, wurde von der Firma Interactiva (Ulm) bezogen.

### 2.25.2. Die Sonde 1,1 *DpnI*

#### 2.25.2.1. Vermehrung des 1,1 kb Fragmentes

Nachdem das Insert des Plasmids pUC4,5 sequenziert und analysiert worden war (3.2.2.), wurde ein 1052 bp langes *DpnI* Fragment am 5'-Ende von *qoxL* zur Konstruktion einer für die Gene der Chinaldin-4-Oxidase spezifischen Sonde ausgewählt, welche zur Identifizierung von *qox*-Genen in Klonen einer Genbank von *A. ilicis* Rü61a eingesetzt wurde. Nach einer Restriktion der Plasmid-DNA von pUC4,5 mit *DpnI* (2.14.) wurde das gewünschte Fragment durch Extraktion aus einem Agarosegel (2.19.1.) gewonnen. Das *DpnI*-Fragment wurde in den mit *SmaI* geöffneten, dephosphorylierten Vektor pUC18 (2.7.1.) ligiert; das neue Konstrukt wurde mit pUC1,1 bezeichnet. *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit pUC1,1 transformiert.

Nach Isolierung der Plasmid-DNA (2.10.1.) konnte das Insert durch eine Doppelrestriktion mit *EcoRI* und *BamHI* und Extraktion der DNA aus einem Agarosegel zurückgewonnen werden. Ein Herausschneiden des Inserts mit *SmaI* war nicht möglich, da *SmaI* und *DpnI* zwar beide glatte Enden erzeugen und so eine Ligation solcher Enden möglich ist, aber die Erkennungssequenzen für beide Enzyme dabei verloren gehen.

#### 2.25.2.2. Markierung des 1,1 kb *DpnI* Fragmentes mit Digoxigenin

Das nach 2.25.2. erhaltene Fragment wurde nach einer Extraktion mit Phenol/Chloroform (2.12.) durch eine Ethanol-fällung mit LiCl als fällendem Salz (2.11.2.) aufkonzentriert.

Die Markierung mit Digoxigenin erfolgte über ein *random primed labeling* mit Hilfe des „DIG-High Prime Labeling and Detection Kit“ (Roche Diagnostics). Diese Markierungsmethode bedient sich der Hybridisierung von Zufallsprimern an eine denaturierte Matrizen-DNA. Bei der Elongation der *primer*, die durch ein Klenow-Enzym katalysiert wird, werden neben nicht-markierten Nukleotiden auch DIG-dUTPs eingebaut. Da die Anlagerung der Zufallsprimer statistisch an jeder Matrizensequenz erfolgen kann, entstehen unterschiedlich lange Sondenmoleküle, die alle komplementär zu der Matrize sind und ca. alle 20-25 Nukleotide ein DIG-dUTP tragen.

Ein  $\mu\text{g}$  der zu markierenden DNA wurde nach der Fällung in  $16 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{ddeion.}}$  resuspendiert. Die dsDNA wurde bei  $100^\circ\text{C}$  für 10 min denaturiert und dann in einer Kältemischung (Eis/NaCl: 3/1) schnell abgekühlt. Anschließend wurden  $4 \mu\text{l}$  „DIG-High Prime“, welches Puffer, die Zufallsprimer, Nukleotide, DIG-dUTP und das Klenow-Enzym enthält, zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 20 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Denaturierung des Enzyms wurden  $2 \mu\text{l}$   $0,2 \text{ M EDTA (pH 8)}$  zugesetzt und der Ansatz wurde für 10 min auf  $65^\circ\text{C}$  erhitzt.

## 2.26. DNA-DNA Hybridisierung

DNA-DNA Hybridisierung wurden eingesetzt, um DNA-Fragmente, die *qox*-Gene enthielten, zur Erstellung einer angereicherten Genbank zu identifizieren und um die angereicherte sowie eine vollständige Genbank von *A. ilicis* Rü61a nach Klonen, die *qox*-Gene trugen, zu durchsuchen.

### 2.26.1. Kolonieblotting

Zum Durchmustern der Genbanken nach Klonen, welche *qox*-Gene enthielten, wurden Bakterienkolonien auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Bei der Durchführung wurde mit kleinen Variationen den Anleitungen des „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ (1995) der Firma Roche Diagnostics gefolgt.

Auf die Größe von Petrischalen zugeschnittene Membranstücke wurden für 5 min in  $1 \text{ mM EDTA}$  gekocht, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddeion.}}$  gespült und zwischen Whatman-Filterpapier liegend autoklaviert. Diese sterilen Membranen wurden auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmedien gelegt, bevor die Kolonien auf die Membranen aufgebracht wurden. Nach ein- bis zweitägiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die bewachsenen Membranen von den Platten entfernt und die Bakterien wurden durch eine Alkalibehandlung lysiert. Dazu wurden die Membranen in einem ersten Schritt mit der Kolonieseite nach oben für 20 min auf mit Denaturierungslösung (2.4.) getränkte Filterpapiere gelegt; freigelegte dsDNA wird in diesem Schritt zu esDNA denaturiert. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurden die Filter anschließend für 20 min auf mit Neutralisationslösung (2.4.) getränkte Filterpapiere gelegt. Im dritten Schritt wurden die

Membranen auf SSC-Puffer (2.4.) äquilibriert, indem man sie für 10 min auf mit  $2 \times$  SSC getränkte Filterpapiere legte. Durch Backen für 30 min bei  $80^{\circ}\text{C}$  wurde die DNA in der Membran fixiert. Zur Hydrolyse der bakteriellen Proteine wurden die Membranen mit Proteinase K Lösung II (2.4.) benetzt und für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zellrückstände wurden entfernt, indem die Membranen zwischen zwei mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  befeuchtete Filterpapiere gelegt wurden und mit einem Reagenzglas darüber gerollt wurde.

Die Membranen wurden entweder sofort zur Hybridisierung eingesetzt, oder bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.26.2. Southern-Transfer

Die von SOUTHERN (1975) entwickelte und von REED & MANN (1985) modifizierte Methode ermöglicht den Transfer und die Detektion spezifischer DNA-Fragmente, welche in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran übertragen wurden. Hier kam die Methode zur Anwendung, um *gox*-Gene enthaltene DNA-Fragmente in genomischer DNA von *A. ilicis* Rü61a zu identifizieren und um Ergebnisse des Kolonieblots nach Isolierung von rekombinanten Plasmiden zu verifizieren.

Genomische, vollständig restringierte DNA bzw. restringierte Plasmid-DNA wurde in einem Agarosegel geeigneter Konzentration aufgetrennt (2.18.), mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert. Die Taschen des Gels wurden mit 1 %iger Agarose verschlossen, um hier ein Brechen des Gels und einen ungleichmäßigen Transfer zu verhindern.

Sollten DNA-Fragmente von über 10 kb Länge übertragen werden, wurde das Gel zuvor für ca. 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Dies führt zu einer partiellen Depurinierung der DNA. In einer späteren alkalischen Behandlung brechen die DNA-Stränge an den depurinierten Stellen, so dass kürzere Fragmente entstehen, die effizienter transferiert werden. Nach der Inkubation in der Säure wurde das Gel mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  gespült. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte mittels Vakuum-Blot für 2 h bei -50 bis -60 mbar Unterdruck. Als Transferlösung wurde 0,4 N NaOH verwendet, wodurch einerseits die Strangbrüche depurinierter DNA-Stränge generiert wurden und andererseits eine kovalente Bindung der denaturierten DNA an die Nylonmembran induziert wurde.

Nach Abschluss des Transfers wurde unter UV-Licht überprüft, ob die DNA restlos aus dem Gel übertragen worden war. Die Membran wurde für 5 min auf mit  $2 \times$  SSC getränkte Filterpapiere gelegt, um sie auf SSC-Puffer zu äquilibrieren, und sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

### 2.26.3. Hybridisierungen

Neben einigen weiteren Faktoren (ANDERSON & BRYAN, 1985) nehmen die Temperatur und die Ionenstärke deutlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit und die Stringenz, mit der DNA-Moleküle miteinander hybridisieren. Die Hybridisierungstemperatur sollte so gewählt werden, dass die Ausbildung von DNA-Doppelsträngen einer optimalen Kinetik unterliegt, Hybride mit Fehlpaarungen jedoch schnell redissoziieren. Für die Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde „b-DIG“ wurde die optimale Hybridisierungstemperatur von 54,5°C empirisch ermittelt; Hybridisierungen mit der spezifischen Sonde „1,1 *DpnI*“ wurden bei 68°C durchgeführt.

Mit steigender Ionenstärke steigt auch die Rate der Hybridbildung, jedoch favorisiert eine hohe Ionenstärke auch die Bildung von *mismatch*-Hybriden. Durch stringente Waschschriffe mit Puffern absteigender Salzkonzentration können solche fehlgepaarten Hybride redissoziiert werden.

Die Membranen wurden nach dem Blotting zusammen mit ca. 20 ml Prähybridisierungslösung (2.4.) pro 100 cm<sup>2</sup> Membran in eine Hybridisierungsröhre gegeben und für 2 h bei der entsprechenden Temperatur (s. o.) inkubiert. Zur Herstellung der Hybridisierungslösungen wurden die Sonden frischer Prähybridisierungslösung zugesetzt; die Lösung der Sonde „b-DIG“ enthielt 3,7 µg (400 pmol) Sonde/ml, die der Sonde „1,1 *DpnI*“ enthielt ca. 25 ng Sonde/ml. Nach der Prähybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und die Hybridisierungslösung wurde auf die Membran gegeben. Die doppelsträngige Sonde „1,1 *DpnI*“ wurde zuvor durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert, die Hybridisierungslösung der Sonde „b-DIG“ wurde auf 54,5°C vorgewärmt. Die Hybridisierungen wurden über Nacht durchgeführt, die Sondenlösungen anschließend bei -20°C gelagert.

Um nicht gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurden die Membranen nach der ca. 16stündigen Hybridisierung zweimal für 15 min mit 2 × SSC-Puffer mit 0,1 % SDS bei RT gewaschen.

Die stringenten Waschschriffe nach Hybridisierungen mit „b-DIG“ waren: (1) 2 × 15 min mit 0,5 × SSC, 0,1 % SDS bei 54,5°C, und (2) 2 × 15 min mit 0,2 × SSC, 0,1 % SDS bei 54,5°C. Nach der Hybridisierung mit „1,1 *DpnI*“ und dem Waschschriff bei RT wurden die Membranen zweimal für 15 min mit 0,5 × SSC, 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen.

### 2.26.4. Detektion

Die Detektion der hybridisierten Sonden erfolgte colorimetrisch, durch Bindung eines anti-DIG-Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugates (anti-DIG-AP) und Umsetzung der Substrate NBT und BCIP durch das Enzym.

Alle Schritte der Detektion wurden bei RT durchgeführt. Zuerst wurden die Membranen für 1 min in Waschpuffer (2.4.) äquilibriert, um dann für 60 min in dem Blockingpuffer (2.4.)

belassen zu werden, wodurch Hintergrundsignale verringert werden sollten. Das anti-DIG-AP-Konjugat wurde 1:5000 in Blockingpuffer verdünnt; in dieser anti-DIG-AP-Lösung wurden die Membranen nach Abgießen des Blockingpuffers für 30 min inkubiert. Zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern wurden die Membranen nun zweimal für 15 min mit Waschpuffer gewaschen und dann kurz in Detektionspuffer (2.4.) äquilibriert. Die Detektionslösung wurde durch Mischen von 66 µl NBT-Stammlösung, 33 µl BCIP-Stammlösung (2.4.) und 10 ml Detektionspuffer hergestellt. Unter Lichtabschluss wurden die Membranen in einer ausreichenden Menge Detektionslösung (die Membranen sollten bedeckt sein) belassen, bis deutliche Signale sichtbar wurden. Die Farbentwicklung wurde durch Spülen mit TE-Puffer gestoppt.

### 2.27. Konjugation

Während alle genetischen Elemente (*tra*-Gene, *oriT*) auf selbst-transmissiblen Plasmiden auf dem Plasmid selbst kodiert sind, fehlen auf mobilisierbaren Plasmiden die *tra*-Gene, die u. a. für die Ausbildung des Pilus notwendig sind. Letztere enthalten jedoch auch einen *oriT* und so genannte *mob*-Gene. Diese kodieren für eine spezifische Endonuklease, die die DNA-Stränge am *oriT* spaltet und für eine Helikase, die die Replikation eines DNA-Stranges ermöglicht. Mobilisierbare Plasmide können mittels *trans*-aktiver Genprodukte von anderweitig in der Zelle lokalisierten *tra*-Genen von einem Bakterium auf ein anderes übertragen werden.

Hier wurden rekombinante Formen des mobilisierbaren Plasmids pSUP202 (2.7.4.) bzw. des Plasmids pSUP202*aacC1* (2.7.5.) verwendet, welche von dem Donorstamm *E. coli* S17-1 (2.6.), der die *tra*-Gene des RP4-Replikons im Chromosom trägt, auf den Rezipientenstamm *P. putida* KT2440 pVK55B/5 übertragen wurden.

Konjugation wurde eingesetzt, um Suizid-Plasmide zur Insertionsinaktivierung der hypothetischen Gene ORF2, 4, 5 und 7 auf dem Plasmid pVK55B/5 (3.8.) in *P. putida* KT2440 pVK55B/5 einzuführen.

Die durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette veränderten Gene ORF2*nptII* und ORF5*nptII* wurden in die Tc-Resistenz des Plasmids pSUP202 kloniert, die disruptierten Gene ORF4*nptII* und ORF7*nptII* in die Cm-Resistenz des Plasmids pSUP202*aacC1* (3.16.4.). Nach Übertragung der mobilisierbaren Suizid-Plasmide in den Rezipienten-Stamm *P. putida* KT2440 pVK55B/5 sollten die intakten Gene auf dem Cosmid durch homologe Rekombination durch die unterbrochenen Gene ausgetauscht werden.

### 2.27.1. Filter-Mating

Der Donor-Stamm *E. coli* S17-1 mit dem rekombinanten, mobilisierbaren Plasmid wurde vor der Konjugation auf Platten mit entsprechendem LB-Selektionsmedium überimpft und über Nacht inkubiert. Der Rezipient *P. putida* pVK55B/5 wurde über Nacht in flüssigem LB-Tc-Medium bei 30°C kultiviert. Für das *mating* wurden einige Kolonien des Donors vorsichtig in 1 ml LB-Medium resuspendiert; 0,5 ml dieser Lösung wurden mit 1 ml der Rezipientenkultur gemischt. Nach einer Zentrifugation (RT, 6000 × *g*, 2 min) wurde das Pellet in ca. 200 µl des Überstandes gelöst. Die Zellsuspension wurde auf einen Nitrocellulose-Filter, der auf einer LB-Platte lag, gebracht. Die Platten wurden für 6 h bei 30°C inkubiert.

### 2.27.2. Selektion der Transkonjuganten

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium von dem Filter gespült und auf LB-Tc-Km-Selektionsplatten ausplattiert. Zur Kontrolle, ob bei der Rekombination ein *doppel-crossover* oder ein *einzel-crossover* stattgefunden hat, wurden die Transkonjuganten, bei denen ORF2 bzw. ORF5 ausgeschaltet werden sollte, auf Verlust der Wachstumsfähigkeit auf Chloramphenicol getestet; die Transkonjuganten, bei denen ORF4 bzw. ORF7 ausgeschaltet werden sollte, wurden auf Verlust der Wachstumsfähigkeit auf Gentamycin getestet.

## 2.28. Analysen von DNA- und Aminosäuresequenzen

Sequenzanalysen wurden hauptsächlich mit Programmen durchgeführt, die in dem HUSAR Programmpaket 4.0 des DKFZ, Heidelberg zur Verfügung stehen. Die Suche in Protein- und Nukleotiddatenbanken nach ähnlichen Sequenzen wurde mit verschiedenen BLAST-Programmen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) durchgeführt. Prozentuale Ähnlichkeiten und Identitäten zweier Sequenzen wurden mit dem Programm GAP (NEEDLEMAN & WUNSCH, 1970) kalkuliert, multiple Alignments wurden mit dem Programm CLUSTAL (HIGGINS *et al.*, 1996) erstellt. Codierende Sequenzbereiche wurden mit dem Programm FRAMES identifiziert und Sekundärstrukturen von Proteinen wurden mit dem Programm PredictProtein (BURKHARD, 1996) bzw. SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998) vorhergesagt.

## 2.29. Reinigung der Chinaldin-4-Oxidase aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

### 2.29.1. Zellaufschluss mit Ultraschall

X Gramm Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 1,5 × X ml Puffer A (2.4.) resuspendiert. Der Proteaseinhibitor PMSF wurde in einer Konzentration von 10 µM zugesetzt, Benzonase in einer Konzentration von 1,25 U/ml, bevor die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen wurden. Die

Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (40 min,  $48000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert, mit dem Überstand (Rohextrakt) wurde weitergearbeitet.

#### **2.29.2. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B**

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Puffer B (2.4.) äquilibrierte DEAE-Sepharose CL-6B Säule (20 ml) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit dem Äquilibrierungspuffer von der Säule gespült, bevor die Elution der gebundenen Proteine in einem linearen Gradient von 0 bis 1 M NaCl (Puffer B/Puffer C) erfolgte. Das Volumen des Gradienten betrug 100 ml, die Flussrate während der gesamten Chromatographie 1 ml/min.

#### **2.29.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B**

Fractionen, die im Eluat der ersten Chromatographie Qox-Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat zu einer Endkonzentration von 0,75 M versetzt. Die präzipitierten Proteine wurden bei  $20000 \times g$  (30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugiert und der Überstand wurde auf eine mit Puffer D (2.4.) äquilibrierte Säule geladen, die 10 ml Phenyl-Sepharose CL-4B enthielt. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen mit 85 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7), 0,55 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  von der Säulenmatrix entfernt, bevor die Qox in einem linearen Gradienten von 85 mM Tris/HCl (pH 7), 0,55 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zu 50 mM Tris/HCl (pH 7) (Puffer B) eluiert wurde. Der Gradient umfasste 50 ml, die Flussrate war 1 ml/min.

#### **2.29.4. Anionenaustauschchromatographie an UNO<sup>TM</sup>-Q 1**

Fractionen der hydrophoben Interaktionschromatographie mit Qox-Aktivität wurden vereinigt und auf eine mit Puffer B äquilibrierte Säule mit einer starken Anionenaustauschmatrix appliziert. Nach Spülen mit Puffer B, um ungebundene Proteine zu entfernen, wurden gebundene Proteine mit einem linearen Gradienten von 0,15 M bis 1 M NaCl in demselben Puffer in einem Volumen von 40 ml eluiert. Die Flussrate während der Chromatographie betrug 1 ml/min.

#### **2.29.5. Gelfiltration an einer HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule**

Das vereinigte, Qox-aktive Eluat aus der vorhergehenden Chromatographie wurde in einem Volumen von maximal 3 ml auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Säule wurde sowohl zum Äquilibrieren als auch zur Elution der Proteine mit Puffer E (2.4.) in einer Flussrate von 1 ml/min gespült.

### 2.29.6. Lagerung der gereinigten Chinaldin-4-Oxidase

Die von der Gelfiltrationssäule eluierte Qox wurde durch Ultrafiltration an VIVASPIN Konzentratoren (Ausschlussgröße 10000 Da) eingeeengt und bei -80 °C gelagert.

### 2.30. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer von ZOR & SELINGER (1996) modifizierten Methode von BRADFORD (1976). Dabei wird neben der Entstehung des Protein-Farbstoff-Komplexes ( $A_{590\text{nm}}$ ) auch die Abnahme des freien Farbstoffes ( $A_{450\text{nm}}$ ) gemessen und der Quotient  $A_{590\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$  gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Gegenüber der Originalmethode, bei der nur bei 590 nm gemessen wird, führt die Bestimmung des Quotienten zu einer linearen Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Absorption über einen größeren Protein-Konzentrationsbereich. Zudem wird die Sensitivität des Testes gesteigert.

0,2 ml der proteinhaltigen Lösung wurde mit 0,8 ml Bradford-Reagenz (2.4.) gemischt und nach 10 min Inkubationszeit bei RT bei beiden Wellenlängen photometrisch gemessen. Als Standardprotein wurde RSA verwendet.

### 2.31. Nachweis von Enzymaktivitäten

#### 2.31.1. Chinaldin-4-Oxidase Test

Die Qox-Aktivität wurde in einem photometrischen Test quantitativ bestimmt (DE BEYER & LINGENS, 1993). Das Testverfahren beruht auf der von der Qox katalysierten Hydroxylierungsreaktion des Substrates Chinaldin bei gleichzeitiger Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors INT zu rotem Formazan. Dieses kann bei 503 nm detektiert werden; sein Spektrum überlagert nicht mit dem des Umsetzungsproduktes 1*H*-4-Oxochinaldin.

Der Testansatz enthielt:

500  $\mu\text{l}$  100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 0,3 % Triton X-100

500  $\mu\text{l}$  2,5 mM INT in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$

50  $\mu\text{l}$  100 mM Chinaldin in Isopropanol

10  $\mu\text{l}$  Enzymlösung

Alle Bestandteile des Ansatzes bis auf das Substrat wurden vorgelegt und es wurde die Bildung des Formazans, welches durch unspezifische INT-Reduktion entstand, für 1 min beobachtet. Die Qox-katalysierte Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient des INT-Formazans  $\epsilon_{503\text{ nm}}: 19,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (BABSON & BABSON, 1973) verwendet. Der Test wurde bei RT durchgeführt.

### 2.31.2. Nachweis der 1*H*-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase

Die Aktivität der 1*H*-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase wurde mit NADPH als Cosubstrat bestimmt. Da bei 340 nm sowohl das Substrat 4-Hydroxychinaldin (1*H*-4-Oxochinaldin), als auch das NADPH absorbieren, wurde die Änderung der Extinktion bei 365 nm beobachtet. Der molare Extinktionskoeffizient für NADPH  $\epsilon_{365 \text{ nm}}$ :  $3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (BERGMEYER, 1975) wurde der Berechnung der Enzymaktivität zugrunde gelegt.

Der Testansatz enthielt:

- 875  $\mu\text{l}$  20 mM Tris/HCl (pH 8)
- 50  $\mu\text{l}$  4 mM NADPH in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$
- 50  $\mu\text{l}$  1,5 mM 4-Hydroxychinaldin in Isopropanol (50 % (v/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ )
- 50  $\mu\text{l}$  Enzymlösung

Die Reaktion wurde durch Substratzugabe gestartet. Der Test wurde bei RT durchgeführt. Zur Dokumentation der Absorptionsänderung wurden UV/Vis-Spektren über einen Zeitraum von einer Stunde aufgezeichnet.

### 2.31.3. Nachweis der *N*-Acetylanthranilat-Amidase

#### 2.31.3.1. Spektrophotometrischer Test

Zum Nachweis der *N*-Acetylanthranilat-Amidase wurde folgender Testansatz zusammengegeben:

- 850  $\mu\text{l}$  20 mM Tris/HCl (pH 8)
- 100  $\mu\text{l}$  1,5 mM *N*-Acetylanthranilsäure in Ethanol
- 50  $\mu\text{l}$  Enzymlösung

Die Reaktion wurde durch Substratzugabe gestartet und bei RT durchgeführt.

Es wurde die Produktbildung anhand der Extinktionsänderung bei 325 nm beobachtet. Bei 309 nm, wo das Anthranilat ein Maximum aufweist, absorbiert auch das Substrat. Der molare Extinktionskoeffizient für Anthranilat bei 325 nm wurde in 20 mM Tris/HCl Puffer pH 8 bestimmt. Zur Dokumentation der Absorptionsänderung wurden UV/Vis-Spektren über einen Zeitraum von einer Stunde aufgezeichnet.

#### 2.31.3.2. Bestimmung des Umsetzungsproduktes durch Dünnschichtchromatographie

Zur Bestimmung des Produktes der enzymkatalysierten Reaktion wurde ein Testansatz, wie er unter 2.31.3.1. beschrieben ist, 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zusatz von einem Tropfen konzentrierter Salzsäure wurden die Proteine denaturiert und die Carbonsäuren protoniert. Nach Abzentrifugieren der Proteine wurde der Überstand mit 100  $\mu\text{l}$  Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die Substanzen, die in die organische Phase übergegangen waren, wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten, welche einen UV-

Indikator (254 nm) enthielten, in Laufmittel I (2.4.) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (254 nm).

### 2.32. Bestimmung von $K_m$ und $k_{cat}$ für Chinaldin und INT für die aus *P. putida* KT2440 pKP1/III gereinigte Qox

Die Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) gibt die Substratkonzentration  $[S]$  an, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Dabei gilt die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

mit:  $V_0$  = Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und  $V_{max}$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

Die kinetischen Parameter für das Substrat Chinaldin und den artifiziellen Elektronenakzeptor INT wurden im Chinaldin-4-Oxidase Test (2.31.1.) bestimmt. Dabei wurde Chinaldin in Konzentrationen von 4,7 mM bis 94,3 mM, INT in Konzentrationen von 4,7 mM bis 117,9 mM eingesetzt. Enzympäparationen mit einer spezifischen Aktivität von 5 U/mg (Proteinkonzentration 1,4 mg/ml) wurden in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt. Die Messungen wurden bei RT durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden in einem Hanes-Diagramm (HANES, 1932) aufgetragen; die Schnittpunkte der Geraden mit den Achsen wurden durch lineare Regression bestimmt.  $V_{max}$  ergibt sich dabei aus dem reziproken Wert der Geradensteigung,  $K_m$  entspricht dem Betrag des Schnittpunktes mit der X-Achse. Die Wechselzahl  $k_{cat}$  gibt die Anzahl der Reaktionszyklen eines Enzyms pro Zeiteinheit an, sie kann direkt aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der eingesetzten Enzymmenge ermittelt werden. Zur Berechnung von  $k_{cat}$  wurde die aus der Aminosäuresequenz ermittelte molare Masse von 266,4 kDa herangezogen.

### 2.33. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

In einem elektrischen Feld bewegen Proteine sich im Verhältnis zu ihrer Ladungsdichte (Ladung/Masse), verschiedene Proteine werden so in einem Polyacrylamidgel bei konstanter Spannung voneinander getrennt. Die Auftrennung von Proteinen unterschiedlicher Größe ist dabei abhängig von der Porengröße des Gels, welche sich durch die prozentuale Gesamtkonzentration (% T) der Monomere (Acrylamid und Bisacrylamid) und durch den prozentualen Anteil des Bisacrylamides (% C) bezogen auf die Gesamtkonzentration T definiert.

### 2.33.1. SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970)

Zur Überprüfung der Homogenität von Proteinpräparationen wurden 0,75 mm dicke SDS-PA Gele mit 13,4 % T und 2,6 % C im Trenngel eingesetzt. Zur Vorbereitung der Proben wurden 20 µl Proteinlösung mit 5 µl SDS-DTT-Lösung (2.4.) gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Färbelösung (2.4.) über Nacht gefärbt und gleichzeitig im Gel fixiert. Überschüssiges Coomassie Blue wurde anschließend durch eine Entfärbelösung (2.4.) aus dem Gel gespült.

### 2.33.2. Native PAGE

Zum Nachweis der Synthese von rekombinanten Proteinen und zum Vergleich ihres Laufverhaltens mit dem des Wildtyp-Proteins wurden PAGEs unter nativen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde das „High-pH discontinuous“ Puffersystem nach HAMES (1990) und 0,75 mm dicke Gele (8 % T, 2,6 % C im Trenngel) eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder einer allgemeinen Proteinfärbung mit Coomassie Blue (2.4.) unterzogen oder aktive Qox wurde in einer Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht. Bei der Aktivitätsfärbung wurde das Gel in eine Lösung, die die Bestandteile des Enzymtestes (Puffer, INT, Chinaldin) (2.31.1.) enthielt, getaucht; die Qox-katalysierte Umsetzung des INT zu Formazan wurde durch Spülen mit 10 %iger (v/v) Essigsäure beendet. Coomassie gefärbte Gele wurden mit einer Entfärbelösung (2.4.) von überschüssiger Farbe befreit.

### 2.34. Lichtabsorptionsspektrum der nativen Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

Zur Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums der gereinigten Qox wurde eine Enzympräparation mit einer spezifischen Aktivität von 5,2 U/mg (Proteingehalt 1,4 mg/ml) herangezogen. Durch Bestimmung der Quotienten  $A_{280\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$  und  $A_{450\text{nm}}/A_{550\text{nm}}$  können einerseits die Reinheit der Präparation und andererseits die stöchiometrischen Verhältnisse von FAD:Fe:S in molybdänhaltigen Hydroxylasen bestimmt werden (COUGHLAN, 1980).

### 2.35. Nachweis von CMP in Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

Zum Nachweis des Nukleotides, welches an den Molybdän-Pyranopterin-Cofaktor gebunden ist, wurden 1,26 mg Qox (3 U/mg) in 3 %iger (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 10 min auf 95°C erhitzt. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation (10 min, 20000 × g, RT) von den gelösten Nukleotiden abgetrennt. Der Überstand wurde mittels HPLC an einer Lichrosorb C-RP-18 Säule (Partikelgröße 5 µm, 4 × 250 mm) analysiert. Als Laufmittel wurde 0,2 %ige (v/v) Essigsäure mit 0,5 % (v/v) Methanol verwendet, die Flussrate betrug 1 ml/min. Peaks wurden

anhand der Retentionszeiten und der UV/Vis-Absorptionsspektren und durch Cochromatographie mit Referenzsubstanzen (CMP, GMP, AMP, Cytidin) identifiziert.

### **2.36. Untersuchung des Metallgehaltes der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III und *A. ilicis* Rü61a**

Die Bestimmung des Metallgehaltes der Enzyme aus *P. putida* KT2440 pKP1/III und dem Wildtyp wurde im Chemical Analysis Laboratory der University of Georgia durchgeführt. Die dabei verwendete Methode der *inductively coupled argon plasma* (ICAP)-Emissionsspektrometrie beruht auf der Veraschung des Proteins in einem Argonplasma, wobei verschiedene in der Probe vorhandene Elemente Licht von charakteristischer Wellenlänge emittieren. Die Intensität des Lichtstrahls ist dabei direkt proportional zu der Konzentration des Elementes in der Probe.

Zur Analyse wurden 1,2 mg Wildtyp-Enzym und 1 mg Enzym aus *P. putida* KT2440 pKP1/III verwendet. Die spezifischen Aktivitäten beider Präparationen lagen bei ca. 5 U/mg.

### **2.37. Elektronenspinresonanzspektroskopie**

Zur Detektion paramagnetischer Zustände der redoxaktiven Zentren der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III ( $\text{Mo}^{\text{V}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{FADH}^{\bullet}$ ) wurden 2,3 mg (8,6 nmol) einer homogenen Präparation ESR-spektroskopisch untersucht. Die Messungen wurden an der Universität des Saarlandes von R. Kraft, Dr. R. Kappl und Prof. Dr. J. Hüttermann durchgeführt.

Das native Enzym wurde in einem ersten Reduktionsschritt mit einem 10-fachen, später mit einem 60-fachen molaren Überschuss an Chinaldin versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurde unter anoxischen Bedingungen gearbeitet, um einen vollständigen Katalysezyklus zu verhindern. Zur kompletten Reduktion der redoxaktiven Zentren wurde ein 20-facher molarer Überschuss an Natriumdithionit zugesetzt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 77 K in flüssigem Stickstoff und zwischen 10 K und 65 K unter Helium. Bei Temperaturen von 65 und 77 K wurde die Mikrowellenleistung von 0,2 mW bis 10 mW variiert. Bei 25 K wurden die Spektren bei 10 mW Mikrowellenleistung aufgenommen. Um ein Hintergrundrauschen zu kompensieren, wurden die Spektren bis zu 50 Mal aufaddiert.

Spektren der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III wurden mit solchen des Wildtyp-Enzyms verglichen.

### 3. Experimente und Ergebnisse

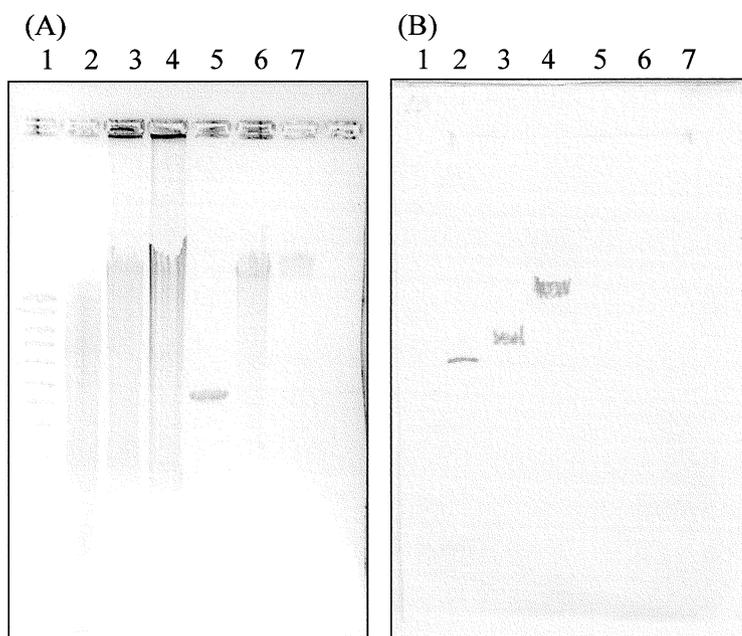
#### 3.1. Konstruktion einer angereicherten Genbank von *A. ilicis* Rü61a

Da zu Beginn der Arbeit nur die hoch degenerierte Oligonukleotidsonde „b-DIG“ zur Verfügung stand, welche mit nur einem DIG-Molekül pro Sondenmolekül markiert war, sollte zuerst eine angereicherte Genbank für *A. ilicis* Rü61a in einem *high-copy number* Vektor (pUC18) erstellt werden. Aufgrund der hohen Kopienzahl des Vektors wurde erwartet, dass die Detektion der Ziel-DNA nach einem Kolonieblotting mit anschließender Hybridisierung in diesem System erfolgreicher sein würde, als in einem Vektor mit niedriger Kopienzahl.

##### 3.1.1. Hybridisierung vollständig restringierter genomischer DNA und Plasmid-DNA mit der Oligonukleotidsonde „b-DIG“

Genomische DNA von *A. ilicis* Rü61a wurde mit den Enzymen *Sma*I, *Sal*I und *Hind*III vollständig restringiert (2.14.). Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.18.) und mittels Southern-Transfer (2.26.2.) an eine positiv geladene Nylonmembran gebunden. Die Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde „b-DIG“ (2.25.1.) zur Identifizierung des *qoxM*-Gens erfolgte wie unter 2.26.3. beschrieben.

Mit der Sonde „b-DIG“ hybridisierten folgende Restriktionsfragment (Abb. 6): Ein *Sma*I-Fragment von ca. 4,5 kb, ein *Sal*I-Fragment von ca. 5,1 kb und ein *Hind*III-Fragment von ca. 11 kb.



**Abb. 6**

Untersuchung der spezifischen Bindung der Oligonukleotidsonde „b-DIG“.

(A) Agarosegel (0,7 %), in dem Restriktionsfragmente genomischer DNA von *A. ilicis* Rü61a und *E. coli* XL1-Blue MRF', bzw. Plasmid-DNA von pUC18 aufgetrennt sind.

(B) Blot des Agarosegels (A) nach Hybridisierung mit der Sonde „b-DIG“ und colorimetrischer Detektion.

Bahn 1: DNA Größenstandard Smart Ladder, Bahn 2: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *SmaI* restringiert, Bahn 3: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *SaII* restringiert, Bahn 4: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *HindIII* restringiert, Bahn 5: pUC18, *SmaI* restringiert, Bahn 6: Genomische DNA aus *E. coli* XL1-Blue MRF', *SmaI* restringiert, Bahn 7: Genomische DNA aus *E. coli* XL1-Blue MRF', nicht restringiert.

### 3.1.2. Konstruktion einer angereicherten Genbank

Das 4,5 kb große *SmaI*-Restriktionsfragment, welches mit der Sonde „b-DIG“ hybridisierte, wurde zur Erstellung einer angereicherten Genbank zur Identifizierung der Qox kodierenden Gene ausgewählt. Ausgehend von dem Wissen um die genetische Organisation der Chinolin-2-Oxidoreduktase von *P. putida* 86 (BLÄSE *et al.*, 1996), der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* (SCHÜBEL *et al.*, 1995) und der Nikotin-Dehydrogenase von *A. nicotinovorans* (BAITSCH *et al.*, 2001), konnte erwartet werden, dass auch die drei Untereinheiten der Qox von drei Genen kodiert werden, welche in einem Cluster organisiert sind. Die Gencluster der oben genannten Enzyme erstrecken sich jeweils über Sequenzabschnitte von weniger als 4 kb und da die drei Proteinuntereinheiten der Qox in der Größe denen der drei anderen Enzyme ähnlich sind, wurde eine ähnliche Größe eines potentiellen Genclusters, der die Strukturgene der Qox umfasst, erwartet.

Nach 2.9.2. isolierte genomische DNA von *A. ilicis* Rü61a wurde vollständig mit *SmaI* restringiert. Fragmente in der Größe zwischen 4-5 kb wurden nach einer Gelelektrophorese mittels Gelextraktion (2.19.1.) zurückgewonnen. 100 ng dieser DNA-Fragmente wurden zur Kontrolle auf einem Southern-Blot mit der Sonde „b-DIG“ hybridisiert; es konnte das erwartete Signal bei ca. 4,5 kb detektiert werden. Daraufhin wurden 450 ng der DNA-Fragmente mit dem mit *SmaI* linearisierten und dephosphorylierten (2.15.) Vektor pUC18 ligiert (2.17.). Der Ligationsansatz wurde genutzt, um damit elektrokompente *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen zu transformieren (2.21.2.).

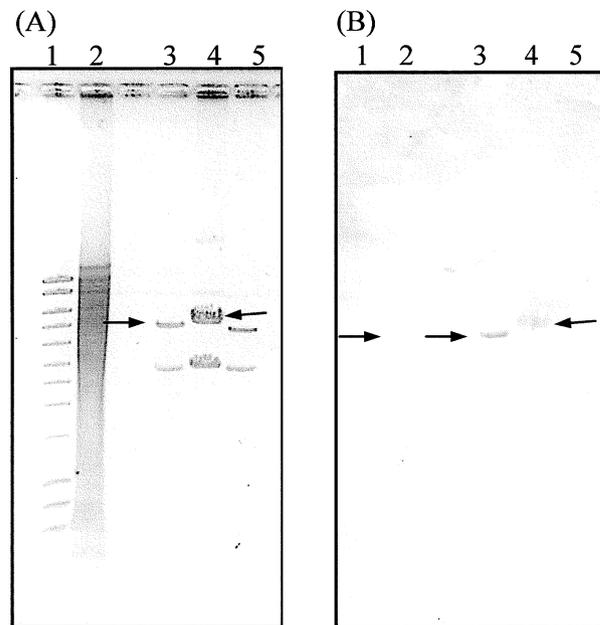
Die angereicherte Genbank enthielt 348 Transformanten.

### 3.1.3. Screening der angereicherten Genbank

Zur Identifizierung der Transformanten, die *qox*-Gene im Insert des Plasmids enthalten, wurde die DNA der Transformanten der angereicherten Genbank (3.1.2.) mittels Kolonieblotting auf eine Nylonmembran übertragen (2.26.1.) und mit der Sonde „b-DIG“ hybridisiert (2.26.3.).

Als Negativkontrolle wurden Kolonien von *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>, der das Plasmid pUC18 enthielt, mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde nach 2.9.2. isolierte genomische DNA von *A. ilicis* Rü61a eingesetzt.

Die Signale auf den Kolonieblots waren sehr schwach und aufgrund störender Hintergrundsignale konnten keine eindeutigen Ergebnisse ermittelt werden. Darum wurde die Plasmid-DNA von Transformanten, die ein schwaches Signal zeigten, nach 2.10.1. isoliert, mit *Sma*I restringiert und im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet (2.26.2.) und mit der Sonde „b-DIG“ hybridisiert (2.26.3.). Drei der getesteten Plasmide enthielten Inserts, welche deutlich mit der Sonde hybridisierten. Abbildung 7 zeigt exemplarisch zwei dieser „positiven“ Plasmide (Bahnen 3 und 4) neben einem, welches kein Hybridisierungssignal zeigte (Bahn 5). Als Positivkontrolle wurde bei diesen Hybridisierungsexperimenten *Sma*I restringierte genomische DNA von *A. ilicis* Rü61a mitgeführt.



**Abb. 7**

Hybridisierung von DNA rekombinanter Plasmide mit der Sonde „b-DIG“.

Agarosegel (A) nach Auftrennung von *Sma*I restringierter Plasmid-DNA und genomischer DNA; korrespondierender Blot (B) nach Southern-Transfer, Hybridisierung mit der Sonde „b-DIG“ und colorimetrischer Detektion.

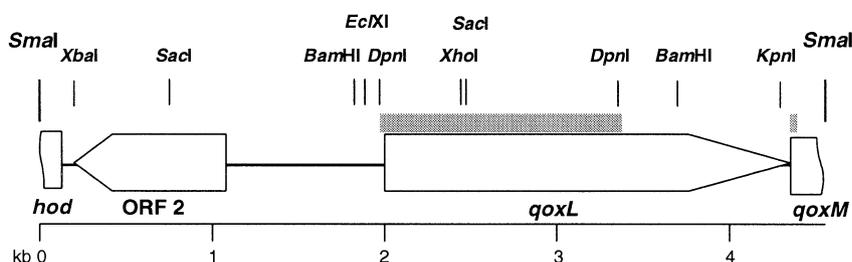
Bahn 1: DNA Größenstandard Smart Ladder, Bahn 2: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *Sma*I restringiert (Positivkontrolle), Bahn 3-5: Plasmid-DNA von Transformanten nach *Sma*I Restriktion

Das Plasmid pUC4,5 (Abb. 7, Bahn 3), dessen Insert ein deutliches Hybridisierungssignal mit der Sonde „b-DIG“ zeigte, wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt; das Insert wurde durch Herrn Dr. B. Hauer (BASF AG) sequenziert.

### 3.2. Analyse des Inserts von pUC4,5

#### 3.2.1. Restriktionsanalyse des 4,5 kb Inserts

Zur Analyse des Plasmidinserts wurde nach 2.10.1. isolierte Plasmid-DNA von pUC4,5 *Sma*I restringiert. Das 4,5 kb lange Fragment wurde durch Gelextraktion (2.19.1.) erhalten und mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Dpn*I, *Ecl*XI, *Kpn*I, *Sac*I, *Xba*I und *Xho*I in separaten Ansätzen behandelt. Zusätzlich wurden Doppelrestriktionen mit *Bam*HI/*Sac*I, *Ecl*XI/*Sac*I und *Ecl*XI/*Xho*I durchgeführt. Die gleichen Restriktionen wurden zur Lokalisation der Schnittstellen (Abb. 8) auf das vollständige Plasmid pUC4,5 angewandt. Die Spaltprodukte wurden sowohl in 0,6 %igen, als auch in 1,5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.



**Abb. 8**

Funktionelle Sequenzabschnitte des 4,5 kb großen Inserts von pUC4,5.

Die Pfeile geben Lage und Leserichtung der gefundenen ORFs an. Unter 3.2.1. experimentell ermittelte Restriktionsschnittstellen sind nach erfolgtem Sequenzabgleich dargestellt (es sind nicht alle *Dpn*I Schnittstellen aufgeführt). Die grau unterlegten Rechtecke bezeichnen die Sequenzabschnitte, die zur Erstellung der Sonden „b-DIG“ und „1,1 *Dpn*I“ genutzt wurden.

#### 3.2.2. Sequenzanalyse des 4,5 kb Inserts

Das 4,5 kb lange DNA-Fragment wurde sequenziert; die dazu eingesetzten *primer* finden sich in Anhang 2. Die Nukleotidsequenz des 4580 bp langen Sequenzabschnittes findet sich in der 23015 bp langen Sequenz (Anhang 1) von Nukleotid 15458 bis Nukleotid 20037.

Auf dem Fragment konnten zwei vollständige und zwei beginnende gencodierende Bereiche (*open reading frames*, ORFs) festgelegt werden (Abb. 8). Anhand der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenzen der drei Qox-Untereinheiten (DE BEYER & LINGENS, 1993) konnte eines der kompletten Gene und das stromabwärts davon beginnende Gen als *qoxL* und *qoxM* identifiziert werden. Stromaufwärts von *qoxL* in reverser Orientierung beginnt ein weiteres potentiell Gen, welches mit ORF 2 bezeichnet wurde. 90 Nukleotide stromabwärts von dessen Stopcodon wurde das 5'-Ende des Gens, welches für die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-

Dioxygenase (Hod) (BETZ *et al.*, 2000; FETZNER, 2002) kodiert, anhand von Sequenzvergleichen identifiziert. Eine detaillierter Beschreibung der (potentiellen) Gene und der Genprodukte folgt unter 3.9. und 3.10..

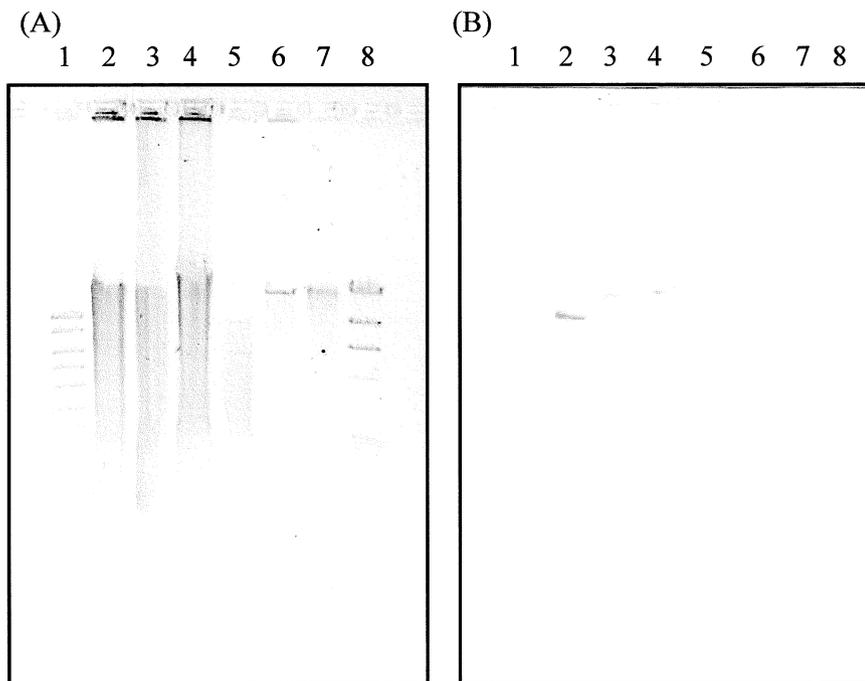
### **3.3. Etablierung einer Genbank, die das Genom von *A. ilicis* Rü61a repräsentiert**

Da mit Hilfe der angereicherten Genbank nicht der komplette die Gene *qoxL*, *qoxM* und *qoxS* umfassende Cluster identifiziert werden konnte, wurde eine Genbank, die das vollständige Genom von *A. ilicis* Rü61a repräsentiert, in dem Cosmid-Vektor pVK100 erstellt. Zum Durchsuchen der Genbank wurde die *qoxL*-spezifische Sonde „1,1 *DpnI*“ (2.25.2.) eingesetzt.

#### **3.3.1. Hybridisierung genomischer DNA mit der Sonde „1,1 *DpnI*“**

Zur Untersuchung der Bindungsspezifität der Sonde „1,1 *DpnI*“, die einen 1052 bp langen Sequenzabschnitt am 5'-Ende von *qoxL* umfasst (Abb. 8), wurde genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a und *E. coli* HB101, sowie Plasmid-DNA des Cosmid-Vektors pVK100 vollständig restringiert (2.14.), nach einer Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen (2.26.2.) und mit der Sonde „1,1 *DpnI*“ hybridisiert (2.26.3.).

Die *qoxL*-spezifische Sonde hybridisierte mit einem 9 kb großen *KpnI*-Fragment, einem 10,5 kb großen *EcoRI*-Fragment, einem 11 kb großen *HindIII*-Fragment und wie erwartet mit dem 4,5 kb großen *SmaI*-Fragment der *A. ilicis* Rü61a DNA (Abb. 9). Weder DNA des Plasmids, noch DNA von *E. coli* HB101 zeigte mit dieser Sonde ein Hybridisierungssignal.

**Abb. 9**

Hybridisierung zur Überprüfung der Spezifität der Sonde „1,1 *DpnI*“.

Agarosegel (A), in dem genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a und *E. coli* HB101, sowie Plasmid-DNA des Cosmids pVK100 nach Restriktionen aufgetrennt wurden. (B) stellt den korrespondierenden Blot nach Hybridisierung mit der Sonde „1,1 *DpnI*“ und colorimetrischer Detektion dar.

Bahn 1: DNA Größenstandard Smart Ladder, Bahn 2: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *KpnI* restringiert, Bahn 3: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *EcoRI* restringiert, Bahn 4: Genomische DNA von *A. ilicis* Rü61a, *HindIII* restringiert, Bahn 5: Genomische DNA aus *A. ilicis* Rü61a, *SmaI* restringiert, Bahn 6: pVK100, *HindIII* restringiert (Negativkontrolle), Bahn 7: Genomische DNA aus *E. coli* HB101, *SmaI* restringiert (Negativkontrolle), Bahn 8: DNA Größenstandard:  $\lambda$ -DNA, *HindIII* restringiert

### 3.3.2. Konstruktion der Genbank

Genomische DNA von *A. ilicis* Rü61a wurde partiell mit *HindIII* restringiert (2.14.1.). Die geschnittene DNA wurde in einem Gel aus *low-melt* Agarose aufgetrennt (2.18.) und Fragmente in der Größe von 15 kb bis 25 kb wurden mittels Hydrolyse der Agarose durch Agarase (2.19.2.) zurückgewonnen. Der Cosmid-Vektor pVK100 wurde mit *HindIII* linearisiert und durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (2.15.). Die Ligation wurde wie unter 2.17.1 beschrieben durchgeführt.

In einer *in vitro packaging* Reaktion wurden die Concatemere aus  $\lambda$ -Phagenarmen und inserierten DNA-Fragmenten in Phagenköpfe „verpackt“ (2.20.1.). Diese wurden genutzt, um *E. coli* HB101 Zellen, die in einer Magnesium-Kultur gezüchtet worden waren (2.20.2.), zu

infizieren. Die Transfektanten wurden auf Tetracyclin-Resistenz ( $Tc^r$ ) und Kanamycin-Sensitivität ( $Km^s$ ) getestet (2.20.3.).

Die Genbank enthielt 3584 *E. coli* HB101 pVK ( $Tc^r$ ,  $Km^s$ ) Klone, die nach unten stehender Formel mit über 99 %iger Wahrscheinlichkeit das vollständige *A. ilicis* Rü61a Genom repräsentieren.

$$N = \ln(1-P) / \ln[1-(F/G)]$$

N = Anzahl der Klone

P = Wahrscheinlichkeit, dass das Genom komplett repräsentiert ist (hier: 99 %)

F = Fragmentlänge (hier: durchschnittlich 20000 bp)

G = Genomgröße (hier: angenommen 6 Mio. bp)

### 3.3.3. Screening der Genbank

Zur Untersuchung der Klone der Genbank wurde DNA der Kolonien auf eine Nylonmembran übertragen (2.26.1.) und mit der *qoxL*-spezifischen Sonde „1,1 *DpnI*“ hybridisiert (2.26.3.). Zwanzig *E. coli* HB101 pVK ( $Tc^r$ ,  $Km^s$ ) Klone zeigten neben der Positivkontrolle (*E. coli* XL1-Blue MRF' pUC4,5) ein deutliches Signal, während die DNA von *E. coli* HB101 pVK100, der als Negativkontrolle mitgeführt wurde, nicht mit der Sonde hybridisierte.

## 3.4. Untersuchung rekombinanter Cosmide und Synthese aktiver Chinaldin-4-Oxidase durch *Pseudomonas putida* KT2440 pVK ( $Tc^r$ , $Km^s$ )

Bevor einer der zwanzig Klone, welche ein positives Hybridisierungssignal mit der Sonde „1,1 *DpnI*“ zeigten, zur Sequenzierung des Cosmidinserts ausgewählt wurde, sollten diese Klone auf die Fähigkeit der Synthese aktiver Qox untersucht werden. Versuche zur heterologen Expression und zur Synthese aktiver molybdänhaltiger Hydroxylasen mit MCD-Cofaktor in *E. coli* Wirtsstämmen waren jedoch bisher erfolglos (BLÄSE *et al.*, 1996; BLACK *et al.*, 1990). Aus diesem Grund wurde der Stamm *P. putida* KT2440, der auch schon zur funktionellen Expression der Chinolin-2-Oxidoreduktase Gene eingesetzt worden war (BLÄSE *et al.*, 1996, FRERICHS-DEEKEN, 2000, FRERICHS-DEEKEN *et al.*, 2003) als Rezipient der rekombinanten Cosmide ausgewählt.

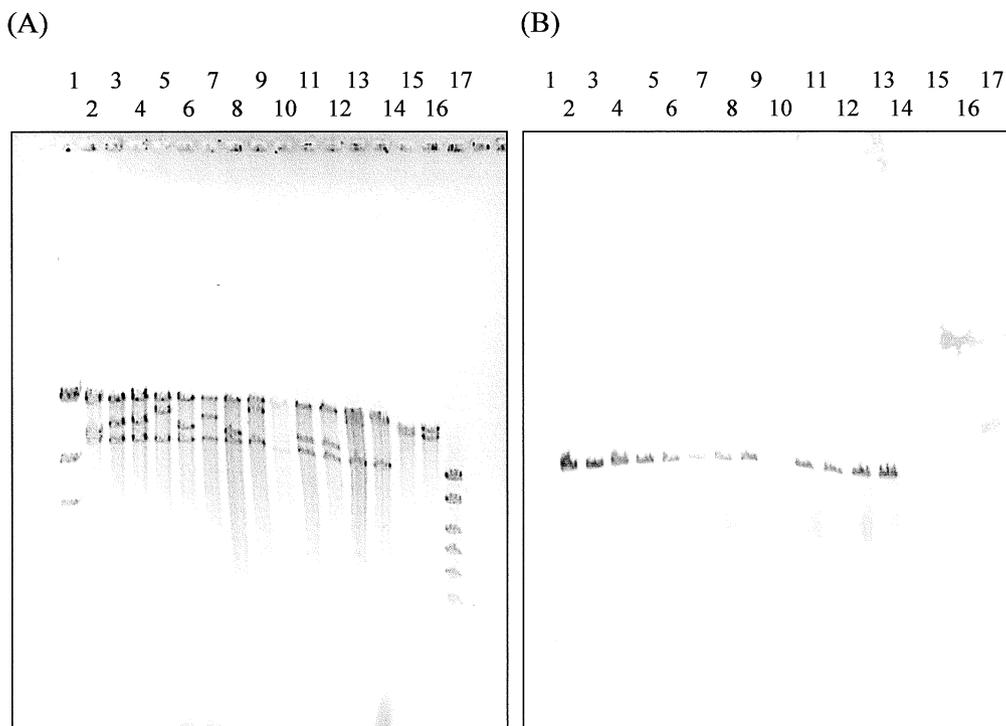
### 3.4.1. Umklonierung der rekombinanten Cosmide in *P. putida* KT2440

Die Cosmid-DNA der zwanzig „positiven“ *E. coli* HB101 pVK ( $Tc^r$ ,  $Km^s$ ) Klone wurde nach 2.10.1. isoliert; 1-2  $\mu$ l der DNA wurden zur Transformation elektrokompetenter *P. putida* KT2440 Zellen eingesetzt (2.21.). Dreizehn rekombinante Cosmide konnten stabil in *P. putida* KT2440 etabliert werden.

### 3.4.2. Hybridisierung von Cosmid-DNA aus *P. putida* KT2440 pVK (Tc<sup>r</sup>, Km<sup>s</sup>) Klonen mit der Sonde „1,1 *DpnI*“

Zur Identifizierung der mit der *qoxL*-spezifischen Sonde hybridisierenden Fragmente wurde Cosmid-DNA der *P. putida* KT2440 Klone mit *Hind*III restringiert, auf eine Nylonmembran übertragen (2.26.2.) und zur Hybridisierung eingesetzt (2.26.3.).

Abbildung 10 zeigt, dass die Inserts der Cosmide, die auch im Kolonieblot mit der Sonde hybridisierten, ein *Hind*III-Fragment von etwa 11 kb aufweisen, welches z. T. komplementär zu der Sondensequenz ist. Daneben besitzen die klonierten DNA-Abschnitte dieser Klone jeweils ein zweites *Hind*III-Fragment unterschiedlicher Größe. Rekombinante Cosmide, die im Kolonieblot kein Hybridisierungssignal zeigten, besitzen die hybridisierenden 11 kb Fragmente nicht (Abb. 10, Bahnen 15 und 16).



**Abb. 10**

Hybridisierung von *Hind*III restringierten rekombinanten Cosmiden mit der *qoxL*-spezifischen Sonde.

(A) Agarosegel nach gelelektrophoretischer Auftrennung *Hind*III-restringierter Cosmide, (B) korrespondierender Blot nach Hybridisierung mit der Sonde „1,1 *DpnI*“ und Detektion

Bahn 1: Größenstandard:  $\lambda$ -DNA, *Hind*III restringiert, Bahnen 2-14: DNA rekombinanter Cosmide, *Hind*III restringiert (Cosmidbezeichnungen: 2: 1E/4, 3: 1G/5, 4: 3D/6, 5: 14D/1, 6: 14F/7, 7: 18D/3, 8: 18F/4, 9: 49G/2, 10: 50A/1, 11: 53B/6, 12: 55B/5, 13: 56B/4, 14: 64C/2), Bahnen 15 und 16: DNA rekombinanter Cosmide, die im Kolonieblot kein Signal gezeigt hatten, 17: DNA Größenstandard Smart Ladder

### 3.4.3. Synthese aktiver Chinaldin-4-Oxidase und cometabolische Chinaldin-Umsetzung durch *P. putida* KT2440 pVK (Tc<sup>r</sup>, Km<sup>s</sup>) Klone

Die dreizehn *P. putida* KT2440 Cosmidklone wurden zur Untersuchung ihrer Fähigkeit, Chinaldin cometabolisch umzusetzen und aktive Qox zu synthetisieren, in Chinaldin-Succinat-Minimalmedium gezüchtet; durch Zugabe von Chinaldin in die wachsende Kultur wurde erhofft, die Expression der Gene der am Abbau beteiligten Enzyme zu induzieren.

Um die spezifische Aktivität der Qox im Rohextrakt der Cosmidklone zu bestimmen, wurden sie nach 2.8.2. gezüchtet. Zur Feststellung, ob die Expression der *qox*-Gene einer Regulation durch das Substrat unterliegt, wurden die Klone sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Chinaldin kultiviert. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Ultraschall (2.29.1.) aufgeschlossen und die Enzymaktivität der Qox wurde im Standardtest (2.31.1.) bestimmt.

Wie durch Aufnahme von UV/Vis-Spektren der Kulturüberstände (2.8.2.) erkennbar, setzten vier der Cosmidklone Chinaldin überhaupt nicht um; sie zeigten auch keine Qox-Aktivität (Tab. 3). In vieren der Cosmidklone katalysierte die Qox den ersten Schritt im Chinaldin-Abbau, die Umsetzung zu 1H-4-Oxochinaldin, welches nicht weiter degradiert wurde. Die verbleibenden fünf *P. putida* KT2440 pVK Klone bauten Chinaldin im Succinatmedium cometabolisch bis zum Anthranilat ab, welches akkumulierte. Aus diesen fünf Klonen wurde der mit *P. putida* KT2440 pVK55B/5 bezeichnete für weitere Untersuchungen ausgewählt, da er im induzierten Zustand die höchste Qox-Aktivität aufwies (Tab. 3).

Es konnte festgestellt werden, dass die Synthese aktiver Qox einer substratabhängigen Regulation unterliegt. Die spezifische Aktivität konstitutiv synthetisierter Qox ist in den Rohextrakten der untersuchten Klone um einen Faktor von 2 bis 8 geringer als die spezifische Qox-Aktivität nach Induktion.

Ein *P. putida* KT2440 Klon, der das unveränderte Cosmid pVK100 enthielt, war nicht in der Lage, Chinaldin oder eines der folgenden Abbauprodukte aus dem Anthranilatweg (1H-4-Oxochinaldin, *N*-Acetylanthranilat, Anthranilat) cometabolisch umzusetzen. Catechol wurde hingegen vollständig abgebaut. Im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK100 Zellen konnte keine Qox-Aktivität nachgewiesen werden.

Rohextrakte der Klone, die Chinaldin umsetzten, wurden in einer nativen PAGE aufgetrennt und einer Färbung auf Qox-Aktivität unterzogen (2.33.2.). In jedem Rohextrakt konnte eine rote Bande (durch Formazanbildung) nachgewiesen werden, die von einem Protein herrührte, welches die gleiche elektrophoretische Mobilität aufwies wie die Qox aus *A. ilicis* Rü61a. In Coomassie gefärbten nativen PA-Gelen derselben Proben konnten den Banden, die in einem einer Aktivitätsfärbung unterzogenen Gel lokalisiert werden konnten, keine korrespondierenden Banden zugeordnet werden. Abbildung 11(A) zeigt diese Ergebnisse am Beispiel des Klons *P. putida* KT2440 pVK55B/5.

**Tab. 3**

Spezifische Qox-Aktivität in Rohextrakten von *P. putida* KT2440 pVK (Tc<sup>r</sup>, Km<sup>s</sup>) Klonen und Umsetzungsprodukte cometabolischer Chinaldin-Konversion.

Stamm/ <i>P. putida</i> KT2440 pVK Klon	spezifische Qox-Aktivität (U/mg)		Umsetzungsprodukt
	induziert	nicht induziert	
<i>P. putida</i> KT2440 pVK100	0,0	0,0	keine Umsetzung
1E/4	0,0	0,0	keine Umsetzung
1G/5	0,0	0,0	keine Umsetzung
3D/6	0,037	0,01	1H-4-Oxochinaldin
14D/1	0,0	0,0	keine Umsetzung
14F/7	0,027	0,009	Anthranilat
18D/3	0,0	0,0	keine Umsetzung
18F/4	0,075	0,009	1H-4-Oxochinaldin
49G/2	0,022	0,01	Anthranilat
50A/1	n. b.	n. b.	1H-4-Oxochinaldin
53B/6	0,012	0,003	1H-4-Oxochinaldin
<b>55B/5</b>	<b>0,041</b>	<b>0,015</b>	<b>Anthranilat</b>
56B/4	n. b.	n. b.	Anthranilat
64C/2	0,016	n. b.	Anthranilat

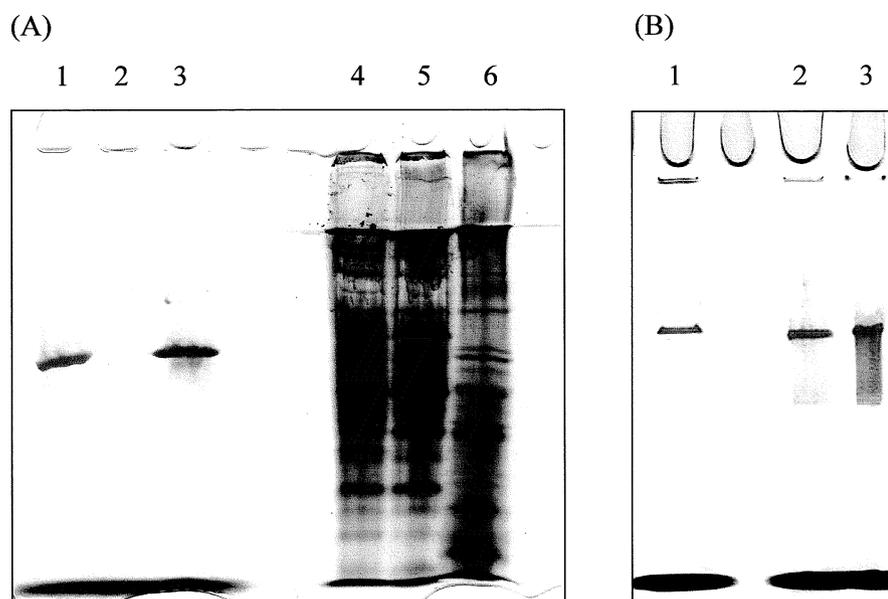
n. b.: nicht bestimmbar, da unter der Nachweisgrenze ( $\Delta E/\text{min} = 0,05$ ) des Enzymtests

### 3.5. Degradative Fähigkeiten von *P. putida* KT2440 pVK55/11 und Synthese aktiver Qox

Das 11 kb Fragment des Cosmids pVK55B/5, welches mit der *qoxL*-spezifischen Sonde „1,1 DpnI“ hybridisierte, wurde nach *Hind*III-Restriktion von pVK55B/5 und Gelextraktion (2.19.2.) in den *Hind*III restringierten, dephosphorylierten Vektor pVK100 inseriert. Das neue Konstrukt pVK55/11 wurde durch Elektroporation in den Stamm *P. putida* KT2440 eingebracht (2.21.).

*P. putida* KT2440 pVK55/11 war in der Lage, genauso wie der Stamm *P. putida* KT2440 pVK55B/5 Chinaldin bis zum Anthranilat abzubauen. Im Rohextrakt dieser Zellen wurde eine spezifische Qox-Aktivität von 0,04 U/mg gemessen. Wurde *P. putida* KT2440 pVK55/11 in Mineralsalzmedium mit Succinat als einziger C-Quelle gezüchtet, lag die spezifische Qox-Aktivität im Rohextrakt bei 0,01 U/mg.

Von *P. putida* KT2440 pVK55/11 synthetisierte Qox zeigt in der nativen PAGE dieselbe elektrophoretische Mobilität wie das vom Wildtyp und das von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 synthetisierte Enzym (Abb. 11B).



**Abb. 11**

Native PA-Gele von Rohextrakten der Stämme *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und pVK55/11 und von *A. ilicis* Rü61a.

(A) Bahnen 1-3 und (B): Aktivitätsfärbung auf Qox-Aktivität, (A) Bahnen 4-6: Coomassie Färbung;

(A) Bahn 1 und 4: *P. putida* KT2440 pVK55B/5, Bahn 2 und 5: *P. putida* KT2440 pVK100, Bahn 3 und 6: *A. ilicis* Rü61a.

(B) Bahn 1: *A. ilicis* Rü61a, Bahn 2: *P. putida* KT2440 pVK55/11, Bahn 3: *P. putida* KT2440 pVK55B/5.

### 3.6. Versuche zur funktionellen Expression der *qox*-Gene in *E. coli* HB101 pVK55B/5

Nachdem nachgewiesen war, dass das Insert des rekombinanten Cosmids pVK55B/5 einem *Pseudomonas* Wirtstamm die Fähigkeit zur Chinaldin-Umsetzung verleiht, sollte untersucht werden, ob die Synthese funktioneller Qox auch in einem entsprechenden *E. coli*-Klon möglich ist.

Es konnte keine Chinaldin-Umsetzung durch *E. coli* HB101 pVK55B/5 beobachtet werden, wenn dieser zur Induktion der Qox-Synthese wie unter 2.8.3. beschrieben gezüchtet wurde. Auch im Rohextrakt dieser Zellen konnte keine Qox-Aktivität nachgewiesen werden. *P. putida* KT2440 pVK55B/5 hingegen synthetisierte unter denselben Bedingungen aktive Qox und setzte Chinaldin zu Anthranilat um.

### 3.7. Subklonierung von Fragmenten des 23 kb Inserts und Sequenzierung des Cosmidinserts von pVK55B/5

Restriktion mit *Hind*III führte zur Aufspaltung des Inserts von pVK55B/5 in ein 10,8 kb großes Fragment und eines von 12,2 kb (s. Abb. 10). Diese beiden Fragmente wurden separat mit dem mit *Hind*III geöffneten, dephosphorylierten Vektor pUC18 ligiert. Mit diesen Konstrukten pUC55/12 und pUC55/11 wurden elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert (2.21.). *Sma*I Restriktion des 11 kb Fragmentes generierte drei Fragmente. Neben dem 4,5 kb Fragment, welches u. a. die Gene *qoxL* und *qoxM* (teilweise) beinhaltet (3.2.), konnten durch *Sma*I bzw. durch *Sma*I/*Hind*III Restriktion von pUC55/11 ein etwa 3,2 kb großes und ein etwa 3 kb großes Fragment erhalten werden. Diese wurden einzeln in die MCS von pUC18 kloniert. Zur Vermehrung der rekombinanten Plasmide wurden pUC55/3 und pUC55/3,2 in *E. coli* DH5 $\alpha$  etabliert. Die Inserts von pUC55/3,2, pUC4,5 (3.2.2.) und pUC55/12 wurden von Herrn Dr. B. Hauer (BASF AG, Ludwigshafen) sequenziert, das Insert von pUC55/3 von einem kommerziellen Anbieter (MWG Biotech, Ebersberg).

Die zur Sequenzierung durch Herrn Dr. B. Hauer eingesetzten Primer finden sich in Anhang 2.

### 3.8. Sequenz des 23 kb Inserts aus pVK55B/5

Die Nukleotidsequenz des 23015 bp langen Inserts des Cosmids pVK55B/5 findet sich in Anhang 1. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden in der EMBL-Datenbank unter der Acc. Nr. AJ537472 hinterlegt.

Neben den Genen, die für die Qox kodieren, wurden sechzehn weitere ORFs identifiziert. Tabelle 4 gibt Auskunft über die Länge der (potentiellen) Gene, die Anzahl der daraus abgeleiteten Aminosäuren und die errechnete Masse der hypothetischen Proteine. Außerdem ist die Lage der ORFs auf dem 23 kb Fragment beschrieben.

**Tab. 4** Beschreibung der hypothetischen ORFs auf dem 23 kb Fragment aus pVK55B/5.

Da ORF1 nicht vollständig ist, sind die Werte in Klammern gesetzt.

Gen/ ORF	Anzahl der Nukleotide	Anzahl der Aminosäuren	errechnete Proteinmasse [Dalton]	Lokalisation auf dem 23 kb Fragment [nt. Nr.-nt. Nr.]	Leseraster
10,8 kb <i>Hind</i> III-Fragment					
ORF 1	(1143)	(380)		21873-23015	+1
<i>qoxS</i>	525	174	18539	20776-21300	+1
<i>qoxM</i>	873	290	30608	19901-20773	+2
<i>qoxL</i>	2388	795	84115	17517-19904	+3
ORF 2	1167	388	42216	16816-15650	-2
<i>hod</i>	831	276	31857	15559-14729	-2
ORF 4	882	293	32002	14721-13840	-3
ORF 5	1272	423	43695	13772-12501	-1
12,2 kb <i>Hind</i> III-Fragment					
ORF 6	888	295	32349	11902-11015	-2
ORF 7	1119	372	39588	10989-9871	-3
ORF 8	612	203	21472	9198-9809	+3
ORF 9	840	279	29409	9094-8255	-2
ORF 10	537	178	20331	8202-7666	-3
ORF 11	1245	414	43306	6395-7639	+2
ORF 12	1011	336	37043	5261-6271	+2
ORF 13	1131	376	40153	4741-3611	-2
ORF 14	762	253	25581	2798-3559	+2
ORF 15	909	302	31820	1885-2793	+1
ORF 16	1305	434	47172	1744-440	-2

### 3.9. Analyse der Sequenzen der Chinaldin-4-Oxidase Untereinheiten

#### 3.9.1. Der Gencluster der Chinaldin-4-Oxidase

Die Gene, die für die Chinaldin-4-Oxidase kodieren, liegen in einem Cluster in der Reihenfolge *qoxL* (kodiert für die große Qox-Untereinheit), *qoxM* (kodiert für die mittelgroße Qox-Untereinheit) und *qoxS* (kodiert für die kleine Qox-Untereinheit) vor. Der gesamte Cluster umfasst eine Länge von 3783 Nukleotiden. Die Lokalisation der einzelnen Gene ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Vierzehn Nukleotide stromaufwärts von dem Startcodon von *qoxL* (ATG) konnte eine potentielle Shine-Dalgarno Sequenz (SHINE & DALGARNO, 1974) mit sieben Nukleotiden (AAGGAGA) identifiziert werden. 146 Nukleotide stromaufwärts des *qoxL* Startcodons liegt ein Sequenzabschnitt (TTGACG), der eventuell einer -35 Promotoregion zur Bindung der RNA-Polymerase entsprechen könnte (DE HASETH *et al.*, 1998). Eine mögliche -10 Region im üblichen Abstand von 16-19 Nukleotiden könnte von dem Sequenzabschnitt GACATA gebildet werden. Die Annahme, dass es sich hier um potentielle Promotorregionen handeln könnte, beruht auf Vergleichen mit bekannten Promotorregionen. Zum Vergleich herangezogen wurden hypothetische Promotoren unterschiedlicher *Arthrobacter* Spezies (DE HASETH *et al.*, 1998, SCHENK *et al.*, 1998, ROBERTS *et al.*, 1985, ZHANG *et al.*, 1993, SCHMITZ *et al.*, 1992), bzw. putative Promotoren, die in Transkriptionseinheiten zur Aromaten-Degradation gefunden wurden (CARL *et al.*, 2004, EATON, 1997) (Tab. 5). In dem Bereich stromaufwärts dieses potentiellen Promotors finden sich einige direkte Wiederholungssequenzen und ein *inverted repeat* (siehe Anhang 1).

Das Gen *qoxL* endet mit dem Stopcodon TGA, welches um zwei Nukleotide mit dem Startcodon ATG des Gens *qoxM* überlappt. Dreizehn Nukleotide vor dem Startcodon findet sich eine potentielle Ribosomen-Bindestelle (AAGGAGA). *QoxM* endet mit einem Stopcodon TGA, auf das in einem Abstand von zwei Nukleotiden das Startcodon von *qoxS* (ATG) folgt. Die potentielle Ribosomen-Bindestelle, die vierzehn Nukleotide vor dem *qoxS* Startcodon beginnt (AAGGGAG), ist etwas unterschiedlich zu denen, die vor den Genen *qoxL* und *qoxM* gefunden wurden. Das Gen wird am 3'-Ende durch ein TGA Stopcodon begrenzt. Sechs Nukleotide stromabwärts von dem *qoxS* Stopcodon befindet sich ein 23 bp langer Sequenzabschnitt, der einen nicht vollständig komplementären *inverted repeat* aufweist (CCtGGAG attagaaac CTCCgGG). Es könnte sich hierbei um eine Struktur zur Transkriptionstermination handeln, die in der mRNA zur Bildung einer Haarnadelstruktur führt.

Der G + C-Gehalt der Gene *qoxL*, *qoxM* und *qoxS* beträgt 60,1 mol %, 62,2 mol % bzw. 58,8 mol %.

**Tab. 5**

Vergleich hypothetischer Promotorregionen.

Potentielle -13, -14 Positionen in den -10 Regionen vor *qoxL* bzw. ORF2, wie sie für  $\sigma^{38}$ -abhängige Promotoren bekannt sind, sind in Klammern gesetzt.

Genbezeichnungen: *6-hlno*: 6-Hydroxy-L-Nikotinoxidase, *6-hdno*: 6-Hydroxy-D-Nikotinoxidase, *kdh*: Keton-Dehydrogenase, *ermA*: Erythromycin Resistenz Protein, *maoxII*: Methylamin-Oxidase, *fcba*: 4-Chlorbenzoat-Coenzym A Ligase, *qorM*: Chinolin-2-Oxidoreduktase (M-Untereinheit), *cymB*: *p*-Cumol Alkohol-Dehydrogenase, *cmtAa*: *p*-Cuminsäure 2,3-Dioxygenase

<sup>1)</sup> DE HASETH *et al.* (1998), <sup>2)</sup> SCHENK *et al.* (1998), <sup>3)</sup> ROBERTS *et al.* (1985),

<sup>4)</sup> ZHANG *et al.* (1993), <sup>5)</sup> SCHMITZ *et al.* (1992), <sup>6)</sup> CARL *et al.* (2004), <sup>7)</sup> EATON (1997)

Stamm	Gen	-35 Region	Anzahl zwischenliegender Nukleotide	-10 Region
<i>A. nicotinovorans</i>	<i>6-hlno</i> <sup>2</sup>	TTGATG	19	TAGAAA
<i>A. nicotinovorans</i>	<i>6-hdno</i> <sup>2</sup>	TTGACA	16	TATCAAT
<i>A. nicotinovorans</i>	<i>kdh</i> <sup>2</sup>	ATGAAA	18	TAAGAT
<i>Arthrobacter</i> sp. NRRLB3381	<i>ermA</i> <sup>3</sup>	TCGGAC	16	TATCCT
<i>Arthrobacter</i> Stamm P1	<i>maoxII</i> <sup>4</sup>	TCGCAT	17	TAGTTT
<i>Arthrobacter</i> sp. Stamm SU	<i>fcba</i> <sup>5</sup>	TTGCGA	15	TATGTT
<i>P. putida</i> 86	<i>qorM</i> <sup>6</sup>	TTGTTC	13	TAGTAT
<i>P. putida</i> F1	<i>cymB</i> <sup>7</sup>	TTGACT	17	GATGAT
<i>P. putida</i> F1	<i>cmtAa</i> <sup>7</sup>	TTGACA	18	GATTTT
<i>A. ilicis</i> Rü61a	<i>qoxL</i>	TTGACG	16	[GC] GACATA
<i>A. ilicis</i> Rü61a	ORF2	TTGACG	16	[GG] TATATA

### 3.9.2. Die Aminosäuresequenz der Chinaldin-4-Oxidase

Aus den Nukleotidsequenzen der Gene *qoxL*, *qoxM* und *qoxS* wurden die Aminosäuresequenzen der Genprodukte abgeleitet. Die Sequenzen finden sich in der EMBL-Datenbank unter folgenden Zugangsnummern: QoxL: CAD61045, QoxM: CAD61046, QoxS: CAD61047.

Die *codon usage*, die bei der Transkription der drei *qox*-Gene gebraucht wird, stimmt tendenziell mit der überein, die für alle kodierenden Bereiche der hier untersuchten Sequenz gefunden wurde und ging mit in Tab. 7 ein.

## 3.9.2.1. QoxL: Die große Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase

Die errechnete molare Masse einschließlich der redoxaktiven Zentren und der organischen Cofaktoren für QoxL von 85,6 kDa ist in Übereinstimmung mit dem Wert (82 kDa), der durch DE BEYER & LINGENS (1993) mittels SDS-PAGE ermittelt wurde. Der errechnete isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei 5,26. Eine Bestimmung der Hydrophobizität nach KYTE & DOOLITTLE (1982) ergab keine ausgeprägte Tendenz zu einem hydrophoben oder hydrophilen Charakter des Proteins.

**Tab. 6**

Verteilung von Aminosäuregruppen in der Chinaldin-4-Oxidase.

Eigenschaft der Aminosäure	Aminosäure- reste	QoxL		QoxM		QoxS	
		Anzahl	mol [%]	Anzahl	mol [%]	Anzahl	mol [%]
sauer	D, E	93	11,7	33	11,4	22	12,6
basisch	H, K, R	88	11,1	34	11,7	19	10,9
aromatisch	F, W, Y	48	6,0	16	5,5	4	2,3
hydrophob	I, L, M, V, F, W	238	29,9	81	27,9	45	25,9

Vergleiche mit Sequenzen in Proteindatenbanken ergaben höchste Identitäten zu der großen Untereinheit der Keton-Dehydrogenase (Acc. Nr. CAD47940) aus *A. nicotinovorans* pAO1 (32,8 % Identität, 41,3 % Ähnlichkeit) und zu QorL, der großen Untereinheit der Chinolin-2-Oxidoreduktase (Acc. Nr. CAA66828) aus *P. putida* 86 (32,2 % Identität, 43,1 % Ähnlichkeit). Im direkten Vergleich mit Aminosäuresequenzen anderer molybdänhaltiger Hydroxylasen konnten auch in der QoxL Sequenzbereiche festgelegt werden, die in diesen Enzymen konserviert sind und die an der Bindung des Molybdo-Pyranopterin-Cofaktors beteiligt sind (ROMÃO *et al.*, 1995, ROMÃO & HUBER, 1998, KAPPL *et al.*, 2003) (Abb. 12) Das erste Motiv MoCoI findet sich in den Positionen QoxL 246-252 (GGSFGSK), MoCoII findet sich in QoxL von Position 358 bis 370 (GPVRGFGVPQVL), MoCoIII ist in den Positionen 485 bis 487 (HGQG) zu finden, das nicht sehr stark konservierte Motiv MoCoIV befindet sich in QoxL in den Positionen 524 bis 529 (TFGSRS) und das letzte Motiv MoCoV, welches den strikt konservierten und vermutlich katalytisch relevanten Glutamatrest umschließt (ROMÃO *et al.*, 1997, REBELO *et al.*, 2000), konnte in QoxL in den Aminosäureresten 734 bis 739 (GAGETAT) identifiziert werden. Weitere Aminosäurereste, denen aufgrund von Röntgenstrukturanalysen der Aldehyd-Oxidoreduktasen aus *D. gigas* und *D. desulfuricans* (ROMÃO *et al.*, 1995, ROMÃO *et al.*, 1997, REBELO *et al.*, 2000, REBELO *et al.*, 2001), den Xanthin-Dehydrogenasen/Oxidasen aus *Rhodobacter capsulatus* (TRUGLIO *et al.*, 2002) und

---

*Bos taurus* (ENROTH *et al.*, 2000) und der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *P. putida* 86 (BONIN, unveröffentlichte Ergebnisse) in diesen Enzymen Funktionen in der Substratbindung oder -positionierung bzw. in der Katalyse zugewiesen werden konnten, konnten zum Teil ebenfalls in der QoxL Sequenz identifiziert werden (QoxL: V88, G253, F323, I326, I330, L459, T461, G523, G526, E736) (Abb. 12).

Die mit dem Programm PredictProtein vorhergesagte Sekundärstruktur von QoxL stimmt in weiten Teilen mit der Sekundärstruktur der entsprechenden Domäne der Aldehyd-Oxidoreduktase (MOP) aus *D. gigas* (ROMÃO & HUBER, 1998) überein (Abb. 12). Für QoxL wurden 28  $\beta$ -Stränge und 19  $\alpha$ -Helices vorhergesagt.

QoxL	1	.....	MVESISAPKM	VGQAIPRK..	ENAGLLTGAA	LFVDDVVL..	EGMLHAKIL	RSPTAHANLL			
QorL	1	.....	HEVVALKKKS	IGTSVLR..	EDTRLLTGRG	RYIADLVL..	.SGMLHVASL	RSPFAHARIV			
MOD	169	.....	..MPADGRI	WGSSIPRP..	SAVAKVTGLA	EFGADAALRM	PENTLHLALA	QAKVSHALIK			
MOP	169	.....	..MPADGRI	WGSKYPRP..	TAVAKVTGIL	DYGADLGLKM	PAGTLHLAMV	QAKVSHANIK			
XDHBC	1	.....	.....MS	VGKPLPHD..	SARAHVTGQA	RYLDDLPC..	PANTLHLAFG	LSTEASAAIT			
CoxL	1	.....	..MNIQTVE	PTSAERAERKL	QGMGCKRKR	EDIRFTQGG	NYVDDVKL..	.PGMLFGDFV	RSSHARARIK		
Xob	551	.....	..KH	PPANIQLFOE	VPNGQSKEDT	VGRPLPHL..	AAAMQASGEA	VCDDIPR..	YENELFLRLV	TSTRAHAKIK	
HxA	551	.....	LSQIEARSSD	LDNSVVABIE	RAISTGEKDN	EASAAQQRV	LGRAGPHL..	SALKQATGEA	QYTTDDIPAQ..	.KNELYGCMV	LSTKAHAKLL
										*	
QoxL	55	.....	DRIVMA	DDKVVFEQOE	IAAVAAESPY	EAWDAVEATK	VAYDELEPVV	DIEFAASSEA			
QorL	59	.....	GIVATMQVEG	FOTIQPLLA	NAVWASSRA	IAEDAAQLIQ	VEYEELPAVT	GIEAALEGEA			
MOD	224	.....	GDGWERPILN	DSKIFQYGD	LAIVCADSEA	NARAAAERVK	FDLELLPEYM	SAPERAMAPDA			
MOP	224	.....	GDGWRDRPILC	DEKVFQYD	IALVCADSEA	NARAAAERVK	VDLEELPAYM	SGPAAAAEDA			
XDHBC	49	.....	DASPAPS..	PEPULA	TGEVHFVQOP	IFLVAATSHR	AARIAARKAR	ITYAPRPAIL	T....LDQA		
CoxL	66	.....	LHYMPTLA	G..DVQAVLA	DEKVLFNQE	VAADAIELVE	VDYEPLVLV	DPFKAMEPDA			
Xob	619	.....	SNETGLFN..	DETVFA	KDTVTCVCHI	IGAVVADTPE	HAERAAHVVK	VTYEDLPAI	T.....IEDA		
HxA	647	.....	ANWGA PNC.	DEVFFA	VDKVTAGQP	IGMILANTAK	AAEEGARAVK	VEYEELPVIL	S.....IEEA		
										**	
QoxL	151	.....	TN	WENYKLIKIG	...DAQSAHG	A...VTVGGK	FRTRNPAAVA	MEPHVCIADF	DRITKSLTLY	TSTQFTHLLA	GIIADVLQIP
QorL	156	.....	N	VSRTRSRARD	..ELAPIFA	S.SAGVVRGQ	FSCGRVSACP	METRGAVAQY	EMTTQQLILM	TATQMPFSFVR	TWAMFCAIP
MOD	322	.....	PN	VYDQLEEKG	E..DTVFFN	DFANVVAEGS	YTYQRPHLP	IEPDVGYG.	INEQGVVIH	SKSVAIHLHA	LMIAPGLGLE
MOP	322	.....	PN	VYFEQPIVKG	E..DTGPIFA	S.ADVTVEGD	FVGRQPHMP	IEPDVAFAY.	MGDDGKCVIH	SKSIGVHLHL	YMIAPGVGLE
XDHBC	133	.....	F	EGGPVIWARG	..DVBETALA	G.AAHLAEGC	FEIGGQEHFY	LEGQAALAL.	.PAEGGVVIH	CSSQHPSEIQ	HKVAHALGLA
CoxL	158	.....	MTGAHGARKH	HNHIFRWEIG	DKEGTDATFA	K.AEUVSKDM	FYHRVHPSP	LETQCQVASM	DKIKGELTLM	GTFOAPHVIR	TVVSLISGLP
Xob	702	.....	F	YSELKIEKG	...DLKKGFS	E.ADNVVSGE	LYIGGDHFY	LETHCTIAIP	KGEEGEMELF	VSTQNMKTQ	SFVAKMLGVP
HxA	733	.....	F	FEHFRYIKNG	...DPESAFR	D.ADHVFEV	SRMGGQEHFY	LETQACVAIP	KAEDGEMEITW	SSTQNPTETQ	SYVAQVTGVA





	770	LALAEKERQG	VDRLVWPLTE	TQGDYQ
XoxL	780	RSIQERPMQ~	~~~~~	~~~~~
QoxL	903	EAMPR~	~~~~~	~~~~~
MOD	903	EALKA~	~~~~~	~~~~~
MOP	768	AAVRRRAEGRA	~~~~~	~~~~~
XDHBC	797	RLWKVGEQLG	LHV~	~~~~~
COxL	1307	NACVDKFTTL	CVTGAPGNCK	PWSLRV
Xob	1338	VSCADPIIER	ARVKAEEGK	SFFVAI
Hxa				

**Abb. 12**

**Multiples Alignment von Aminosäuresequenzen großer Untereinheiten verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen.**

Abkürzungen: QoxL: große Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase aus *A. ilicis* Rü61a (Acc. Nr. CAD61045), QorL: große Untereinheit der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *P. putida* 86 (Acc. Nr. CAA66830) (die Aminosäurereste D465 und C466 sind aufgrund neuer Sequenzierergebnisse ausgetauscht gegen E465 und V466), MOD: Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Acc. Nr. CAB64929), MOP: Aldehyd-Oxidoreduktase aus *D. gigas* (Acc. Nr. Q46509), XDHBC: B-Untereinheit der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* (Acc. Nr. CAA04470), CoxL: große Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* (Acc. Nr. P19919), XOb: Xanthin-Oxidase aus *Bos taurus* (Acc. Nr. P80457), HxA: Xanthin-Dehydrogenase aus *Emericella nidulans* (Acc. Nr. A55875)

Sterne (\*) unter den Sequenzen bezeichnen Aminosäurereste, die in allen Sequenzen vorkommen. Rauten (♦) über den Sequenzen weisen auf Aminosäurereste hin, die in Bezug auf ihre potentielle Funktion in Substratbindung oder Katalyse von Bedeutung sein könnten. Die potentiellen Bindestellen für den Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor sind mit den Bezeichnungen MoCoI bis MoCoV gekennzeichnet, konservierte Reste innerhalb dieser Bereiche sind grau hinterlegt. Die Zahlen am Reihenanfang entsprechen den Nummerierungen in den Sequenzen, die in den Datenbanken abgelegt sind.

Die mit dem Programm PredictProtein vorhergesagte Sekundärstruktur von QoxL ist in den weißen Pfeilen und Blöcken oberhalb der Sequenzen angezeigt, die Sekundärstruktur der MOP (ROMÃO & HUBER, 1998) in den grauen Pfeilen und Blöcken. Pfeile symbolisieren  $\beta$ -Stränge, Blöcke symbolisieren  $\alpha$ -Helices.



**Abb. 13**

Multiples Alignment von Aminosäuresequenzen mittelgroßer Untereinheiten verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen.

Abkürzungen: Qox, Cox, Qor, XDHARc und XOb: siehe Legende zu Abb. 12 (Acc. Nr.: QoxM: CAD61046, CoxM: P19920, QorM: CAA66828, XDHARc: CAA04469, XOb: P80457) NdhMAN: mittelgroße Untereinheit der Nikotin-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAO1 (Acc. Nr. AAK64243). Die mit dem Programm PredictProtein vorhergesagte Sekundärstruktur von QoxM ist in den weißen Pfeilen und Blöcken oberhalb der Sequenzen angezeigt, die Sekundärstruktur von CoxM (DOBBEK *et al.*, 1999) in den grauen Pfeilen und Blöcken. Pfeile symbolisieren  $\beta$ -Stränge, Blöcke symbolisieren  $\alpha$ -Helices. In allen Sequenzen identische Aminosäuren sind durch Sternchen (\*) unterhalb der Sequenzen angezeigt, Reste, die in die Bindung des FAD involviert sind, durch Rauten (♦). Die zwei konservierten Motive, die an der Bindung des FAD beteiligt sind, sind eingerahmt. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der der Sequenzen in den Datenbanken.

### 3.9.2.2. QoxM: Die mittelgroße Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase

Der errechnete isoelektrische Punkt für das QoxM Protein liegt bei 6,07. Der Anteil aromatischer Aminosäuren ist dem in QoxL ähnlich, ebenso wie der Anteil der hydrophoben Reste (Tab. 6).

Die Aminosäuresequenz von QoxM zeigt höchste Homologien zu CoxM, der mittelgroßen Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (Acc. Nr. P19920) (31,6 % Identität, 41,1 % Ähnlichkeit) und zu CutB, der mittelgroßen Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *P. thermocarboxydovorans* (Acc. Nr. CAA54900) (30,1 % Identität, 40,1 % Ähnlichkeit).

In der Aminosäuresequenz von QoxM konnten zwei konservierte Motive identifiziert werden (Abb. 13), deren Beteiligung an der Bindung des FAD-Cofaktors nach der Strukturaufklärung einiger molybdänhaltiger Hydroxylasen (DOBBEK *et al.* 1999, TRUGLIO *et al.*, 2002) postuliert werden kann. Beide Motive, <sup>30</sup>AGGQT<sup>34</sup> und <sup>109</sup>TIGG<sup>112</sup> in QoxM, enthalten zwei Glycinreste; die Bereiche in den analogen Motiven in den Proteinen CoxM (DOBBEK *et al.*, 1999) und QorM (BONIN, unveröffentlichte Ergebnisse) formen *loops*. Die Sekundärstrukturvorhersage für QoxM mit dem Programm PredictProtein zeigt gute Übereinstimmungen mit der bei DOBBEK *et al.* (1999) beschriebenen Sekundärstruktur für CoxM (Abb. 13). In beiden Proteinen ist das N-terminale Motiv, welches an der Bindung des Pyrophosphates und der Ribose des FAD beteiligt ist (DOBBEK *et al.*, 1999, TRUGLIO *et al.*, 2002) in einem *loop* zwischen einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Strang lokalisiert. In CoxM liegt das zweite Motiv zwischen zwei  $\alpha$ -Helices, wobei die zweite  $\alpha$ -Helix für QoxM nicht vorhergesagt wurde. Eine Strukturvorhersage für CoxM mit demselben Programm zeigte jedoch an dieser Stelle auch keine  $\alpha$ -Helix (Daten hier nicht gezeigt). Weitere Aminosäurereste, die in CoxM, XDHARc und QorM in engem Kontakt mit dem FAD-Cofaktor stehen und nicht zu den oben

beschriebenen Motiven gehören, konnten auch in QoxM identifiziert werden (L99, A100, A104, A113, D122, K182, P190).

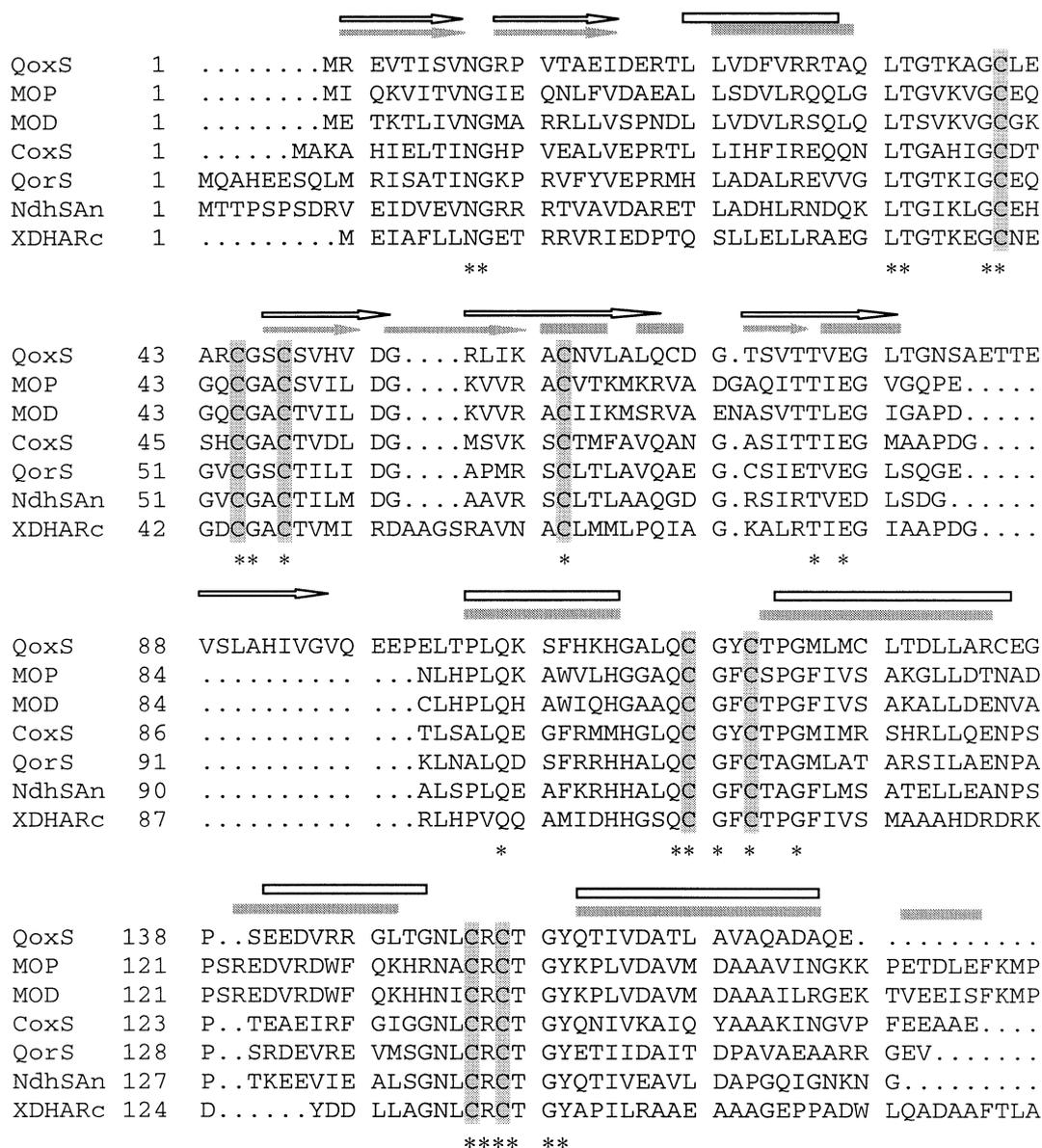
### 3.9.2.3. QoxS: Die kleine Untereinheit der Chinaldin-4-Oxidase

Die Aminosäuresequenz von QoxS zeigt höchste Identitäten zu CutC, der kleinen Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *P. thermocarboxydovorans* (Acc. Nr. S49123) (49 % Identität, 54,7 % Ähnlichkeit) und zu der kleinen Untereinheit der Nikotin-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAI1 (46,8 % Identität, 54,5 % Ähnlichkeit).

Der errechnete isoelektrische Punkt für QoxS beträgt 4,94 und liegt damit weiter im sauren Bereich als der von QoxL und QoxM. Während der Anteil der hydrophoben Aminosäuren bei QoxS in derselben Größenordnung liegt wie bei QoxL und QoxM, beträgt der prozentuale Anteil der aromatischen Aminosäuren nur etwa  $\frac{1}{3}$  dessen, der beiden anderen Untereinheiten (Tab. 6).

Auffällig ist die hohe Anzahl von 11 Cysteinresten in der QoxS Sequenz (174 AS insgesamt) (QoxL: 5 Cys bei 765 AS insgesamt, QoxM: 0 Cys bei 290 AS insgesamt). Acht der Cysteinreste finden sich in zwei hoch konservierten Motiven wieder (Abb. 14); bei molybdänhaltigen Hydroxylasen binden die Cysteinreste dieser Motive die zwei [2Fe-2S]-Cluster, die an der intramolekularen Elektronenübertragung beteiligt sind. In QoxS finden sich diese Motive in den Positionen  $^{40}\text{CX}_4\text{CGXCX}_{11}\text{C}^{60}$  bzw.  $^{117}\text{CGXCX}_{31}\text{CXC}^{154}$ .

Eine Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm PredictProtein ergab für QoxS sechs  $\beta$ -Stränge und fünf  $\alpha$ -Helices. Die Lage der Strukturelemente entspricht nahezu der, wie sie für den N-terminalen Teil der MOP beschrieben wird (ROMÃO & HUBER, 1998).



**Abb. 14**

Multiples Alignment von Aminosäuresequenzen kleiner Untereinheiten verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen.

Abkürzungen: Qox, MOP, MOD, Cox, Qor, XDHARc und NdhAn: siehe Legenden zu Abb. 12 und 13 (Acc. Nr.: QoxS: CAD61047, MOP: Q46509, MOD: CAB64929, CoxS: P19921, QorS: CAA66829, XDHARc: CAA04469, NdhSAn: AAK64244).

Cysteinreste, die wahrscheinlich an der Bindung der [2Fe2S]-Cluster beteiligt sind, sind grau unterlegt; weitere in allen Sequenzen identische Aminosäurereste sind mit einem Sternchen (\*) unter der Sequenz gekennzeichnet. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte entsprechend der Sequenzen in den Datenbanken. Die mit dem Programm PredictProtein vorhergesagte Sekundärstruktur von QoxS ist in den weißen Pfeilen und Blöcken oberhalb der Sequenzen angezeigt, die Sekundärstruktur der MOP in diesem Bereich (ROMÃO & HUBER, 1998) in den grauen Pfeilen und Blöcken. Pfeile symbolisieren  $\beta$ -Stränge, Blöcke symbolisieren  $\alpha$ -Helices.

### 3.10. Identifizierung potentieller Gene auf dem 23 kb Fragment und Sequenzanalyse der daraus abgeleiteten Genprodukte

Neben den Genen, die für die Chinaldin-4-Oxidase kodieren, wurden auf dem 23 kb Insert des Cosmids pVK55B/5 mit Hilfe des Programms FRAMES 16 weitere kodierende Bereiche identifiziert (Tab. 4). Das Gen der 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase (Hod) (FISCHER *et al.*, 1999, FISCHER & FETZNER, 2000, BETZ *et al.*, 2000) ist 1958 bp stromaufwärts von dem *qoxL* Gen lokalisiert. Auf dem 10,8 kb *HindIII*-Fragment findet sich neben drei vollständigen ORFs einer, dessen 3'-Ende nicht komplett ist. Auf dem 12 kb *HindIII*-Fragment konnten 11 vollständige, potentiell genkodierende Sequenzabschnitte identifiziert werden (Tab. 4).

Für den gesamten 23015 bp langen Sequenzabschnitt wurde ein G + C-Gehalt von 61,8 mol % errechnet.

In der *codon usage* aller (potentiellen) Gene (Tab. 7) findet sich der hohe G + C-Gehalt wieder. Bevorzugt werden Codons genutzt, die in der dritten Position ein Guanin oder ein Cytosin besitzen.

**Tab. 7**

*Codon usage* aller (potentiellen) Gene, die auf dem bekannten 23 kb Fragment lokalisiert sind.

Aminosäure		Anzahl	Anzahl der Triplet-Codons					
Ala	A	809	GCA: 144	GCC: 333	GCG: 218	GCT: 114		
Arg	R	407	AGA: 7	AGG: 47	CGA: 35	CGC: 153	CGG: 102	CGT: 63
Asn	N	152	AAC: 109	AAT: 43				
Asp	D	363	GAC: 275	GAT: 88				
Cys	C	54	TGC: 41	TGT: 13				
Gln	Q	184	CAA: 53	CAG: 131				
Glu	E	371	GAA: 165	GAG: 206				
Gly	G	621	GGA: 98	GGC: 286	GGG: 117	GGT: 120		
His	H	172	CAC: 131	CAT: 41				
Ile	I	327	ATA: 17	ATC: 234	ATT: 76			
Leu	L	636	CTA: 24	CTC: 179	CTG: 253	CTT: 83	TTA: 11	TTG: 86
Lys	K	153	AAA: 49	AAG: 104				
Met	M	119	ATG: 119					
Phe	F	221	TTC: 175	TTT: 46				
Pro	P	340	CCA: 38	CCC: 134	CCG: 141	CCT: 27		
Ser	S	363	AGC: 91	AGT: 28	TCA: 47	TCC: 107	TCG: 68	TCT: 22
Thr	T	374	ACA: 52	ACC: 117	ACG: 107	ACT: 38		
Trp	W	12	TGG: 12					
Try	Y	133	TAC: 105	TAT: 28				
Val	V	543	GTA: 73	GTC: 180	GTG: 194	GTT: 96		
Stop		18	TAA: 5	TAG: 7	TGA: 6			

### 3.10.1. ORF1

573 Nukleotide stromabwärts von *goxS* in derselben Orientierung ist ORF1 lokalisiert. Zwölf Nukleotide stromaufwärts des ORF1 Startcodons befindet sich eine potentielle Shine-Dalgarno Sequenz (GGAGAA). Innerhalb des sequenzierten Bereichs konnte jedoch kein Stopcodon für das potentielle Gen gefunden werden.

Die Aminosäuresequenz des ORF1 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61048.

Die Vorhersage für das ORF1 Genprodukt zeigt im C-terminalen Teil ausgeprägt hydrophile Proteinbereiche, während im N-terminalen Bereich hydrophile und hydrophobe Regionen ausgeglichen sind. Der errechnete isoelektrische Punkt des ORF1 Proteins liegt bei 5,1.

Das ORF1 Protein zeigt 55,6 % Identität und 67,9 % Ähnlichkeit zu ORF377 aus *A. nicotinovorans* pAO1 (Acc. Nr. AAK64260). Des Weiteren wurden markante Homologien auf Aminosäureebene gefunden zu: ORF3 aus *P. putida* 86 (Acc. Nr. CAE47359.1) (45 % Ähnlichkeit, 36,7 % Identität), PucA aus *B. subtilis* (Acc. Nr. CAB15241) (41,2 % Ähnlichkeit, 31,9 % Identität), XdhC aus *R. capsulatus* (Acc. Nr. CAB41849) (37 % Ähnlichkeit, 29,3 % Identität) und zu den Sequenzen von CoxF (Acc. Nr. X82447) (47,4 % Ähnlichkeit, 34,1 % Identität) und CoxI (Acc. Nr. X82447) (36,7 % Ähnlichkeit, 26,9 % Identität) aus *O. carboxidovorans*.

Die Gene, die für diese Proteine kodieren sind alle, wie auch der ORF1, in der Nähe von Strukturgenen molybdänhaltiger Hydroxylasen lokalisiert. Obwohl es bisher nur für XdhC aus *R. capsulatus* funktionell bewiesen ist (LEIMKÜHLER & KLIPP, 1999), wird für alle diese Proteine aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu XdhC eine Chaperonfunktion postuliert. Aus XdhC<sup>-</sup> Mutanten von *R. capsulatus* wurde eine Xanthin-Dehydrogenase mit Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor Defizienz gereinigt, so dass für XdhC eine Beteiligung an der Insertion des MPT-Cofaktors in das reife Enzym und/oder an der Faltung des Enzyms angenommen wird.

Da die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF1 Proteins mit 380 AS länger ist als die anderer XdhC-homologer Proteine (ORF377: 377 AS, PucA: 337, XdhC: 312 AS), ist anzunehmen, dass am 3'-Ende des ORF1 nur eine geringe Anzahl von Nukleotiden zur Vervollständigung des Gens fehlt.

### 3.10.2. ORF2

Zwölf Nukleotide vor ORF2, der in reverser Orientierung zu *goxL* transkribiert wird (Tab. 4), findet sich eine putative Ribosomen-Bindestelle (GGAGA). 133 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons ATG konnte ein -10 Hexamer einer potentiellen RNA-Polymerase-Bindestelle identifiziert werden, welches in einem Abstand von 16 Nukleotiden von einer möglichen -35 Region begleitet wird (Tab. 5). In einem Bereich von 55 Nukleotiden stromaufwärts dieses



Die Aminosäurereste 146-339 des ORF2 Proteins zeigen große Sequenzhomologien zu einer konservierten Region (Pfam Acc. Nr. PF01360), die häufig bei Flavin-haltigen Monoxygenasen, welche aromatische Substrate umsetzen, zu finden ist.

### 3.10.3. ORF4

ORF4 beginnt sieben Nukleotide stromabwärts des *hod*-Gens mit dem Startcodon ATG. Achtzehn Nukleotide stromaufwärts davon befindet sich eine mögliche Ribosomen-Bindestelle (AAGGCCAG). Mögliche -10/-35 Regionen konnten in 5'-Richtung vor dem Startcodon nicht identifiziert werden.

Die Aminosäuresequenz des ORF4 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61042.

Der errechnete isoelektrische Punkt des ORF4 Proteins liegt bei 4,63. Die Bestimmung der Hydrophobizität des Proteins ergab für den N-terminalen (AS 1-70) und für den C-terminalen (AS 230-293) Bereich ausgeprägt hydrophile Regionen, während in der mittleren Proteinregion das Verhältnis hydrophiler und hydrophober Bereiche eher ausgeglichen ist.

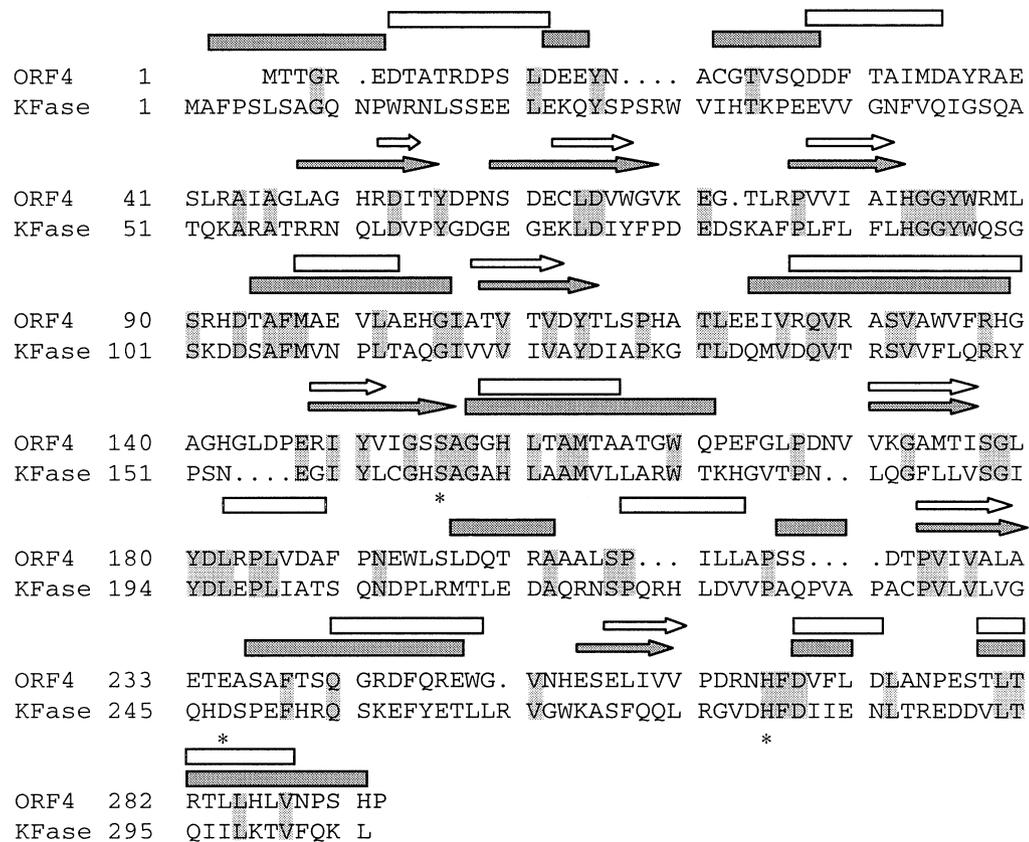
Das ORF4 Protein zeigt 49 % Ähnlichkeit (40 % Identität) zu einem hypothetischen Protein aus *Pseudomonas* sp. CA10 (Acc. Nr. Q9AQQ0), welches wahrscheinlich zur Familie der B-Typ Carboxylesterasen gehört. Ein Konsensusmotiv für B-Typ Carboxylesterase (PROSITE Signatur PS00122), welches einen katalytisch aktiven Serinrest in Enzymen dieser Familie umschließt, wurde fast vollständig konserviert auch in dem ORF4 Protein gefunden:

<sup>148</sup>**IYVIGSSAG**<sup>157</sup> (S: katalytisch aktives Serin, fett: konservierte Reste).

Die Aminosäurereste 75 bis 202 des ORF4 Proteins zeigen markante Ähnlichkeiten mit einer Konsensus-Sequenz, die für Proteine eines *Cluster of Orthologous Groups* (COG) (TATUSOV *et al.*, 2003) (COG0657) definiert wurde. Mitglieder dieses COG0657 gehören zu der Familie der Esterasen/Lipasen/Thioesterasen, welche wie die B-Typ Carboxylesterasen in die Superfamilie der Protein mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung gehören. Proteine mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung zeichnen sich neben ihrer einheitlichen Struktur besonders durch eine konservierte katalytische Triade aus, die aus einem nukleophilen und einem sauren Aminosäurerest und aus einem hoch konservierten Histidinrest besteht (NARDINI & DIJKSTA, 1999).

Des Weiteren zeigt das ORF4 Protein 39 % Ähnlichkeit und 28 % Identität zu der Kynurenin-Formamidase aus der Maus (*Mus musculus*) (Acc. Nr. AAM62284). Für dieses Enzym wurde anhand von Sequenzvergleichen und Modulation der räumlichen Struktur postuliert, dass es ebenfalls zur Familie der Esterasen/Lipasen/Thioesterasen gehört und eine den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen entsprechende Faltung aufweist (PABARCUS & CASIDA, 2002). Die drei Aminosäurereste, die in der Kynurenin-Formamidase als Bestandteil der katalytischen Triade postuliert werden (S162, D247, H279), finden in der Sequenz des ORF4 Proteins korrespondierende Reste (S155,

E235, H266) (Abb. 16). Die Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm PredictProtein ergab für das ORF4 Protein 8  $\beta$ -Stränge und 10  $\alpha$ -Helices.



**Abb. 16**

Alignment des ORF4 Proteins mit der Kynurenin-Formamidase (KFAse) aus *Mus musculus*.

Identische Aminosäurereste in beiden Sequenzen sind grau hinterlegt. Sternchen (\*) unter den Sequenzen bezeichnen die Lage der Reste, die vermutlich an der katalytischen Triade beteiligt sind. Über den Sequenzen sind in weißen Symbolen die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente des ORF4 Proteins gezeigt, in grauen Symbolen die modellierten Sekundärstrukturelemente der KFAse (PABARCUS & CASIDA, 2002). Balken:  $\alpha$ -Helices, Pfeile:  $\beta$ -Stränge. Die Nummerierung am Beginn der Zeilen ist entsprechend den Datenbankeinträgen.

### 3.10.4. ORF5

ORF5 beginnt 67 Nukleotide stromabwärts des ORF4 Stopcodons in derselben Leserichtung. Zwölf Nukleotide vor dem Startcodon befindet sich ein mögliche Ribosomen-Bindestelle (AGGAG). Eine mögliche Promotorregion konnte vor dem Gen nicht identifiziert werden.

Die Aminosäuresequenz des ORF5 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61041.

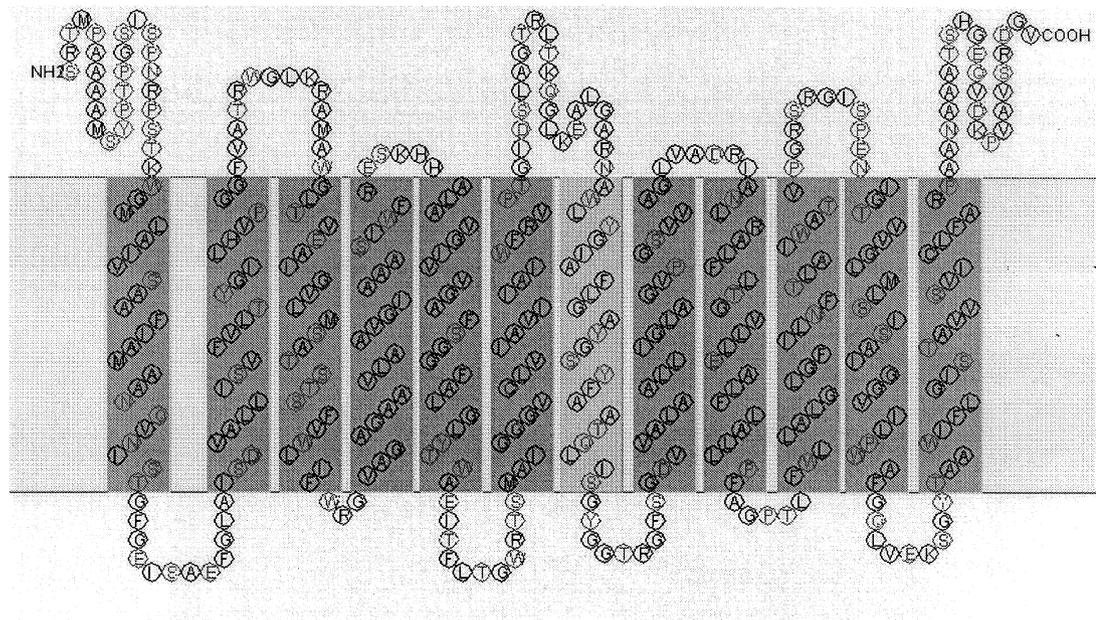
Der isoelektrische Punkt für das ORF5 Protein wurde zu 10,42 errechnet. Der sehr hohe Prozentsatz hydrophober Aminosäurereste von 30,7 mol % ist auffällig, auch die Kalkulation des Proteincharakters nach KYTE & DOOLITTLE (1982) ergab einen hohen Anteil hydrophober Proteinbereiche.

Vergleiche mit Proteindatenbanken ergaben höchste Übereinstimmungen (39 % Ähnlichkeit, 27 % Identität) mit einer potentiellen Permease aus *Pyrococcus abyssi* (Acc. NR. CAB50057) und einem hypothetischen Transmembran-Transport-Protein (36 % Ähnlichkeit, 28 % Identität) aus *Ralstonia solanacearum* (Acc. Nr. CAD18765). Des Weiteren wurden Ähnlichkeiten zu potentiellen Transportproteinen gefunden, die der Superfamilie der *Major Facilitator* (MFS-Transporter) angehören.

Die Vorhersage von potentiellen Transmembran-Helices mit dem Programm SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998) ergab 12 Membran-durchspannende  $\alpha$ -Helices für das ORF5 Protein (Abb. 17). Charakteristisch für MFS-Transporter sind 12 (bis 14) Transmembran-Helices, wobei der *loop* zwischen der zweiten und der dritten Helix durch Aminosäuren, die in dem Motiv [R/K]X<sub>2,3</sub>[R/K] konserviert sind, gebildet werden sollte (MARGER & SAIER, 1993). Reste dieses Motivs sind wahrscheinlich sowohl strukturell als auch funktionell von Bedeutung, da sie an Konformationsänderungen des Proteins während des Transportprozesses beteiligt sein könnten (JESSEN-MARSHALL *et al.*, 1997). In dem ORF5 Protein formen nach der Sekundärstruktursage die Reste <sup>79</sup>RWGLK<sup>83</sup> den *loop* an entsprechender Position. Da MFS-Transporter wahrscheinlich aus einer Duplikation von Genen, die für Transportproteine mit sechs Transmembran-Helices kodierten, hervorgegangen sind, sollte sich zwischen den Helices acht und neun dasselbe Motiv noch einmal befinden. In dem ORF5 Protein findet man das Motiv an dieser Stelle (Positionen 278-283) nicht konserviert. MARGER & SAIER (1993) bemerkten jedoch, dass die Konserviertheit der Sequenz in diesem *loop* weitaus geringer ist, als im N-terminalen Abschnitt.

PAO *et al.* (1998) nahmen eine Klassifikation der Mitglieder MFS-Transporter anhand von Sequenzhomologien vor und konnten 17 Familien innerhalb der Superfamilie identifizieren. Für jede der 17 Familien wurde von PAO *et al.* (1998) sowohl ein Familien-spezifisches konserviertes Motiv festgelegt, als auch eine 11 Aminosäuren lange Konsensus-Sequenz, welche die Reste des *loops* zwischen der zweiten und der dritten Transmembran-Helix (s. o.) umschließt. Die korrespondierenden, *loop*-formenden Aminosäurereste des ORF5 Proteins zeigen mit keiner der Konsensussequenzen 100 %ige Übereinstimmung. Sie sind jedoch in acht von elf Resten übereinstimmend mit dem wenig konservierten Motiv der Cyanat-Permeasen und in sechs von elf Resten identisch mit dem Motiv der Familie der Symporter für aromatische Säuren und H<sup>+</sup> bzw. mit dem Motiv der Zucker Transporter.

Markante Übereinstimmungen zu einem der Familien-spezifischen Motive, die von PAO *et al.* (1998) definiert wurden, konnten in dem ORF5 ebenfalls nicht detektiert werden.

**Abb. 17**

Vorhersage transmembranärer Helices des ORF5 Proteins mit dem Programm SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998).

Primäre  $\alpha$ -Helices sind dunkelgrau dargestellt, die sekundäre  $\alpha$ -Helix 7 ist hellgrau.

### 3.10.5. ORF6

Während die Gene *goxLMS*, *hod* und die ORFs 1, 2, 4, 5 auf dem 10,8 kb langen *Hind*III-Insertfragment des Cosmides pVK55B/5 lokalisiert sind, befinden sich die ORFs 6-16 auf dem 12,2 kb *Hind*III-Fragment (Tab. 4). Das Startcodon von ORF6 findet sich 301 Nukleotide in 5'-Richtung zu der *Hind*III-Schnittstelle. Eine Purin-reiche Sequenz, die eine mögliche Ribosomen-Bindestelle darstellen könnte, konnte erst in einer Distanz von 27 Nukleotiden vor dem Startcodon identifiziert werden (GAGGGG).

Die Aminosäuresequenz des ORF6 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61040.

Die Anzahl saurer und basischer Aminosäurereste ist in dem ORF6 Protein nahezu ausgeglichen. Der isoelektrische Punkt wurde zu 6,4 errechnet. BLASTP-Vergleiche mit Proteindatenbanken ergaben ausschließlich Ähnlichkeiten zu Aminoacyl-tRNA Synthetasen (AARS) und unter diesen hauptsächlich zu (hypothetischen) Glutamyl-tRNA Synthetasen. Größte Übereinstimmungen wurden gefunden zu der Glutamyl-, Glutamyl-tRNA Synthetase aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (Acc. Nr. BAB97629) (56,2 % Identität, 64,8 % Ähnlichkeit) und zu einer putativen Glutamyl-tRNA Synthase aus *C. efficiens* YS-314 (Acc. Nr. BAC17013) (54,9 % Identität, 61,8 % Ähnlichkeit).

Glutamyl-tRNA Synthetasen gehören zu der Klasse I der AARS und zeichnen sich durch zwei konservierte Sequenzmotive aus. Die Aminosäurereste dieser Motive sind in den ersten

Reaktionsschritt, der Umformung der Aminosäure zu Aminoacyl-adenylat, durch Bindung des ATP, involviert (PERONA *et al.*, 1993). Diese Motive, die den Konsensus-Sequenzen HIGH (oder HVGG) und KMSKS (oder KISKR (SEKINE *et al.*, 2003)) folgen, konnten in der Sequenz des ORF6 Proteins in den Positionen <sup>16</sup>HGVN<sup>19</sup> bzw. <sup>233</sup>RLAKR<sup>237</sup> identifiziert werden. Die mit dem Programm PredictProtein durchgeführte Sekundärstrukturvorhersage für das ORF6 Protein zeigt gute Übereinstimmungen mit den bekannten Sekundärstrukturelementen der bereits kristallisierten Glutamyl-tRNA Synthetase aus *Thermus thermophilus* (Acc. Nr. 1N77). Während das ORF6 Protein jedoch aus nur 295 Aminosäureresten besteht und eine errechnete Molekularmasse von 32,3 kDa aufweist, haben alle charakterisierten bakteriellen Glutamyl-tRNA Synthetasen eine Primärstruktur von ca. 500 Aminosäuren und eine Masse von ca. 50 kDa (FREIST *et al.*, 1997). Viele der potentiellen Glutamyl-tRNA Synthetasen, die im BLAST Vergleich starke Ähnlichkeit mit dem ORF6 Protein zeigten, bestehen jedoch auch aus etwa 300 Aminosäureresten.

### 3.10.6. ORF7

ORF7 beginnt 25 Nukleotide stromabwärts des ORF6 Stopcodons und hat eine Länge von 1119 bp. Eine potentielle Ribosomen-Bindestelle befindet sich 11 Nukleotide vor dem 5'-Ende des Gens (AGGCTG).

Die Aminosäuresequenz des ORF7 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61039.

Der isoelektrische Punkt des hypothetischen Proteins wurde zu 4,85 errechnet. Vergleiche mit Proteindatenbanken zeigten höchste Übereinstimmung (81,7 % Identität, 86,6 % Ähnlichkeit) mit einer stereospezifischen Chrysanthemat-Esterase aus *A. globiformis* SC-6-98-28 (Acc. Nr. AAA99492). Weitere potentielle Proteine, die bis zu 35 % Identität zu dem ORF7 Protein aufweisen, gehören ebenfalls zu den Esterasen. 32,3 % Identität wurde außerdem zu einer potentiellen  $\beta$ -Lactamase der Klasse C aus *P. fluorescens* (Acc. Nr. ZP\_00085701) gefunden. Eine Suche innerhalb der Proteinfamilien-Datenbank (Pfam, Sanger Institut, [<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>]) bestätigte, dass das ORF7 Protein in die Familie der  $\beta$ -Lactamasen und Penicillin-bindenden Proteine eingeordnet werden kann. Bei  $\beta$ -Lactamasen der Klassen A, C und D handelt es sich um Hydrolasen, die einen katalytisch aktiven Serinrest beinhalten; verwandte Serinhydrolasen sind außerdem D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidasen und Penicillin-bindende Proteine, welche an der Zellwandsynthese beteiligt sind.

Das in Enzymen der  $\beta$ -Lactamase-Familie und verwandter Familien konservierte N-terminal lokalisierte Motiv S-X-X-K, welches den katalytisch aktiven Serinrest beinhaltet, ist bei dem ORF7 Protein in den Positionen 59 bis 62 zu finden (Abb. 18). Aminosäurereste einer Triade, welche im C-terminalen Teil der  $\beta$ -Lactamasen konserviert ist, sind an der Koordination des

Substrates beteiligt (OEFNER *et al.*, 1990). Die Konsensus-Sequenz dieser Triade ist K(S/T)G bei den  $\beta$ -Lactamasen. In den  $\beta$ -Lactamase verwandten Enzymen, die sensitiv sind gegenüber  $\beta$ -Lactamverbindungen, findet man jedoch auch Variationen des Motivs (Abb. 18).

57	VFSCSKGM	64	307	KSH	309	ORF7 Protein
57	VFSCSKGV	64	310	KSH	312	Chrysanthem-Esterase <i>A. globiformis</i> <sup>1</sup>
62	LGSVSKTF	69	315	KTG	317	$\beta$ -Lactamase <i>Citrobacter freundii</i> <sup>2</sup>
71	MCSTSKVM	78	237	KTG	239	$\beta$ -Lactamase <i>E. coli</i> <sup>3</sup>
91	VGSVTKSF	98	339	HTG	341	DD-Carboxyesterase <i>Streptomyces</i> R61 <sup>4</sup>
60	ICSVSKQF	67	168	HTG	170	D-Amino-peptidase <i>Ochrobactrum anthropi</i> <sup>5</sup>

**Abb. 18**

Alignment konservierter Motive des ORF7 Proteins mit  $\beta$ -Lactamase verwandten Enzymen.

Die Nummerierung der Aminosäure entspricht den Einträgen in der EMBL-Datenbank: Acc. Nr.:

<sup>1)</sup> AAA99492, <sup>2)</sup> 1FR6B, <sup>3)</sup> Q47066, <sup>4)</sup> P15555, <sup>5)</sup> A42209. Vollständig konservierte Reste sind grau hinterlegt.

### 3.10.7. ORF8

ORF8 liegt in reverser Orientierung zu den ORFs 6 und 7. Eine mögliche, wenn auch wenig konservierte Ribosomen-Bindestelle findet man 11 Nukleotide in 5'-Richtung vor dem Startcodon (AGACTGA).

Die Aminosäuresequenz des ORF8 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61038.

Der isoelektrische Punkt wurde für das ORF8 Protein zu 6,51 berechnet. BLASTP-Vergleiche mit Proteindatenbanken deuteten darauf hin, dass es sich bei dem ORF8 Protein um einen Transkriptionsregulator der Familie der TetR-Regulatoren handeln könnte. Höchste Übereinstimmungen wurden zu zwei potentiellen TetR-Transkriptionsregulatoren aus *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (Acc. Nr. BAC72796) (38,8 % Identität, 46,8 % Ähnlichkeit) bzw. *Caulobacter crescentus* CB15 (Acc. Nr. AAK24175) (34,5 % Identität, 42,3 % Ähnlichkeit) gefunden. Ein potentielles Helix-Turn-Helix-Motiv, mit dem transkriptionsregulatorische Proteine an die DNA binden, wurde in dem ORF8 Protein für den Sequenzbereich AS 33 bis AS 52 vorhergesagt. In der PROSITE Datenbank des *Swiss Institute of Bioinformatics* ist für TetR-Transkriptionsregulatoren eine konservierte Signatur (PS01081) hinterlegt, die den Bereich der Helix-Turn-Helix Struktur überspannt. Die Aminosäurereste 27 bis 57 des ORF8 Proteins entsprechen dieser Signatur bis auf zwei Ausnahmen (P47 und A48): <sup>27</sup>GVDGLSLRQLARDVNVSHGAPAKHFRDKQAL<sup>57</sup> (fett: strikt konservierte Reste der Signatur PS01081, kursiv: nicht konservierte Reste der Signatur in dem ORF8 Protein).

Alle Proteine, die in der Proteinfamilie der TetR-Regulatoren zusammengefasst werden (Pfam Acc. Nr. PF00440), haben molekulare Massen von 21 kDa bis 25 kDa. Die errechnete

molekulare Masse des ORF8 Proteins liegt bei 21,4 kDa (Tab. 4). Die Vorhersage für das ORF8 Protein ergab eine Sekundärstruktur von 10  $\alpha$ -Helices, was in Übereinstimmung ist mit der Anzahl von  $\alpha$ -Helices in strukturell untersuchten Repressor-Proteinen der TetR-Familie (ORTH *et al.*, 2000).

### 3.10.8. ORF9 und ORF14

ORF9 wird in umgekehrter Richtung zu ORF8 transkribiert. Zwischen den beiden ORFs liegt ein 103 bp langer intergenischer Abschnitt. 14 Nukleotide stromaufwärts des ORF9 Startcodon könnte eine mögliche Shine-Dalgarno Sequenz beginnen (GATGGGA).

ORF14 ist stromabwärts von ORF9 lokalisiert; in 5'-Richtung vor dem Startcodon konnte keine mögliche Ribosomen Bindestelle identifiziert werden.

Die Aminosäuresequenzen der Genprodukte von ORF9 und ORF14 finden sich in der EMBL-Proteindatenbank unter den Acc. Nr. CAD61037 und CAD61032.

Der isoelektrische Punkt des ORF9 Genproduktes wurde zu 10,5 berechnet. Demgegenüber liegt der berechnete isoelektrische Punkt des ORF14 Proteins eher im sauren Bereich bei 5,7. Die beiden Proteine zeigen ausgesprochene Ähnlichkeiten in der Länge der Aminosäuresequenz (ORF9: 279 AS, ORF14: 253 AS) und den daraus ermittelten molekularen Massen (ORF9: 29,4 kDa, ORF14: 25,6 kDa) (Tab. 4).

Sequenzvergleiche beider Proteine mit Proteindatenbanken deuten auf eine Verwandtschaft mit Enzymen hin, die in die Superfamilie der *short-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) eingeordnet werden. Größte Identitäten zu dem Genprodukt von ORF9 wurden gefunden zu potentiellen SDR aus *Nostoc punctiforme* (Acc. Nr. ZP\_0107009) (36,8 % Identität, 47,2 % Ähnlichkeit) und aus *Agrobacterium tumefaciens* (Acc. Nr. AAL45014) (39 % Identität, 48 % Ähnlichkeit). Das ORF14 Protein weist markante Sequenzübereinstimmungen mit zwei potentiellen Oxidoreduktasen aus *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (Acc. Nr. BAC74994) (75,8 % Identität, 78,2 % Ähnlichkeit) bzw. *S. coelicolor* A3(2) (Acc. Nr. CAB55718) (68,3 % Identität, 73,6 % Ähnlichkeit) auf, die ebenfalls zu den SDR gehören. Untereinander zeigen die Proteine von ORF9 und ORF14 33 % Identität und 39 % Ähnlichkeit und besonders im N-terminalen Teil fallen ausgeprägte Homologien auf.

Enzyme der SDR-Superfamilie katalysieren NAD(P)H-abhängige Oxidations- oder Reduktions-Reaktionen an unterschiedlichsten Substraten. Die Sekundärstrukturelemente dieser Enzyme folgen im N-terminalen Teil meistens einem einheitlichen  $\alpha/\beta$ -Arrangement. In der Primärstruktur der SDR zeigen sich einige konservierte Aminosäurereste. In einem ersten konservierten Motiv finden sich die Reste zur Bindung des Cosubstrates (GXXXGXG), in einem Zweiten (YXXXX) sind zwei katalytisch relevante Reste konserviert. Außerdem sind in den Sequenzen der Enzyme drei weitere Reste (G-X<sub>6</sub>-S; P) konserviert (JÖRNVALL *et al.*, 1995). Nahezu alle diese Reste sind auch in den Aminosäuresequenzen der ORF9 und ORF14

Proteine aufzufinden (Abb. 19). Anhand von Sekundärstrukturvorhersagen kann für beide Proteine ein N-terminales  $\beta\alpha\beta$ -Muster postuliert werden, in dem die Reste zur Cosubstrat-Bindung lokalisiert sind (vergl. 3.10.2.). Auch das weitere Arrangement der Sekundärstrukturelemente dieser beiden Proteine ist mit dem bekannter SDRs (JÖRNVALL *et al.*, 1995) vergleichbar.

ORF9 Protein	11	TGASSGLGA	137	GALVNVAS	157	YGATK	187	P
ORF14 Protein	15	TGGASGIGA	128	AAIVNTCS	148	YSASK	178	P

### Abb. 19

Konservierte Aminosäurereste der SDR-Superfamilie in den Proteinen der ORFs 9 und 14.

Konservierte Reste sind grau hinterlegt. Die Nummerierung der AS entspricht den Datenbank Einträgen: ORF9: CAD61037, ORF14: CAD61032.

### 3.10.9. ORF10

Der nur 537 bp lange ORF10 beginnt 53 Nukleotide stromabwärts des Stopcodons von ORF9. Eine potentielle Ribosomen-Bindestelle befindet sich 10 Nukleotide vor dem Startcodon (GGAGG).

Die Aminosäuresequenz des ORF10 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61036.

Der Anteil saurer Aminosäurereste (D + E) ist in dem nur 178 Aminosäuren langen Protein mit 36 (20 mol %) auffällig hoch. Der isoelektrische Punkt des Proteins wurde zu 4,8 berechnet.

Das ORF10 Protein hat deutliche Sequenzähnlichkeiten zu den N-terminalen Regionen von Enzymen der Familie der RelA/SpoT-Proteine. 30,4 % Identität wurden sowohl zum N-terminalen Teil einer putativen Guanosin-3,5-Bis(diphosphat) 3-Pyrophosphohydrolase aus *Coxiella burnetii* RSA 493 (Acc. Nr. NP\_819346) gefunden, als auch zum N-terminalen Teil einer hypothetischen GTP Pyrophosphokinase aus *Clostridium tetani* E88 (Acc. Nr. NP\_782750). Proteine der RelA/SpoT-Familie katalysieren die Phosphorylierung von GTP zu (p)ppGpp (RelA und SpoT) bzw. die hydrolytische Spaltung von (p)ppGpp zu GTP (SpoT). (p)ppGpp wirkt u. a. als Induktor zur Expression von Genen in der stationären Phase oder in Stresssituationen (WEHMEIER *et al.*, 1998). RelA/SpoT-Proteine enthalten in der N-terminalen Region eine so genannte HD-Domäne. Ein Abgleich der ORF10 Aminosäuresequenz mit der Proteinfamilien-Datenbank (Pfam) zeigte, dass der größte Teil des ORF10 Proteins (AS 30-120) aus einer solchen HD-Domäne besteht. Proteine, die eine HD-Domäne beinhalten, katalysieren an verschiedenen Substraten, die eine Phosphatesterbindung enthalten, die Hydrolyse dieser Bindung in Gegenwart von divalenten Kationen (Beispiele sind Nukleotidyltransferasen oder Helikasen). Dabei geht die Phosphohydrolaseaktivität direkt von der HD-Domäne aus (ARAVIND & KOONIN, 1998). Neben Enzymen, bei denen die HD-Domäne mit anderen

Domänen kombiniert ist, wie bei den RelA/SpoT-Proteinen, gibt es jedoch auch Enzyme, die nur aus einer HD-Domäne bestehen, wie es auch bei dem ORF10 Protein der Fall zu sein scheint. Typisch für diese Metalloenzyme ist eine Signatur aus Histidin- und Aspartatresten, welche wahrscheinlich an der Koordination der Metall-Ionen beteiligt sind (ARAVIND & KOONIN, 1998). In der Aminosäuresequenz des ORF10 Proteins konnten die meisten Reste dieser Signatur identifiziert werden (Abb. 20).

ORF10 Protein 31	REHVLAVGDALADFDEDIQIAGYLHDIAE	X <sub>51</sub>	VKIADNAHNS	120
Konsensus	XXHXbXXXXsXXXhXXXhXXsshHDhsc	X <sub>n</sub>	hXXhDXh	
Sequenz				

### Abb. 20

Vergleich der Aminosäuresequenz des ORF10 Proteins mit der HD-Domänen Konsensus-Sequenz (ARAVIND & KOONIN, 1998).

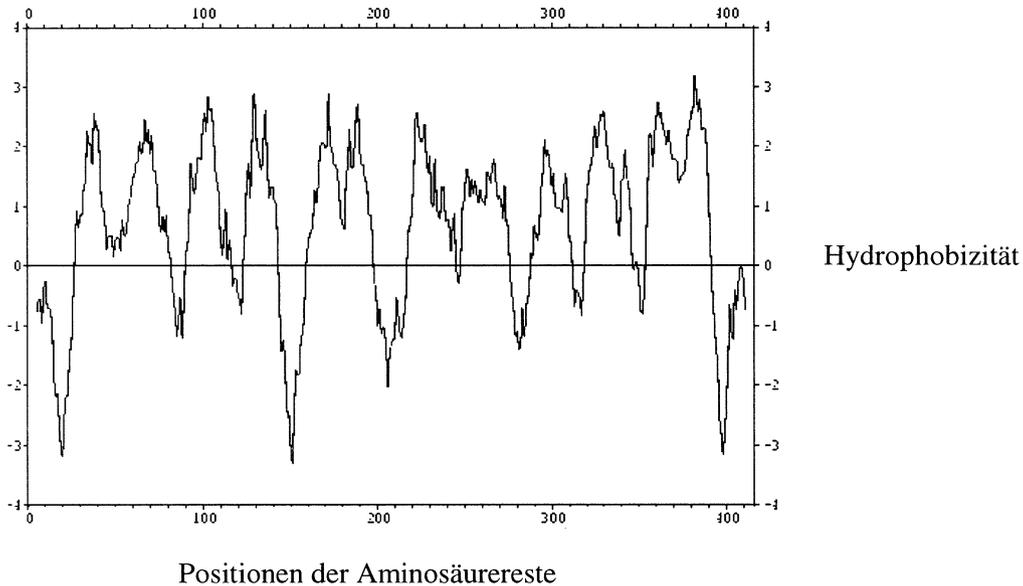
b: große AS, h: hydrophobe AS, s: kleine AS, c: geladene AS, X: beliebige AS

### 3.10.10. ORF11

ORF11 ist 1245 bp lang und liegt in reverser Orientierung zu ORF10. Zwischen den Stopcodons der ORFs 10 und 11 befindet sich ein 26 bp langer intergenischer Bereich. Fünfzehn Nukleotide stromaufwärts vor dem Startcodon von ORF11 befindet sich eine mögliche Ribosomen-Bindestelle (GGCGGTAA).

Die Aminosäuresequenz des ORF11 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61035.

Der errechnete isoelektrische Punkt des Proteins liegt im neutralen Bereich bei 7,5. Auffällig ist die hohe Anzahl hydrophober Aminosäuren (129 von 414). In der Vorhersage nach KYTE & DOOLITTLE (1982) wird die Verteilung hydrophiler und hydrophober Bereiche in dem Protein deutlich (Abb. 21).

**Abb. 21**

Graphische Darstellung der Verteilung hydrophiler und hydrophober Aminosäurereste in dem ORF11 Protein.

Werte oberhalb der Linie mittlerer Hydrophobizität repräsentieren hydrophobe Aminosäuren, Werte unterhalb der Linie hydrophile Aminosäuren.

Größte Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz wurden zu einem hypothetischen integralen Membranprotein aus *S. coelicolor* gefunden (Acc Nr. CAB90976) (43 % Identität, 51,5 % Ähnlichkeit). Der N-terminale Teil der Aminosäuresequenz des ORF11 Proteins enthält außerdem Bereiche, die konserviert bei potentiellen Membranproteinen gefunden wurden, welche in dem *Cluster of Orthologous Groups* COG4292 zusammengefasst werden. Zehn potentielle Transmembran-Helices konnten mit dem Programm SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998) für das ORF11 Protein vorhergesagt werden. In Tabelle 8 sind die Positionen der Aminosäuren, welche die Membran durchspannenden Helices formen, aufgeführt.

Bei dem durch ORF11 kodierten Protein scheint es sich um ein transmembranes Protein zu handeln, dessen Funktion nicht bekannt ist.

**Tab. 8**

Vorhersage transmembraner Helices in dem ORF11 Protein nach HIROKAWA *et al.* (1998).

Nr.	N-terminal	transmembrane Region	C-terminal	Länge
1	25	ATPLELFFDLTFVIAFGVAGSQF	47	23
2	55	HFGAGLLGFGFAMFAVIWAWINF	77	23
3	89	WVFRVVTMIQMVGVLILAMGIEP	111	23
4	123	NNVAILIGYIIMRVALIFQWLRA	145	23
5	167	QVGWVIALVIETDVLTTFLAAP	189	23
6	217	RYGLLAIIALGECLIGAIETLRA	239	23
7	250	AALVGLSGTGLAFAMWWIYFILP	272	23
8	291	HMPVFAAIAATGAGLHVAAYFID	313	23
9	322	AAVASIAVPVILFKASLTTYCI	344	23
10	362	GLAATIALAAAGASVPICMLVMM	384	23

### 3.10.11. ORF12

Neun Nukleotide stromaufwärts des Startcodons von ORF12, welcher stromabwärts des ORFs 11 in derselben Orientierung lokalisiert ist, wurde eine mögliche Shine-Dalgarno Sequenz detektiert (GAGAA).

Die Aminosäuresequenz des ORF12 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61034.

Der aus der Verteilung der Aminosäureeigenschaften kalkulierte isoelektrische Punkt des potentiellen Proteins liegt bei 4,99. Das Protein, welches durch ORF12 kodiert wird, scheint verwandt zu sein mit Enzymen, die der Familie der AAA<sup>+</sup> ATPasen (*ATPases associated with diverse cellular activities*) angehören. Im Abgleich mit Proteindatenbanken wurden 30,5 % Identität und 43 % Ähnlichkeit zu der C-terminalen Region eines *cell division control protein 48* aus *P. abyssi* (Acc. Nr. CAB49317) gefunden, welches der Familie der AAA<sup>+</sup> ATPasen zugeordnet wird. Des Weiteren zeigt das ORF12 Protein 27 % Identität und 41 % Ähnlichkeit zu dem C-terminalen Teil einer putativen AAA ATPase aus *Sulfolobus solfataricus* (Acc. Nr. AAK42941).

AAA<sup>+</sup> ATPasen katalysieren die ATP-Hydrolyse in Enzymen verschiedenster Funktionen. Allen AAA<sup>+</sup> ATPasen gemeinsam ist ein ca. 220 Aminosäuren langes Modul, in dem die ATP-Bindestelle lokalisiert ist. Der Bereich von AS 101 bis AS 283 des ORF12 Proteins zeigt ausgeprägte Homologien zu konservierten Domänen, die in der Proteinfamilien Datenbank (Pfam) unter der Acc. Nr. PF00004 (AAA ATPasen) abgelegt sind. Innerhalb des AAA-Moduls sind zwei Sequenzmotive konserviert, das Walker-Motiv A (oder *P-loop*) und das Walker-

Motiv B. Aminosäurereste beider Motive sind an der Bindung des ATP und an der Katalyse beteiligt. Beide Motive sind ebenfalls in dem ORF12 Protein konserviert (Abb. 22).

Neben den in der N-terminalen Region des AAA-Moduls liegenden Walker-Motiven existiert noch ein weiteres konserviertes Motiv im zentralen Bereich des Moduls. Eine Konsensus-Sequenz dieses Motivs ist als PROSITE Signatur PS00674 dokumentiert [<http://us.expasy.org/cgi-bin/nicesite.pl?PS00674>]. Auch dieses Motiv ist in der Sequenz des ORF12 Protein fast vollständig konserviert.

ORF12 Protein	106	GPPGTGKT	113
Walker A		GXXXXGKT	
ORF12 Protein	160	VVFIDEV	167
Walker B		hhhhDEh	
PS00674 im	201	RLLVCATNFIRALDTAFLR	219
ORF12 Protein			

### Abb. 22

Konservierte Motive in der Sequenz des ORF12 Proteins.

Konsensus-Sequenzen der Walker-Motive nach OGURA & WILKINSON (2001), h: hydrophobe AS, X: beliebige AS. Grau hinterlegte Aminosäurereste sind in Übereinstimmung mit exakt definierten Resten der bekannten Motive. An der Position von R201 des ORF12 Proteins ist durch die PROSITE Signatur ein hydrophober Rest gefordert.

Das AAA-Modul bekannter AAA<sup>+</sup> ATPasen ist aus zwei Domänen aufgebaut, die größere, N-terminale Domäne besteht aus einem fünf-strängigen, parallelen  $\beta$ -Faltblatt, welches von  $\alpha$ -Helices umgeben ist, die C-terminale Domäne wird bevorzugt aus  $\alpha$ -Helices geformt (OGURA & WILKINSON, 2001). Die Lage der Sekundärstrukturelemente für das ORF12 Protein wurden mit dem Programm PredictProtein kalkuliert. Innerhalb des potentiellen AAA-Moduls (AS 101-283) des Proteins wurden fünf  $\beta$ -Stränge und acht  $\alpha$ -Helices vorhergesagt. In strukturell untersuchten AAA<sup>+</sup> ATPasen formen die Aminosäurereste des Walker-Motivs A einen *loop* zwischen dem  $\beta$ -Strang 1 und der  $\alpha$ -Helix 2, während die Reste des Motivs B den  $\beta$ -Strang 3 formen (OGURA & WILKINSON, 2001). Übereinstimmend mit den bekannten AAA<sup>+</sup> ATPasen wird der  $\beta$ -Strang 3 auch in dem ORF12 Protein von den Resten des postulierten Walker-Motivs B geformt. Nach der Strukturvorhersage für das ORF12 Protein müssten die Reste des Motivs A hier jedoch zwischen  $\beta$ -Strang 1 und  $\alpha$ -Helix 1 des AAA-Moduls lokalisiert sein.

### 3.10.12. ORF13

Zwischen dem Startcodon von ORF13 und dem von ORF12 liegt ein intergenischer Bereich von über 500 bp. Vor dem ORF13 Startcodon in 5'-Richtung ist eine potentielle Ribosomen-Bindestelle (GGGAAG) lokalisiert.

Die Aminosäuresequenz des ORF13 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61033.

Der isoelektrische Punkt des potentiellen Proteins wurde zu 4,47 berechnet. Das ORF13 Protein (376 AS) zeigt größte Ähnlichkeit zu der C-terminalen Region eines 666 Aminosäuren langen, putativen ATP/GTP-bindenden Proteins aus *A. nicotinovorans* pAO1 (Acc. Nr. CAD47885) (32 % Identität, 43 % Ähnlichkeit). Weiterhin wurden Ähnlichkeiten zu den C-Termini potentieller Proteine aus *S. coelicolor* A3 (2), denen jedoch keine Funktion zugeordnet ist, gefunden (Acc. Nr. CAB51964: 30 % Identität, 36,6 % Ähnlichkeit; Acc. Nr. CAB75372: 30 % Identität, 38 % Ähnlichkeit).

Anhand von Sequenzvergleichen kann keine Aussage über die Funktion des ORF13 Proteins gemacht werden.

### 3.10.13. ORF15

Zehn Nukleotide stromaufwärts des ORF15 Startcodons konnte eine mögliche Ribosomen-Bindestelle lokalisiert werden (GGAGGAA). Die Aminosäuresequenz des ORF15 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61031.

Der isoelektrische Punkt wurde für das Protein zu 4,38 berechnet. Das ORF15 Protein zeigt markante Ähnlichkeiten zu HHDD (*2-hydroxy-hept-2,4-diene-1,7-dioic acid*; 1-Hydroxy-penta-1,3-dien-1,5-dicarbonsäure)-Isomerasen/OPET (5-Oxo-penta-3-en-1,2,5-tricarbonsäure)-Decarboxylasen. Diese bifunktionalen Enzyme des Homoprotocatechuat-Katabolismus in *E. coli* bilden eine Familie mit den Fumarylacetoacetat-Hydrolasen (FAA-Hydrolasen) (Pfam Familie: FAA-Hydrolasen PF01517), welche den letzten Schritt im Abbau der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin katalysieren. Vergleiche des ORF15 Proteins mit Proteindatenbanken ergaben hohe Übereinstimmungen mit zwei verschiedenen hypothetischen HHDD-Isomerasen aus *S. coelicolor* A3 (2) (Acc. Nr. NP\_624669: 59 % Identität, 66 % Ähnlichkeit; Acc. Nr. NP\_627079: 51 % Identität, 61 % Ähnlichkeit).

Eine einzelne Untereinheit der HHDD-Isomerase/OPET-Decarboxylase HpcE aus *E. coli* C besteht aus zwei nahezu identischen Domänen, die aus den Aminosäureresten 1-210 bzw. 221-429 geformt werden. In den FAA-Hydrolasen findet man ein Äquivalent dieser Domänen in Kombination mit einer dazu verschiedenen N-terminalen Domäne (TAME *et al.*, 2002). Die Aminosäuren 79 bis 292 des ORF15 Proteins zeigen 44 % Identität und 53,6 % Ähnlichkeit zu der C-terminalen Domäne von HpcE (Acc. Nr. CAA52936) und 31 % Identität (38 % Ähnlichkeit) zu der C-terminalen Domäne der FAA-Hydrolase des Menschen (Acc. Nr.

AAA52422). Wie die Domäne von HpcE scheint der korrespondierende Sequenzabschnitt des ORF15 Proteins hauptsächlich aus  $\beta$ -Strängen zu bestehen. Es wurden 13  $\beta$ -Stränge und zwei  $\alpha$ -Helices für diesen 213 Aminosäuren langen Abschnitt mit dem Programm PredictProtein vorhergesagt.

Die katalytische Aktivität sowohl der HpcE aus *E. coli* C als auch der FAA-Hydrolase des Menschen ist abhängig von einem divalenten Kation. Während das Metall-Ion in der C-terminalen Domäne der HpcE durch drei Aminosäurereste koordiniert wird (E276, E278, D307), sind in der FAA-Hydrolase vier Reste dafür erforderlich (D126, E199, E201, D233) (TAME *et al.*, 2002, BERGERON *et al.*, 2001). In dem ORF15 Protein finden sich Äquivalente (E132, E134, D164) zu dreien der konservierten Reste (Abb. 23). Die Strukturanalyse der HpcE ergab, dass an der räumlich identischen Position zu D126 der FAA-Hydrolase ein Alanin zu finden ist (A227), dieser Alaninrest ist auch in dem ORF15 Protein konserviert (A83). Konservierte Reste, die erwiesenermaßen zur Erhaltung der Struktur der FAA-Hydrolase des Menschen notwendig sind (C193, W234) (BERGERON *et al.*, 2001), sind in dem ORF15 Protein nicht konserviert. Zu Aminosäuren, die in der HpcE an der Stabilisierung der räumlichen Struktur um das Metall-Ion beteiligt sind (K252, K325, T393, G394), konnten jedoch in dem ORF15 Protein korrespondierende Reste detektiert werden (K108, K183, T300, G301) (Abb. 23).

		* *		*		**
ORF15 Protein	127	EKYDWEVELA	157	AGYAVANDLSERDYQ	294	PGDVIITGTPEG
HpaG	271	EYMHYEAELV	300	AGYTVCN DYAIRDYL	387	PGDMIATGTPKG
HpcE	271	EYMHYEAELV	300	AGYTVCN DYAIRDYL	387	PGDMIATGTPKG
FAA En	204	KKLDIELELA	236	FGVLMNDWSARDIQ	354	TGDL LGS GTISG
FAA Hs	194	KLLDMELEMA	226	FGMVL MNDWSARDIQ	342	PGDLLASGTISG
		*		*		
ORF15 Protein	107	LKPSNTIAGP	181	GKSLP		
HpaG	251	LKAPNTLTGD	324	VKSRD		
HpcE	251	LKAPNTLTGD	324	VKSRD		

**Abb. 23**

Alignment von Sequenzbereichen des ORF15 Proteins mit entsprechenden Bereichen von Mitgliedern der FAA-Hydrolase-Familie.

Dargestellt sind konservierte Sequenzbereiche, die u. a. Aminosäurereste umfassen, welche das divalente Kation koordinieren. In allen Sequenzen konservierte Reste sind grau hinterlegt. Im Text angesprochene Reste sind mit einem Sternchen (\*) über den Sequenzen markiert. Die Nummerierung der AS entspricht den Datenbankeinträgen: HpaG: HHDD-Isomerase/OPET-Decarboxylase aus *E. coli* W (Acc. Nr. CAA86040), HpcE: HHDD-Isomerase/OPET-Decarboxylase aus *E. coli* C (Acc. Nr. CAA52936), FAA En: FAA-Hydrolase aus *Emericella nidulans* (Acc. Nr. AAA85778), FAA Hs: FAA-Hydrolase aus *Homo sapiens* (Acc. Nr. AAA52422).

### 3.10.14. ORF16

ORF16 befindet sich am 5'-Ende des 12,2 kb langen *Hind*III Fragmentes in dem Cosmid pVK55B/5. Neun Nukleotide stromaufwärts des Startcodons beginnt ein kurzer Purin-reicher Sequenzabschnitt (AGGAG), der eventuell als Ribosomen-Bindestelle dienen kann.

Die Aminosäuresequenz des ORF16 Genproduktes findet sich in der EMBL-Proteindatenbank unter der Acc. Nr. CAD61030.

Die Kalkulation des isoelektrischen Punktes ergab für das ORF16 Protein einen Wert von 5,15. Im Vergleich mit Einträgen in Proteindatenbanken wurde eine signifikante Ähnlichkeit des ORF16 Proteins mit Mitgliedern der Enolase-Superfamilie deutlich. Auf Aminosäureebene hat das ORF16 Protein 68,5 % Identität (76,5 % Ähnlichkeit) zu einer hypothetischen Mandelat-Racemase aus *S. avermitilis* MA-4080 (Acc. Nr. BAC 74993) und 57 % Identität (64,3 % Ähnlichkeit) zu einer putativen Enolase aus *Burkholderia fungorum* (Acc. NR. ZP\_00028757). Enzyme, die in der Enolase-Superfamilie zusammengefasst werden, sind strukturell verwandt. Allen Enzymen dieser Superfamilie gemeinsam ist eine Struktur bestehend aus zwei Domänen, wobei die C-terminale Domäne das katalytische Zentrum enthält und einer  $(\beta/\alpha)_8$  TIM barrel Struktur entspricht (BABBITT *et al.*, 1996, GERLT & BABBITT, 2001). Die Suche nach konservierten Domänen in dem ORF16 Protein ergab Übereinstimmungen der Aminosäuren 4-137 mit der, den Enzymen der Enolase-Superfamilie gemeinsamen, N-terminalen Domäne (Pfam Acc. Nr. PF02746). Der Proteinbereich der Aminosäuren 174-424 scheint der C-terminalen TIM barrel-Domäne (Pfam Acc. Nr. PF01188) zu entsprechen. Die Lage der Sekundärstrukturelemente in der C-terminalen Domäne, die für das ORF16 Protein mit dem Programm PredictProtein kalkuliert wurden (Abb. 24), weist hohe Übereinstimmungen mit der Verteilung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen auf, wie sie für die Mandelat-Racemase aus *P. putida* bekannt ist (Acc. Nr. P11444).

Enzyme der Enolase-Superfamilie katalysieren verschiedene Reaktionen, die jedoch immer durch die Abstraktion eines Protons vom  $\alpha$ -C-Atom einer Carboxylgruppe und die Generierung eines Enolat-Intermediates eingeleitet werden. BABBITT *et al.* (1996) klassifizierten die Mitglieder der Superfamilie anhand der katalytisch aktiven Aminosäurereste in drei Gruppen: (1) die Mandelat-Racemase (MR), die die Interkonversion der enantiomeren Formen von (*R*)- und (*S*)-Mandelat katalysiert, (2) das Muconat-lactonisierende Enzym (MLE), welches im *ortho-pathway* der Catechol-Degradation die Zyklisomerisierung von *cis*, *cis*-Muconat zu Muconolacton katalysiert, und (3) die Enolasen, die die  $\beta$ -Elimination eines Hydroxid-Ions vom Substrat katalysieren. Alle diese Reaktionen bedürfen der Anwesenheit eines (MR, MLE) bzw. zweier (Enolase) divalenter Kationen und Aminosäureresten, die die Funktion einer Base bzw. einer Säure übernehmen.

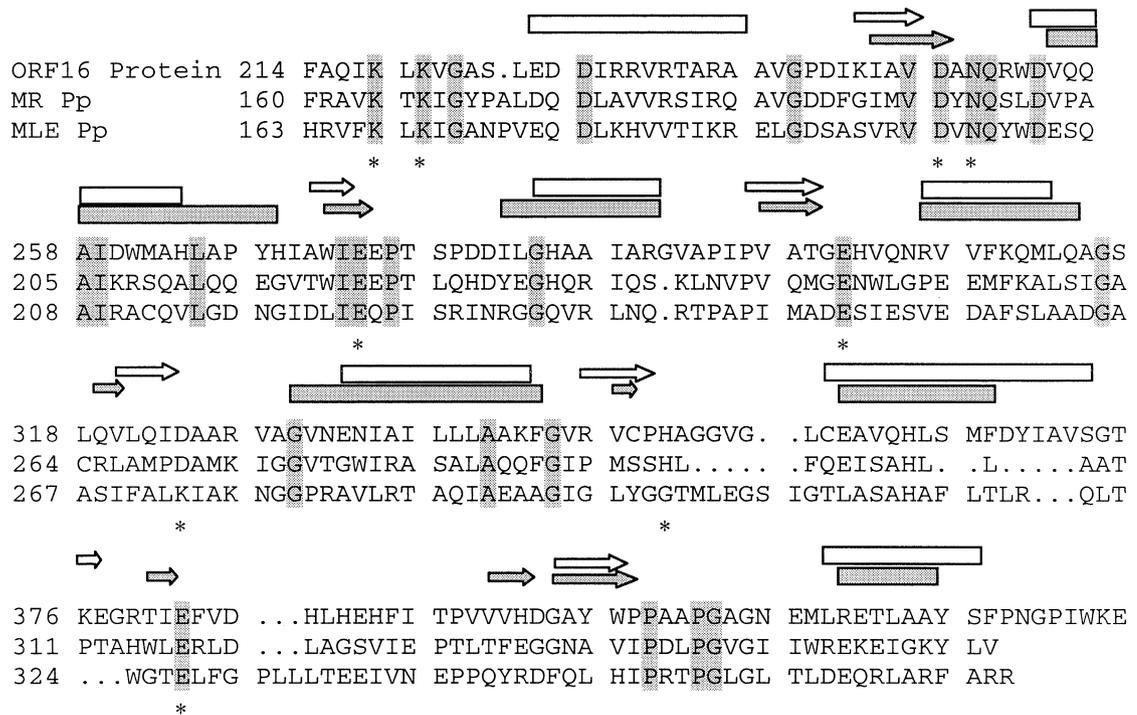


Abb. 24

Alignment des C-terminalen Bereichs des ORF16 Proteins mit den TIM *barrel*-Domänen der MR und dem MLE aus *P. putida*.

In der jeweils ersten Zeile ist die Sequenz des ORF16 Proteins wiedergegeben, in der zweiten Zeile die Sequenz der MR aus *P. putida* (Acc. Nr. P11444) und in der dritten Zeile die Sequenz der MLE aus *P. putida* (Acc. NR. AAA66202). Vollständig konservierte Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Jeweils über den Sequenzen sind die Sekundärstrukturelemente des ORF16 Proteins (weiß) (vorhergesagt mit PredictProtein) und der MR (grau) dargestellt. Pfeile:  $\beta$ -Stränge, Balken:  $\alpha$ -Helices. Sternchen (\*) unter den Sequenzen markieren die Positionen der Metall-Liganden und katalytisch essentieller Reste (s. Text).

Das katalytisch essentielle Metall-Ion wird in den Enzymen aller drei Gruppen durch drei Ligandenbindungen koordiniert. In den strukturell analysierten Enzymen MR und MLE aus *P. putida* und der Enolase aus *Saccharomyces cerevisiae* wird diese Funktion von folgenden Aminosäureresten übernommen: MR: D195, E221, E247; MLE: D198, E224, D249; Enolase: D246, E295, D320 (BABBIT *et al.*, 1996). In dem ORF16 Protein wurden die sauren Aminosäurereste D248, E274 und E301 als Äquivalente zu diesen Liganden identifiziert (Abb. 24). In einem konservierten KXX Motiv sind bei der MR und der MLE zwei katalytisch aktive Lysinreste lokalisiert, die die Funktion eines Elektrophils bzw. einer Base haben. Dieses kurze Motiv findet man in der Sequenz des ORF16 Proteins in den Positionen 218-220 (Abb. 24). Ein weiterer saurer Aminosäurerest hat die Funktion einer katalytischen Säure in der Reaktion aller drei Enzyme (MR: E317, MLE: E327, Enolase: E211) (BABBITT *et al.*, 1996). Er gibt ein Proton an die Carboxylgruppe des Substrates ab, nachdem das  $\alpha$ -Proton abstrahiert worden ist.

Ein Äquivalent dazu findet sich in dem ORF16 Protein in Position E382. Drei weitere, in der MR katalytisch aktive Aminosäurereste (H297, D270, N197) (BABBITT *et al.*, 1996, St. MAURICE & BEARNE, 2000), sind ebenfalls in dem ORF16 konserviert (H351, D324, N250).

### 3.11. Heterologe, funktionelle Expression der Gene der Chinaldin-4-Oxidase

Nachdem die Sequenz der *qox*-Gene bekannt war, sollten die Strukturgene *qoxLMS* in einen Expressionsvektor kloniert werden, um eine regulierte, heterologe Expression zu ermöglichen. Damit sollte ein System geschaffen werden, welches eine gerichtete Mutagenese der Qox erlaubte. Der schon bei der Expressionsklonierung der Gene der Qor aus *P. putida* 86 (FRERICHS-DEEKEN *et al.*, 2003) und der Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *B. diminuta* 7 (ISRAEL *et al.*, 2002) eingesetzte *broad-host-range* Plasmidvektor pJB653 (2.7.2.) wurde zu diesem Zweck ausgewählt. Als Wirtstamm wurde *P. putida* KT2440 eingesetzt, welcher sich durch die Fähigkeit zur Synthese aktiver Qox in den Systemen pVK55B/5 und pVK55/11 ausgezeichnet hatte.

#### 3.11.1. PCR-Amplifikation des *qoxLMS*-Clusters

Die Amplifikation des Genclusters *qoxLMS* erfolgte in einer *Pfu*-Polymerase katalysierten Reaktion mit Hilfe der *primer qox-for* und *qox-rev* (2.23.1.). Als Matrizen-DNA wurde nach 2.10.1. isolierte DNA des Cosmids pVK55B/5 verwendet.

Die DNA der PCR-Ansätze wurde mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche Diagnostics GmbH (2.24.) von Puffersalzen, dNTPs und der Polymerase gereinigt. Zur Kontrolle, ob tatsächlich die *qox*-Gene amplifiziert worden waren, wurde das PCR-Produkt verschiedenen Restriktionen unterzogen. Die Größen der erhaltenen Restriktionsfragmente wurden nach Auftrennung in verschiedenen konzentrierten Agarosegelen abgeschätzt und mit den aus der bekannten Sequenz errechneten Fragmentgrößen verglichen. Die Ergebnisse der Restriktionsanalyse (Tab. 9) bestätigten die Amplifikation der *qox*-Gene.

**Tab. 9**Restriktionsanalyse des *qoxLMS* PCR-Produktes.

<b>Restriktionsenzym</b>	<b>experimentell ermittelte Fragmentgrößen</b>	<b>errechnete Fragmentgrößen</b>
<i>Pst</i> I	1500, 1100, 1000, 450	1447, 1085, 959, 429
<i>Bam</i> HI	2000, 1700	2245, 1675
<i>Xho</i> I	2500, 950, 450	2471, 1008, 441
<i>Pvu</i> II	3000, 600	3311, 609
<i>Kpn</i> I	2200, 900, 550	2262, 906, 752

**3.11.2. Konstruktion des Expressionsklons *P. putida* KT2440 pKP1**

Der Expressionsvektor pJB653 wurde mit *Sma*I und *Eco*RI restringiert. Das gereinigte *qoxLMS* PCR-Amplifikat wurde mit *Eco*RI restringiert, um auf einer Seite mit kohäsiven Enden und auf der anderen Seite mit glatten Enden in den Vektor inseriert zu werden, wodurch das Plasmid pKP1 entstand. Das neue Konstrukt wurde in *P. putida* KT2440 etabliert.

Zur Kontrolle der *qoxLMS*-Insertion in pJB653 wurde Plasmid-DNA ampicillinresistenter *P. putida* KT2440 Transformanten mit *Pst*I restringiert. Rekombinante Plasmide, die das richtige Insert enthielten, zeigten das Restriktionsmuster mit den charakteristischen Spaltprodukten von etwa: 7000 bp, 1450 bp, 1100 bp und 950 bp, zusätzlich war noch ein 400 bp *Pst*I Fragment aus dem Vektor pJB653 (2.7.2.) zu detektieren.

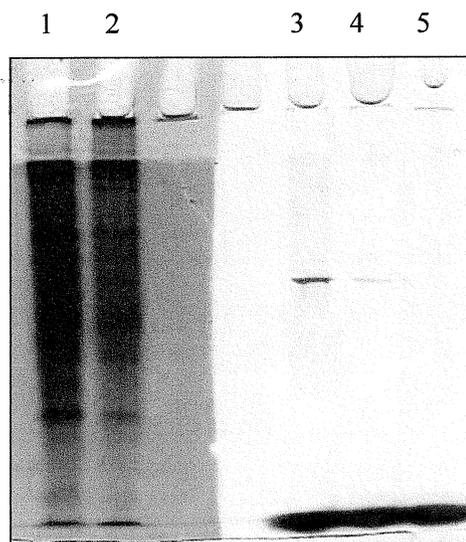
**3.11.3. Cometabolische Chinaldin-Umsetzung und Synthese aktiver Qox durch  
*P. putida* KT2440 pKP1 Klone**

Drei *P. putida* KT2440 pKP1 Klone (I, II, III) wurden zur Synthese funktioneller Qox in Benzoat-Minimalmedium (2.8.4.) gezüchtet. Die Transkription der *qoxLMS*-Gene wurde durch Zugabe der XylS-Effektoren Benzoat und 2-Methylbenzoat induziert.

Alle drei Klone waren in der Lage, Chinaldin cometabolisch zu 1*H*-4-Oxochinaldin umzusetzen, welches im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte. In den Rohextrakten der drei Klone konnten spezifische Aktivitäten der Qox von 0,048 U/mg (*P. putida* KT2440 pKP1/I), 0,022 U/mg (*P. putida* KT2440 pKP1/II) und 0,066 U/mg (*P. putida* KT2440 pKP1/III) gemessen werden. Nach Auftrennung der Rohextrakte in einer nativen PAGE und Anfärbung auf Qox-Aktivität (2.33.2.) zeigte sich bei allen drei Klonen eine rote Bande, die auf derselben Höhe wie die Bande der Qox aus *A. ilicis* Rü61a lag. Abbildung 25 zeigt dies beispielhaft für Klon *P. putida* KT2440 pKP1/III, welcher aufgrund der hohen spezifischen Aktivität im Rohextrakt für weitere Versuche ausgewählt wurde.

In der allgemeinen Proteinfärbung mit Coomassie Blue konnte im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pKP1/III im Vergleich mit dem Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pJB653 keine korrespondierende, deutliche Proteinbande, die auf gleicher Höhe wie die Qox-Bande im Aktivitätsgel lokalisiert ist, detektiert werden.

*P. putida* KT2440 pJB653, welcher zur Kontrolle unter denselben Bedingungen gezüchtet wurde, war nicht in der Lage Chinaldin cometabolisch im Benzoat-Minimalmedium umzusetzen und auch im Rohextrakt konnte keine Qox-Aktivität nachgewiesen werden.



**Abb. 25**

Native PAGE mit Rohextrakten von *P. putida* KT2440 pKP1/III, *A. ilicis* Rü61a und *P. putida* KT2440 pJB653.

Bahn 1 und 2: Coomassie Färbung, Bahnen 3-5: Färbung auf Qox-Aktivität.

Bahn 1: *P. putida* KT2440 pKP1/III, Bahn 2: *P. putida* KT2440 pJB653, Bahn 3: *P. putida* KT2440 pKP1/III, Bahn 4: *A. ilicis* Rü61a, Bahn 5: *P. putida* KT2440 pJB653.

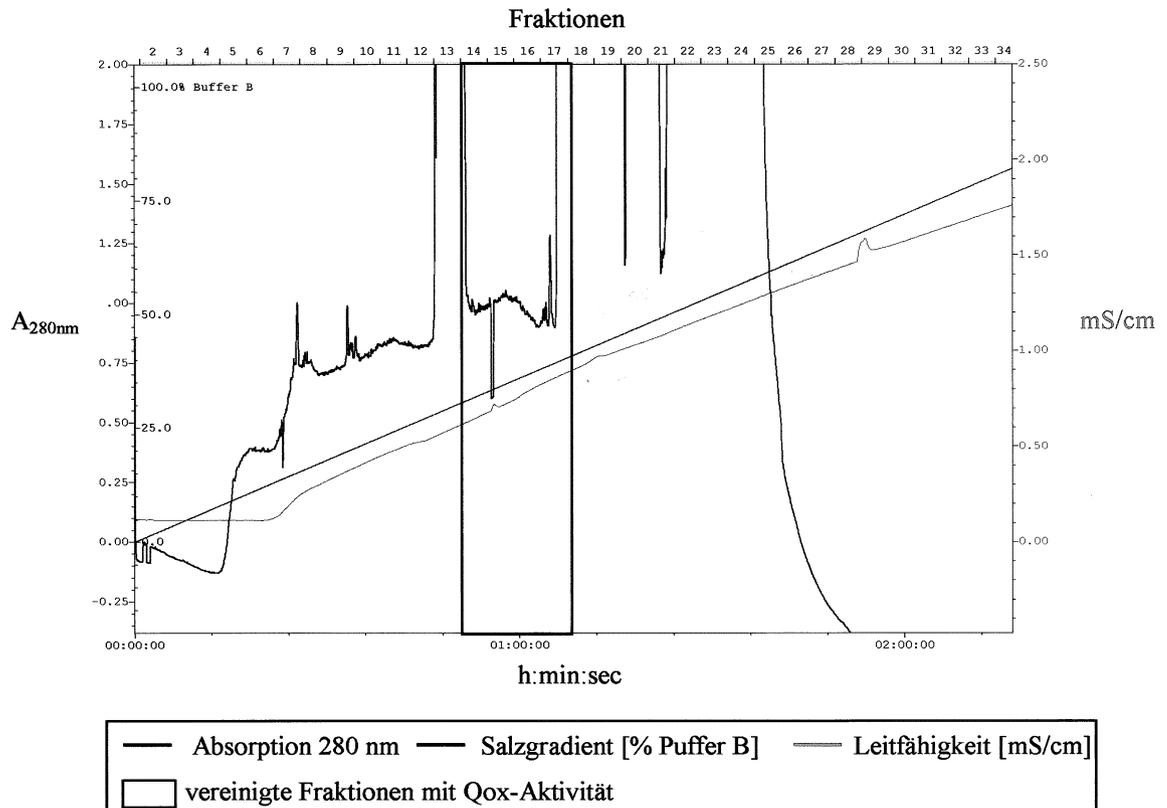
### 3.12. Reinigung der Chinaldin-4-Oxidase aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

Zur Produktion von Zellmasse bei gleichzeitiger Induktion der Expression der *qox*-Gene wurde *P. putida* KT2440 pKP1/III in zwei 4 l Fermentoren für ca. 12 h bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm}$  von etwa 2,5 bis 3 kultiviert (2.8.4.). Daraus konnten 25 g bis 30 g feuchte Zellmasse gewonnen werden. Pro Reinigungszyklus wurden 15 g bis 20 g Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

Im Rohextrakt konnte eine spezifische Qox-Aktivität von 0,059 U/mg nachgewiesen werden.

### 3.12.1. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B

Durch Waschen der mit dem Rohextrakt beladenen Säule mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7) konnten ungebundene Proteine abgetrennt werden. Die Qox eluierte ab einer NaCl-Konzentration von 0,27 M von der Säulenmatrix (Fraktionen 14-17) (Abb. 26). Der Enzympool wies eine spezifische Aktivität von 0,79 U/mg auf.

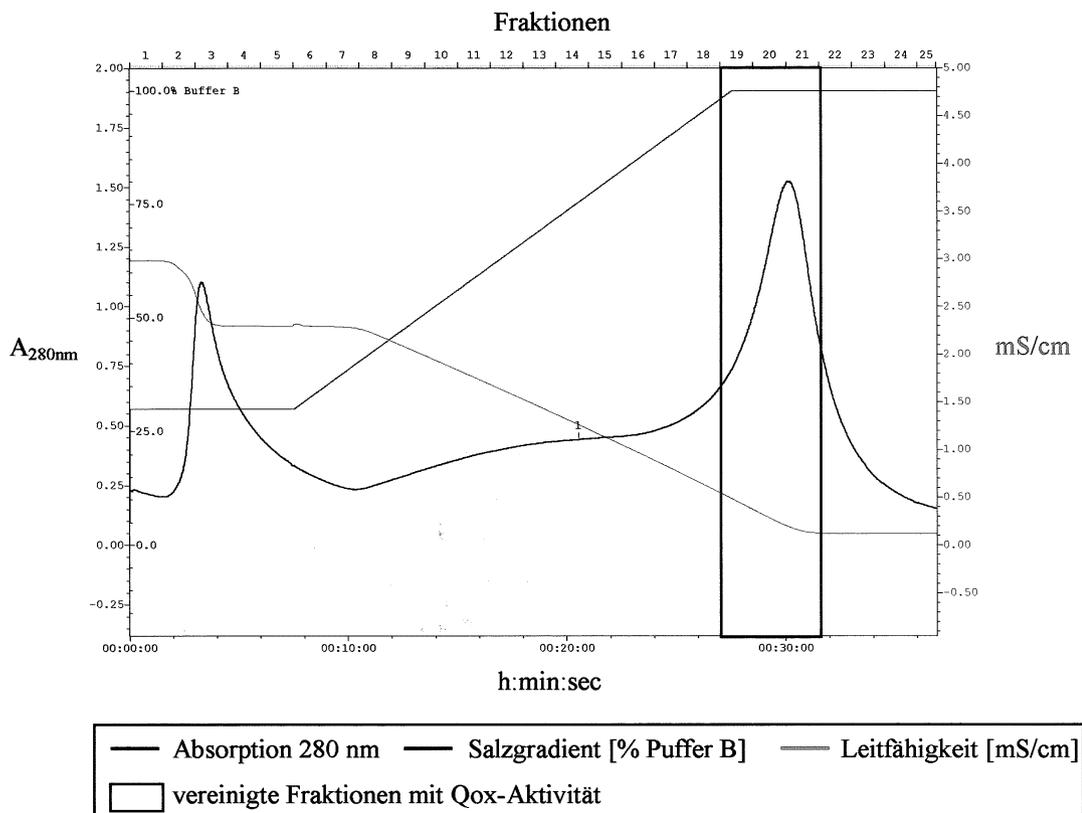


**Abb. 26**

Elutionsdiagramm der Chromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B.

### 3.12.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B

Ansalzen der aus der Anionenaustauschchromatographie resultierenden Proteinlösung mit Qox-Aktivität und nachfolgende Zentrifugation führte zur Fällung einiger Proteinverunreinigungen, während die Qox bei einer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 0,75 M in Lösung blieb. Die angereicherte Qox adsorbierte bei dieser Salzkonzentration an die Phenyl-Sepharose-Matrix und wurde auch beim Waschen mit 85 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7) mit 0,55 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nicht von der Säule gespült. Fraktionen aktiver Qox, deren Elution in einem 50 mM Tris/HCl-Puffer ohne  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  erfolgte (Abb. 27) (Fraktionen 19-21), wurden gesammelt. Die spezifische Aktivität der Qox in diesem Proteinpool betrug 1,37 U/mg.

**Abb. 27**

Elutionsdiagramm der Chromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B.

### 3.12.3. Anionenaustauschchromatographie an UNO™-Q 1

In einer zweiten Ionenaustauschchromatographie wurde die Qox an einer Matrix aus Q-Sepharose weiter von Fremdproteinen gereinigt. Das Enzym konnte in einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten bei einer Salzkonzentration von 30 mM bis 34 mM von der Säule eluiert werden (Abb. 28). Die angereicherte Qox, die sich in den Fraktionen 14 und 15 fand, wies eine spezifische Aktivität von 4,54 U/mg auf.

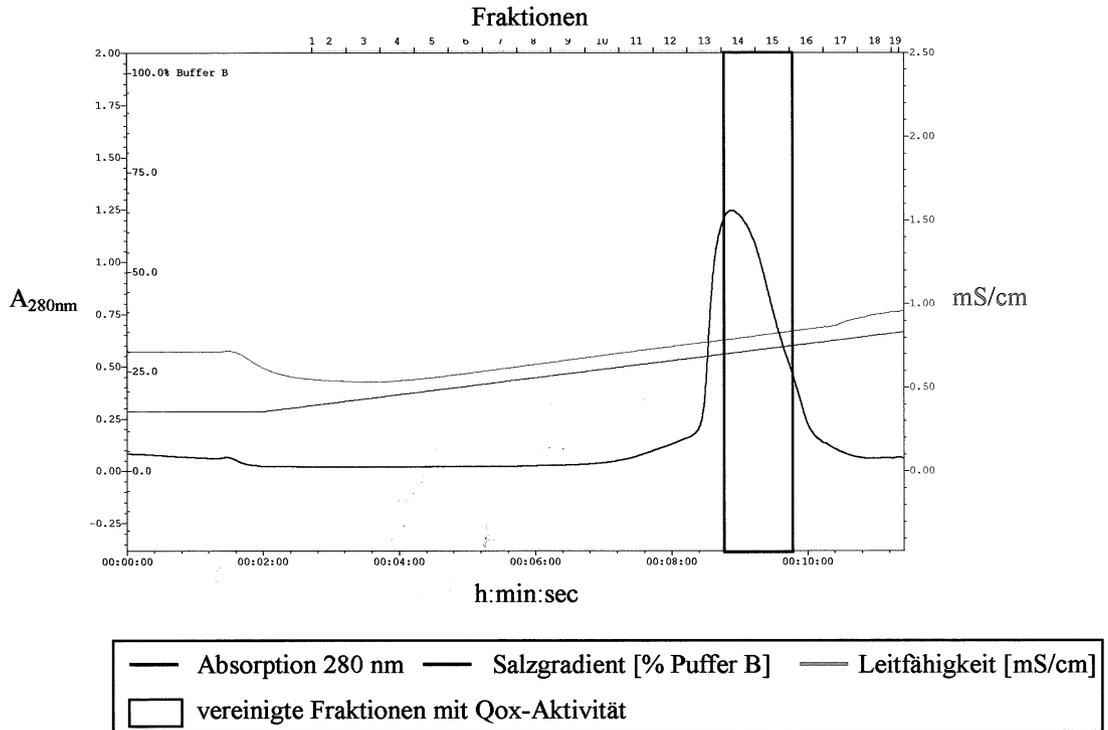


Abb. 28 Elutionsdiagramm der Chromatographie an UNO™-Q.

### 3.12.4. Gelfiltration an einer HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule

In einem letzten Reinigungsschritt wurde die Qox aufgrund ihrer Größe von bisher nicht abgetrennten Proteinen gereinigt. Wenn auch im Elutionsdiagramm keine Absorption durch Fremdproteine zu erkennen ist (Abb. 29), so konnte die spezifische Aktivität der Qox, die aus den Fraktionen 22-27 vereinigt wurde, doch noch auf 5 U/mg gesteigert werden.

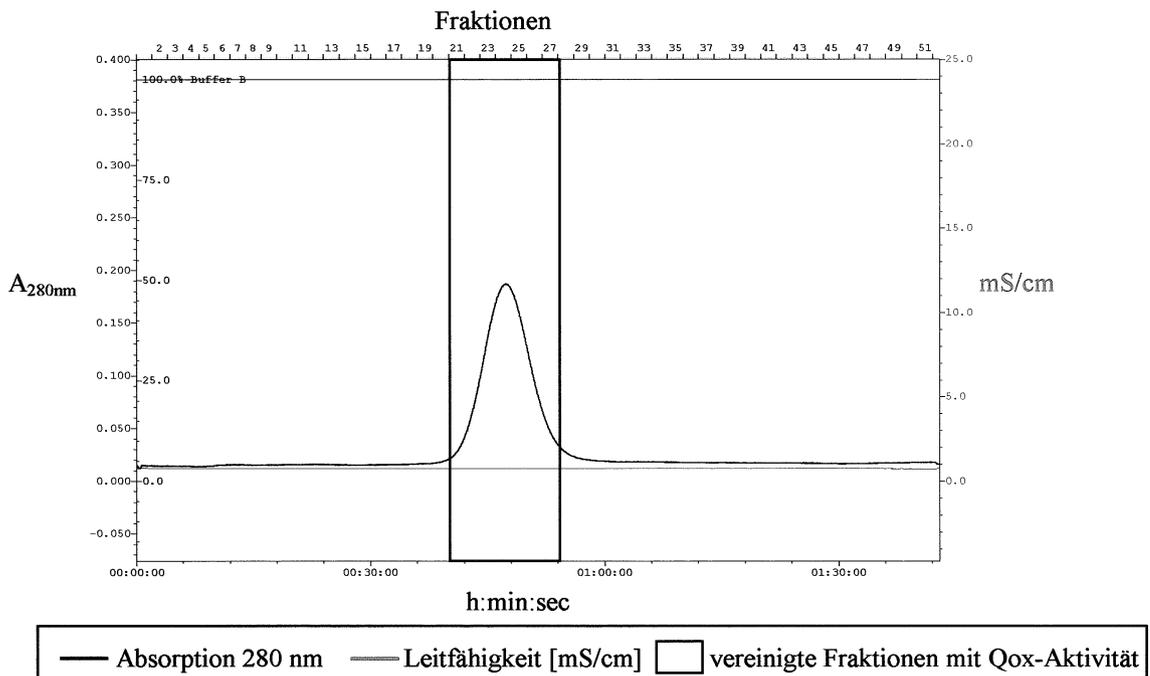


Abb. 29 Elutionsdiagramm der Chromatographie an HiLoad 26/60 Superdex 200.

### 3.12.5. Zusammenfassung der Reinigung und Homogenität der gereinigten Qox

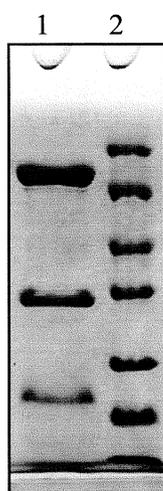
Mit den oben beschriebenen Schritten war es möglich, die Qox bis zur Homogenität zu reinigen. Tab.10 stellt die Ergebnisse eines exemplarischen Reinigungszykluses dar. Es konnten aus 22 g Zellmasse (Feuchtwicht) 1,12 mg reine Qox mit einer spezifischen Aktivität von 5 U/mg gewonnen werden. Es wurde mit einer Ausbeute von 7 % eine Anreicherung um das 85-fache gegenüber dem Rohextrakt erlangt.

**Tab. 10**

Reinigung der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III ausgehend von 22 g feuchter Zellmasse.

Reinigungsschritt	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spez. Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
<b>Rohextrakt</b>	82	1390	0.059	1	100
<b>DEAE-Sepharose CL-6B</b>	60	75	0.79	13.5	72
<b>Phenyl Sepharose CL-4B</b>	23	17	1.37	23.2	28
<b>UNO™-Q 1</b>	15.5	3.5	4.54	77	19
<b>HiLoad 26/60 Superdex 200</b>	5.6	1.12	5	85	7

Die Fortschritte der Reinigung wurden routinemäßig mittels SDS-PAGE überprüft. Bahn 1 in Abbildung 30 zeigt eine homogene Präparation; sichtbar sind die drei Untereinheiten der Qox.



**Abb. 30**

SDS-PAGE (13,4 %ig) der gereinigten Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III.

Bahn 1: Gereinigte Qox

Bahn 2: Standard-Proteine, von oben:

β-Galactosidase (116 kDa)

RSA (66,2 kDa)

Ovalbumin (45 kDa)

Lactat-Dehydrogenase (35 kDa)

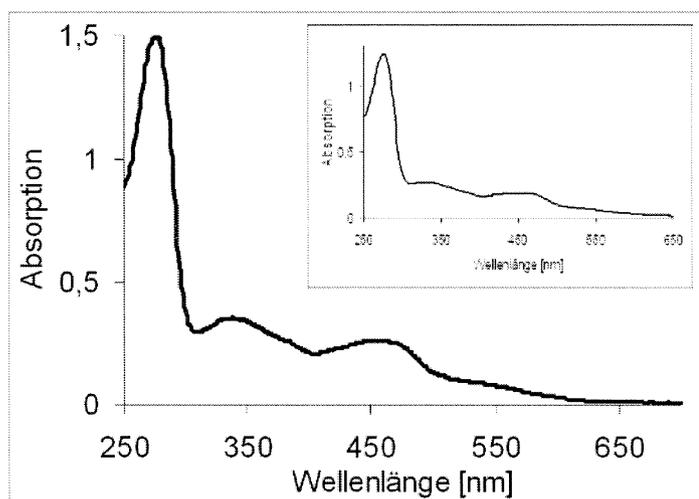
Restriktionsendonuklease *Bsp98I* (25 kDa)

β-Lactoglobulin (18,4 kDa)

### 3.13. Cofaktor-Analyse der Chinaldin-4-Oxidase aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

#### 3.13.1. Lichtabsorptionsspektrum

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III im oxidierten Zustand zeigt einen Verlauf, der typisch ist für molybdänhaltige Hydroxylasen, die Flavin- und Fe-S-Cofaktoren beinhalten (LEHMANN *et al.*, 1994, TSHISUAKA *et al.*, 1993; HÄNZELMANN & MEYER, 1998; HETTRICH & LINGENS, 1991) (Abb. 31). Das Enzym zeigt Absorptionsmaxima bei 280 nm und 342 nm. Um 450 nm ist eine breite Absorptionsbande zu erkennen ebenso wie eine schwache Absorption um 550 nm. Damit ist das Spektrum des heterolog synthetisierten Enzyms identisch mit dem des Wildtyp-Enzyms (Abb. 31 Inset). Die Verhältnisse  $A_{280\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$  und  $A_{460\text{nm}}/A_{550\text{nm}}$  sind 5,6, bzw. 3,3 im Spektrum der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III.



**Abb. 31**

UV/Vis-Absorptionsspektrum der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III.

Inset: UV/Vis-Absorptionsspektrum der Qox aus *A. ilicis* Rü61a (Daten von S. Sielker).

#### 3.13.2. Nukleotidgehalt

Zum Nachweis der im Enzym gebundenen Nukleotide wurden 1,26 mg gereinigte Qox nach 2.35. aufgeschlossen und die löslichen Bestandteile in der HPLC aufgetrennt. Die Elutionsdiagramme und UV-Spektren originaler Referenzsubstanzen wurden zur Identifizierung der in der Probe enthaltenen Substanzen herangezogen.

Referenzsubstanz	Retentionszeit [min]	Absorptionsmaximum [nm]
CMP	4,6	279,3
AMP	8,0	256,9
GMP	6,9	253,4
Cytidin	8,8	279,3

Im HPLC-Elutionsdiagramm der Probe konnten zwei Peaks mit Retentionszeiten von 4,58 min und 7,98 min detektiert werden. Die aufgetrennten Substanzen konnten anhand der Retentionszeiten und identischer Absorptionsmaxima der UV-Spektren als CMP und AMP identifiziert werden. In der Cochromatographie der Probe mit den Referenzsubstanzen CMP und AMP konnte dieses Ergebnis bestätigt werden; die Peaks überlagerten vollständig.

Da reine Qox eingesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das CMP aus dem MCD-Cofaktor freigesetzt wurde, während das AMP dem FAD-Cofaktor entstammt. Damit konnte bewiesen werden, dass der Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor in der Qox nicht als MPT sondern in der Dinukleotidform mit Cytidin-Monophosphat vorliegt.

### 3.13.3. Metallgehalt

Zur Bestimmung des Metallgehaltes der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III wurde 1 mg reines Enzym in einer ICAP-ES Analyse (2.36.) eingesetzt. Es konnten 9,15 nmol Eisen und 1,27 nmol Molybdän nachgewiesen werden, was einem Verhältnis Fe:Mo von 7:1 entspricht. Erwartet wurde bei einem Einsatz von 1 mg (3,8 nmol) Enzym jedoch eine Ausbeute von 30,4 nmol Fe und 7,6 nmol Mo.

Die Analyse des Wildtyp-Enzyms, von dem 1,2 mg (4,56 nmol) eingesetzt wurden, ergab einen Fe-Gehalt von 18,79 nmol (erwartet 36,48 nmol) und einen Mo-Gehalt von 10,12 nmol (erwartet 9,12 nmol).

In der vollständig aktiven Qox müssen Eisen und Molybdän in einem Verhältnis von 4:1 mit 8 mol Fe und 2 mol Mo pro mol Enzym vorliegen. Da bei der ICAP-ES Analyse jedoch weder bei der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III noch bei dem Wildtyp-Enzym die erwarteten Metallgehalte detektiert werden konnten, scheint diese Methode in der hier durchgeführten Weise nicht zum quantitativen Nachweis der Metalle geeignet zu sein. Wäre das Enzym vor der Analyse durch Säurebehandlung aufgeschlossen worden, hätte der Nachweis der Metalle eventuell quantitativ erfolgen können.

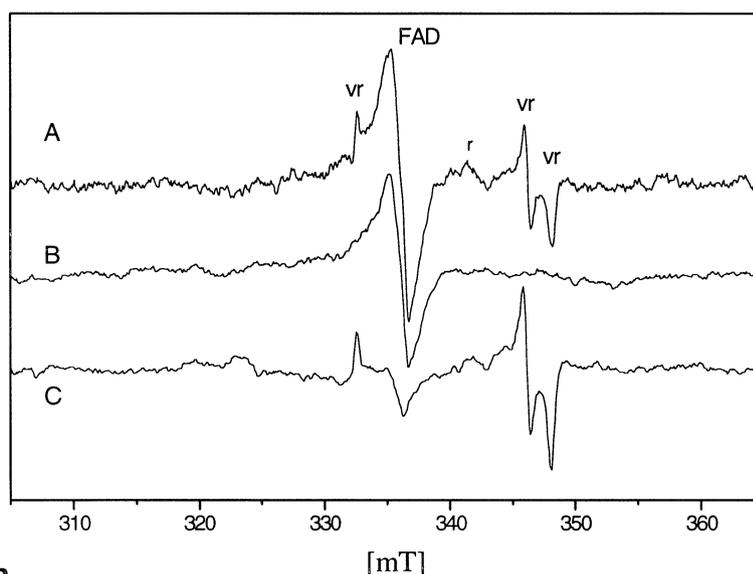
### 3.13.4. Elektronenspinresonanz-spektroskopische Untersuchungen an der Qox aus

#### *P. putida* KT2440 pKP1/III und Vergleiche mit dem Wildtyp-Enzym

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie können die paramagnetischen Zustände der redoxaktiven Zentren des Enzyms erfasst werden. Da die Qox molekularen Sauerstoff als

Elektronenakzeptor nutzt, musste, um eine Oxidation des reduzierten Enzyms zu unterbinden, unter anoxischen Bedingungen gearbeitet werden.

Reduktion der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III mit 10-fachem Substratüberschuss führte zur Ausbildung des FAD-Semichinonradikals (Abb. 32B), welches bei 65 K detektiert werden konnte. Dieses Signal weist eine Peak zu Peak Linienbreite von 1,6 mT auf, welche typisch ist für das anionische (rote) FAD-Radikal. Weitere Reduktion der aktiven Zentren durch erhöhte Substratzugabe führte zur Ausbildung von Signalen des Mo<sup>V</sup>, die ebenfalls bei 65 K aufgezeichnet werden konnten (Abb. 32C) und zum Verschwinden des FAD-Radikal-Signals, da das FAD nun zum diamagnetischen Dihydrochinon reduziert wird. Die so genannten „very rapid“ Mo<sup>V</sup>-Signale der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III und aus *A. ilicis* Rü61a, die kurzzeitig detektierbar sind, wenn ein transienter Enzym-Produkt-Komplex vorliegt, wobei das Enzym mit zwei Elektronen reduziert ist (KAPPL *et al.*, 2002) (vergl. Abb. 44), haben Werte von  $g_1=2,024$ ,  $g_2=1,945$ ,  $g_3=1,935$  (Abb. 32A, C). Neben den „very rapid“ Mo<sup>V</sup>-Signalen sind in diesem Stadium der Reduktion und unter diesen Temperaturbedingungen bei beiden Enzymen auch so genannte „rapid“ Mo<sup>V</sup>-Signale zu beobachten (Abb. 32A, C). Diese Mo<sup>V</sup>-Signale werden durch einen Enzymzustand hervorgerufen, in dem das Enzym mit zwei Elektronen reduziert ist und das Produkt im katalytischen Zentrum vorliegt, jedoch nicht Enzym-gebunden ist.

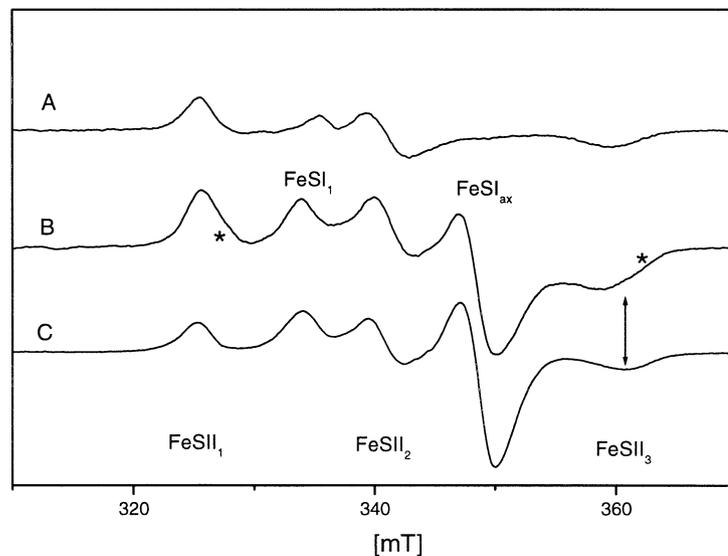


**Abb. 32**

ESR-Spektren der Substrat-reduzierten Qox aus *A. ilicis* Rü61a und aus *P. putida* KT2440 pKP1/III, aufgenommen bei 65 K.

(A) Qox aus *A. ilicis* Rü61a bei ca. 60-fachen Substratüberschuss, (B) Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III bei ca. 10-fachem Substratüberschuss, (C) Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III bei ca. 60-fachem Substratüberschuss, vr= very rapid, r= rapid.

Messungen der substratreduzierten Probe bei niedrigeren Temperaturen (15K) führte zur Ausbildung der Signale der FeS-Zentren, während die FADH<sup>•</sup>- und Mo<sup>V</sup>-Signale nicht mehr zu detektieren waren (Abb. 33A). Reduktion der Zentren durch Dithionit-Zugabe und Erhöhung der Temperatur auf 25 K führt zur Verstärkung der FeS-Signale, unter diesen Bedingungen liegt das Eisen vollständig als Fe<sup>2+</sup> vor. Abbildung 33 zeigt einen Vergleich der Spektren der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III (B) und *A. ilicis* Rü61a (C) aufgenommen unter den vorher beschriebenen Bedingungen. Das axiale FeSI<sub>ax</sub> Signal, welches typisch ist für die Qox (CANNE *et al.*, 1997, KAPPL *et al.*, 2002), konnte auch in dem heterolog synthetisierten Enzym nachgewiesen werden, allerdings erscheint die Form des Signals durch minimale Erhöhung der Rhombizität von g<sub>2</sub> und g<sub>3</sub> etwas verändert. Die Signale und ESR-Parameter der FeS-Cluster sind in beiden Enzyme jedoch nahezu identisch. Die ESR-Parameter für die FeS-Zentren im Wildtyp-Enzym wurden bestimmt zu: FeSI: g<sub>II</sub> = 2,021, g<sub>⊥</sub> = 1,937; FeSII: g<sub>1</sub> = 2,075, g<sub>2</sub> = 1,983, g<sub>3</sub> = 1,874 (CANNE *et al.*, 1997, KAPPL *et al.*, 2002). Die FeSII g<sub>3</sub>-Komponente ist in dem Enzym aus *P. putida* KT2440 pKP1/III etwas verschoben gegenüber dem *A. ilicis* Rü61a Enzym (Pfeil) und zeigt genauso wie die g<sub>1</sub>-Komponente eine Asymmetrie in der Signallinie (durch \* angedeutet).



**Abb. 33**

ESR-Spektren der [2Fe<sub>2</sub>S]-Zentren der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III und *A. ilicis* Rü61a, aufgenommen bei 15 K und 25 K.

(A) *P. putida* KT2440 pKP1/III Qox nach Reduktion mit Chinaldin (15 K), (B) Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III, (C) Qox aus *A. ilicis* Rü61a; (B und C) nach Reduktion mit Dithionit, aufgenommen bei 25 K.

### 3.14. Kinetische Parameter der Chinaldin-4-Oxidase aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

Die kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $V_{max}$  und  $k_{cat}$  der heterolog synthetisierten Qox ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und des Wildtyp-Enzyms ( $Q_{ox_{WT}}$ ) (Daten von S. Sielker) für das Substrat Chinaldin und für den künstlichen Elektronenakzeptor INT wurden im Standard-Enzymtest bestimmt (2.31.1.).

Für das Substrat Chinaldin ergaben sich Michaelis-Menten-Konstanten  $K_m$  Chinaldin von  $3,5 \times 10^{-5}$  M ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und  $3,4 \times 10^{-5}$  M ( $Q_{ox_{WT}}$ ). Die Wechselzahlen  $k_{cat}$  Chinaldin wurden berechnet zu  $29,4 \text{ s}^{-1}$  ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und  $16,7 \text{ s}^{-1}$  ( $Q_{ox_{WT}}$ ). Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_{max}$  Chinaldin beliefen sich auf  $17,46 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$  ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und  $17,76 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$  ( $Q_{ox_{WT}}$ ). Für den künstlichen Elektronenakzeptor INT betragen die Parameter:  $K_m$  INT:  $1,7 \times 10^{-5}$  M ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und  $1,9 \times 10^{-5}$  M ( $Q_{ox_{WT}}$ ),  $k_{cat}$  INT:  $24,88 \text{ s}^{-1}$  ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und  $15,6 \text{ s}^{-1}$  ( $Q_{ox_{WT}}$ ), und  $V_{max}$  INT:  $14,78 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$  ( $Q_{ox_{pKP1}}$ ) und  $16,64 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$  ( $Q_{ox_{WT}}$ ).

Die vergleichende Betrachtung der kinetischen Parameter des heterolog synthetisierten Enzyms und des Wildtyp-Enzyms lässt darauf schließen, dass alle an der Redoxreaktion beteiligten Zentren in dem Enzym aus *P. putida* KT2440 pKP1/III in funktioneller Weise vorliegen und dass die Substratbindung hier in identischer Weise geschieht, wie im Wildtyp-Enzym.

### 3.15. Gerichtete Mutagenese an der Chinaldin-4-Oxidase

Anhand von Röntgenstrukturanalysen verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen konnte gezeigt werden, dass sich ein in dieser Enzym-Familie strikt konservierter Glutamatrest in unmittelbarer Nähe zu dem Molybdän im aktiven Zentrum befindet (REBELO *et al.*, 2000, ROMÃO *et al.*, 1995, TRUGLIO *et al.*, 2002). Um eine vermutliche katalytische Relevanz des korrespondierenden Glutamatrestes E736 in QoxL während der Hydroxylierungsreaktion der Chinaldin-4-Oxidase nachzuweisen, wurde dieser durch gerichtete Mutagenese gegen einen Glutaminrest ausgetauscht.

Da das Plasmid pKP1 mit fast 11 kb jedoch zu groß ist, um es vollständig mittels PCR zu amplifizieren (2.23.5.), wurde ein 2,55 kb großes Fragment, welches die Sequenz in dem Bereich des E736 Codons umfasst, in den kleineren Vektor pUC18 (2.7.1.) subkloniert. Dieses Konstrukt (pUC2,5) wurde für die Mutagenese eingesetzt. Das Plasmid pKP1E736Q wurde dann aus dem 2,55 kb Fragment und dem 8,4 kb Rest von pKP1 rekonstruiert und in *P. putida* KT2440 etabliert.

#### 3.15.1. Konstruktion von pUC2,5

Das Plasmid pKP1 wurde aus *P. putida* KT2440 pKP1/III isoliert (2.10.1.) und mittels einer Doppelrestriktion mit den Enzymen *Sma*I und *Eco*RI (2.14.) in zwei Produkte von 2551 bp und

8391 bp gespalten. Beide Fragmente wurden aus einem Agarosegel aufgereinigt (2.19.1.), das Größere wurde zur Aufbewahrung bei -20 °C gelagert. Das 2,55 kb Fragment wurde mit dem ebenfalls *SmaI/EcoRI* restringierten Vektor pUC18 ligiert (2.17.) und in *E. coli* DH5 $\alpha$  etabliert. Zur Verifizierung der Konstrukte wurde eine *SmaI/EcoRI* Restriktion an den Plasmiden ausgesuchter Transformanten durchgeführt, die richtigen Konstrukte wurden in zwei Fragmente von 2,55 kb und 2,68 kb gespalten.

Das neue Plasmid pUC2,5 wurde als Matrize in der PCR (2.23.5.) eingesetzt.

### 3.15.2. Mutagenese

Der Basenaustausch (E: GAG gegen Q: CAG) wurde durch die *primer* Gln-for und Gln-rev (2.23.1.) während einer PCR-Amplifikation des Plasmids pUC2,5 herbeigeführt.

Nach der Amplifikation und Aufreinigung der DNA (2.24.) wurde, nachdem die parentale DNA durch das Restriktionsenzym *DpnI* verdaut wurde, die neu synthetisierte DNA zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen eingesetzt.

Die Mutation wurde durch Sequenzierung mit dem *primer* „mutseq“ (2.23.1.) verifiziert.

### 3.15.3. Rekonstruktion von pKP1

DNA des Plasmids pUC2,5(E736Q) aus einem nach 3.15.2. erhaltenen Transformanten wurde mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *EcoRI* restringiert (2.14.). Das 2551 bp große Fragment wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt (2.19.1.) und mit dem 8,4 kb pKP1(*SmaI/EcoRI*)-Fragment (3.15.1.) zur Rekonstruktion von pKP1E736Q ligiert. *P. putida* KT2440 wurde wiederum als Empfängerstamm des Plasmids eingesetzt. Zur Überprüfung der Plasmidintegrität wurde Plasmid-DNA von pKP1 und pKP1E736Q parallel mit *PstI* restringiert. Beide Plasmide zeigten die Spaltprodukte von 7000 bp, 1450 bp, 1100 bp, 950 bp und 400 bp.

Die DNA-Bereiche um die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SmaI* wurden zur Kontrolle der Plasmidintegrität sequenziert.

### 3.15.4. Versuche zur cometabolischen Umsetzung von Chinaldin durch

#### *P. putida* KT2440 pKP1E736Q

Drei *P. putida* KT2440 Transformanten, die das mutierte Plasmid pKP1E736Q trugen, wurden nach 2.8.4. in Benzoat-Minimalmedium gezüchtet. Chinaldin, das der Kultur bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1 in einer Konzentration von 0,8 mM zugesetzt wurde, wurde von den pKP1E736Q-Mutanten nicht umgesetzt. Bei *P. putida* KT2440 pKP1/III, der parallel unter denselben Bedingungen gezüchtet wurde, nahm die Chinaldinkonzentration kontinuierlich ab, bis das Substrat nach etwa sieben Stunden nahezu vollständig zu 1H-4-Oxochinaldin umgesetzt war.

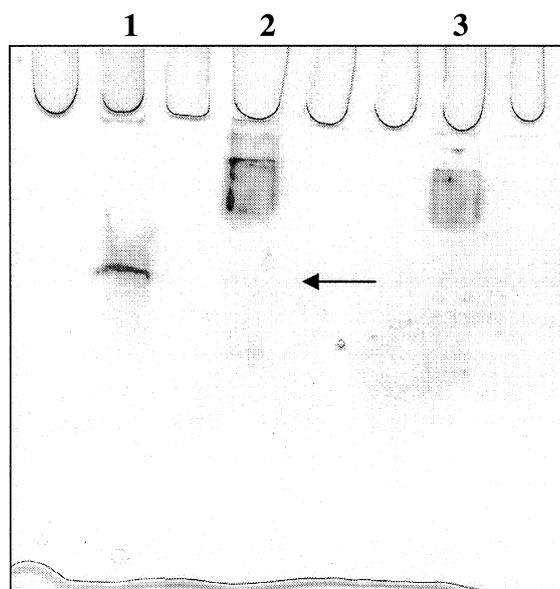
Die Stämme, die das Plasmid pKP1E736Q trugen, wurden durch das Chinaldin nicht im Wachstum beeinträchtigt.

### 3.15.5. Versuche zum Nachweis von Chinaldin-4-Oxidase Aktivität in

#### *P. putida* KT2440 pKP1E736QII

Klon *P. putida* KT2440 pKP1E736QII wurde wie unter 2.8.4. beschrieben in Benzoat-Minimalmedium gezüchtet. Im Rohextrakt der durch Ultraschall aufgeschlossenen Zellen konnte im Enzymstandardtest (2.31.1.) keine Qox-Aktivität nachgewiesen werden.

Nach Auftrennung der Proteine des Rohextraktes in einer nativen PAGE (2.33.2.) und Anfärbung auf Qox-Aktivität konnte jedoch nach 12stündiger Inkubation neben einer Rotfärbung, die durch Chinaldin-unabhängige INT-Reduktion entsteht, eine sehr schwache Bande detektiert werden (Pfeil), die dieselbe elektrophoretische Mobilität zeigte wie die Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III (Abb. 34) und die nur nach Zugabe des Substrates Chinaldin auftrat. Damit konnte gezeigt werden, dass die von *P. putida* KT2440 pKP1E736QII synthetisierte Qox noch eine sehr geringe Restaktivität aufweist.



**Abb. 34**

Native PAGE mit Rohextrakten von *P. putida* KT2440 pKP1/III und *P. putida* KT2440 pKP1E736QII, angefärbt auf Qox-Aktivität.

Bahn 1: Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pKP1/III (1 µg Protein) nach 3 min Inkubation im Enzymtestansatz. Bahn 2: Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pKP1E736QII (1 µg Protein) nach 12 h Inkubation im Enzymtestansatz (der Pfeil deutet auf die sehr schwache Qox-Bande). Bahn 3: Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pKP1E736QII (1 µg Protein) nach 12 h Inkubation im Enzymtestansatz ohne Chinaldin.

### 3.16. Insertionsinaktivierung der potentiellen Gene ORF2, ORF4, ORF5 und ORF7

Die Sequenzanalyse der ORFs 2 und 4 (3.10.2, 3.10.3.) legte nahe, dass diese potentiellen Gene für die 1*H*-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase bzw. die *N*-Acetylanthranilat-Amidase kodieren, die den zweiten bzw. vierten Schritt in der Chinaldin-Degradation durch *A. ilicis* Rü61a katalysieren. Der Nachweis, dass alle Enzyme, die einem fremden Wirtstamm die Fähigkeit zur Umsetzung von Chinaldin bis zur Anthranilat verleihen, auf dem 10,8 kb Fragment kodiert sind (3.5.), bekräftigte diese Annahme.

Die Nähe des Genes für den potentiellen Transporter (ORF5) (3.10.4) zu den Genen für potentielle Abbauenzyme lässt die Möglichkeit zu, dass auch dieses Protein in die Chinaldin-Verwertung involviert sein könnte.

ORF7 liegt zwar außerhalb des 10,8 kb Fragmentes, kodiert jedoch eventuell auch für ein hydrolytisches Enzym, das verwandt ist mit Esterasen und  $\beta$ -Lactam spaltenden Enzymen (3.10.6). Es sollte auch hier untersucht werden, ob eine eventuelle Beteiligung an der Chinaldin-Umsetzung gegeben ist.

Auf dem Weg der Insertionsinaktivierung entsprechender Gene auf dem 23 kb Insert des Cosmids pVK55B/5 (3.8.) sollte die funktionelle Bedeutung der durch diese Gene kodierten Proteine erschlossen werden. Da es sich als nicht möglich erwies, eine Kanamycin-Resistenzkassette (*nptII*) direkt in das Cosmid pVK55B/5 zu klonieren, wurde der „Umweg“ über homologe Rekombination gewählt. Plasmide, die entsprechende Gene mit *nptII*-Insertion trugen, sollten durch Konjugation auf *P. putida* KT2440 pVK55B/5 übertragen werden, um eine Disruption der intakten Gene auf pVK55B/5 durch homologe Rekombination zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden die betreffenden Sequenzabschnitte in den Vektor pUC18 subkloniert. Aufgrund der geringen Größe des Vektors waren weitere Modifikationen in diesem System ohne Probleme durchzuführen. Die ORFs wurden jeweils durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette unterbrochen. Die um die *nptII*-Kassette ergänzten Sequenzabschnitte wurden in mobilisierbare Vektoren umkloniert und mittels Konjugation auf *P. putida* KT2440 pVK55B/5 übertragen. Durch homologe Rekombination wurden die funktionellen Gene auf pVK55B/5 durch solche mit *nptII*-Insertion ausgetauscht.

#### 3.16.1. Subklonierung der ORFs 2, 4, 5 und 7 in den Vektor pUC18

Sequenzabschnitte der betreffenden ORFs wurden nach Restriktion der Plasmid-DNA von pVK55/11 bzw. pVK55/12 durch Extraktion aus Agarosegelen gewonnen.

Restriktion des Plasmids pUC55/11 (3.7.) mit *Bam*HI erzeugte ein 2617 bp langes Fragment [Nukleotide 14685-17301 Anhang 1], welches ORF2 umfasst. Dieser Abschnitt wurde in den ebenfalls *Bam*HI restringierten, dephosphorylierten Vektor pUC18 inseriert.

Restriktion von pUC55/11 mit *EcoRI* führte unter anderem zu einem Sequenzabschnitt von 577 bp [Nukleotide 13627-14203 Anhang 1], der das 3'-Ende von ORF4 enthielt. Dieser wurde mit dem *EcoRI* geöffneten, dephosphorylierten Vektor pUC18 ligiert.

Zur Subklonierung des ORF5 enthaltenen DNA-Fragmentes wurde das Plasmid pUC55/11 zuerst mit *HindIII* restringiert und anschließend mit *SalI*. Dadurch konnte ein Fragment von 1928 bp gewonnen werden [Nukleotide 12204-14131 Anhang 1], das mit dem ebenfalls *HindIII/SalI* restringierten Plasmid pUC18 ligiert wurde.

Um ORF7 in das Plasmid pUC18 zu inserieren, wurde ein 2635 bp großes Fragment [Nukleotide 8515-11149 Anhang 1] mittels *EcoRI* Restriktion aus dem Plasmid pUC55/12 (3.7.) herausgeschnitten, welches neben anderen kodierenden Bereichen auch den 1119 bp langen ORF7 umfasst. Dieser 2,6 kb lange Sequenzabschnitt wurde in den *EcoRI* geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pUC18 inseriert.

Die neuen Konstrukte pUCorf2, pUCorf4, pUCorf5 und pUCorf7 wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  etabliert und vermehrt.

### 3.16.2. Insertion von Kanamycin-Resistenzkassetten

Zur Disruption der hypothetischen Gene wurden Kanamycin-Resistenzkassetten (*nptII*) in singuläre Restriktionsschnittstellen der subklonierten ORFs inseriert.

Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde mit den *primer*-Paaren *nptAge*-for, -rev bzw. *nptEco*-for, -rev und DNA des Plasmids pBG2b (2.7.6.) als Matrize mittels PCR vervielfältigt (2.23.3.). Nach Aufreinigung der PCR-Amplifikate (2.24.) standen diese für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung.

#### Konstruktion von pUCorf2*nptII*

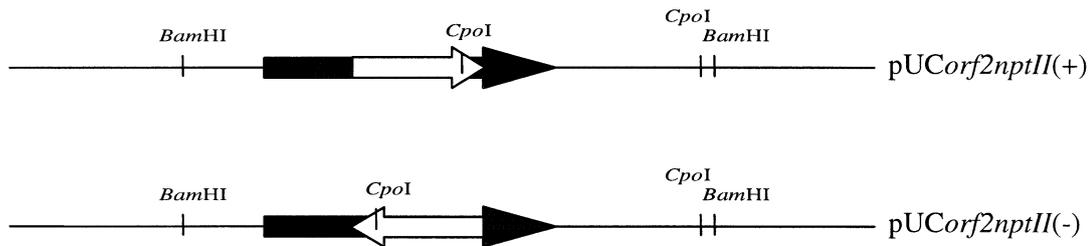
Zur Insertion der *nptII*-Resistenzkassette in den ORF2 wurde Plasmid-DNA von pUCorf2 mit dem Restriktionsenzym *AgeI* linearisiert. Die mit den Primern *nptAge*-for und *nptAge*-rev amplifizierte Kanamycin-Resistenzkassette wurde ebenfalls mit *AgeI* restringiert. Durch Ligation der komplementären, überhängenden Enden (2.17.) wurde das Plasmid pUCorf2*nptII* geschaffen, welches in *E. coli* DH5 $\alpha$  etabliert wurde. Transformanten, die die *nptII* Kassette inseriert hatten, wurden durch Resistenz auf Ampicillin und Kanamycin selektiert.

Während die Orientierung, in der ORF2 in den Vektor pUC18 inseriert war, nicht von Bedeutung war, sollten jedoch beide Varianten des Plasmides pUCorf2*nptII* (d. h. die Leserichtung des *nptII*-Gens in gleicher bzw. in entgegengesetzter Leserichtung zu ORF2) selektiert werden.

Zur Identifizierung der zwei verschiedenen Plasmide wurde an ausgesuchten Transformanten eine Restriktion mit *CpoI* vorgenommen (Abb. 35(A)). Es befindet sich jeweils eine singuläre

*CpoI* Schnittstelle in der *nptII*-Resistenzkassette und eine in dem 2617 bp langem, klonierten ORF2 Fragment (3.16.1.). Der Vektor pUC18 wird von *CpoI* nicht geschnitten.

Plasmide, bei denen die Resistenzkassette in derselben Orientierung wie ORF2 vorlag (Markierung: (+)), zeigten *CpoI*-Restriktionsfragmente in der Größe von 4,85 kb und 1,42 kb. Plasmide, bei denen die Resistenzkassette revers zum ORF2 orientiert war (Markierung: (-)), wurden in Fragment von 4,23 kb und 2,04 kb Länge gespalten. Es wurde je ein *E. coli* DH5 $\alpha$  Klon mit einer der Plasmidvarianten (pUCorf2*nptII*(+) bzw. pUCorf2*nptII*(-)) für weitere Versuche eingesetzt.



**Abb. 35(A)**

Darstellung des Plasmids pUCorf2 nach Insertion der *nptII*-Kassette.

schwarze Pfeile: ORF2, weiße Pfeile: *nptII*-Resistenzkassette. Die im Text beschriebenen Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung und zur Festlegung der Kassettenorientierung genutzt wurden, sind bezeichnet.

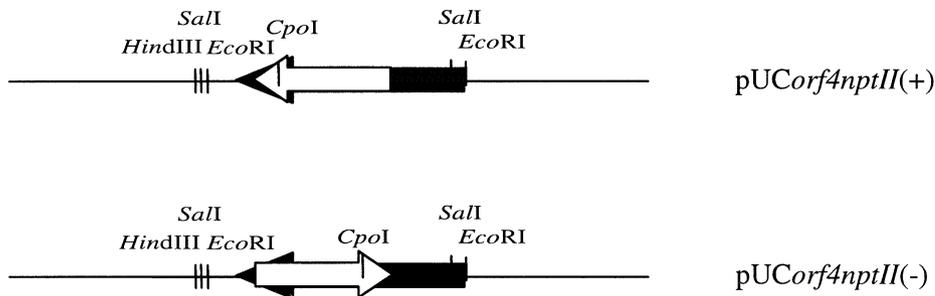
#### Konstruktion von pUCorf4*nptII*

Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde in eine singuläre *Kpn*2I Schnittstelle in das 3'-terminale Ende von ORF4 inseriert. Dazu wurde das Plasmid pUCorf4 mit *Kpn*2I restringiert; die entstandenen überhängenden Enden wurden durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase (2.16.) geglättet. Die *nptII*-Kassette, die mit den *primern nptEco-for* und *nptEco-rev* amplifiziert wurde, bedurfte nach einem Reinigungsschritt (2.24.) keiner weiteren Modifikationen. Da die PCR-Reaktion mit einer *Pfu*-Polymerase durchgeführt wurde (2.23.3.), hatte das PCR-Produkte glatte Enden, so dass die *nptII*-Resistenzkassette direkt mit dem nun ebenfalls glatte Enden enthaltenden, linearisierten Plasmid pUCorf4 ligiert werden konnte (2.17.). *E. coli* DH5 $\alpha$  Transformanten mit *nptII*-Insertion in pUCorf4 konnten auf Ampicillin und Kanamycin selektiert werden.

Durch Restriktion des Plasmids pUCorf4 mit *Sal*I, die zu zwei Spaltprodukten von 0,5 kb und 2,79 kb führte, wurde die Orientierung von ORF4 in dem Plasmid festgelegt.

Auch von pUCorf4*nptII* sollten zwei Plasmidvarianten (Leserichtung des *nptII*-Gens mit bzw. entgegen der ORF4 Leserichtung) selektiert werden. Zur Festlegung der Orientierung der *nptII*-Kassette im Bezug zu ORF4 wurden einige Transformanten in einer Doppelrestriktion mit den

Enzymen *CpoI* (schneidet einmal im *nptII*-Gen) und *HindIII* (schneidet in der MCS von pUC18) behandelt (Abb. 35(B)). Bei Plasmiden, bei denen die *nptII*-Kassette in derselben Orientierung wie ORF4 vorlag, konnten zwei Restriktionsfragmente von 0,43 kb und 3,79 kb detektiert werden; lag die *nptII*-Kassette in reverser Orientierung zu ORF4 vor, waren die Restriktionsfragmente 1,05 kb und 3,17 kb groß. Die Plasmidvarianten wurden analog zu denen mit ORF2 mit pUCorf4*nptII*(+) und pUCorf4*nptII*(-) bezeichnet.



**Abb. 35(B)**

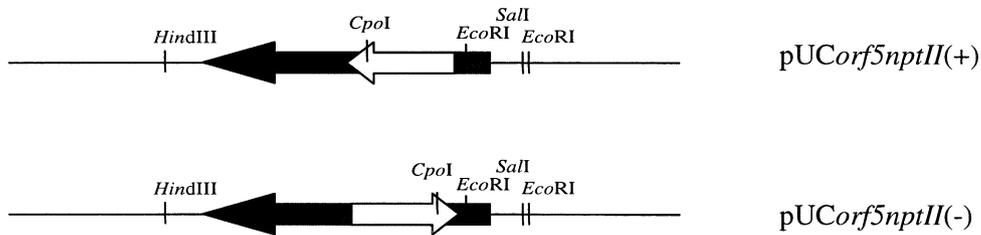
Darstellung des Plasmids pUCorf4 nach Insertion der *nptII*-Kassette.

schwarze Pfeile: ORF4, weiße Pfeile: *nptII*-Resistenzkassette. Die im Text beschriebenen Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung und zur Festlegung der Kassettenorientierung genutzt wurden, sind bezeichnet.

#### Konstruktion von pUCorf5*nptII*

Zur Insertion in ORF5 wurde die *nptII*-Kassette ebenfalls mit den primären *nptEco*-for und *nptEco*-rev amplifiziert (2.23.3.). Das Plasmid pUCorf5 wurde durch Restriktion mit *DraIII* linearisiert und zum Glätten der überhängenden Enden einer T4-DNA-Polymerase Reaktion unterzogen. So konnte wie bei der Konstruktion von pUCorf4*nptII* eine Ligation glatter Enden durchgeführt werden (2.17.), die zur Entstehung von pUCorf5*nptII* führte.

Ampicillin- und Kanamycinresistente *E. coli* DH5 $\alpha$  Transformanten wurden zur Festlegung der Orientierung der *nptII*-Kassette im Bezug zu ORF5 einer Doppelrestriktion mit *CpoI* (schneidet einmal in *nptII*) und *EcoRI* (schneidet einmal im 1928 bp langen *HindIII/SalI* Fragment (3.16.1.) und in der pUC18 MCS) unterzogen (Abb. 35(C)). Lag die Kanamycinresistenz-Kassette in gleicher Orientierung wie ORF5 vor (+), waren Restriktionsfragmente von 4,2 kb, 0,89 kb und 0,5 kb zu identifizieren. Lag die Kassette in umgekehrter Leserichtung zu ORF5 (-), waren die Restriktionsfragmente 4,82 kb, 0,27 kb und 0,5 kb groß. Die Plasmidvarianten wurden mit pUCorf5*nptII*(+) und pUCorf5*nptII*(-) bezeichnet.

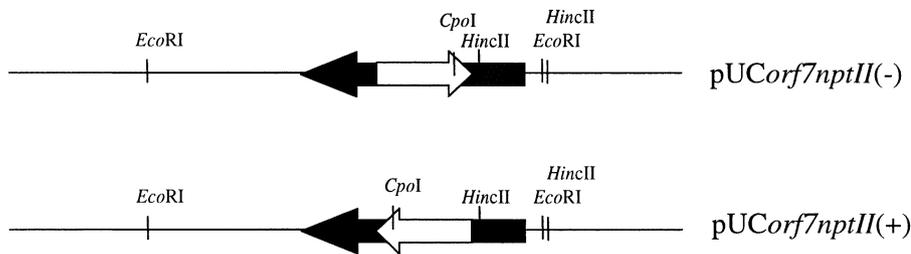
**Abb. 35(C)**

Darstellung des Plasmids pUCorf5 nach Insertion der *nptII*-Kassette.

schwarze Pfeile: ORF5, weiße Pfeile: *nptII*-Resistenzkassette. Die im Text beschriebenen Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung und zur Festlegung der Kassettenorientierung genutzt wurden, sind bezeichnet.

### Konstruktion von pUCorf7nptII

Nachdem Plasmid-DNA von pUCorf7 durch Restriktion mit *BstEII* linearisiert worden war, wurden die überhängenden Enden durch eine T4-DNA-Polymerase Reaktion geglättet (2.16.), um so die Voraussetzungen für eine Ligation glatter Enden (2.17.) mit einer mit den *primern nptEco-for* und *nptEco-rev* amplifizierten (2.23.3.) Kanamycin-Resistenzkassette zu schaffen. Nach einer Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz wurden Transformanten mit Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz auf Orientierung der inserierten *nptII*-Kassette untersucht. Die Leserichtung des Resistenzgens konnte durch Doppelrestriktion mit *CpoI* (schneidet einmal in *nptII*) und *HincII* (schneidet einmal im 2635 bp langen *EcoRI* Fragment (3.16.1.) und in der MCS von pUC18) herausgefunden werden (Abb. 35(D)). Plasmide, bei denen die Leserichtung des *nptII*-Gens parallel zu der des ORF7 war (+), zeigten Restriktionsfragmente von 4,89 kb, 0,87 kb und 0,53 kb; dort, wo die Leserichtung von ORF7 und dem *nptII*-Gen entgegengesetzt war (-), hatten die Restriktionsfragmente eine Größe von 5,51 kb, 0,25 kb und 0,53 kb. Analog zu den oben beschriebenen Plasmiden wurden diese mit pUCorf7nptII(+) und pUCorf7nptII(-) bezeichnet.

**Abb. 35 (D)**

Darstellung des Plasmids pUCorf7 nach Insertion der *nptII*-Kassette.

schwarze Pfeile: ORF7, weiße Pfeile: *nptII*-Resistenzkassette. Die im Text beschriebenen Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung und zur Festlegung der Kassettenorientierung genutzt wurden, sind bezeichnet.

### 3.16.3. Konstruktion des Plasmids pSUPaacC1

Wie unter 2.7.5. beschrieben, sollte der Tetracyclinresistenzmarker des mobilisierbaren Vektors pSUP202 für Klonierungen mit *orf4nptII* bzw. *orf7nptII* zerstört werden. Dazu wurde das Plasmid pSUP202 durch Restriktion mit *HindIII* linearisiert. Die überhängenden Enden wurden durch eine T4-DNA-Polymerase-Reaktion (2.16.) geglättet, so dass eine mittels PCR erzeugte Gentamycin-Resistenzkassette (*aacC1*) (2.23.3.) mit dem Vektor ligiert werden konnte. Elektrokompente *E. coli* S17-1 Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Transformanten mit dem veränderten Plasmid zeigten Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol und Gentamycin und Sensitivität gegenüber Tetracyclin.

### 3.16.4. Umklonierung der die *nptII*-Kassette tragenden Sequenzabschnitte in mobilisierbare Vektoren

Die durch Insertion der *nptII*-Kassette veränderten Fragmente wurden mit Hilfe dieselben Restriktionsschnittstellen wieder aus den Plasmiden (3.16.2.) herausgeschnitten, die für die Insertion in pUC18 verwendet worden waren (3.16.1.), d.h. *orf2nptII(+)/orf2nptII(-)* wurden durch *BamHI* Restriktion erhalten, *orf4nptII(+)/orf4nptII(-)* und *orf7nptII(+)/orf7nptII(-)* durch *EcoRI* Restriktion und *orf5nptII(+)/orf5nptII(-)* durch *HindIII/SalI* Doppelrestriktion. Nach Extraktion aus Agarosegelen standen die Fragmente für die Umklonierung zur Verfügung.

Die Fragmente *orf2nptII(+)* und *orf2nptII(-)* wurde mit dem *BamHI* restringierten, dephosphorylierten Plasmid pSUP202 (2.7.4.) ligiert; die Fragmente *orf5nptII(+)* und *orf5nptII(-)* mit pSUP202 nach einer *HindIII/SalI* Doppelrestriktion des Plasmids. In beiden Fällen wurde dadurch das Tetracyclinresistenzgen auf dem Plasmid unterbrochen.

Die Fragmente *orf4nptII(+)* und *orf4nptII(-)*, bzw. *orf7nptII(+)* und *orf7nptII(-)* wurden in die *EcoRI* Schnittstelle des Plasmides pSUPaacC1 (3.16.3.) inseriert. Dadurch verlor das Plasmid den funktionellen Chloramphenicol-Resistenzmarker.

Die neu entstandenen Plasmide erhielten folgende Bezeichnungen: pSUPorf2nptII(+), pSUPorf2nptII(-), pSUPorf5nptII(+), pSUPorf5nptII(-), pSUPaacC1orf4nptII(+), pSUPaacC1orf4nptII(-), pSUPaacC1orf7nptII(+), pSUPaacC1orf7nptII(-).

*E. coli* S17-1 wurde als Wirtstamm für alle neuen Konstrukte eingesetzt. Transformanten, die Derivate von pSUP202 enthielten, wurden auf Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin selektiert, solche, die Derivate von pSUPaacC1 enthielten, wurden auf Ampicillin, Gentamycin und Kanamycin selektiert.

### 3.16.5. Konjugation

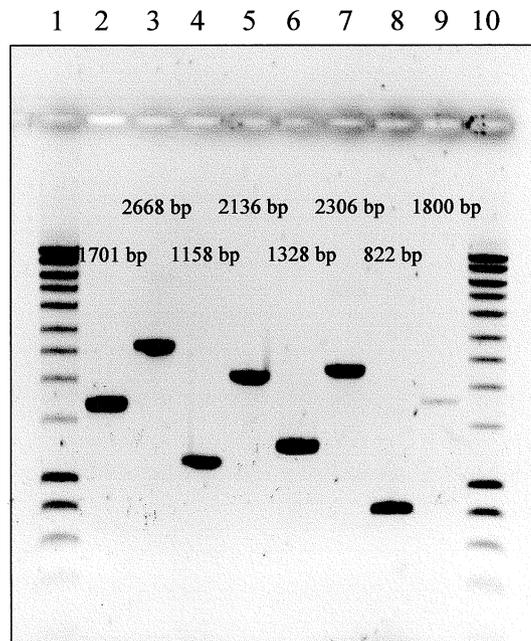
Der Rezipient *P. putida* KT2440 pVK55B/5 wurde jeweils mit einem *E. coli* S17-1 Donorstamm, der eines der unter 3.16.4. beschriebenen Plasmide enthielt, in einem Filter-Mating (2.27.1.) zur Konjugation gebracht. Transkonjuganten wurden auf LB-Medium mit Tetracyclin und Kanamycin selektiert. In jedem der acht Konjugationsexperimente wurden etwa 300 Transkonjuganten gepickt, die darauf kontrolliert wurden, ob bei der homologen Rekombination ein doppel-*crossover* oder ein einfach-*crossover* stattgefunden hatte.

*P. putida* KT2440 pVK55B/5 Transkonjuganten, bei denen ORF2 bzw. ORF4 ausgeschaltet werden sollte, wurden auf Resistenz gegen Chloramphenicol getestet. Diese konnte nur dann vorliegen, wenn durch ein einfach-*crossover* der komplette Vektor in das Cosmid pVK55B/5 inseriert worden ist. Unter denselben Voraussetzungen wurden *P. putida* KT2440 pVK55B/5 Transkonjuganten, bei denen ORF4 bzw. ORF7 ausgeschaltet werden sollte, auf Resistenz gegen Gentamycin getestet. Die Häufigkeit eines Rekombinationsereignisses, bei dem ein doppel-*crossover* stattgefunden hat, lag bei 1 bis 5 %.

Als weitere Kontrolle, ob eine homologe Rekombination mit einem doppel-*crossover* stattgefunden hatte, wurde jeweils ein DNA-Fragment, welches die in den ORF inserierten Resistenzkassette und flankierende Bereiche zu beiden Seiten der Kassette umfasste, mittels PCR amplifiziert (2.23.4.). DNA der Cosmide pVK55B/5orf2nptII(+), bzw. (-), pVK55B/5orf4nptII(+), bzw. (-), pVK55B/5orf5nptII(+), bzw. (-) und pVK55B/5orf7nptII(+), bzw. (-) wurde in den einzelnen Reaktionen als Matrize eingesetzt. In den Kontrollen, in denen DNA des Cosmids pVK55B/5 als Matrize diente, wurden auf diesem Weg Abschnitte der unveränderten ORFs amplifiziert.

Abbildung 36 zeigt, dass die PCR mit der DNA der veränderten Cosmide als Matrize (im Bild beispielhaft für jeweils eine Cosmidvariante dargestellt) jeweils ein einziges Amplifikat hervorbringt, welches genau um die Länge der *nptII*-Kassette größer ist, als das Amplifikat, das durch die PCR mit pVK55B/5 als Vorlage produziert wurde.

Hätte eine illegitime Rekombination oder eine Rekombination mit einem einfach-*crossover* stattgefunden, würde man neben dem Amplifikat richtiger Größe weitere PCR-Produkte erwarten.



**Abb. 36**

Kontrolle der Insertion einer *nptII*-Kassette in die ORFs 2, 4, 5 und 7 auf dem 23 kb langen Insert von pVK55B/5 mittels PCR.

Im Agarosegel wurden die Produkte verschiedener PCR-Reaktionen aufgetrennt. Die genauen Größen der Produkte sind angegeben.

Bahn 1 und 10: DNA Größenstandard Smart-Ladder

Bahn 2 und 3: Kontrolle der *nptII*-Insertion in ORF2, PCR-*primer* orf2-for, -rev; Template DNA: 2: pVK55B/5, 3: pVK55B/5orf2*nptII*(+).

Bahn 4 und 5: Kontrolle der *nptII*-Insertion in ORF4, PCR-*primer* orf4-for, -rev, Template DNA: 4: pVK55B/5, 5: pVK55B/5orf4*nptII*(+).

Bahn 6 und 7: Kontrolle der *nptII*-Insertion in ORF5, PCR-*primer* orf5-for, -rev, Template DNA: 6: pVK55B/5, 7: pVK55B/5orf5*nptII*(+).

Bahn 8 und 9: Kontrolle der *nptII*-Insertion in ORF7, PCR-*primer* orf7-for, -rev, Template DNA: 8: pVK55B/5, 9: pVK55B/5orf7*nptII*(+).

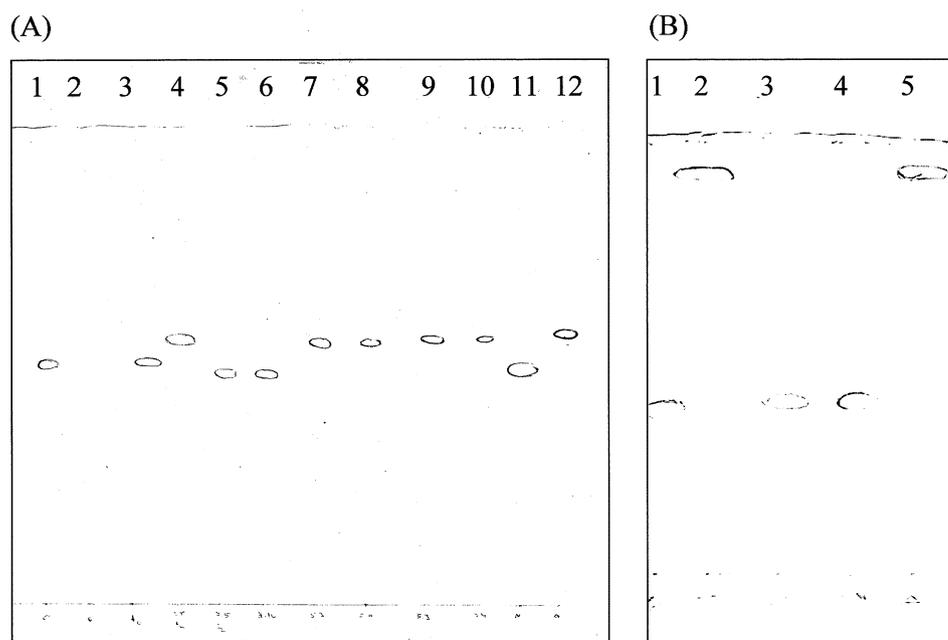
### **3.17. Auswirkungen der *nptII*-Insertion in die ORFs 2, 4, 5 und 7 des 23 kb Inserts von pVK55B/5 auf die Chinaldin-Umsetzung**

#### **3.17.1. Nachweis der Fähigkeiten zur cometabolischen Chinaldin-Umsetzung**

Alle *P. putida* KT2440 pVK55B/5 Klone mit einer *nptII*-Insertion in einem der ORFs wurden zur Untersuchung ihrer degradativen Fähigkeiten in Succinat-Chinaldin-Minimalmedium gezüchtet (2.8.2.). Die Synthese von Enzymen des Chinaldin-Abbaus wurde durch Zugabe des

Substrates induziert. Abbauprodukte, die im Medium akkumulierten, konnten im Kulturüberstand mittels Dünnschichtchromatographie (2.8.2.1.) (Abb. 37) bzw. UV/Vis-Spektroskopie (Abb. 38) identifiziert werden.

Während die Klone *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(+) bzw. (-) und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf7nptII(+) bzw. (-) ebenso wie *P. putida* KT2440 pVK55B/5 Chinaldin bis zum Anthranilat umsetzen konnten, wurde im Kulturüberstand der Klone *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+) bzw. (-) 1H-4-Oxochinaldin nachgewiesen. Im Medium der Kulturen von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+) bzw. (-) akkumulierte *N*-Acetylanthranilat. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass ORF2 tatsächlich für die 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase kodiert und es sich bei dem Genprodukt von ORF4 um die *N*-Acetylanthranilat-Amidase handelt. Den potentiellen Genprodukten von ORF5 und ORF7 konnte aufgrund dieser Versuche keine Funktionen zugesprochen werden.



**Abb. 37**

Dünnschichtchromatogramme der Kulturüberstände von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und Mutanten.

(A)

Bahn 1, 2, 11, 12: Referenzsubstanzen: 1: Chinaldin ( $R_f$ : 0,51), 2: 4-Hydroxychinaldin ( $R_f$ : 0,0), 11: *N*-Acetylanthranilsäure ( $R_f$ : 0,49), 12: Anthranilsäure ( $R_f$ : 0,56)

Bahn 3: *P. putida* KT2440 pVK55B/5 direkt nach Induktion mit Chinaldin.

Bahn 4: *P. putida* KT2440 pVK55B/5 (12 h Wachstum)

Bahn 5 + 6: *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+) bzw. (-) (12 h Wachstum)

Bahn 7 + 8: *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(+) bzw. (-) (12 h Wachstum)

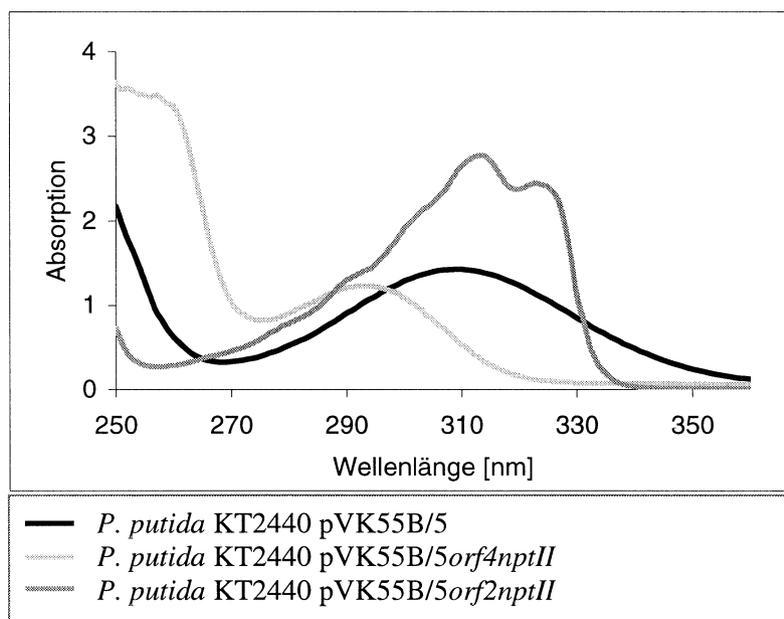
Bahn 9 + 10: *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf7nptII(+) bzw. (-) (12 h Wachstum)

Laufmittel: Toluol/1,4-Dioxan/Eisessig 60/16/1,6 (v/v/v)

(B)

Bahn 1 + 5: Referenzsubstanzen: 1: 4-Hydroxychinaldin ( $R_f$ : 0,31) , 5: Anthranilat ( $R_f$ : 0,9)Bahn 2: *P. putida* KT2440 pVK55B/5 (12 h)Bahn 3 + 4: *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII (+) bzw. (-) (12 h)

Laufmittel: Chloroform/Aceton 1/1 (v/v)

**Abb. 38**

UV/Vis-Spektren der Kulturüberstände von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 Klonen vor und nach Insertion der *nptII*-Kassette in ORF2 bzw. ORF4.

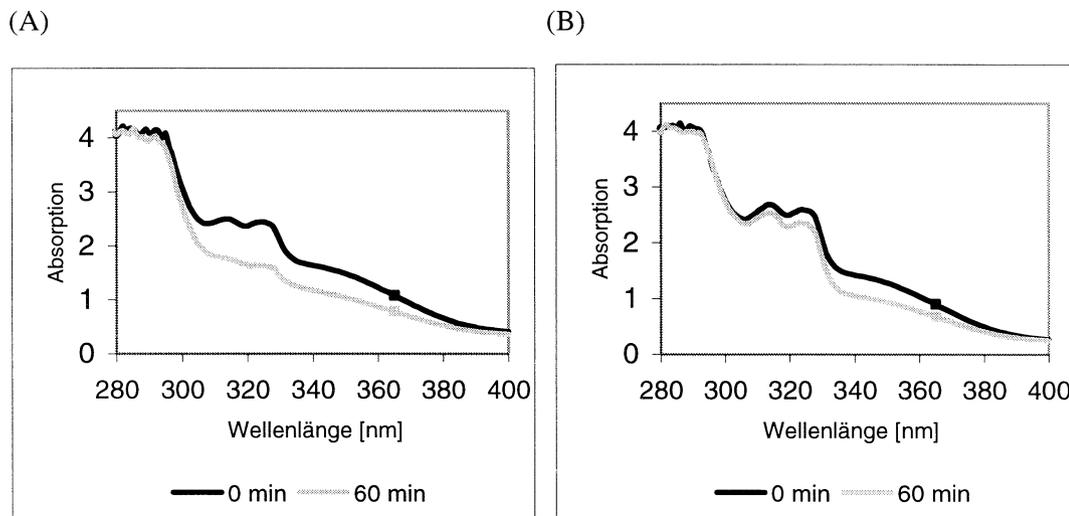
### 3.17.2. Nachweis der Aktivität der 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase

Zum Nachweis der Monooxygenase-Aktivität in *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+) wurden die Zellen nach 2.8.2 gezüchtet und zur Gewinnung des Rohextrakts durch Ultraschall aufgeschlossen (2.29.1.). Die Aktivität der 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase wurde photometrisch wie unter 2.31.2. beschrieben bestimmt. Da das Cosubstrat NADPH im Rohextrakt einer unspezifischen Oxidation unterliegt (Abb. 39B), wurde die vor der Substratzugabe gemessene Extinktionsänderung von der, die nach Zugabe des Substrates 4-Hydroxychinaldin gemessen wurde, subtrahiert.

Während im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+) keine Monooxygenase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, betrug die spezifische Aktivität im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 0,001 U/mg. Zur Kontrolle, ob die Induktion der Synthese von Enzymen, die an der Chinaldin-Umsetzung beteiligt sind, in beiden Klonen gleich war, falls eine gemeinsame Transkriptionsregulation vorliegt, und ob die Zellaufschlüsse vergleichbar waren, wurde in beiden Rohextrakten auch die spezifische Qox-Aktivität bestimmt. Sie betrug

für *P. putida* KT2440 pVK55B/5 0,032 U/mg, für *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+) 0,026 U/mg.

In den UV/Vis-Spektren, die im Testansatz zu Beginn der Inkubation und nach einer Stunde aufgenommen wurden, wurde anhand des Verschwindens der für das 1*H*-4-Oxochinaldin charakteristischen Maxima bei 314 nm und 324 nm deutlich, dass das 1*H*-4-Oxochinaldin durch die 1*H*-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase im Rohextrakt aus *P. putida* KT2440 pVK55B/5 umgesetzt wurde (Abb. 39A). Dagegen konnte im Ansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+) keine signifikante Veränderung der Absorptionsmaxima des 1*H*-4-Oxochinaldins festgestellt werden (Abb. 39B). Die allgemeine Verringerung der Absorption ab ca. 310 nm im Spektrum dieses Testansatzes nach 60 min Inkubationsdauer ist auf die unspezifische NADPH-Oxidation durch andere im Rohextrakt vorliegende Enzyme zurückzuführen. Ohne das Cosubstrat NADPH wurde in demselben Zeitraum auch im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 keine Umsetzung des 1*H*-4-Oxochinaldins beobachtet.



**Abb. 39**

Umsetzung von 1*H*-4-Oxochinaldin durch Rohextrakte von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII.

(A) UV/Vis-Spektrum, aufgenommen im Monooxygenase-Testansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5.

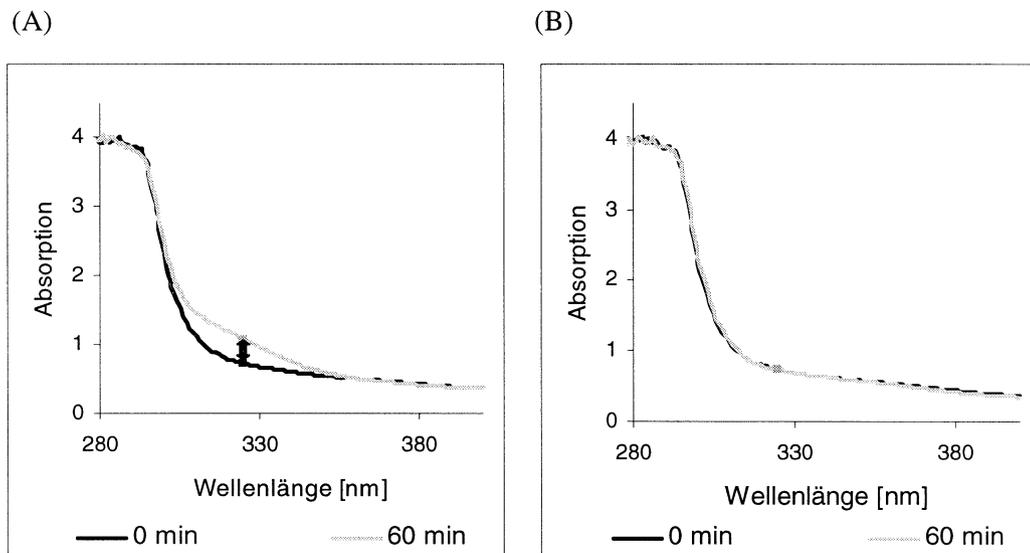
(B) UV/Vis-Spektrum, aufgenommen im Monooxygenase-Testansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+).

### 3.17.3. Nachweis der Aktivität der *N*-Acetylanthranilat-Amidase

Die Klone *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+) wurden in Succinat-Chinaldin-Minimalmedium (2.8.2.) gezüchtet, der Rohextrakt wurde durch Ultraschallaufschluss gewonnen (2.29.1.). Die Aktivität der *N*-Acetylanthranilat-Amidase

wurde anhand der Zunahme des Umsetzungsproduktes Anthranilat bestimmt (2.31.3.). Der in die Berechnung eingehende molare Extinktionskoeffizient des Anthranilat bei 325 nm betrug  $2,012 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 wurde eine spezifische Aktivität der *N*-Acetylanthranilat-Amidase von 0,013 U/mg gemessen, während im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+) keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Zur Kontrolle der Enzyminduktion und des Zellaufschlusses wurde in beiden Rohextrakten auch die spezifische Qox-Aktivität bestimmt, die für *P. putida* KT2440 pVK55B/5 0,032 U/mg, für *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+) 0,029 U/mg betrug.

Zusätzlich wurden in Testansätzen beider Rohextrakte über eine Stunde UV/Vis-Spektren aufgezeichnet (Abb. 40). Während im Testansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+) keine Veränderung des Absorptionsspektrums zu verzeichnen war (Abb. 40B), konnte im Testansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 ein Anstieg der Absorption ab 300 nm detektiert werden (Abb. 40A), welcher mit der Bildung des Produktes Anthranilat einhergeht (vergl. Abb. 38).



**Abb. 40**

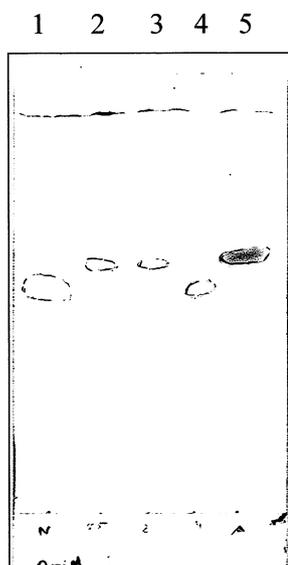
*N*-Acetylanthranilat-Umsetzung durch Rohextrakte von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+).

(A) UV/Vis-Spektrum aufgenommen im Amidase-Testansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5.

(B) UV/Vis-Spektrum aufgenommen im Amidase-Testansatz mit Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+).

Der Pfeil markiert die Extinktionsdifferenz über eine Stunde bei 325 nm.

Anthranilat als eines der Produkte der Reaktion der Amidase aus *P. putida* KT2440 pVK55B/5 bzw. aus *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII wurde außerdem dünnschichtchromatographisch nachgewiesen (2.31.3.2.) (Abb. 41).

**Abb. 41**

Dünnschichtchromatographischer Nachweis des Umsetzungsproduktes der *N*-Acetylanthranilat-Amidase.

Bahn 1 + 5: Referenzsubstanzen: 1: *N*-Acetylanthranilsäure

( $R_f$ : 0,49), 5: Anthranilsäure ( $R_f$ : 0,56)

Bahn 2: *P. putida* KT2440 pVK55B/5

Bahn 3: *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf2nptII(+)

Bahn 4: *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf4nptII(+)

Laufmittel: Toluol/1,4-Dioxan/Eisessig 60/16/1,6 (v/v/v)

### 3.17.4. Versuche zur Substrataufnahme durch *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(+), *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(-) und *P. putida* KT2440 pVK55B/5

Sequenzanalysen des Genproduktes von ORF5 lassen die Vermutung zu, dass es sich bei dem potentiellen Protein um ein Transmembran-Protein handeln könnte, welches möglicherweise eine Transportfunktion hat. Da ORF5 sich in unmittelbarer Nähe zu den Genen befindet, welche in die Chinaldin-Umsetzung involviert sind, besteht die Möglichkeit, dass das ORF5 Protein an dem Transport des Chinaldins oder eines der katabolen Intermediate beteiligt ist. Um eventuelle Auswirkungen auf die Insertion der *nptII*-Kassette in ORF5 zu untersuchen, wurden die Stämme *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(+ bzw. (-) parallel in Succinat-Chinaldin-Minimalmedium gezüchtet. Wie unter 3.17.1. bemerkt, hatten *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(+ bzw. *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(-) die Fähigkeit, Chinaldin zu Anthranilat umzusetzen, nicht eingebüßt. Um jedoch die Frage zu beantworten, ob eventuell die Geschwindigkeit der Substrataufnahme durch die Insertion beeinträchtigt worden war, wurden 100 ml Kulturen je eines Stammes bei gleicher  $OD_{600nm}$  mit 0,8 mM Chinaldin induziert. Zum qualitativen Nachweis der Umsetzungsprodukte wurden von in regelmäßigen Abständen genommenen Proben Dünnschichtchromatogramme (2.8.2.1.) entwickelt. Vergleichend betrachtet wurden die Proben, bei deren Entnahme die Kulturen etwa dieselbe  $OD_{600nm}$  aufwiesen. Die aufgetrennten Substanzen wurden anhand von mitgeführten Referenzsubstanzen identifiziert.

Es wurde deutlich, dass bei *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55B/5orf5nptII(+ bzw. (-) das Substrat Chinaldin bei gleicher Zelldichte nicht mehr im Kulturüberstand nachzuweisen war und dass das Umsetzungsprodukt Anthranilat ebenso bei vergleichbaren Zelldichten in den Kulturen zu detektieren war. Bei den Kulturen der Mutanten,

---

bei denen ORF5 inaktiviert wurde, konnte jedoch über einen längeren Wachstumszeitraum *N*-Acetylanthransäure im Kulturüberstand nachgewiesen werden, während *P. putida* KT2440 pVK55B/5 dieses Zwischenprodukt in kürzester Zeit vollständig umsetzt.

Aus diesem Grund wurde derselbe Wachstumsversuch mit den drei Stämmen noch einmal mit 0,5 mM *N*-Acetylanthranilat als Cosubstrat durchgeführt. Wiederum zeigte sich, dass zwar alle drei Stämme das Substrat umsetzen, bei den ORF5<sup>-</sup>-Mutanten das *N*-Acetylanthranilat jedoch länger im Medium nachzuweisen war als bei *P. putida* KT2440 pVK55B/5.

Während die Inaktivierung des ORF5 Genproduktes keinen Einfluss auf die Aufnahme des Chinaldins nimmt, scheint die Umsetzung und/oder die Aufnahme des Abbauszwischenproduktes *N*-Acetylanthranilat durch die *nptII*-Insertion in den ORF5 verlangsamt zu sein, so dass man eine Beteiligung des ORF5 Proteins an der Chinaldin-Umsetzung durch *A. ilicis* Rü61a vermuten kann.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Chinaldin-4-Oxidase kodierenden Gene

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Gene *qoxL*, *qoxM* und *qoxS*, die für die Untereinheiten der Qox kodieren, auf einem 10,8 kb langen Fragment genomischer DNA aus *A. ilicis* Rü61a identifiziert.

Die von DE BEYER & LINGENS (1993) durch Edman-Abbau bestimmten N-terminalen Aminosäuresequenzen für die drei Proteine QoxL, QoxM und QoxS konnten nahezu bestätigt werden. Die 18. Aminosäure in QoxL erwies sich als Lysin, die zweite in QoxM ist ein Arginin (Methionin bzw. Histidin bei DE BEYER & LINGENS (1993)). Unter Einbeziehung der Molekularmassen der redoxaktiven Zentren, die für die Qox bekannt sind (KAPPL *et al.*, 2002), konnten den drei Proteinen errechnete Molekularmassen von 85,6 kDa, 31,4 kDa und 19,2 kDa zugeordnet werden. Diese Werte sind in Übereinstimmung zu den durch DE BEYER & LINGENS (1993) experimentell ermittelten Größen der Qox-Untereinheiten.

Die *qox*-Gene wurden in der Reihenfolge 5'-*qoxL* - *qoxM* - *qoxS*-3' gefunden. Obwohl die drei Gene molybdänhaltiger Hydroxylasen mit heterotrimerer Untereinheitenstruktur meistens als Cluster vorliegen, scheint es keine einheitliche Transkriptionsreihenfolge der die Untereinheiten kodierenden Gene zu geben. Bei einer Reihe von Enzymen liegen die Gene der Untereinheiten in der Reihenfolge 5'-*M-S-L*-3' vor, wie z. B. bei den CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* (*coxMSL*) (SCHÜBEL *et al.*, 1995), aus *P. thermocarboxydovorans* (*cutBCA*) (PEARSON *et al.*, 1994) und aus *Hydrogenophaga pseudoflava* (*cutMSL*) (KANG & KIM, 1999) oder auch der Qor aus *P. putida* 86 (*qorMSL*) (BLÄSE *et al.*, 1996) und der Nikotin-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAO1 (*ndhMSL*) (GRETHER-BECK *et al.*, 1994). Eine Transkriptionsreihenfolge der drei Gene von 5'-*S-L-M*-3' wurde bei den 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktasen aus *T. aromatica* (*hcrCAB*) (BREESE & FUCHS, 1998) und *R. palustris* (*hbaBCD*) (GIBSON *et al.*, 1997) gefunden. Die Gene *kdhSML*, die für die Keton-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAO1 kodieren, sind auf eine bislang einzigartige Weise arrangiert. Während *kdhM* und *kdhS* in einer Transkriptionsrichtung mit einer Base überlappen, findet man *kdhL* in einer Distanz von 4266 bp in inverser Orientierung zu den beiden anderen Genen (BAITSCH *et al.*, 2001). Diese uneinheitliche Organisation der Gene lässt die Vermutung zu, dass es kein gemeinsames „Urenzym“ für heterotrimere molybdänhaltige Hydroxylasen gibt. Viel mehr könnte angenommen werden, dass die drei Proteine der heutigen Untereinheiten in früheren Zeiten „eigenständige“ redoxaktive Einheiten waren und sich die jetzt beobachteten Enzyme konvergent daraus entwickelt haben.

Der errechnete G + C-Gehalt der Gene *qoxL*, *qoxM* und *qoxS* beträgt 60,1 mol %, 62,2 mol % und 58,8 mol %. Für das ganze 23 kb Fragment des *A. ilicis* Genoms, das in das Cosmid pVK55B/5 kloniert wurde, konnte ein G + C-Gehalt von 61,8 mol % bestimmt werden. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit dem G + C-Gehalt von 61,5 mol %, der in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (JONES & COLLINS, 1986) für die Spezies *A. ilicis* veröffentlicht wurde.

Von IGLOI & BRANDSCH (2003) wurde festgestellt, dass die Gene, die in *A. nicotinovorans* pAO1 für Enzyme der Nikotin-Degradation kodieren (*nic*-Cluster), wahrscheinlich auf einem ca. 44 kb großen Transposon lokalisiert sind. Des Weiteren wurde ein hypothetisches Transposon gefunden, auf dem solche Gene lokalisiert sind, welche für Enzyme kodieren, die zur Biosynthese des Molybdo-Pyranopterin-Cofaktors benötigt werden. Aufgrund des geringeren G + C-Gehaltes dieser Sequenzabschnitte (56,6 mol % und 60,6 mol %), verglichen mit dem Rest des Plasmides pAO1 (62 mol %) wird von den Autoren postuliert, dass *A. nicotinovorans* pAO1 die Fähigkeit zur Synthese von Enzymen mit Molybdopterin-Cofaktor und damit die Fähigkeit zur Nikotinverwertung durch Transpositionsergebnisse von anderen Bakterienstämmen erworben hat. Für den in dieser Arbeit untersuchten DNA-Abschnitt liegen keine offensichtliche Anzeichen vor, dass es sich um „erworbene“ Gene handelt, weder ist der G + C-Gehalt abweichend von dem für das *Arthrobacter* Genom beschriebenen, noch wurden Gene identifiziert, die für Transposasen kodieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich auch hier um ein sehr großes Transposon handelt, dessen Erkennungssequenzen und für die Transposition notwendigen Gene sich außerhalb des sequenzierten Bereichs befinden. Da der gefundene DNA-Abschnitt Teil eines linearen Megaplasמידs ist (persönliche Mitteilung von S. Sielker), besteht die Möglichkeit, dass *A. ilicis* Rü61a die Fähigkeit zur Chinaldin-Degradation durch Übertragung des Plasmids von einem anderen, verwandten Bakterium erhalten hat.

In einem Abstand von 13 bis 14 Basen vor den Startcodons der drei Gene *qoxL*, *M* und *S* wurden Purin-reiche Sequenzabschnitte in der Länge von sieben bis acht Nukleotiden gefunden, die vermutlichen Ribosomen-Bindestellen. Stromabwärts von *qoxS* wurde ein Sequenzbereich identifiziert, der zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur der mRNA führen könnte und eventuell als Transkriptionsterminator dienen könnte. Dieser Abschnitt wird jedoch nicht von einer T-reichen Region, die zur Destabilisierung der DNA:RNA Hybridplex führt, gefolgt, wie es für Faktor-unabhängige Terminatoren gefordert wird (NUDLER & GOTTESMAN, 2002).

Im Bereich zwischen den Startcodons der divergent angeordneten Gene ORF2 und *qoxL* wurden zwei potentielle Promotorregionen postuliert (3.9.1.), an denen eventuell die Transkription des jeweiligen Gens initiiert wird. Diese potentiellen Promotorregionen leiten sich jedoch nur aus

jedoch nur aus Sequenzvergleichen zu bekannten Promotoren (besonders solchen der Gattung *Arthrobacter*) ab; eine funktionelle Analyse steht noch aus.

Das RNA-Polymerase Holoenzym besteht aus fünf Untereinheiten mit der Struktur  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ , wobei die  $\sigma$ -Untereinheit reversibel mit dem Kernenzym assoziiert ist und durch verschiedene  $\sigma$ -Faktoren repräsentiert werden kann. Während das Kernenzym die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der wachsenden RNA und den NTPs katalysiert, sind die unterschiedlichen  $\sigma$ -Faktoren verantwortlich für die Erkennung spezifischer Promotorsequenzen und determinieren somit eine differenzierte Genexpression, die den jeweiligen Umweltbedingungen angepasst ist.

Tabelle 11 gibt die Erkennungssequenzen einiger häufig vorkommender Promotoren wieder. Daneben existieren jedoch noch Promotoren, die von alternativen  $\sigma$ -Faktoren erkannt werden; 1997 berichteten JISHAGE & ISHIHAMA von sieben unterschiedlichen  $\sigma$ -Faktoren, die alleine für *E. coli* bekannt waren.

**Tab. 11**

Konsensus-Sequenzen von Promotoren unterschiedlicher  $\sigma$ -Faktor-Abhängigkeit.

<sup>1)</sup> DE HASETH *et al.*, 1998; <sup>2)</sup> BECKER & HENGGE-ARONIS, 2001; <sup>3)</sup> YAMAUCHI *et al.*, 2003;

<sup>4)</sup> REITZER & SCHNEIDER, 2001

<b><math>\sigma</math> -Abhängigkeit des Promotors</b>	<b>Konsensus-Sequenz der -35 Region</b>	<b>Anzahl zwischenliegender Nukleotide</b>	<b>Konsensus-Sequenz der -10 Region</b>
$\sigma^{70}$ <sup>1)</sup>	TTGACA	17	TGN TATAAT
$\sigma^{38}$ <sup>2)</sup>	nicht konserviert	17	(G/T)C TATACT
$\sigma^{32}$ <sup>3)</sup>	TNNCNCCTTGAA	13-15	CCCCATNTA
$\sigma^{54}$ <sup>4)</sup>	<b>Konsensus-Sequenz der -24 Region</b> CTGGCAC(A/G)	4	<b>Konsensus-Sequenz der -12 Region</b> TTGC(A/T)

Während die hypothetischen -35 Regionen der postulierten Promotorregionen vor *qoxL* und ORF2 bis auf ein Nukleotid mit der Konsensus-Sequenz  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren übereinstimmen (vergl. Tab. 5), finden sich für die potentiellen -10 Regionen nur in wenigen Positionen Übereinstimmungen mit den bekannten Konsensus-Sequenzen. Eine eindeutige Zuordnung zu einem der hier beschriebenen Promotor-Typen ist daher nicht möglich. Falls es sich bei den hier gefundenen Sequenzabschnitten tatsächlich um Promotorregionen handeln sollte, scheinen sie nicht sehr stark konserviert zu sein oder dienen vielleicht alternativen  $\sigma$ -Faktoren als Erkennungssequenz. Zur Spezifität einer Promotorsequenz bemerken DE

HASETH *et al.* (1998): Je stärker eine Promotorsequenz konserviert ist, umso strikter ist die Regulation der Transkription. Darum erlauben nicht so stark konservierte Promotoren eine unregulierte (basal) Transkription, so dass die Genprodukte ständig auf einem geringen Level synthetisiert werden. Wie Untersuchungen zur konstitutiven Synthese der Qox zeigten (s. 4.3.2.), scheint die Transkription der *qox*-Gene nicht besonders stringent reguliert zu sein. LEE & GRALLA (2001) führen an, dass einige weniger stark konservierte Promotoren von zwei verschiedenen  $\sigma$ -Faktoren erkannt werden können, jedoch mit unterschiedlicher Affinität, was eine maximale Flexibilität der Expression von Genen erlaubt, die unter verschiedenen physiologischen Bedingungen benötigt werden. Ein gut untersuchtes Beispiel für die Erkennung eines Promotors durch zwei unterschiedliche  $\sigma$ -Faktoren ist der *Pm* Promotor in *P. putida* mt-2, der sowohl von  $\sigma^{32}$ -Faktoren („Hitze-Schock Faktoren“) als auch von  $\sigma^{38}$ -Faktoren ( $\sigma$ -Faktoren der stationären Phase) erkannt wird (MARQUÉS *et al.*, 1999) (vergl. 4.3.3.).

Es darf jedoch bei der Betrachtung der Transkriptionsregulation nicht allein von vorhandenen Promotorsequenzen ausgegangen werden. Mindestens ebenso wichtige Bestandteile der Transkriptionsregulation sind die Interaktionen von Effektoren mit spezifischen DNA-Bindestellen im Operator-/Promotorbereich oder auch Faktoren wie z. B. die Konformation der DNA (KUSANO *et al.*, 1996) oder das Vorhandensein cytoplasmatischer Substanzen (KUSANO & ISHIHAMA, 1997, JISHAGE *et al.*, 2002), die die Bindung eines  $\sigma$ -Faktors gegenüber einem anderen favorisieren.

Promotoren, an denen die Transkription von Genen prokaryotischer molybdänhaltiger Hydroxylasen reguliert wird, sind bislang wenig charakterisiert. Potentielle -10/-35 Promotorsequenzen wurden vor *coxM* (SANTIAGO *et al.*, 1999), *qorM* (CARL *et al.*, 2004), *pucA* (BEIER *et al.*, 2002) und Genen, die in den Nikotinabbau involviert sind (SCHENK *et al.*, 1998), gefunden. Stromaufwärts der Gene *cutB* (PEARSON *et al.*, 1994) und *xdhA* (XI *et al.*, 2000) wurden Promotoren postuliert, die von  $\sigma^{54}$ -Faktoren erkannt werden.

Die Transkriptionsanalyse der Gene, die für die Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *P. putida* 86 kodieren, legt nahe, dass alle drei Gene *qorMSL* zusammen als eine polycistronische mRNA transkribiert werden (CARL *et al.*, 2004). Als eine Transkriptionseinheit werden auch die Gene beschrieben, die für die Xanthin-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* kodieren (*pucABCDE*) (BEIER *et al.*, 2002). Ob auch die *qoxLMS*-Gene als ein Operon exprimiert werden und wo der (eventuell gemeinsame) Transkriptionsstartpunkt liegt, kann jedoch nur durch eine Transkriptionsanalyse geklärt werden.

## 4.2. Die Aminosäuresequenz der Chinaldin-4-Oxidase

Vergleiche der Aminosäuresequenzen von QoxL, QoxM und QoxS mit Sequenzen, die in Proteindatenbanken hinterlegt sind, führten nahezu ausschließlich zu Treffern mit Proteinen, die der Familie der molybdänhaltigen Hydroxylasen zugeordnet werden. Die größten Übereinstimmungen betragen 32,8 % Identität von QoxL und KdhC, der großen Untereinheit der Keton-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAO1, 31,6 % Identität von QoxM und CoxM, der mittelgroßen Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und 49 % Identität von QoxS und CutC, der kleinen Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *P. thermocarboxydovorans*.

### 4.2.1. QoxL: Die große Untereinheit

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von QoxL zu den Sequenzen der prokaryotischen Aldehyd-Oxidoreduktasen aus *D. gigas* (MOP) und *D. desulfuricans* (MOD) ist von besonderem Interesse, da die Chinaldin-4-Oxidase neben dem namensgebenden Substrat Chinaldin und anderen *N*-Heteroaromaten auch Aldehyde, besonders aromatische Aldehyde, mit Raten der spezifischen Aktivität von bis zu 70 % (bezogen auf die Chinaldinumsetzung als 100 %) umzusetzen vermag (STEPHAN *et al.*, 1996). Da die Strukturen der MOP und der MOD aufgeklärt sind, ist es möglich, anhand von Sequenzhomologien zwischen der Qox und diesen Enzymen Rückschlüsse auf eventuelle strukturelle Eigenschaften der Qox bezüglich der Katalyse und der Substrataufnahme zu ziehen.

Neueste Erkenntnisse über die Struktur der Chinolin-2-Oxidoreduktase (Qor) können dagegen besonders dem Erkenntnisgewinn über die Substrataufnahme und -positionierung der Qox, bezogen auf die heterozyklischen Substrate, dienlich sein.

Während die N-terminalen Bereiche der großen Untereinheiten molybdänhaltiger Hydroxylasen und die N-terminalen Bereiche der entsprechenden Proteinabschnitte der eukaryotischen Xanthindehydrogenase und der prokaryotischen Aldehyd-Oxidoreduktasen kaum Homologien aufweisen, sind in den zentralen und C-terminalen Teilen dieser Proteine und Proteinabschnitte die konservierten Aminosäurereste lokalisiert, die an der Cofaktorbindung bzw. der Katalyse beteiligt sind.

Die Abfolge der Sequenzabschnitte, die als MoCo-Bindestellen bezeichnet werden, entspricht in der Qox der nahezu aller molybdänhaltigen Hydroxylasen, Ausnahmen stellen die Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *B. diminuta* 7 (LEHMANN *et al.*, 1995) und die Aldehyd-Dehydrogenase aus *Acetobacter polyoxogenes* (TAMAKI *et al.*, 1989). Bei den beiden letztgenannten Enzymen wurde eine Verschiebung von Proteinabschnitten beobachtet, so dass die Bindestellen für den Molybdopterin-Cofaktor in der Reihenfolge III, IV, I, II, V (Nummerierung nach KAPPL *et al.*, 2002) anzutreffen sind.

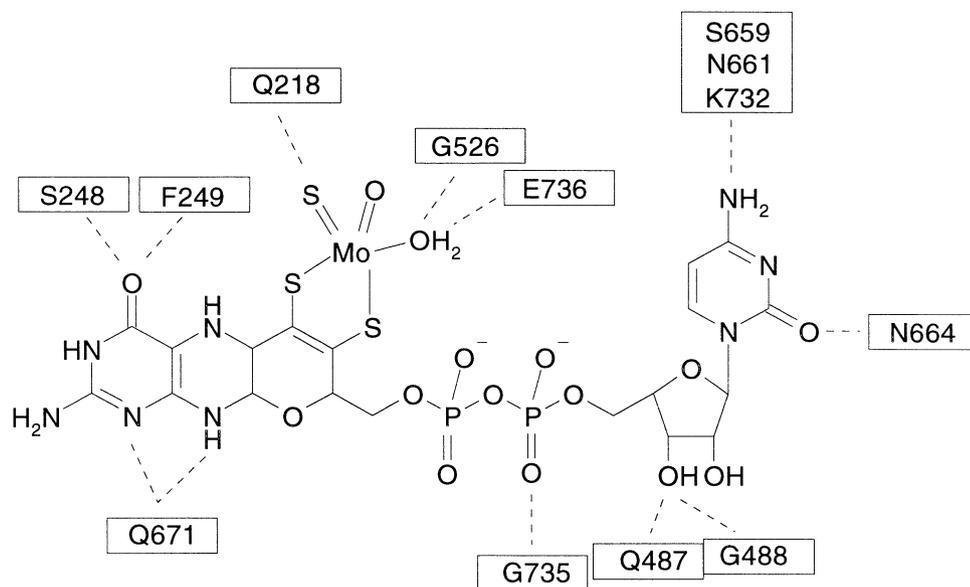
Der Proteinbereich der MOP, in dem der Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor lokalisiert ist, wird aus zwei Domänen geformt, die als Mo1 und Mo2 bezeichnet werden (ROMÃO *et al.*, 1995, ROMÃO *et al.*, 1997). Eine identische Domänenstruktur wurde auch bei QorL (BONIN, unveröffentlichte Ergebnisse), XDHBRC, der Molybdänzentrum tragenden Untereinheit der Xanthindehydrogenase aus *R. capsulatus* (TRUGLIO *et al.*, 2002) und CoxL (die große Untereinheit der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*) (DOBBEK *et al.*, 1999) gefunden. Die Sekundärstrukturvorhersage für QoxL ergab eine Verteilung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen, die der des MoCo-tragenden Teils der MOP in großen Teilen entspricht. Geht man hier also von einer weitestgehend übereinstimmenden Faltung der Proteine aus, so kann auch für QoxL eine Zweidomänenstruktur postuliert werden.

Bei den strukturell untersuchten Enzymen liegt der Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor im Inneren der großen Untereinheiten verborgen und wird durch ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäureresten beider Domänen koordiniert. Das katalytisch aktive Molybdänatom trägt in den Enzymen neben den zwei Schwefelatomen der Dithiolengruppe, welche das Metallatom mit dem Pyranopterinssystem verbinden, einen Oxo-, einen Sulfido- und einen Wasser- (oder Hydroxyl-) Liganden. Während die Molybdänzentren der MOP, der MOD, der Qor und der XDHRc keine kovalenten Bindungen zu dem Protein aufweisen, ist bei der Cox das Metallatom über einen Schwefelliganden und ein Cu-Atom kovalent mit dem S-Atom des Cysteinrestes 388 verknüpft (DOBBEK *et al.*, 2002, GNIDA *et al.*, 2003). Dieser Cysteinrest ist Teil des MoCo-Bindemotivs II und ist ausschließlich bei der Cox zu finden (Abb. 12). Durch diese unterschiedliche Koordination der Mo-Atome findet man bei der Cox auch eine von den meisten anderen Enzyme abweichende Geometrie des aktiven Zentrums. Während in den Zentren der Aldehyd-Oxidoreduktasen und (wahrscheinlich) der Xanthindehydrogenase der Oxo- und der H<sub>2</sub>O-Ligand eine quadratische Ebene mit der Dithiolengruppe bilden und der Sulfidoligand darüber in der Spitze einer Pyramide liegt (REBELO *et al.*, 2000, TRUGLIO *et al.*, 2002), wird bei der Cox eine unregelmäßige Pyramidenebene von dem Sulfido- und dem H<sub>2</sub>O-Liganden sowie von den Dithiolen-Schwefelatomen gebildet; der Oxoligand liegt hier apikal dazu (DOBBEK *et al.*, 2002). Für die Qox, für die auch ein cyanolysierbarer Sulfidoligand nachgewiesen wurde (DE BEYER & LINGENS, 1993) und bei der C388 (CoxL) nicht konserviert ist, kann analog zur MOP auch eine quadratisch, pyramidale Geometrie des Mo-Zentrums angenommen werden.

Der H<sub>2</sub>O-Ligand wird zum einen durch das N-Atom einer kleinen Aminosäure (MOP: G697, CoxL: G569, QorL: A546, XDHBRC: A529) positioniert, in QoxL ist hier ebenfalls ein Glycin (G526) konserviert. Der zweite Aminosäurerest, der mit dem H<sub>2</sub>O-Liganden verbunden ist, ist ein als katalytisch relevant postulierter Glutamatrest (REBELO *et al.*, 2000), der in den molybdänhaltigen Hydroxylasen hoch konserviert in dem MoCoV-Bindemotiv zu finden ist (MOP: E869, CoxL: E763, QorL:E743, XDHBRC: E730, XOb: E1261, QoxL: E736). Der

apikale Sulfidoligand steht in der XDH aus *R. capsulatus* in Verbindung mit Ne2 des Restes Q197 (TRUGLIO *et al.*, 2002). Ein Glutaminrest findet sich in dieser Position in vielen molybdänhaltigen Hydroxylasen (XOb: Q767, CoxL: Q240, QorL: Q224, QoxL: Q218), jedoch nicht in den Aldehyd-Oxidoreduktasen MOP und MOD. Bei der Cox wird durch diesen Rest das apikale Sauerstoffatom koordiniert. Der Oxoligand in der planaren Pyramidenebene liegt bei der MOP unter anderem benachbart zu einem Argininrest (R533) (ROMÃO *et al.*, 1995). Dieser Argininrest findet sich vollständig konserviert (CoxL: R387, QorL: R371, XDHBrc: R342, QoxL: R362) in dem MoCoII-Bindemotiv (Abb. 12).

Nur zwei Bindungen werden bei der MOP von der Mo1 Domäne zur Bindung des MCD-Cofaktors gestellt (T420 und F421), alle übrigen Aminosäurereste, die zur Positionierung des MCD-Cofaktors beitragen, liegen in der Mo2 Domäne (ROMÃO *et al.*, 1997). Zu dem Aminostickstoff des Cytosins bestehen bei der MOP H-Brücken ausgehend von den Resten S797 und S865. In der Qor und der Cox wird dieses N-Atom von O-Atomen der Reste QorL: T668, C666, K739 und CoxL: T688, C686, K759 gebunden. Beim direkten Sequenzvergleich (Abb. 12) findet man für die Qox in diesen Positionen folgende Reste: S659 (entsprechend: QorL: C666, CoxL: 686), N661 (QorL: T668, CoxL: T688, MOP: S797) und K732 (QorL: K739, CoxL: K759, MOP: S865). Ein vollständig konservierter Asparaginrest (QorL: N671, MOP: N800, QoxL: N664) bindet das Cytosin am Carbonylsauerstoff (Abb. 42). Die Ribose des Dinukleotidanteils des Cofaktors wird bei der MOP durch den Glutaminrest 655 und den Glycinrest 656 positioniert. Beide Reste sind Bestandteil des hoch konservierten MoCo-Bindemotivs III [GQG], das auch bei der Qox zu finden ist.



**Abb. 42**

Schematische Darstellung des MCD-Cofaktors und potentiell koordinierende Reste in der Qox.

GRETHER-BECK *et al.* (1994) postulierten bei der Nikotin-Dehydrogenase (Ndh) eine Beteiligung des Motivs **GMGESG** (AS: 742-747 in Acc. Nr. CAD47952.1) an der Bindung des Dinukleotid-Cofaktors, nachdem MÖLLER & AMONS (1985) in Proteinen mit Dinukleotid-Cofaktoren das konservierte Motiv GXGXX(G/A) gefunden hatten. Tatsächlich korrespondiert das Motiv der Ndh mit den Resten, die das MoCo-Bindemotiv V bilden. Hier findet man bei vielen Enzymen, die die Dinukleotid-Form des Molybdopterin-Cofaktors enthalten, zumindest die ersten beiden Glycinreste konserviert (Abb. 12) (Qox: **GAGETA**). Wie von MÖLLER & AMONS im Allgemeinen beschrieben, ist in der MOP der zweite Glycinrest des Motivs (G868) in die Bindung des Pyrophosphates involviert (ROMÃO *et al.*, 1997).

An dem N8-Atom des Pyranopterin-Ringsystems findet sich eine H-Brückenbindung zu einem Glutaminrest (Abb. 42) (ROMÃO *et al.*, 1997, TRUGLIO *et al.*, 2002), der in allen Sequenzen konserviert ist (QorL: Q678, CoxL: Q698, MOP: Q807, XDHBrc: Q663, XOb: Q1194, QoxL: Q671). Die Reste, die sich in dem MoCo-Bindemotiv I finden, sind an der Bindung des C4-Sauerstoffs des Pterins beteiligt (MOP: T420, F421, CoxL: G270, F271, XDHBrc: G227, F228, QorL: G254, F255). Die Qox weist an diesen Stellen die Reste S248 und F249 auf. Der aromatische Ring des konservierten Phenylalanins tritt dabei in  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen mit dem Pterin (ROMÃO & HUBER, 1998).

Bei den Aldehyd-Oxidoreduktasen MOP und MOD ist der Zugang für das Substrat durch einen Tunnel gegeben, der von hydrophoben Aminosäureresten der Domänen Mo1 und Mo2 geformt wird. Innerhalb dieses Tunnels wird von den Resten F425/F427, F494/496, L497/L499 und L626/L628 (MOP/MOD) eine Verengung geformt (ROMÃO *et al.*, 1995, REBELO *et al.*, 2000), die zwar für kleine Moleküle passierbar ist, für die Passage aromatischer Aldehyde, wie sie von den Enzymen auch umgesetzt werden (BARATA *et al.*, 1993), jedoch durch eine Konformationsänderung des Proteins vergrößert werden muss. Während F425/F427 (MOP/MOD) in QoxL durch ein Glycin (G253) ersetzt ist, finden sich in den weiteren drei Positionen identische bzw. ähnliche Reste (QoxL: F323, I327, L459). Falls diese Reste tatsächlich bei der Qox auch am Substratzugang beteiligt sind, könnten also auch hier Teile der Verengung des Tunnels vorhanden sein. Der Austausch eines Phenylalanins gegen das kleinere Glycin an Position 253 könnte bei der Qox jedoch die Erweiterung des Zugangs gewährleisten, so dass aromatische Aldehyde, die von der Qox bevorzugt umgesetzt werden, ohne Veränderung der Proteinstruktur ins katalytische Zentrum gelangen könnten. Aminosäurereste, die eventuell an der Formung des Substratzugangstunnels bei der Qor beteiligt sind (BONIN, unveröffentlichte Ergebnisse), finden sich in der Qox kaum konserviert; Ausnahmen sind: V88 (Qor)/V88 (Qox) und T484 (Qor)/T461 (Qox).

Wie hier dargestellt wurde, können in der Aminosäuresequenz der Qox viele Reste, denen in verwandten Enzymen aufgrund von Röntgenstrukturanalysen eine katalytische Relevanz oder eine Beteiligung an der Positionierung des Molybdopterin-Cofaktors zugesprochen wird,

ebenfalls nachgewiesen werden. Es kann daher postuliert werden, dass die Umgebung des katalytischen Zentrums der Qox der anderer Enzyme derselben Familie ähnlich ist und dass die durch die Qox katalysierte Reaktion dem Mechanismus, der z. B. für die MOP vorgeschlagen wurde (ROMÃO *et al.*, 1997; s. Abb. 45), ebenfalls folgt.

Mutationsexperimente an der Xanthindehydrogenase aus *Emericella nidulans* (HxA) führten zu ersten Nachweisen von Aminosäureresten, die direkt an der Substratpositionierung oder -bindung beteiligt sind (GLATIGNY *et al.*, 1998). Der Austausch des Argininrestes R911 (HxA) gegen Glutamin oder Glycin führte zu einer Veränderung der Hydroxylierungsposition an dem Substrat 2-Hydroxypurin, welches durch das Wildtyp-Enzym in Position C8, durch die Proteinvarianten jedoch in Position C6 hydroxyliert wird. Dieser Rest ist in allen Xanthindehydrogenasen (HILLE, 1996) und auch in der MOP (R501) und der MOD (R503) konserviert. In der Xanthindehydrogenase wird das Substrat durch die Argininseitenkette koordiniert (GLATIGNY *et al.*, 1998), während bei der MOP von dem Argininrest eine H-Brücke zu einem der bereitliegenden Wassermoleküle gebildet wird (REBELO *et al.*, 2000). Bei der Qor und der Qox findet man in dieser Position kein Arginin, sondern hydrophobe Reste (QorL: V339, QoxL: I330).

Ein weiterer in allen Xanthindehydrogenasen konservierter Rest ist das Glutamat 833 in HxA. HUBER *et al.* (1996) postulierten für einen korrespondierenden Phenylalaninrest in den Aldehyd-Oxidoreduktasen (MOP: F425, MOD: F427) eine essentielle Beteiligung an der Ausprägung der Substratspezifität, woraufhin auch für den Glutamatrest der Xanthindehydrogenasen eine solche Funktion in Betracht gezogen wurde. In der Qor und der Qox findet man in dieser Position kleine Reste (QoxL: G253, QorL: A259), die eventuell die Positionierung der bizyklischen *N*-Heteroaromaten begünstigen.

#### 4.2.2. QoxM: Die mittelgroße Untereinheit

Aminosäurereste, die an der Bindung des FAD-Cofaktors in den entsprechenden Untereinheiten beteiligt sind, konnten durch die Röntgenstrukturanalyse verschiedener Enzyme identifiziert werden (DOBBEK *et al.*, 1999, TRUGLIO *et al.*, 2002, ENROTH *et al.*, 2000, BONIN, unveröffentlichte Ergebnisse zu QorM). Vergleiche von QoxM mit diesen Proteinen lassen den Schluss zu, dass auch in der Qox der FAD-Cofaktor in der mittelgroßen Untereinheit lokalisiert ist.

Zwei hoch konservierte Motive konnten in QoxM in den Positionen 30-33 (AGGQ) und 109-112 (TIGG) identifiziert werden. Während die Motive in bakteriellen Enzymen häufig als AGG(Q/T/H) und T(I/L)GG erscheinen (Abb. 13), sind sie in den eukaryotischen Xanthindehydrogenasen eher in der Variation VGNT und S(I/V)GG (HILLE, 1996) zu finden. In der generellen Form ssGHs und shsG (mit s = kleine AS, h = hydrophobe AS) findet man die Motive auch in den FAD-haltigen Enzymen, die in der Vanillylalkohol-Oxidase Familie

zusammengefasst werden und die Redoxreaktionen mit unterschiedlichsten Substraten katalysieren (FRAAIJE *et al.*, 1998). Die Aminosäurereste des N-terminalen Motivs und der Threoninrest des C-terminalen Motivs bilden bei der XDH aus *R. capsulatus* Bindungen zum Pyrophosphatanteil des FAD-Moleküls aus. Für das Enzym wird außerdem beschrieben, dass die Reste des Motivs TIGG eine Tasche für das Adenosin des FAD formen (TRUGLIO *et al.*, 2002).

L166 in QorM bzw. L167 in CoxM, die in L165 von QoxM ein Äquivalent haben, binden an den Adenosinteil des FAD. Verbindungen zum Isoalloxazinring des FAD finden sich bei CoxM in den Resten D124, N115, A102 und K185 (DOBBEK *et al.*, 1999), wobei lediglich der Asparaginrest in verwandten Proteinen nicht konserviert ist. Ein saurer Rest in der Position, die D124 in CoxM entspricht, ist hoch konserviert (QorM: E123, XDHARc: D293, XOb: D360, NdhM: E123, QoxM: D122); hier wird eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff der Carbonsäure und dem N3 des Isoalloxazins gebildet. Der Alaninrest 102 in CoxM, der in allen hier verglichenen Proteinen gefunden wurde, bindet den C4-Carbonyl-Sauerstoff des Isoalloxazinringes. Den Lysinrest K185 in CoxM, der ebenfalls an den C4-Carbonyl-Sauerstoff des Isoalloxazinringes bindet, findet man in QoxM in Position 182; er korrespondiert außerdem mit K352 in XDHARc und K422 in XOb (Abb. 13). Während der Isoalloxazinring auf einer Seite der Umgebung exponiert ist, schirmen die oben genannten Aminosäurereste die andere Seite ab (TRUGLIO *et al.*, 2002). Ein in den Xanthindehydrogenasen/Oxidasen konservierter Phenylalaninrest (XOb: F337, XDHARc: F270), der  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen mit dem Pyrimidinring des Isoalloxazins eingeht (ENROTH *et al.*, 2000), ist in den Untereinheiten der anderen Enzyme nicht vorhanden, hier finden sich hydrophobe Reste ohne aromatische Seitenketten. Tyrosin 193 in CoxM, welches den mittleren Part des Isoalloxazinsystems auf der dem Lösungsmittel zugänglichen Seite abschirmt (DOBBEK *et al.*, 1999) ist nur in QorM und NdhM zu finden; in QoxM findet sich hier ein Prolinrest.

Durch eine Sekundärstrukturvorhersage konnten zehn  $\alpha$ -Helices und zehn  $\beta$ -Stränge für das QoxM Protein postuliert werden, damit wäre diese Struktur der von CoxM (DOBBEK *et al.*, 1999) sehr ähnlich. Für die entsprechenden Proteine der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *P. putida* 86 (QorM) (BONIN, unveröffentlichte Ergebnisse) und der Xanthindehydrogenase aus *R. capsulatus* (XDHARc) (TRUGLIO *et al.*, 2002) wurde ebenso wie für CoxM eine Struktur mit drei Domänen identifiziert. Dabei umfassen die N-terminalen Domänen von CoxM und QorM je drei  $\beta$ -Stränge, die von zwei  $\alpha$ -Helices flankiert werden, die zentrale Domäne wird in beiden Proteinen von fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen und einigen  $\alpha$ -Helices gebildet und die C-terminalen Domänen bestehen aus je drei  $\alpha$ -Helices und drei  $\beta$ -Strängen. Aufgrund der fast identischen Sekundärstruktur von QoxM zu CoxM kann auch für QoxM eine ebensolche Domänenstruktur postuliert werden.

### 4.2.3. QoxS: Die kleine Untereinheit

Die Aminosäuresequenz von QoxS weist acht Cysteinreste auf, die in zwei konservierten Motiven mit je vier Cysteinresten organisiert sind (Abb. 14). Bei den strukturell aufgeklärten Enzymen binden diese Reste über die Schwefelatome der Aminosäureseitenketten die Fe-Atome der [2Fe2S]-Zentren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch bei der Qox die kleine Untereinheit die zwei verschiedenen [2Fe2S]-Zentren trägt, die ESR-spektroskopisch erfasst werden können (CANNE *et al.*, 1997, KAPPL *et al.*, 2002).

Analog zu anderen Enzymen kann postuliert werden, dass in QoxS C40 und C45 das eine Fe-Atom eines Zentrums binden und C48 und C60 das andere Fe-Atom desselben Zentrums. Das N-terminale Motiv  $CX_4CGXCX_nC$  findet man auch bei [2Fe2S]-Ferredoxinen, die bei der oxygenen Photosynthese von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien als terminaler Elektronenakzeptor fungieren. Im Fall der photosynthetischen FeS-Zentren ist  $n = 30$  (STICHT & RÖSCH, 1998), während die Anzahl  $n$  bei molybdänhaltigen Hydroxylasen nicht einheitlich ist (QoxS:  $n=11$ ). Strukturanalysen der Proteine, die die photosynthetischen [2Fe2S]-Zentren (STICHT & RÖSCH, 1998) bzw. die [2Fe2S]-Zentren vom Ferredoxin-Typ in den molybdänhaltigen Hydroxylasen umgeben (ROMÃO & HUBER, 1998, REBELO *et al.*, 2000, DOBBEK *et al.*, 1999), ergaben eine Sekundärstruktur mit einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt und ein bis zwei  $\alpha$ -Helices. Die Sekundärstrukturvorhersage für QoxS ergab in diesem Proteinbereich auch ein Vorkommen von fünf  $\beta$ -Strängen und einer  $\alpha$ -Helix, so dass eine ähnliche Proteinfaltung anzunehmen ist. Aufgrund von Struktur- und ESR-spektroskopischen Analysen verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen wird dieses FeS-Zentrum als das „distale“ bezogen auf den Molybdo-Pyranopterin-Cofaktor bezeichnet (KAPPL *et al.*, 2002, DOBBEK *et al.*, 1999, REBELO *et al.*, 2000). Es befindet sich bei den FAD-haltigen Enzymen in der Nähe dieses Cofaktors und überträgt die Elektronen, die es von dem „proximalen“ [2Fe2S]-Zentrum übernimmt, auf das FAD. Der Abstand zwischen diesem FeS-Zentrum und dem FAD beträgt bei der Cox aus *O. carboxidovorans* 8,8 Å und bei der bovinen Xanthinoxidase 7,9 Å (ROMÃO *et al.*, 2002). Zwischen den zwei [2Fe2S]-Zentren sind bei verschiedenen Enzymen Abstände von 12,3 Å bis 12,6 Å gemessen worden (ROMÃO *et al.*, 2002), eine Bindung zwischen den Zentren wird durch die Stickstoffatome der Peptidkette generiert.

Die Cysteinreste, die das „proximale“ FeS-Zentrum koordinieren, liegen in einem Aminosäuremotiv, welches den molybdänhaltigen Hydroxylase eigen ist (THOENES *et al.*, 1994, STICHT & RÖSCH, 1998, KAPPL *et al.*, 2002, ROMÃO *et al.*, 2002). Die beiden ersten Cysteinreste des Motivs  $CGXCX_nCRC$  (QoxS:  $n = 31$ ) binden eines der beiden Fe-Atome, während das zweite von den letzten beiden Cysteinresten kovalent gebunden wird. Die Struktur, die das Protein um das FeS-Zentrum bildet, wird als Bündel aus vier  $\alpha$ -Helices beschrieben (ROMÃO & HUBER, 1998, DOBBEK *et al.*, 1999, ROMÃO *et al.*, 2002). Auch die

Sekundärstrukturvorhersage für QoxS zeigte C-terminal vier  $\alpha$ -Helices, die hier strukturgebend sein könnten. Dieses [2Fe2S]-Zentrum ist bei den molybdänhaltigen Hydroxylasen, deren Struktur bekannt ist, weit im Inneren des Enzyms lokalisiert und übernimmt die Elektronen direkt von dem Molybdäncofaktor, in dessen Nähe (14,5 Å bis 15 Å entfernt) es sich befindet. Eine Bindung zu dem Molybdäncofaktor besteht bei der MOP, der Cox und der eukaryotischen Xanthindehydrogenase zwischen dem NH<sub>2</sub> des äußeren Pterinringes und dem Schwefelatom des letzten Cysteinrestes des C-terminalen Motivs (ROMÃO *et al.*, 2002).

Von einigen mononuklearen Molybdoenzymen ist bekannt, dass sie membranassoziiert in der Zelle vorliegen. Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* konnte an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert werden (ROHDE *et al.*, 1984), die Nikotin-Dehydrogenase aus *A. nicotinovorans* pAO1 wurde sowohl in löslicher als auch in membranassoziiierter Form gefunden (GRETHER-BECK *et al.*, 1994). Versuche, die Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *P. putida* 86 immunocytochemisch und durch Untersuchung der Qor-Aktivität in subzellulären Fraktionen in der Zelle zu lokalisieren ergaben zwar keine eindeutigen Ergebnisse, eine schwache Assoziation des Enzyms mit der Membran konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Ergebnisse von Dr. G. Romanowski). Die Molybdoenzyme DMSO-Reduktase und die TMAO-Reduktase aus *E. coli*, die Elektronenübertragungsprozesse in anaeroben Atmungsketten katalysieren, findet man an eine Membran gebunden. Diese Enzyme werden durch das *twin-arginine translocation* (Tat) System durch die Cytoplasmamembran auf die periplasmatische Seite befördert (ORESNIK *et al.*, 2001, POMMIER *et al.*, 1998, PALMER & BERKS, 2003), wo sie durch ein Ankerprotein (DmsC bzw. TorC) an die Membran gebunden werden. Ein Signalpeptid, welches das konservierte Tat-Motiv SRRXFL(K) (BUCHANAN *et al.*, 2001) enthält, wurde auch in der Sequenz von IorB, der großen Untereinheit der Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *B. diminuta* 7 entdeckt. Für die Isochinolin-1-Oxidoreduktase wurde von LEHMANN *et al.* (1995) ebenfalls eine mögliche Beteiligung an einer Elektronentransportkette über die Membran postuliert. Die N-terminalen Aminosäuresequenzen von QoxL, M und S weisen das Tat-Motiv jedoch nicht auf und in einer Computer gestützten Vorhersage wurden keine Signalpeptide angezeigt. Ob die Qox jedoch eventuell auf der cytoplasmatischen Seite der Membran assoziiert ist, bleibt bislang ungeklärt.

### 4.3. Heterologe Expression der Gene *qoxLMS* und Synthese katalytisch aktiver Chinaldin-4-Oxidase durch *P. putida* KT2440

#### 4.3.1. Synthese aktiver Chinaldin-4-Oxidase durch *P. putida* KT2440

Mit der Synthese der Qox in vollständig katalytisch kompetenter Form durch *P. putida* KT2440 ist es zum ersten Mal gelungen, die Gene einer molybdänhaltigen Hydroxylase mit Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor in einem heterologen Wirtsstamm funktionell und reguliert zu exprimieren. Mehrere Versuche zur Synthese katalytisch aktiver Enzyme mit MCD-Cofaktor in heterologen Wirtsstämmen waren bisher erfolglos (BLACK *et al.*, 1990, BLÄSE *et al.*, 1996). Die Isochinolin-1-Oxidoreduktase aus *B. diminuta* 7 konnte zwar von dem Chinolin verwertenden Stamm *P. putida* 86 synthetisiert werden, die spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms, gemessen im Rohextrakt, lag jedoch weit unterhalb der, des Wildtyp-Enzyms (ISRAEL *et al.*, 2002). Versuche, die Gene der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *P. putida* 86 funktionell in *P. putida* KT2440 zu exprimieren, waren erfolgreich, nachdem ein 30 kb großes Fragment des *P. putida* 86 Genoms in einem Cosmidvektor in den Wirtsstamm eingebracht wurde (BLÄSE *et al.*, 1996). Versuche der regulierten Expression der *qor*-Gene in demselben Stamm, nachdem die Gene separat in einen Expressionsvektor kloniert worden waren, resultierten jedoch in der Synthese von Enzym, welches eine zehnmal geringere spezifische Aktivität aufwies als das von *P. putida* 86 produzierte. Als eine mögliche Erklärung für die mangelnde Aktivität wird ein Defekt in dem MCD-Cofaktor diskutiert; es konnte nachgewiesen werden, dass das heterolog synthetisierte Enzym ein Defizit an in den organischen Cofaktor integriertem Molybdän aufwies (FRERICHS-DEEKEN *et al.*, 2003). Es kann vermutet werden, dass auf dem 30 kb langen Cosmidfragment, welches *P. putida* KT2440 in die Lage versetzte, funktionelle Qor zu synthetisieren, neben den *qor*-Strukturgenen akzessorische Gene zur Cofaktorsynthese lokalisiert waren.

Katalytisch aktive Qox konnte sowohl in den Cosmidklonen *P. putida* KT2440 pVK55B/5 und *P. putida* KT2440 pVK55/11 als auch in dem Expressionsklon *P. putida* KT2440 pKP1 nachgewiesen werden. *E. coli* HB101 pVK55B/5 war hingegen nicht in der Lage, Chinaldin umzusetzen bzw. aktive Qox zu synthetisieren. Letzteres war nicht sonderlich unerwartet, da schon frühere Versuche, MCD-haltige molybdänhaltige Hydroxylasen in *E. coli* in aktiver Form zu synthetisieren, scheiterten (BLACK *et al.*, 1990, BLÄSE *et al.*, 1996). Zurückgeführt wird die Synthese inaktiver Enzyme auf die Tatsache, dass in *E. coli* bisher nur Enzyme mit Molybdopterin-Cofaktoren in der Dinukleotid-Form gefunden wurden, bei denen ein GMP an den MPT-Cofaktor gebunden ist (MGD), so dass angenommen wird, dass *E. coli* nicht in der Lage ist, die Cytosin-Dinukleotid-Form des Cofaktors zu synthetisieren.

Da *P. putida* KT2440 fähig ist, Qox in aktiver Form zu synthetisieren, müssen dem Stamm alle akzessorischen Gene, deren Genprodukte zur Synthese der Cofaktoren essentiell sind, zur Verfügung stehen. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass Gene, deren Genprodukte an

der Assemblierung der [2Fe2S]-Cluster und des Flavin-Cofaktors beteiligt sind, ubiquitär vorliegen. Zur Synthese eines funktionellen MCD-Cofaktors bedarf es jedoch nicht nur eines Molybdat-Transportsystems mit hoher Mo-Bindeaffinität und einer Reihe von Proteinen, die zur Synthese des ebenfalls ubiquitären MPT-Cofaktors benötigt werden, sondern es wird außerdem ein Protein benötigt, welches die Insertion des Cytidinmonophosphates in den MPT-Cofaktor katalysiert (PAU & LAWSON, 2002, MENDEL & SCHWARZ, 2002).

Bekannte Molybdat-Transportsysteme setzen sich aus drei Proteinkomponenten zusammen (ModA: periplasmatisches Molybdat-Bindeprotein, ModB: integrales Membranprotein, ModC: peripheres Membranprotein und ATPase) und gehören zu den ABC-Transportern. Sequenzvergleiche der bekannten Proteine ModA, ModB und ModC aus *E. coli* (Acc. Nr. ModA: P37329, ModB: P0934, ModC: P09833) mit der *P. putida* KT2440 Genom-Datenbank [<http://www.tigr.org>.] zeigten dort hypothetische Proteine, für die gleiche Funktionen postuliert werden und die 26 %, 28 % bzw. 38 % Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene zu den *E. coli* Proteinen aufweisen. In *E. coli* ist die Transkription des Mod-Operons negativ durch den Repressor ModE reguliert; Bindung von Molybdat führt zur Dimerisierung von ModE und erlaubt damit eine DNA-Bindung in dem *mod*-Operator (ANDERSON *et al.*, 1997). Ein homologes ModE-Protein (35 % identische Aminosäurereste) findet man auch in *P. putida* KT2440.

Die Synthese des Molybdo-Pyranopterin-Cofaktors, die bei *E. coli* genau untersucht ist, erfordert Proteine, die in den Operons *moa*, *moe* und *mod* kodiert werden (MENDEL & SCHWARZ, 2002). Der erste Schritt der MPT-Biosynthese beinhaltet die Umformung eines Guanosinphosphates, wahrscheinlich GTP, zu einem Intermediat, welches als *Precursor Z* bezeichnet wird. An der Umsetzung beteiligt sind die Genprodukte von *moaA* und *moaC* (*E. coli* MoaA: Acc. Nr. P30745, MoaC: Acc. Nr. P30747). Zu beiden Proteinen finden sich Äquivalente bei *P. putida* KT2440 (36 % bzw. 69 % Identität). Das *P. putida* KT2440 MoaA Protein weist wie das *E. coli* MoaA neben zwei konservierten cysteinhaltigen Motiven, die vermutlich einen [3Fe4S]-Cluster binden, ein konserviertes C-terminales Doppelglycin-Motiv auf (MENÉNDEZ *et al.*, 1995). Die Anbindung der zwei Schwefelatome, die im MPT-Cofaktor die Dithiolengruppe formen, an den *Precursor Z* wird von der MPT-Synthase katalysiert. Dieses Enzym besteht aus zwei großen Untereinheiten, kodiert durch *moaE*, und zwei kleinen Untereinheiten, kodiert durch *moaD*. Zusätzlich wird in diesem Syntheseschritt die MPT-Synthase-Sulfurase MoeB zur Aktivierung von MoaD durch Thiocarboxylierung benötigt. Bei *P. putida* KT2440 finden sich hypothetische Genprodukte, denen die Funktionen von MoaE, MoaD bzw. MoeB zugesprochen werden und die 68 %, 45 % bzw. 50 % identische Aminosäurereste zu den *E. coli* Proteinen aufweisen (*E. coli* Acc. Nr.: MoaE: P30749, MoaD: P30748, MoeB: BAA35521). Essentiell für die Insertion eines Molybdän-Ions in den MPT-Cofaktor sind die Proteine MogA und MoeA. Putative *P. putida* KT2440 MogA und MoeA

Proteine weisen 31 % bzw. 45 % Identität auf Aminosäureebene zu den *E. coli* Proteinen (Acc. Nr. MogA: P28694, MoeA: 1FC5A) auf. *P. putida* KT2440 scheint alle Voraussetzungen zu erfüllen, einen funktionellen Molybdän-Pyranopterin-Cofaktor (MPT) synthetisieren zu können. Die Tatsache, dass *P. putida* KT2440 katalytisch aktive Qox synthetisiert, in der CMP als Dinukleotidanteil des Molybdän-Pyranopterin-Cofaktors nachgewiesen werden konnte (3.13.2.), setzt voraus, dass dieser Stamm außerdem über die nötigen Enzyme zur Synthese des MCD-Cofaktors verfügt. Das Enzym, welches wahrscheinlich in Analogie zur MGD-Synthese die Umsetzung von MPT und CTP zu aktivem MCD katalysiert, ist bis heute nicht bekannt. Das Enzym MobA, welches die Umsetzung von MPT und GTP zu MGD in Anwesenheit eines divalenten Kations katalysiert, ist hingegen strukturell und funktionell untersucht (LAKE *et al.*, 2000, GUSE *et al.*, 2003). Ein hypothetisches MGD-Biosynthese Protein A aus *P. putida* KT2440 zeigt 30 % identische Aminosäurereste zu MobA aus *E. coli* (Acc. Nr. P32173). Neben den Resten, denen Bedeutung bei der Bindung des MPT und der Ribose des Nukleotids zukommt, sind auch nahezu alle Reste in dem putativen *P. putida* KT2440 Protein konserviert, die an der Bindung des Guaninringes während der Interaktion des Enzyms mit dem Substrat GTP bzw. mit dem Produkt MGD beteiligt sind (LAKE *et al.*, 2000, GUSE *et al.*, 2003). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich in der Tat um ein MobA-Protein handelt, welches die Modifikation von MPT zu MGD katalysiert. Das Gen eines hypothetischen MobA homologen Proteins (ORF204) wurde von IGLOI & BRANDSCH (2003) im *nic*-Cluster von *A. nicotinovorans* pAO1 in der Nähe der Gene der MCD-haltigen Nikotin-Dehydrogenase und Keton-Dehydrogenase identifiziert. Im Sequenzvergleich des ORF204 Proteins mit dem *E. coli* MobA stellt man fest, dass einige der Aminosäurereste, die an der Bindung des MPT, der Ribose und des  $Mg^{2+}$  beteiligt sind (LAKE *et al.*, 2000) konserviert sind, während die Reste, die den Purinring des GTP binden, nicht vorhanden sind. Bei *P. putida* KT2440 findet sich jedoch neben dem hypothetischen MobA kein weiteres Protein, das ausgeprägte Homologien zu der ORF204 Sequenz aufweist. Da jedoch wie erwähnt noch kein Enzym identifiziert und charakterisiert wurde, welches die Insertion von CMP in den MPT-Cofaktor katalysiert, sind sequenzielle Vorhersagen, die sich auf Vergleiche mit dem gut untersuchten MobA stützen, rein hypothetischer Natur.

Bei *E. coli* wird zusammen mit MobA das Protein MobB in einer Transkriptionseinheit kodiert. Obwohl MobB nicht essentiell zur Biosynthese aktiven MGDs ist, scheint es durch Bildung eines MobA:MobB-Komplexes die Effizienz der Umformung von MPT zu MGD zu steigern (McLUSKEY *et al.*, 2003). Sequenzvergleiche mit dem *P. putida* KT2440 Genom zeigten kein homologes Protein zu *E. coli* MobB.

Für die DMSO-Reduktase aus *R. sphaeroides* wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit von MobA ausreichend ist, um aus MPT,  $Mg^{2+}$  und GTP *in vitro* einen funktionellen Bis-MGD-Cofaktor zu synthetisieren (TEMPLE & RAJAGOPALAN, 2000). Dagegen bedarf es zur

Biosynthese aktiver respiratorischer Nitrat-Reduktase aus *E. coli* eines systemspezifischen Chaperons, welches durch *narJ* kodiert wird, das zusammen mit den Strukturgenen des Enzyms eine Transkriptionseinheit *narGHJI* bildet. Für NarJ werden zwei Funktionen postuliert, i) Schutz des cytoplasmatischen Apoenzyms NarGH gegen endogene Proteasen und thermische Denaturierung, und ii) die Stabilisierung einer offenen Konformation von NarG in dem löslichen NarGH-Komplex, die die Insertion des MGD-Cofaktors in NarG erlaubt (SODERGREN *et al.*, 1988, LIU & DeMOSS, 1997, BLASCO *et al.*, 1998). NarJ ist nur bei der Synthese aktiver Nitrat-Reduktase in *E. coli* essentiell, eine NarJ-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Biosynthese aktiver TMAO-Reduktase in demselben Stamm (PALMER *et al.*, 1996). In der Biosynthese der *E. coli* TMAO-Reduktase wird jedoch ebenfalls ein spezifisches Chaperon (TorD) benötigt, um aktives Enzym in maximaler Ausbeute zu erhalten. Die Funktion von TorD ist wahrscheinlich ähnlich der von NarJ, die spezifische Bindung und Stabilisierung des cytoplasmatischen Proteins TorA, bevor der Molybdäncofaktor inseriert wird und die Molybdoreduktase TorA in das Periplasma transportiert wird (POMMIER *et al.*, 1998).

Neben dem zuerst von LEIMKÜHLER & KLIPP (1999) beschriebenen Chaperon XdhC, welches essentiell am Einbau des MPT-Cofaktors und/oder an der Faltung der Xanthindehydrogenase aus *R. capsulatus* beteiligt ist, konnten in den letzten Jahren viele Proteine gefunden werden, für die aufgrund von Sequenzähnlichkeiten eine entsprechende Funktion postuliert wurde. Die Gene, die für diese Proteine kodieren, finden sich häufig in der Nähe von Strukturgenen molybdänhaltiger Hydroxylasen. So findet man z. B. ORF377 im *nic*-Cluster von *A. nicotinovorans* pAO1, *coxI* und *coxF* befinden sich in der Nähe der Gene der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans*, *pucA* wird in einem Operon mit den Genen für die Xanthindehydrogenase in *B. subtilis* transkribiert und ORF3 ist stromaufwärts der Gene *qorMSL* in *P. putida* 86 lokalisiert. Auch bei *A. ilicis* Rü61a wurde stromabwärts von *qoxS* ein ORF gefunden (ORF1) (Abb. 47), der 37 % Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz von XdhC aus *R. capsulatus* zeigt. Im Genom von *P. putida* KT2440 findet sich ebenfalls ein Gen für ein hypothetisches Protein, welches 37 % identische Aminosäurereste zu dem XdhC von *R. capsulatus* und 26 % Identität zu dem hypothetischen XdhC (ORF1) aus *A. ilicis* Rü61a aufweist.

Bei XdhC-Homologen könnte es sich also eventuell um Proteine handeln, die ubiquitär an der Synthese aktiver molybdänhaltiger Hydroxylasen beteiligt sind. Da jedoch bisher keine weiteren Versuche zur Charakterisierung dieser hypothetischen Proteine unternommen wurden, kann nicht bestätigt werden, ob es sich allgemein um Chaperone handelt und wenn, ob diese spezifisch nur mit einem Enzym interagieren, oder ob sie innerhalb verschiedener molybdänhaltiger Hydroxylasen austauschbar sind. Ein Sequenzvergleich einiger dieser Proteine zeigt, dass sich sowohl im N-terminalen, als auch im C-terminalen Bereich konservierte Aminosäurereste befinden, während sich die Sequenzen im zentralen Bereich

stärker unterscheiden. Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass N-, und/oder C-terminaler Bereich eher katalytisch von Bedeutung sind, während im zentralen Bereich die Reste zu finden sind, die für die Determination der Enzymspezifität verantwortlich sind.

Da *P. putida* KT2440 in der Lage ist, Qox in aktiver Form zu synthetisieren, kann angenommen werden, dass für die Faltung und die Assemblierung des Proteins kein systemspezifisches Chaperon benötigt wird, zumindest keines, welches nicht auch von dem Wirtsstamm bereitgestellt werden kann. Was die mangelnde Aktivität der durch *P. putida* KT2440 synthetisierten Chinolin-2-Oxidoreduktase und Isochinolin-1-Oxidoreduktase betrifft, könnte ein fehlendes, sehr spezifisches Chaperon eine mögliche Erklärung sein. So scheint interessanterweise zwischen der Maschinerie der Enzymsynthese von *A. ilicis* und *P. putida* KT2440 eine größere Kompatibilität zu bestehen, als zwischen den näher verwandten Stämme *P. putida* 86 bzw. *B. diminuta* 7 und *P. putida* KT2440.

#### 4.3.2. Expression der *qox*-Gene in *P. putida* KT2440 pVK-Cosmidklonen

Während die Transkription der Gene *qoxLMS* in *P. putida* KT2440 pKP1 am *Pm* Promotor des Expressionsvektors pJB653 initiiert wird, sind in den Cosmidklonen regulatorische Strukturen an der Transkription beteiligt, die dem Herkunftsstamm *A. ilicis* Rü61a entstammen.

Bei *A. ilicis* Rü61a bewirkt die Induktion mit Chinaldin eine Steigerung der spezifischen Qox-Aktivität im Rohextrakt um das etwa 30-fache gegenüber dem konstitutiven Aktivitätsniveau, das im Rohextrakt von auf Vollmedium gezüchteten Zellen gemessen wird (persönliche Mitteilung von S. Sielker). In den *P. putida* KT2440 pVK-Cosmidklonen konnte eine Induktion der Qox-Synthese durch das Substrat festgestellt werden (Tab. 3), die eine 2- bis 8-fache Steigerung der spezifischen Aktivität zur Folge hatte. Es scheint also, dass es sich im Fall der *qox*-Gene um eine Effektor-abhängige Transkription handelt. In *P. putida* KT2440 pVK55/11 müsste jedoch ein wirtseigenes Regulatorprotein in die Transkription involviert sein, da auf dem 10,8 kb Insertfragment in pVK55/11 kein potentieller Transkriptionsregulator kodiert ist. Es ist anzunehmen, dass durch ein *P. putida* KT2440 Effektorprotein die Transkription der *qox*-Gene nicht so stringent reguliert wird, wie es in *A. ilicis* Rü61a der Fall ist, so dass die Differenz zwischen induzierter und konstitutiver Qox-Synthese bei *P. putida* KT2440 nicht so ausgeprägt ist wie bei *A. ilicis* Rü61a. Dass im Bereich der hypothetischen Promotorsequenzen sowohl direkte Wiederholungssequenzen als auch *inverted repeats* gefunden wurden (siehe Anhang 1 nt 16900- nt 17500), könnte ein Hinweis darauf sein, dass hier Regulator-Bindestellen vorliegen.

CARL *et al.* (2004) konnten beweisen, dass das XylS-verwandte Protein OxoS, welches von einem Gen in der Nähe der *qor*-Gene kodiert wird, als Transkriptionsregulator des *qorMSL*-Genclusters dient. BEIER *et al.* (2002) zeigten, dass PucR die Transkription der Xanthindehydrogenase-Gene *pucABCDE* inhibiert, während es ein Induktor für die Transkription von Genen der weiteren Purindegradation ist. Auch im *nic*-Gencluster von *A.*



Zelle vorliegen. Sind Benzoate als Effektoren vorhanden, binden diese an die N-terminale Domäne des XylS-Proteins und bewirken die Stabilisierung eines XylS-Dimers, das die aktive Form von XylS, bezogen auf die Transkriptionsstimulation, darstellt (RUIZ & RAMOS, 2002, RUIZ *et al.*, 2003). „Aktives“ XylS-Protein tritt über spezifische DNA-Bindestellen mit dem *Pm* Promotor in Interaktion und stimuliert hier die Transkription der Gene, die stromabwärts des Promotors liegen.

Die Aktivierung von XylS kann durch Benzoat oder an bestimmten Positionen durch Methylgruppen oder Halogene substituierte Benzoatderivate erfolgen (RAMOS *et al.*, 1986, RAMOS *et al.*, 1990). Zur Expression der *qoxLMS*-Gene wurde *P. putida* KT2440 pKP1/III in Mineralsalzmedium mit Benzoat als einzig verwertbare Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Fähigkeit, Benzoat vollständig über den  $\beta$ -Ketoacidweg zu metabolisieren, ist in *P. putida* KT2440 chromosomal kodiert (JIMÉNEZ *et al.*, 2002). Da die Konzentration des Benzoats im Medium damit jedoch einer ständigen Änderung unterlag, wurde 2-Methylbenzoat als zusätzlicher XylS-Effektor eingesetzt. Die Toluolat-1,2-Dioxygenase, welche in *P. putida* mt-2 auf dem TOL Plasmid (*xyXYZ*) kodiert ist und dort die Dihydroxylierung und Demethylierung des 2-Methylbenzoats katalysiert (GE *et al.*, 2002), hat kein Äquivalent auf dem Chromosom des *P. putida* mt-2 Derivats *P. putida* KT2440 (Komplette Genomsequenz von *P. putida* KT2440 unter [<http://www.tigr.org>]), so dass keine spezifische Umsetzung des 2-Methylbenzoats erwartet wurde. Eine sehr schwache cometabolische Umsetzung von 2-Methylbenzoat durch *P. putida* KT2440 kann jedoch eventuell durch die unspezifische Reaktion der Benzoat-Dioxygenase katalysiert werden (YAMAGUCHI & FUJISAWA, 1980). Durch mehrfaches Nachfüttern mit Benzoat und die lange Persistenz von 2-Methylbenzoat konnte bei der Kultivierung von *P. putida* KT2440 pKP1/III jedoch gewährleistet werden, dass über den gesamten Kultivierungszeitraum ein XylS-Aktivator im Medium vorlag.

Das „aktive“ XylS-Dimer bindet mit seinen C-terminalen Domänen an zwei sich wiederholende Sequenzabschnitte in der *Pm* Promotorregion, die zum Teil mit der -35 Region der Bindestelle der RNA-Polymerase überlagern. Es wird angenommen, dass durch die Nähe der Bindestellen für den Effektor und die RNA-Polymerase die Interaktionen, die zwischen XylS und der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase  $\alpha$ -Untereinheit bestehen und den Expressionslevel an dem *Pm* Promotor beeinflussen, erleichtert werden (RUIZ & RAMOS, 2001, RUIZ *et al.*, 2001, GONZÁLES-PÉREZ *et al.*, 2002). Die Transkription am *Pm* Promotor wird abhängig von der Wachstumsphase durch  $\sigma^{32}$ - bzw.  $\sigma^{38}$ -RNA-Polymerasen initiiert. Während die Transkription in der späten exponentiellen und in der stationären Phase  $\sigma^{38}$ -abhängig verläuft, bedarf es in der frühen exponentiellen Wachstumsphase eines  $\sigma^{32}$ -Faktors zur Transkription. In dieser Phase wird von Substraten, die auch der XylS-Aktivierung dienen, in der Zelle eine so genannte Hitze-Schock-Reaktion ausgelöst, wodurch einerseits eine Stabilisierung der vorhandenen  $\sigma^{32}$ -Moleküle, andererseits eine Aktivierung der Expression von

*rpoH* induziert wird (MARQUÉS *et al.*, 1999). Ein sehr geringer Level konstitutiver Expression von *Pm* aus wird eventuell durch unspezifische Bindung von  $\sigma^{70}$ -Faktoren mit den DNA Erkennungssequenzen erklärt.

Wurde *P. putida* KT2440 pKP1/III zur Gewinnung aktiver Qox in Fermentoren gezüchtet, wurden die Zellen bis in die späte exponentielle Phase kultiviert, bevor sie geerntet wurden. Studien zur Kinetik der Expression am *Pm* Promotor zeigten, dass diese in der stationären Phase, also unter  $\sigma^{38}$ -Kontrolle, am höchsten ist (WINTHER-LARSEN *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Qox-Synthese durchgeführt. Obwohl die Aktivierung von XylS während des gesamten Kultivierungszeitraums gewährleistet war, ist nicht auszuschließen, dass eine Maximierung der spezifischen Qox-Aktivität im Zellextrakt durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen erreicht werden kann. Dabei ist jedoch die hier erzielte spezifische Qox-Aktivität im Rohextrakt des Expressionsklons (0,06 U/mg) durchaus der spezifischen Qox-Aktivität im Rohextrakt des Wildtyps vergleichbar (0,052 U/mg) (STEPHAN *et al.*, 1996).

Obwohl das etablierte System keine Überexpression der *qox*-Gene erlaubt, wurde mit *P. putida* KT2440 pKP1 erstmals ein regulierbares Expressionssystem geschaffen, das es ermöglicht, durch gezielte Modifikationen der Chinaldin-4-Oxidase einen Einblick in die Struktur und Funktion des Enzyms zu gewinnen.

#### 4.4. Charakterisierung der Chinaldin-4-Oxidase aus *P. putida* KT2440 pKP1/III

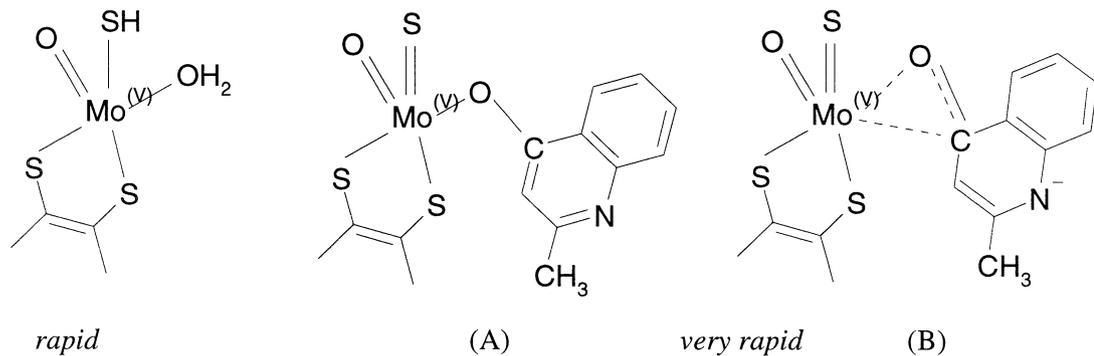
Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III wurde in vier Chromatographieschritten bis zur Homogenität gereinigt. Gegenüber einem zuvor durchgeführten Reinigungsprotokoll konnte die spezifische Aktivität des Enzyms bei einer 85-fachen Anreicherung auf 5 U/mg (3,3 U/mg bei STEPHAN *et al.*, 1996) gesteigert werden. Allerdings wurden ausgehend von 22 g feuchter Zellmasse (1390 mg Protein im Rohextrakt) nur 1,12 mg reine Qox gewonnen.

Das UV/Vis-Spektrum der gereinigten Qox ist charakteristisch für molybdänhaltige Hydroxylasen mit Fe/S-Zentren und FAD-Cofaktoren (COUGHLAN, 1980) und gleicht dem des Wildtyp-Enzyms in der Lage der Absorptionsmaxima, was auf eine identische Proteinumgebung der Cofaktoren hindeutet. Das Verhältnis  $A_{460\text{nm}}/A_{550\text{nm}}$  beträgt im Spektrum der gereinigten Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III 3,3, was nach RAJAGOPALAN & HANDLER (1967) in molybdänhaltigen Hydroxylasen auf ein Verhältnis von Eisen zu FAD von 4:1 schließen lässt. Leider konnte durch die Metallanalyse die Unversehrtheit der redoxaktiven Zentren nicht bestätigt werden. Da jedoch der Gesamtgehalt an gefundenem Eisen bzw. Molybdän sowohl im aktiven Enzym aus *P. putida* KT2440 pKP1 als auch im aktiven Wildtyp-Enzym weit unterhalb des erwarteten Metallgehaltes lag, kann hier eher ein methodischer Fehler vermutet werden, als ein wirklicher Defekt in den Enzymen. Eine mögliche Fehlerquelle war eventuell der Verzicht auf einen Aufschluss der Enzyme, z. B. durch Kochen

in konzentrierter Salpetersäure, vor der Messung, so dass nicht alle Metallatome im Emissionsspektrum erfasst werden konnten. Die Sensitivität der Methode hätte eigentlich ausreichen sollen, auch in geringen Enzymmengen beide Metalle in gleichem Maße zu erfassen. Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie können die paramagnetischen Zustände der redoxaktiven Zentren der Qox (Molybdän, zwei ESR-spektroskopisch unterschiedliche [2Fe2S]-Zentren (I und II) und FAD) erfasst werden. Vergleiche z. B. der spezifischen Zustände der Molybdänzentren oder der Signale der [2Fe2S]-Zentren des heterolog synthetisierten Enzyms und des Wildtyp-Enzyms können Aufschluss über das Vorhandensein und die Unversehrtheit der Zentren geben.

Reduktion der Enzyme unter anoxischen Bedingungen mit Chinoldin versetzte das oxidierte  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  in den katalytisch kompetenten „*very rapid*“ ( $\text{Mo}^{\text{V}}$ )-Zustand. Das ESR-Signal des  $\text{Mo}$ -Zentrums in diesem Zustand, in dem das Enzym mit zwei Elektronen reduziert ist und das oxidierte Reaktionsprodukt noch mit dem Enzym verbunden ist (Abb. 44) (KAPPL *et al.*, 2002), konnte in beiden Enzymen bei einer Temperatur von 65 K detektiert werden. Die  $g$ -Faktoren des „*very rapid*“  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Signals der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III gleichen denen, die für das Wildtyp-Enzym unter denselben Versuchsbedingungen und auch schon in früheren Versuchsreihen (CANNE *et al.*, 1997) gefunden wurden. Die Identität des Signals des katalytischen Intermediates kann als Beweis für die identische Konformation des  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Zustandes der beiden Qox-Präparate gewertet werden. Unter denselben Bedingungen wurden in beiden Enzymen auch  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Signale aufgezeichnet, die als „*rapid*“-Signale bezeichnet werden. Neben dem Enzym-Produkt-Komplex scheint daher auch ein Zustand vorzuliegen, bei dem sich das Substrat zwar im aktiven Zentrum befindet, aber nicht direkt an das Enzym gebunden ist (Abb. 44) (KAPPL *et al.*, 2002). Messung derselben substratreduzierten Probe von der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III bei niedrigeren Temperaturen (15 K bis 25 K) ließ die  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Signale verschwinden und Signale, die dem [2Fe2S]-Zentrum II zugeordnet werden, erscheinen. Bestimmungen der Mittelpunkts-Redoxpotentiale der [2Fe2S]-Cluster der Qox aus *A. ilicis* Rü61a ergaben für das FeSII-Zentrum ein Redoxpotential von -70 mV, während das Redoxpotential des FeSI-Zentrums mit -250 mV viel niedriger liegt (CANNE *et al.*, 1997). Bei partieller Reduktion des Enzyms kommt es zu einer Verteilung der Elektronen auf die redoxaktiven Zentren, die abhängig ist von den Redoxpotentialen der Zentren (OLSON *et al.*, 1974). Bei partieller Reduktion des Enzyms aus *P. putida* KT2440 pKP1/III war, wie es auch bei dem Wildtyp-Enzym zu beobachten ist, das Signal des FeSII-Zentrums zuerst zu detektieren. Daraus lässt sich schließen, dass die Verhältnisse der Redoxpotentiale der [2Fe2S]-Zentren beider Enzyme vergleichbar sind. Nach vollständiger Reduktion der Enzyme mit Dithionit lagen beide [2Fe2S]-Zentren komplett im paramagnetischen Zustand vor. Die Signale des nun auch detektierbaren FeSI-Zentrums sind ebenfalls für beide Enzympräparationen nahezu identisch. Dieses [2Fe2S]-Zentrum der Qox zeichnet sich durch ein axiales ESR-Signal

aus, welches für dieses Enzym charakteristisch ist (KAPPL *et al.*, 2002). Dass dieses spezielle Signal auch bei der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III anzutreffen ist, lässt auf eine konservierte strukturelle Umgebung dieses Metallclusters schließen. ESR-spektroskopische Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen dem Mo<sup>V</sup>-Signal und den [2Fe2S]-Signalen gaben Aufschluss darüber, dass es sich bei dem FeSI-Zentrum um jenes handelt, welches proximal zu dem Mo-Zentrum liegt, während das FeSII-Zentrum in weiterer Entfernung zum Mo-Zentrum eher an der Enzymoberfläche lokalisiert ist (KAPPL *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse sind konsistent mit den für die [2Fe2S]-Cluster ermittelten Redoxpotentialen der Qox. Die leichte Verschiebung der g<sub>3</sub>-Komponente und die Asymmetrie, die bei der g<sub>1</sub>-Komponente des FeSII-Signals bei dem Enzym aus *P. putida* KT2440 pKP1/III gefunden wurden, können eventuell auf das gleichzeitige Vorhandensein von Substrat und Dithionit im Probenansatz zurückgeführt werden. Aufgrund der exponierteren Lage des FeSII-Clusters ist hier ein stärkerer Einfluss gegenüber dem Lösungsmittel zu verzeichnen als bei dem FeSI-Zentrum.



**Abb. 44**

Schematische Darstellungen des Molybdän-Zentrums im substratgebundenen („*very rapid*“) bzw. substratassoziierten („*rapid*“) Zustand.

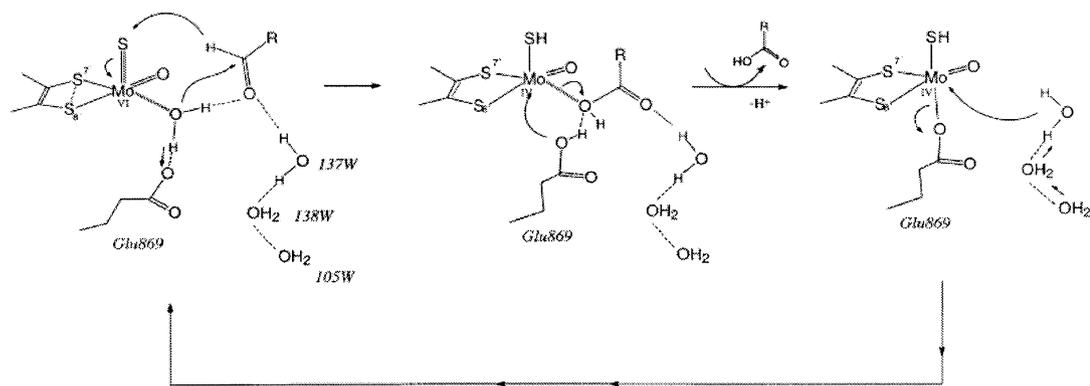
Zu dem substratgebundenen Zustand des reduzierten Mo-Zentrums werden verschiedene Bindungsmöglichkeiten postuliert (A und B), die sich aus den unterschiedlichen Reaktionsmechanismen ableiten, welche für den reduktiven Teil der Reaktion des Substrates an dem Mo-Zentrum molybdänhaltiger Hydroxylasen postuliert werden (vergl. 4.5.) (Abb. nach KAPPL *et al.*, 2002).

Das FADH<sup>•</sup>-Signal der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1/III weist eine Peak zu Peak Linienbreite von 1,6 mT auf, was auf ein anionisches (rotes) FAD-Radikal schließen lässt, welches auch bei dem Wildtyp-Enzym detektiert wurde. Dies ist ebenfalls ein Charakteristikum der Qox; bei der Qor aus *P. putida* 86 und der eukaryotischen Xanthindehydrogenase findet sich die protonierte, neutrale Form des FAD-Radikals (KAPPL *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse der ESR- und UV/Vis-spektroskopischen Analysen und der Nachweis, dass nach saurer Hydrolyse der Qox CMP freigesetzt wird, welches höchstwahrscheinlich im nativen Enzym als Nukleotidanteil in dem Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor gebunden ist, sind deutliche Hinweise, dass in dem Enzym aus *P. putida* KT2440 pKP1/III alle an der Redoxreaktion beteiligten Zentren in der selben funktionellen Weise vorliegen wie in dem Wildtyp-Enzym. Dies wird durch die kinetischen Parameter, die vergleichend für die heterolog synthetisierte Qox und das Wildtyp-Enzym bestimmt wurden, bestätigt.

#### **4.5. Gerichtete Mutagenese von *qoxL* zum Austausch des potentiell katalytisch essentiellen Glutamatrestes 736**

Wie unter 4.2. beschrieben, findet sich in der Aminosäuresequenz von QoxL an Position 736 ein Glutamatrest, der bei allen molybdänhaltigen Hydroxylasen konserviert ist. Aufgrund der Nähe, in der dieser Aminosäurerest bei der MOP, der MOD und der Cox zu dem katalytisch aktivem Molybdänzentrum detektiert wurde (ROMÃO *et al.*, 1995, REBELO *et al.*, 2001, DOBBEK *et al.*, 2002) wird diesem Glutamatrest eine katalytische Relevanz zugesprochen. Für die Reaktion der Aldehyd-Oxidoreduktasen wurde ein Mechanismus postuliert, in dem die Carboxylatgruppe des Glutamatrestes (E869 in MOP) in der Funktion einer Base den Wasserliganden des Molybdäns im aktiven Zentrum des Enzyms deprotoniert und damit einen nukleophilen Angriff des Sauerstoffs desselben Moleküls auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats erleichtert (Abb. 45). Gleichzeitig wird ein Hydrid-Ion von dem Aldehyd auf den Sulfidoliganden des Molybdäns übertragen. Das OH<sup>-</sup> des deprotonierten Wasserliganden bindet an das Carbonyl-C-Atom des Substrats, bleibt jedoch vorübergehend auch noch mit dem Molybdän verbunden. Eine transiente Bindung des Carboxylatrestes des Glutamats an das Molybdän erleichtert die Dissoziation des Carbonsäureproduktes. Diese Ligandenposition wird im Folgenden wieder von einem Wassermolekül eingenommen (HUBER *et al.*, 1996, ROMÃO *et al.*, 1997, REBELO *et al.*, 2000). Dieses Modell lässt sich auch auf die Reaktion an Substraten anderer molybdänhaltiger Hydroxylasen übertragen, bei denen die Hydroxylierung an einem C-Atom mit partiell positiver Ladung stattfindet.

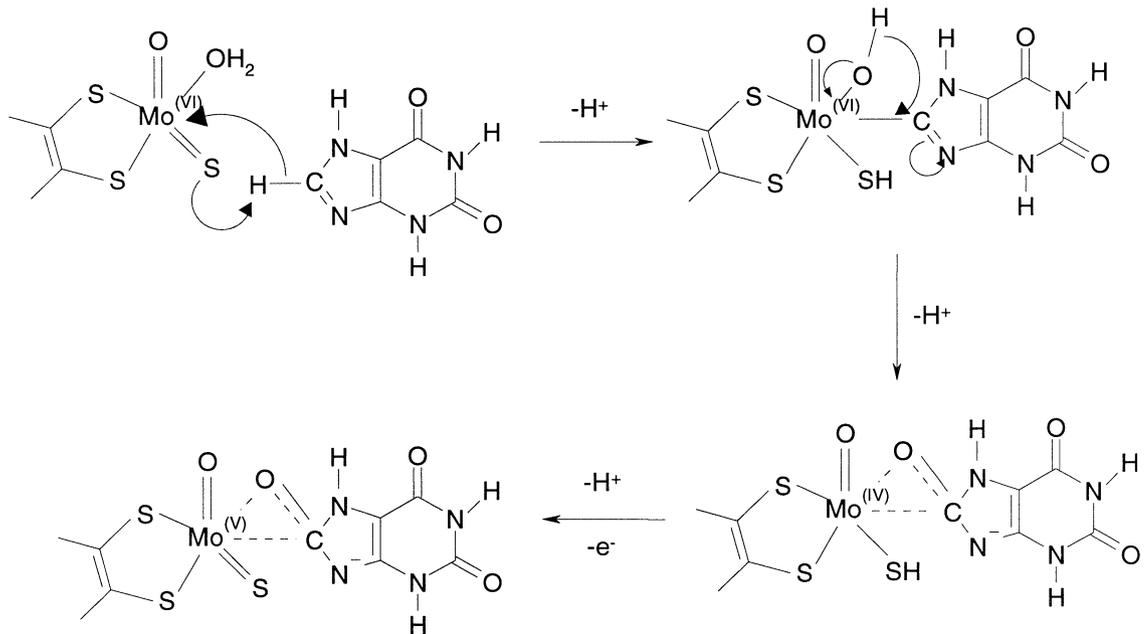
**Abb. 45**

Reaktionsmechanismus der Enzymreduktion, wie er für die Aldehyd-Oxidoreduktase aus *D. gigas* postuliert wird (aus ROMÃO *et al.*, 1997).

Der Austausch des Glutamatrestes 736 in QoxL gegen einen Glutaminrest führte zum vollständigen Verlust der messbaren Qox-Aktivität im Rohextrakt von *P. putida* KT2440 pKP1E736Q Zellen, die in Gegenwart von Benzoat und 2-Methylbenzoat gezüchtet worden waren. Nach 12stündiger Inkubation im Enzymtestgemisch konnte in einer nativen PAGE jedoch eine sehr schwache Qox-spezifische Bande detektiert werden. Diese weist dieselbe elektrophoretische Mobilität auf wie die aktive Qox aus dem Expressionsklon *P. putida* KT2440 pKP1/III, was als Zeichen vergleichbarer Proteinfaltung gewertet werden kann. Um diese minimale Restaktivität zu quantifizieren und um zu definieren, ob die Mutation die Substratbindung oder die Katalyse beeinflusst, müsste das modifizierte Enzym jedoch in hohem Maße angereichert werden, um mit der reinen QoxE736Q die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $k_{cat}$  zu bestimmen.

Da ein Glutaminrest nicht als Protonenakzeptor in der Enzymkatalyse wirken kann, dürfte auch der nukleophile Angriff des Sauerstoffs des Wasserliganden an das Substratmolekül erschwert sein. LOWE *et al.* (1997) postulierten neben dem oben vorgeschlagenen einen weiteren Reaktionsmechanismus, der in Abbildung 46 mit Xanthin als Substrat dargestellt ist. In diesem Mechanismus erfolgt zuerst eine Bindung des zu hydroxylierenden C-Atoms an das Molybdän. Erst in einem zweiten Schritt folgt ein nukleophiler Angriff des (durch den Glutamatrest) deprotonierten Wasserliganden auf das gebundene C-Atom, was zur Entstehung eines Dreiringsystems zwischen Molybdän, Kohlenstoff und Sauerstoff führt. In diesem Stadium wird das  $Mo^{VI}$  zu  $Mo^{IV}$  reduziert. Geht man von diesem Reaktionsmechanismus aus, so liegen die Reaktionspartner Wassersauerstoff und Kohlenstoffatom räumlich näher zusammen, als bei dem von ROMÃO *et al.* (1997) postulierten Mechanismus, was eine Bindung erleichtern könnte. Bei dem für die MOP postulierten Mechanismus muss das Hydroxid-Ion über eine Entfernung von 3,4 Å (HUBER *et al.*, 1996) transferiert werden, um an das nukleophile C-Atom zu binden.

Geht man weiterhin davon aus, dass bei einem pH von 8,5, bei dem der Qox-Enzymtest durchgeführt wird, das Dissoziationsgleichgewicht des Wassers leicht auf die Seite der Hydroxid-Ionen verschoben ist, so kann man sich vielleicht vorstellen, dass in seltenen Fällen auch ohne Aktivierung des Wasserliganden eine Bindung zwischen dem Chinaldin C4 und dem Sauerstoff erfolgt, was zur Reduktion des modifizierten Enzyms führt. Zudem hat die Aminosäure Glutamin einen polaren Charakter, der sich unterstützend durch Polarisierung des Wassermoleküls auf die Reaktion auswirken könnte.

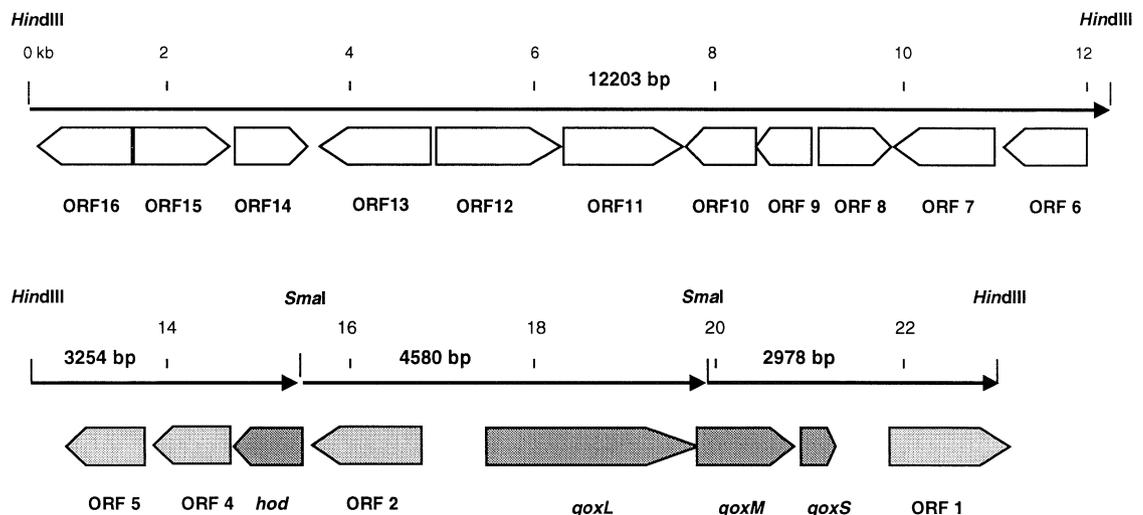


**Abb. 46**

Reaktionsmechanismus der Enzymreduktion am Beispiel der Xanthinoxidase (nach LOWE *et al.*, 1997).

#### 4.6. Chinaldin-Degradation durch *Arthrobacter ilicis* Rü61a

Wie in Versuchen zur cometabolischen Umsetzung gezeigt werden konnte, ist *P. putida* KT2440 pVK55/11 genauso wie *P. putida* KT2440 pVK55B/5 in der Lage, Chinaldin zu Anthranilat abzubauen. Da der Wirtstamm *P. putida* KT2440 außer Catechol keines der Substrate, die als Intermediate des Anthranilatweges bekannt sind (HUND *et al.*, 1990), umsetzen kann, ist diese Fähigkeit der Cosmidklone auf Enzyme zurückzuführen, die auf dem 10,8 kb langen *Hind*III-Fragment der Cosmidinserts kodiert sind (Abb. 47, unteres *Hind*III-Fragment). Neben den Strukturgenen der Qox wurde auf diesem Fragment auch das Gen, welches für die 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase (*Hod*) kodiert, identifiziert. Die *Hod* katalysiert die dioxygenolytische Ringspaltung von 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin zu *N*-Acetylanthranilat und Kohlenmonoxid. Während nahezu alle bekannten Dioxygenasen entweder ein Übergangsmetall und/oder einen organischen Cofaktor zur Aktivierung molekularen Sauerstoffs benötigen, bildet die *Hod* zusammen mit der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinolin-2,4-Dioxygenase aus *P. putida* 33/1 eine Ausnahme, da beide Enzyme, die zu den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gehören, keine Cofaktoren besitzen (FISCHER *et al.*, 1999, FISCHER & FETZNER, 2000, FETZNER, 2002). Es wird für diese Enzyme ein Mechanismus diskutiert, bei dem ein Histidinrest in der Funktion einer Base ein Proton vom Substratanion abstrahiert. Das dadurch generierte Dianion des Substrats könnte molekularen Sauerstoff durch Übertragung eines Elektrons aktivieren.



**Abb. 47**

Gencodierende Bereiche auf dem 23 kb Insert des Cosmids pVK55B/5.

Die offenen Pfeile geben die Lage der ORFs auf dem 23 kb Fragment an (siehe auch Tab. 4), bekannte Gene sind dunkelgrau (*qoxLMS*: Gene der Chinaldin-4-Oxidase, *hod*: Gen der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase), potentiell am Chinaldin-Abbau beteiligte sind hellgrau; durchgezogene Pfeile symbolisieren die Sequenzabschnitte, die zur Sequenzierung subkloniert wurden, zur Subklonierung genutzte Restriktionsschnittstellen sind bezeichnet (vergl. 3.7.).

#### 4.6.1. Die 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase

Stromaufwärts des *hod*-Gens wurde ein ORF (ORF2) definiert, der identisch ist mit dem bei BETZ *et al.* (2000) beschriebenen ORF491. Das ORF2 Genprodukt zeigt 58,4 % Ähnlichkeit (36,1 % Identität) zu der 2-Methyl-3-hydroxypyridin-5-carbonsäure Oxygenase aus *Pseudomonas* sp. MA-1. Dies Enzym katalysiert die oxygenolytische Ringspaltung von 2-Methyl-3-hydroxypyridin-5-carbonsäure zu  $\alpha$ -(*N*-Acetylamino-methylen)-Succinat im Abbau von Vitamin B<sub>6</sub> (CHAIYEN *et al.*, 1997). Weitere (hypothetische) Proteine, die hohe Sequenzähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz des ORF2 Genproduktes aufweisen, gehören alle zu den Flavin-haltigen Monooxygenasen, welche den Einbau eines Sauerstoffatoms von molekularem Sauerstoff in einen aromatischen Ring katalysieren. Das zweite Sauerstoffatom wird bei diesen Enzymen entweder durch das Substrat oder durch ein Cosubstrat zu Wasser reduziert.

Durch Erzeugung einer *P. putida* KT2440 pVK55B/5 ORF2'-Mutante konnte gezeigt werden, dass dieses Gen für die 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase kodiert, welche in *A. ilicis* Rü61a die Umsetzung von 1H-4-Oxochinaldin zu 1H-3-Hydroxy-4-oxochinaldin katalysiert. *P. putida* KT2440 pVK55B/5 ORF2'-Mutanten waren nicht mehr in der Lage, Chinaldin cometabolisch zu Anthranilat umzusetzen, sondern akkumulierten 1H-4-Oxochinaldin im Medium; auch im Rohextrakt dieser Mutanten konnte keine Monooxygenase-Aktivität nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase aus *A. ilicis* Rü61a NADPH und nicht NADH als reduzierendes Cosubstrat nutzen kann.

LESK (1995) zeigte anhand von Strukturvergleichen NAD(P)-bindender Dehydrogenasen, dass das konservierte Motiv GXGXXG, welches einen *loop* (*P-loop*) zwischen dem ersten  $\beta$ -Strang und der ersten  $\alpha$ -Helix der Dehydrogenase-Domäne formt und den ADP-Anteil des Cosubstrates bindet, in einem Abstand von ca. 20 Aminosäuren von einem konservierten Aspartatrest in NAD-bindenden Dehydrogenasen gefolgt wird, welcher bei Dehydrogenasen, die NADPH als Cosubstrat nutzen, nicht vorhanden ist. EPPINK *et al.* (1997, 1998a, 1998b, 1999a, 1999b) stellten jedoch fest, dass ein solches konserviertes Motiv zur Bindung des NAD(P)H-Cosubstrates bei Flavoprotein-Monooxygenasen nicht vorhanden ist, während ein *P-loop* und eine  $\beta\beta$ -Sekundärstruktureinheit zur Bindung des ADP-Anteils des FAD-Cofaktors in einer N-terminalen Domäne konserviert ist. Der N-terminale Teil des ORF2 Proteins zeigt Homologien zu der FAD-Bindedomäne bekannter Flavin-haltiger Monooxygenasen und hier finden sich auch *P-loop* formende Aminosäuresreste und eine potentielle  $\beta\beta$ -Sekundärstruktur im Bereich der Positionen AS 7 bis AS 35. Eine zweite Version dieses Motivs, das an der Bindung des NADPH-Cosubstrates beteiligt sein könnte, liegt jedoch nicht vor. Anhand eingehender kristallographischer, spektroskopischer und kinetischer Untersuchungen und durch Mutageneseexperimente an der *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH) aus *P. fluorescens*

wurde festgestellt, dass der Pyridinnukleotid-Cofaktor bei dieser Flavoprotein-Monooxygenase sowohl von Aminosäureresten der FAD-Bindedomäne, als auch von Resten der Substrat-Bindedomäne koordiniert wird (EPPINK *et al.*, 1998b). Das Genprodukt von ORF2 zeigt 34 % Ähnlichkeit und 27 % Identität zu der PHBH (Acc. Nr. P00438). Die Spezifität für NADPH (gegenüber NADH) als Cosubstrat wird bei der PHBH unter anderem durch Reste (R33, Y38, R42) definiert, die an der Formation der  $\alpha$ -Helix2 in der N-terminalen Domäne beteiligt sind und durch H-Brücken bzw. ionische Wechselwirkungen in Interaktion mit dem 2'-Phosphat des NADPH stehen (EPPINK *et al.*, 1998a, 1999a). In dem ORF2 Protein findet man jedoch nur zu PHBH R33 einen korrespondierenden Rest (R36). 1997 postulierten EPPINK *et al.* ein *fingerprint*-Motiv für Flavoprotein-Hydroxylasen (AS 153-166 der PHBH aus *P. fluorescens*), in dem Reste konserviert sind, die durch Stabilisierung der Proteinstruktur sowohl an der Koordination des FAD-Cofaktors, als auch an der des NADPH-Cosubstrates beteiligt sind. Die hoch konservierten Reste D159 und R166 in dem Motiv der PHBH sind auch im ORF2 Protein konserviert (D162, R169); ein Aminosäureaustausch in der Position 166 der PHBH führte zu einer markanten Erniedrigung der Affinität gegenüber NADPH, so dass dieser Rest für die Positionierung des Cosubstrates essentiell zu sein scheint (EPPINK *et al.*, 1999a).

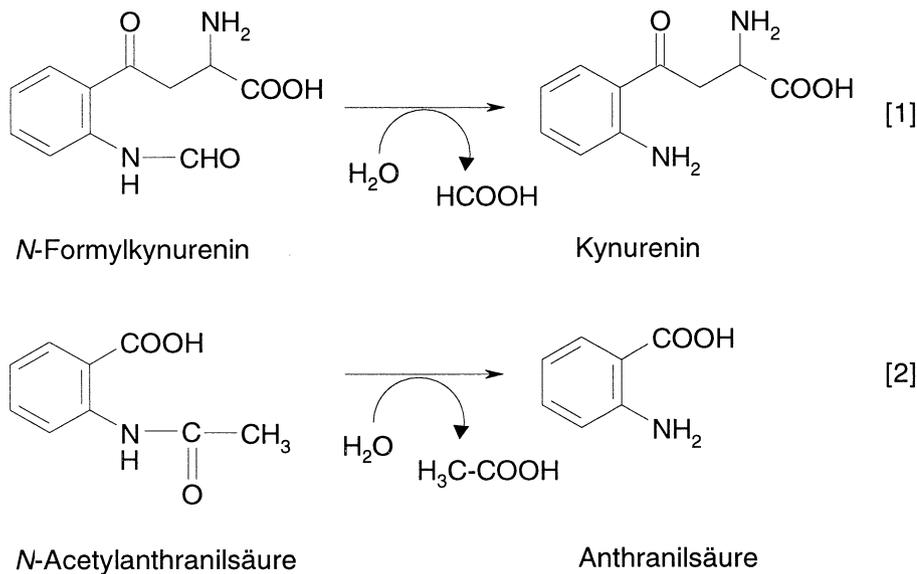
Obwohl die 1H-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase ebenfalls NADPH als reduzierendes Cosubstrat nutzt, sind einige der Aminosäurereste, die in der PHBH aus *P. fluorescens* für die Bindung des Cosubstrates essentiell sind, im ORF2 Protein nicht vorhanden. Eine Vorhersage über eine mögliche Beteiligung bestimmter Aminosäurereste an der Cosubstratbindung in dem ORF2 Protein ist daher eher hypothetisch.

#### 4.6.2. Die N-Acetylanthranilat-Amidase

Disruption des ORF4 durch Insertion einer *nptII*-Kanamycinresistenzkassette in *P. putida* KT2440 pVK55B/5 führte in diesem Stamm zum Verlust der Fähigkeit N-Acetylanthranilat zu Anthranilat umzusetzen. Dies konnte durch Versuche zur cometabolischen Umsetzung von Chinaldin bewiesen werden, da hier N-Acetylanthranilat im Medium akkumulierte. Im Rohextrakt von ORF4-Mutanten von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 konnte keine Aktivität der N-Acetylanthranilat-Amidase detektiert werden. Das führt zu dem sicheren Schluss, dass ORF4 für die N-Acetylanthranilat-Amidase codiert, welche den vierten Schritt des Chinaldin-Abbaus über den Anthranilatweg durch *A. ilicis* Rü61a katalysiert.

Obwohl es sich bei dem ORF4 Protein um eine Amidase handelt, enthält die Aminosäuresequenz nicht das Motiv G(A/G)S(G/S)(G/S)G, das in vielen anderen Amidasen konserviert gefunden wird (FOURNAND & ARNAUD, 2001). Dagegen scheint das Enzym nahe verwandt zu sein mit Enzymen, die der B-Typ Carboxylesterase-Familie und im Besonderen der Unterfamilie der Esterasen/Lipasen/Thioesterasen angehören. Markante Übereinstimmungen zeigen sich zu der Kynurenin-Formamidase aus der Maus. Dieses Enzym

katalysiert den zweiten Schritt im Abbau von Tryptophan zu Kynurensäure, die Hydrolyse von *N*-Formylkynurenin zu Kynurenin (PABARCUS & CASIDA, 2001). Sowohl das ORF4 Protein, als auch die Kynurenin-Formamidase katalysieren die Hydrolyse einer Amidbindung in einem Arylamid (Abb. 48).



**Abb. 48**

Vergleich der von der Kynurenin-Formamidase [1] bzw. der *N*-Acetylanthranilat-Amidase [2] katalysierten Reaktionen.

Anhand von Sequenzanalysen und Modulation der Sekundärstruktur wird die Kynurenin-Formamidase in die Superfamilie der Enzyme mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung eingeordnet, innerhalb derer sie ebenfalls starke Sequenzähnlichkeiten zu der Unterfamilie der Esterasen/Lipasen /Thioesterasen aufweist. Sowohl für die Kynurenin-Formamidase, als auch für das ORF4 Protein konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die an einer katalytischen Triade beteiligt sein könnten. Sensitivität der Kynurenin-Formamidase gegenüber Diazoxon (einer organische Phosphatesterverbindung), welches ein Inhibitor von Serin-Proteasen ist, führt zu dem Schluss, dass auch in der Kynurenin-Formamidase ein katalytisch relevanter Serinrest vorliegen muss. Die Lage der Sekundärstrukturelemente, die für das ORF4 Protein vorhergesagt werden konnten, zeigt ausreichende Übereinstimmungen mit der für die Kynurenin-Formamidase modellierten Sekundärstruktur, um postulieren zu können, dass es sich bei dem ORF4 Protein ebenfalls um ein Enzym mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung handeln könnte. Die nukleophile Aminosäure der katalytischen Triade ist bei  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen immer in einem so genannten „nukleophilen Ellenbogen“ der Proteinstruktur lokalisiert (NARDINI & DIJKSTRA, 1999); Reste, die diese Struktur formen, liegen in dem Konsensusmotiv Sm-X-Nu-X-Sm (Sm: kleine AS, Nu: nukleophile AS, X: beliebige AS). In dem ORF4 Protein ist das Nukleophil der

potentiellen Triade (Ser 155) in die Sequenz GSSAG eingebettet, die dem Konsensusmotiv folgt. Der gezielte Austausch der Aminosäurereste, denen hier potentielle katalytische Relevanz zugesprochen wurde, könnte Aufschluss darüber geben, ob das ORF4 Protein tatsächlich eine katalytische Triade besitzt.

#### 4.6.3. Ist das Genprodukt von ORF5 an der Chinaldin-Degradation beteiligt?

Anhand von Sequenzvergleichen und Sekundärstrukturvorhersagen kann vermutet werden, dass ORF5 für ein Transporterprotein kodiert, das eventuell zu der Superfamilie der *Major Facilitator* (MFS-Transporter) gehört.

Da ORF5 benachbart zu Genen liegt, die für Enzyme des Chinaldin-Abbaus kodieren (Abb. 47), könnte angenommen werden, dass der potentielle durch ORF5 kodierte Transporter entweder das Substrat Chinaldin oder eines der Abbauzwischenprodukte durch die Cytoplasmamembran transportiert. Insertionsinaktivierung von ORF5 in dem Cosmidklon *P. putida* KT2440 pVK55B/5 zeigte in ersten Versuchen im Vergleich zu dem unveränderten Klon *P. putida* KT2440 pVK55B/5 keinen Effekt bezüglich der Chinaldinaufnahme, während eine etwas längere Verweildauer des Zwischenproduktes *N*-Acetylanthranilat im Medium festgestellt werden konnte. BUGG *et al.* (2000) untersuchten den Transport polyzyklischer Aromaten durch die Membran bei *P. fluorescens* LP6a und postulierten die Aufnahme dieser Substrate in die Zelle durch passive Diffusion, während gleichzeitig Hinweise auf eine energieabhängige Effluxpumpe für diese hydrophoben Substanzen gefunden wurden. Geht man also davon aus, dass das hydrophobe Substrat Chinaldin durch Diffusion in die Zelle gelangt, könnte es sich bei dem ORF5 Genprodukt eventuell um einen Transporter zur Aufnahme von *N*-Acetylanthranilat handeln.

PAO *et al.* (1998) klassifizierten die MFS-Transporter in 17 Familien, begründet einerseits durch Sequenzhomologien, andererseits durch die Spezifität der Proteine gegenüber den transportierten Substraten. In der *Transport Commission Database* der University of California, San Diego [<http://tcd.ucsd.edu/tcdb/tcfamilybrowse.php?tcname=2.A.1#protein>], sind heute 38 Familien der MFS-Transporter anhand derselben Kriterien definiert.

Häufig findet man die Gene, die für Transporter der Familie „Symporter von aromatischen Säuren und H<sup>+</sup>“ (AAHS-Transporter) (PAO *et al.*, 1998) kodieren, in Operons mit Genen vor, welche für Enzyme der Degradation des aromatischen Substrates kodieren. In *Acinetobacter calcoaceticus* befindet sich *benK*, das für einen Benzoat-Transporter kodiert, benachbart zu *benM* und dem Operon *benABCDE*, welche für einen Benzoat-abhängigen Transkriptionsregulator bzw. Enzyme des Abbaus von Benzoat zu Catechol kodieren (COLLIER *et al.*, 1997, CLARK *et al.*, 2002). In demselben Stamm findet man auch das *pca*-Operon (*pcaJFBDKCHG*), welches für Enzyme des Protocatechuat-Abbaus über den  $\beta$ -Ketoacidat-Weg kodiert und das Gen für den 4-Hydroxybenzoat-Transporter (*PcaK*),

einschließt (KOWALCHUK *et al.*, 1994). Bei *P. putida* findet man das Gen *pcaK* in einem Cluster mit *pcaR* und *pcaF*, die für einen Transskriptionsregulator für die in den  $\beta$ -Ketoacid-Weg involvierten Gene und die  $\beta$ -Ketoacid-Coenzym A Thiolase kodieren (HARWOOD *et al.*, 1994). Da die Aminosäurereste des Familien-spezifischen Motivs, welches für die AAHS Familie definiert wurde (PAO *et al.*, 1998), in dem entsprechenden Sequenzabschnitt des ORF5 Proteins wenig konserviert sind, kann das durch ORF5 kodierte Protein kaum in die Familie der AASH-Transporter eingeordnet werden. DITTY & HARWOOD (2002) beschrieben außerdem für die Familie der AASH-Transporter weitere konservierte Reste, die erwiesenermaßen für den 4-Hydroxybenzoat-Transport durch PcaK in *P. putida* essentiell sind; diese liegen jedoch in der Sequenz des ORF5 Proteins ebenfalls zum größten Teil nicht konserviert vor.

MSF-Transporter, die organische Anionen wie Phthalat oder 4-Hydroxyphenylacetat als Substrate haben, findet man auch in der Familie der „Anion: Kation Symporter“. Zu dem Phthalat-Transporter Pht1 aus *P. putida* (Acc. Nr. Q05181) weist das ORF5 Protein im N-terminalen Bereich ausgeprägte Homologien auf. Eine eindeutige Zuordnung zu einer der Familien der MFS-Transporter war anhand der bei PAO *et al.* (1998) beschriebenen Konsensussequenzen und BLASTP-Vergleichen innerhalb Datenbank der MFS-Transporter [<http://tcd.ucsd.edu/tcdb/database.php>] für den durch ORF5 kodierten Transporter jedoch nicht möglich.

Da es wahrscheinlich ist, dass *P. putida* KT2440 als Wirtstamm der Cosmide pVK55B/5orf5nptII(+) bzw. (-) durch eigene Transportproteine den Defekt der ORF5-Mutanten komplementieren kann, müsste ORF5 direkt auf dem Plasmid pAIL in *A. ilicis* Rü61a ausgeschaltet werden, um die Frage zu klären, ob es sich tatsächlich um ein Transportprotein für *N*-Acetylanthranilat handelt.

#### 4.6.4. Gencluster im Aromatenabbau

Wie gezeigt werden konnte, sind die Enzyme, welche die Umsetzung von Chinaldin zu Anthranilat katalysieren, und eventuell ein Transportprotein für eines der Abbauintermediate, auf einem 9 kb großen DNA-Abschnitt kodiert, der auf dem Plasmid pAIL in *A. ilicis* Rü61a lokalisiert ist. Die Organisation von Genen, die für Enzyme des Abbaus aromatischer Substrate kodieren, in Clustern ist in einer Reihe von Stämmen zu beobachten und häufig sind ähnliche oder identische Gencluster degradativer Enzyme in verschiedenen Stämmen anzutreffen (vergl. 1.1.) (HABE *et al.*, 2003, VAN DER MEER *et al.*, 1992, HICKEY *et al.*, 2001, IGLOI & BRANDSCH, 2003, MISHRA *et al.*, 2001, REAMS & NEIDLE, 2003). Das Ausmaß der Ähnlichkeiten der genetischen Organisation und sogar von Nukleotid-Sequenzen innerhalb dieser Gencluster legt nahe, dass einzelne Gene oder Elemente der Cluster in unterschiedlicher Weise, z. B. durch Insertion, Deletion, Duplikation oder Inversion neu kombiniert werden, um so neue Abbauewege zu erschaffen. Ein Beispiel hierfür findet man bei *Sphingomonas*

*yanoikuyae* B1, der durch Kombination von Elementen unterschiedlicher kataboler Gencluster die Fähigkeit zur Verwertung von verschiedenen polyzyklischen und monozyklischen Aromaten erlangt hat (KIM & ZYLSTRA, 1999). Die Lokalisation kataboler Gencluster oder einzelner Gene auf Transposons oder selbsttransmissiblen Plasmiden eröffnet die Möglichkeit weitestgehender Verbreitung dieser genetischen Elemente (TAN, 1999, DAVISON, 1999) und somit eine schnelle Adaptation verschiedener Bakterienstämme an neue Umweltbedingungen, wie z. B. die Verfügbarkeit neuer Wachstumssubstrate.

Der Abbau von 1*H*-4-Oxochinolin durch *P. putida* 33/1 geschieht ebenso wie der Chinaldin-Abbau durch *A. ilicis* Rü61a über einen Anthranilatweg und die Gene zumindest einiger der beteiligten Enzyme sind in beiden Organismen in der gleichen Organisation anzutreffen (BOTT *et al.*, 1990, FETZNER *et al.*, 1998, MAX *et al.*, 1999). Besonders das Auftreten der 1*H*-3-Hydroxy-4-oxo(chinaldin/chinolin)-2,4-Dioxygenasen, welche eine so ungewöhnliche Stellung unter den Dioxygenasen einnehmen (s. 4.6.), lässt vermuten, dass hier entweder ein kompletter Gencluster oder doch wenigstens Teile davon zwischen den Bakterien ausgetauscht wurden.

Ob die Gene, die für die Enzyme der ersten vier Schritte des Anthranilatweges kodieren, eventuell sogar eine Transkriptionseinheit bilden, muss jedoch erst noch durch Transkriptionsanalysen festgestellt werden.

#### **4.6.5. Metabolisierung von Anthranilat durch *A. ilicis* Rü61a**

Die Enzyme zur weiteren, vollständigen Degradation von Anthranilat sind bei *A. ilicis* Rü61a höchstwahrscheinlich chromosomal kodiert, wie in Wachstumsversuchen mit dem *A. ilicis* Rü61a Wildtyp und einer pAIL<sup>-</sup>-defizienten Mutante festgestellt werden konnte (HOMBURG, 2002). Verschiedene Enzyme sind bekannt, die den ersten Schritt im aeroben Anthranilat-Katabolismus katalysieren können. In *Aspergillus niger* katalysiert die Anthranilat-Hydroxylase, eine NADPH-abhängige Monooxygenase mit einem Nicht-häm Eisen-Cofaktor, die oxidative Desaminierung und Dihydroxylierung von Anthranilat zu 2,3-Dihydroxybenzoat (SUBRAMANIAN & VAIDYANATHAN, 1984). Die aus zwei Komponenten bestehende Anthranilat-1,2-Dioxygenase des Stammes *Acinetobacter* sp. ADP1 katalysiert die Dihydroxylierung von Anthranilat zu einem instabilen Diol, welches sich durch spontane Desaminierung und Decarboxylierung zu Catechol umsetzt (EBY *et al.*, 2001). Dieselbe Reaktion kann auch durch Benzoat-1,2-Dioxygenasen, die ein breites Substratspektrum aufweisen, wie z. B. die Enzyme aus *Rhodococcus* sp. 19070 (HADDAD *et al.*, 2001) oder *P. putida* (*arvilla*) C-1 (YAMAGUCHI & FUJISAWA, 1980), katalysiert werden. Auch für die 2-Halobenzoat-1,2-Dioxygenase aus *P. cepacia* 2CBS ist die Umsetzung von Anthranilat zu Catechol durch Dihydroxylierung beschrieben (FETZNER *et al.*, 1992). Ein dritter Weg der aeroben Anthranilat-Degradation erfolgt über die Bildung von Coenzym A Thioestern und wird eingeleitet durch die ATP-abhängige 2-Aminobenzoat-CoA-Ligase. In *Azoarcus evansii* wurden

neben dem Gen für die 2-Aminobenzoat-CoA-Ligase auch die Gene für Enzyme des weiteren Abbaus identifiziert und es wird postuliert, dass Anthranilat über eine  $\beta$ -Oxidation vollständig mineralisiert wird (SCHÜHLE *et al.*, 2001).

Da Catechol als eines der Intermediate der Chinaldin-Degradation detektiert worden ist (HUND *et al.*, 1990), ist anzunehmen, dass die Metabolisierung des Anthranilats bei *A. ilicis* Rü61a durch eine Dioxygenase eingeleitet wird. Da Anthranilat als ein Abbauprodukt der Kynureninase katalysierten Reaktion in der Tryptophan-Degradation bekannt ist (KURNASOV *et al.*, 2003), ist es jedoch auch nicht auszuschließen, dass dem Stamm verschiedene Wege zum Abbau des Anthranilats zur Verfügung stehen.

Catechol wird bei *A. ilicis* Rü61a wahrscheinlich durch eine Catechol-1,2-Dioxygenase zu *cis,cis*-Muconat gespalten, welches zu Intermediaten des Tricarbonsäurezyklus abgebaut wird (HUND *et al.*, 1990).

#### **4.7. Hypothetische Funktionen der durch die ORFs 6 bis 9, 12 und 14 bis 16 kodierten Proteine**

Wie in Hybridisierungsexperimenten mit Sonden, die komplementär zu ORF16 bzw. zu ORF8 waren, festgestellt wurde, befinden sich das 12,2 kb *Hind*III-Fragment und das 10,8 kb lange *Hind*III-Fragment, welche in dem Cosmid pVK55B/5 nebeneinander vorliegen, im *A. ilicis* Rü61a Genom nicht benachbart zueinander. Während eine *qoxL*- und eine ORF4-spezifische Sonde in einer Southern-Blot-Analyse genomischer DNA von *A. ilicis* Rü61a mit DNA des Megaplasmids pAIL hybridisierten, hybridisierten ORF16- bzw. ORF8-spezifische Sonden mit chromosomaler DNA. Eine Sonde, die komplementär war zu den Nukleotiden 11107-13228 (Anhang1), also die *Hind*III-Schnittstelle zwischen dem 12,2 kb und dem 10,8 kb Fragment auf pVK55B/5 überspannte, zeigte Hybridisierungssignale sowohl mit der Plasmid-DNA als auch mit chromosomaler DNA. Durch diesen Umstand ist auch zu erklären, warum die Insertfragmente der dreizehn *P. putida* KT2440 pVK (Tc<sup>r</sup>, Km<sup>s</sup>) Cosmidklone, die neben dem 10,8 kb Fragment detektiert wurden, unterschiedliche Größen aufweisen (Abb. 10). Nach der Restriktion mit *Hind*III müssen die kohäsiven Enden der Fragmente so feste Hybride gebildet haben, dass sie sich selbst in der Gelelektrophorese nicht getrennt haben, und als ein Fragment erst aus dem Gel eluiert wurden und danach auch zusammen in das Cosmid ligiert wurden.

Bei der Betrachtung der potentiellen Genprodukte der ORFs 6-16 muss also beachtet werden, dass es sich hierbei um chromosomal kodierte Proteine handelt, die wahrscheinlich nicht in direktem Zusammenhang stehen mit der Fähigkeit der Chinaldin-Degradation.

Da für die Genprodukte der ORFs 10 (eine potentiell Enzym mit Phosphohydrolaseaktivität), 11 (ein potentiell Membranprotein) und 13 (keine Funktion vorhersagbar) aufgrund der Sequenzanalysen keine weiteren Hypothesen zur Struktur oder Funktion ableitbar sind, wird auf sie in diesem Abschnitt nicht weiter eingegangen.

#### 4.7.1. Das ORF6 Protein: Eine potentielle Aminoacyl-tRNA Synthetase

Aminoacyl-tRNA Synthetasen (AARS) katalysieren die spezifische Bindung einer Aminosäure mit einer speziellen tRNA. Die Reaktion verläuft dabei in zwei Stufen: In einem ersten Schritt wird die Aminosäure unter ATP-Hydrolyse und in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  zu einem energiereichen Intermediat, dem Aminoacyl-adenylat umgesetzt. Im zweiten Schritt wird dann der Aminoacyl Teil an das 3'-terminale Adenosin der tRNA ligiert. Strukturell können zwei Klassen von AARS unterschieden werden. Während Klassen II AARS häufig dimere oder trimere Moleküle sind, sind Klasse I AARS Monomere. Drei der Klasse I Enzyme, die Glutamyl-, Glutaminyl- und Arginyl-tRNA Synthetase, unterscheiden sich von anderen Klasse I AARS dadurch, dass sie den ersten Reaktionsschritt nur in Anwesenheit der spezifischen tRNA katalysieren. Da die Aminoacyl-adenylat Zwischenprodukte instabil sind, wird auf diese Weise ein „nutzloser“ ATP-Verbrauch minimiert.

Die postulierten Strukturelemente des ORF6 Proteins zeigen markante Übereinstimmungen mit der Sekundärstruktur des N-terminalen Bereichs der Glutamyl-tRNA Synthetase von *T. thermophilus* (GluRS *T.th.*), für die eine Röntgenstrukturanalyse vorliegt (SEKINE *et al.*, 2003). Die N-terminalen Aminosäurereste der GluRS *T.th.* formen die katalytisch aktive Domäne, in der sowohl das ATP, als auch die Aminosäure gebunden werden. Reste des ersten konservierten Motivs innerhalb dieser Domäne, des so genannten HIGH-Motivs, sind neben anderen Resten an der Bindung der Aminosäure und der tRNA beteiligt. Weitere Aminosäurereste der katalytischen Domäne und solche der *stem-contact* Domäne, die zum Teil in einem zweiten konservierten Motiv zu finden sind (KISKR in GluRS *T.th.*; RLAKR in ORF6) interagieren ebenfalls mit der tRNA (SEKINE *et al.*, 2003). Durch Bindung der tRNA kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des Enzyms, welche die Koordination des ATP dahingehend beeinflussen, dass die enzymkatalysierte Reaktion möglich wird. Zu vielen der in der GluRS *T.th.* tRNA-bindenden Aminosäurereste konnten korrespondierende Reste in der Sequenz des ORF6 Proteins identifiziert werden.

Verwunderlich ist, dass eine Reihe hypothetischer Glutamyl-tRNA Synthetasen, die in Datenbanken hinterlegt sind, genauso wie das ORF6 Protein aus nur ca. 300 Aminosäuren bestehen. Die C-terminalen Aminosäurereste der Glutamyl-tRNA Synthetase aus *T. thermophilus*, die 468 Aminosäuren umfasst, formen zwei Anticodon-bindende Domänen, welche in diesen Proteinen fehlen. WOLF *et al.* (1999) untersuchten die evolutionäre Entwicklung von AARS und postulierten, dass gerade AARS durch den „Erwerb“ von Domänen anderer Proteine oder auch durch Rekombinationsereignisse innerhalb der AARS zu ihrer derzeitig beobachteten Domänen-Mosaikstruktur gelangten und dadurch zusätzliche funktionelle Möglichkeiten erhalten haben. Besonderes Augenmerk wurde in diesen Untersuchungen auf eine Anticodon-bindende Domäne (DARL-Domäne) gelegt, die weit verbreitet in AARS gefunden wird und die eventuell in der frühen Evolution der AARS mit den

Kerndomänen der Enzyme fusioniert ist. Es kann eventuell vermutet werden, dass die „verkürzten“ hypothetischen Glutamyl-tRNA Synthetasen rudimentäre Kernenzyme darstellen, die aufgrund fehlender Anticodon-bindender Domänen eine andere oder keine Funktion haben.

#### 4.7.2. Das ORF7 Protein: Eine mit den $\beta$ -Lactamasen verwandte potentielle Esterase

Bakterielle Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wird durch  $\beta$ -Lactamasen, die das zyklische Amid des  $\beta$ -Lactams hydrolysieren, vermittelt.  $\beta$ -Lactamasen der Klasse A, C und D zeichnen sich durch einen katalytisch aktiven Serinrest aus, der auch in verwandten Enzymen, die  $\beta$ -Lactamen gegenüber nicht aktiv sind, konserviert ist. Von der Seitenketten-Hydroxylgruppe dieses Serinrests wird ein nukleophiler Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff des  $\beta$ -Lactamringes ausgeführt, was in der Bildung eines Enzym-Acyl Intermediates resultiert. Die Enzym-Substratbindung wird im Folgenden durch eine hydrolytische Reaktion gespalten (SHIMAMURA *et al.*, 2002). Ein Lysinrest, der in einem Motiv mit dem Serin konserviert ist, agiert wahrscheinlich als Base und abstrahiert ein Proton von dem katalytischen Serinrest (IBUKA *et al.*, 2003). Beide Aminosäurereste sind auch in der D-Amino-peptidase aus *Ochrobacterium anthropi* SCRC CI-38 katalytisch essentiell, obwohl dieses Enzym gegenüber  $\beta$ -Lactamverbindungen nicht aktiv ist, jedoch kompetitiv durch diese inhibiert wird (ASANO *et al.*, 1992). In dem ORF7 Protein findet man den Serin- und den Lysinrest ebenfalls konserviert. *A. ilicis* Rü61a weist jedoch keine Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auf, wie in einem Antibiogramm für den Stamm festgestellt wurde.

Für die Crysanthemat-Esterase aus *A. globiformis* wurde ebenfalls ein katalytisch essentieller Serinrest postuliert und auch sie wird kompetitiv durch  $\beta$ -Lactamverbindungen gehemmt (NISHIZAWA *et al.*, 1995). Aufgrund der ausgeprägten Sequenzähnlichkeiten zu diesem Enzym und anderen Esterasen kann vermutet werden, dass es sich auch bei dem ORF7 Protein um ein Enzym mit Esteraseaktivität handelt, welches mit den  $\beta$ -Lactamasen oder Penicillin-bindenden Enzymen verwandt ist und eventuell einen katalytisch relevanten Serinrest besitzt.

Nachdem in ersten Versuchen festgestellt worden war, dass der Cosmidklon *P. putida* KT2440 pVK55B/5 in der Lage ist, Chinaldin zu Anthranilat umzusetzen, wurde zunächst angenommen, dass das Enzym, welches von ORF7 kodiert wird, die Hydrolyse der Amidbindung in der Umsetzung von *N*-Acetylanthranilat zu Anthranilat katalysieren könnte. Eine ORF7<sup>-</sup>-defiziente Mutante von *P. putida* KT2440 pVK55B/5 hatte jedoch die Fähigkeit zur Umsetzung von *N*-Acetylanthranilat nicht eingebüßt. Wie später festgestellt wurde, wird die *N*-Acetylanthranilat-Amidase durch ORF4 auf dem 10,8 kb *Hind*III-Fragment des Cosmidklons kodiert.

#### 4.7.3. Das ORF8 Protein: Ein potentieller Transkriptionsregulator der TetR-Familie

In Gram-negativen Bakterien wird die Tetracyclin (Tc) Resistenz durch das Protein TetA, einem Protonen/Tc•Mg<sup>2+</sup> Antiporter, vermittelt. Die Expression des *tetA*-Gens wird durch das Tetracyclin-Repressorprotein (TetR) negativ reguliert. In Abwesenheit des Effektors Tc bindet ein TetR-Dimer an die Operatorregionen *tetO*<sub>1</sub> und *tetO*<sub>2</sub>, die zwischen dem *tetA*-Gen und dem *tetR*-Gen lokalisiert sind, was zur Inhibition der Transkription von *tetA* und *tetR* führt. Diffundiert Tc durch die Cytoplasmamembran, bindet es als Mg<sup>2+</sup>-Tc-Komplex an das TetR Protein, wodurch Konformationsänderungen in dem Protein induziert werden, die in der Lösung des Proteins von den Operatorbindestellen resultieren. Aufgrund der induzierten Synthese von TetA und dessen Aktivität sinkt die cytoplasmatische Tc-Konzentration so weit, dass die Transkription der beiden Gene erneut abgeschaltet wird (KISKER *et al.*, 1995, BERENS & HILLEN, 2003).

Repressorproteine der TetR-Familie sind wie das archetypische TetR häufig in die Transkriptionsregulation von Efflux-Transportproteinen involviert, die verschiedene Antibiotika oder hydrophobe Agenzien als Substrate haben. MtrR in *Neisseria gonorrhoeae* oder QacR in *Staphylococcus aureus* regulieren z. B. die Transkription der Effluxproteine MtrCDE bzw. QacA (LUCAS *et al.*, 1997, SCHUMACHER *et al.*, 2002). Man trifft aber auch auf TetR-verwandte Repressorproteine, die an der Regulation von Operons beteiligt sind, in denen katabole Enzyme kodiert werden (EATON, 1997, NAKADA *et al.*, 2001). In verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen wird außerdem die Transkription des Sigma-Factors RpoS durch den TetR-verwandten Repressor PsrA reguliert (KOJIC *et al.*, 2002).

Während die Lokalisation der DNA-Bindestellen dieser Regulatorproteine identisch ist, nämlich zwischen dem Gen für das Repressorprotein und dem in umgekehrter Richtung transkribierten Gen, dessen Transkription durch den Repressor reguliert wird, unterscheiden sich die Nukleotidsequenzen der Repressorbindestellen doch erheblich (Abb. 49). In dem 103 Nukleotide langen intergenischen Bereich zwischen dem Startcodon des ORFs 8 und dem Startcodon des in reverser Richtung transkribierten ORFs 9 wurde ein nicht perfekter *inverted repeat* gefunden, der eine potentielle Bindestelle des durch ORF8 kodierten TetR-verwandten Transkriptionsregulators darstellen könnte. Die potentielle Operatorsequenz ist mittig zwischen den Genen lokalisiert: 50 bp bis zum ORF9 Startcodon, 54 bp bis zum ORF8 Startcodon (von der Mitte des *inverted repeat*).

Die Diversität der (hypothetischen) TetR-Bindestellen (Abb. 49) erscheint ungewöhnlich, da die N-terminalen Aminosäurereste der Repressorproteine, welche die Helix-Turn-Helix-Struktur zur DNA-Bindung formen, hohe Übereinstimmungen zeigen. Mechanistische Unterschiede zwischen der DNA-Bindung von TetR und QacR, die sich sowohl auf die DNA-Konformation als auch auf die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste erstrecken (SCHUMACHER *et al.*, 2002; ORTH *et al.*, 2000), machen jedoch deutlich, dass gleiche Strukturen und homologe

Aminosäuresequenzen nicht ausreichend sind, die mechanistische Funktion von Mitgliedern einer Familie zu beschreiben.

CTCTATCATTGATAGGG-N <sub>11</sub> -CTCTATCAATGATAGGG	TetR <sup>1</sup>
CTTATAGACCG-N <sub>6</sub> -CGGTCTATAAG	QacR <sup>2</sup>
AAAAAA-N <sub>3</sub> -TTTTTT	MtrR <sup>3</sup>
AAAACAAACAGAC-N <sub>7</sub> -GTCTGTTTGTATT	CymR <sup>4</sup>
TCCGAT-N <sub>4</sub> -ATCGGA	AguR <sup>5</sup>
TTCAAAC-N <sub>4</sub> -GTTTGAA	PsrA <sup>6</sup>
AATGTAGTCGCTGTCTAC-N <sub>3</sub> -GTAGGCAGTGACTACATT	ORF8

#### Abb. 49

Operatorsequenzen, die von TetR (verwandten)-Repressoren erkannt werden.

<sup>1)</sup> KISKER *et al.*, 1995, <sup>2)</sup> SCHUMACHER *et al.*, 2002, <sup>3)</sup> LUCAS *et al.*, 1997, <sup>4)</sup> EATON, 1997,

<sup>5)</sup> NAKADA *et al.*, 2001, <sup>6)</sup> KOJIC *et al.*, 2002

#### 4.7.4. Potentielle *short-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen kodiert durch ORF9 und ORF14

In der Superfamilie der SDRs sind die Enzyme eher aufgrund gleicher Faltung, denn aufgrund vergleichbarer Funktionen zusammengefasst. SDRs sind NAD(P)H-abhängige Oxidasen oder Reduktasen, die mit den unterschiedlichsten Substraten, darunter Zucker, Alkohole oder Aromaten, reagieren. Während die N-terminalen Regionen der Enzyme größere Homologien aufweisen, da hier die Bindestellen für die Cosubstrate lokalisiert sind, sind die C-terminalen Regionen, in denen die Substratspezifität determiniert wird, sehr unterschiedlich.

KALLBERG *et al.* (2002) definierten anhand von Sequenz- und Strukturvergleichen fünf Familien innerhalb der SDR-Superfamilie und in zweien dieser Familien weitere Unterfamilien. Aufgrund der für die einzelnen Familien beschriebenen konservierten Sequenzmotive, können die Proteine, die von ORF9 und ORF14 kodiert werden, in die Familie der „klassischen SDR“ eingeordnet werden, welche Oxidoreduktasen mit verschiedenen Substraten umfasst. Innerhalb der klassischen Familie der SDR konnten wiederum vier Unterfamilien definiert werden, deren Mitglieder NADH als Cosubstrat nutzen, während die Mitglieder der klassischen Familie, die NADPH nutzen, in drei Unterfamilien klassifiziert wurden. Das ORF9 Protein scheint der größten Unterfamilie der NADH-abhängigen Oxidoreduktasen (Unterfamilie cD1d) anzugehören. Diese Unterfamilie definiert sich durch einen Aspartatrest, der am Ende des zweiten  $\beta$ -Stranges liegt. Anhand der Sekundärstrukturvorhersage wird diese Position in dem

ORF9 Protein von Aspartat 42 eingenommen. Das ORF14 Protein kann vermutlich in die Unterfamilie cP2 der NADPH-abhängigen Enzyme eingeordnet werden. Diesen Proteinen ist ein basischer Rest (K/R) an der ersten Position nach dem zweiten  $\beta$ -Strang gemeinsam; in dem ORF14 Protein findet sich in dieser Position der Argininrest 39.

Da die Aminosäuresequenzen der C-terminalen Regionen der Proteine, die durch ORF9 bzw. ORF14 kodiert werden, kaum Ähnlichkeiten aufweisen, kann vermutet werden, dass es sich um zwei Oxidoreduktase handelt, welche unterschiedliche Cosubstrate nutzen und die Umsetzung verschiedener Substrate katalysieren.

#### **4.7.5. Das ORF12 Protein: Ein potentielles ATP-hydrolysierendes Enzym der AAA<sup>+</sup> ATPase Familie**

Enzyme, die der Superfamilie der AAA<sup>+</sup> ATPasen angehören, nutzen die Energiegewinnung durch ATP-Hydrolyse zur Ausübung verschiedenster Funktionen. Meistens haben sie Chaperon-ähnliche Funktionen und sind involviert in die Assemblierung, Faltung, Denaturierung oder den Transport von Proteinen. Des Weiteren beinhaltet die Superfamilie auch Enzyme, die in die Replikation, Rekombination, Reparatur oder Transkription der DNA involviert sind (NEUWALD *et al.*, 1999, OGURA & WILKINSON, 2001). Die ATP-Hydrolyse wird dabei durch Reste des so genannten AAA-Moduls katalysiert, das in den meisten Fällen, je nach der Funktion des Enzyms, mit anderen Domänen kombiniert ist. Dabei kann ein Enzym entweder ein einziges AAA-Modul enthalten, oder auch mehrere (NEUWALD *et al.*, 1999). Die ATP-Hydrolysereaktion wird eingeleitet durch ein durch eine katalytische Base aktiviertes Wassermolekül, welches einen nukleophilen Angriff auf das  $\gamma$ -Phosphat des ATP ausführt. Die negative Ladung eines transienten Zustandes wird durch ein divalentes Kation und durch positive Ladungen umgebender Aminosäurereste stabilisiert. Aminosäurereste eines ersten konservierten Motivs (Walker-Motiv A) koordinieren das ATP durch Bindungen zu den Phosphaten und bilden Bindungen aus zu dem katalytisch relevanten divalenten Kation. Reste, die in einem zweiten Motiv (Walker-Motiv B) lokalisiert sind, sind einerseits ebenfalls an der Bindung des Metalls beteiligt und stellen andererseits die katalytische Base.

Das ORF12 Protein enthält ein AAA-Modul, in dem die relevanten Aminosäurereste zur ATP-Bindung und zur Katalyse konserviert sind. Aufgrund von Sequenzhomologien kann also postuliert werden, dass es sich bei dem durch ORF12 kodierten Protein wahrscheinlich um ein Enzym mit ATPase-Aktivität handelt, dessen genaue Funktion jedoch nicht bekannt ist.

#### **4.7.6. Das ORF15 Protein: Ein potentielles Enzym zur Spaltung von C-C-Bindungen**

Catechol (oder substituierte Catecholderivate) und Gentisat (oder substituierte Derivate) sind die Schlüsselintermediate verschiedener Abbaupfade in der aeroben Aromatendegradation.

Im Abbau von Homoprotocatechuat durch *E. coli* W bzw. *E. coli* C über den *meta-pathway* wird die Umsetzung des Zwischenproduktes 5-Oxo-penta-3-en-1,2,5-tricarbonsäure (OPET) zu 5-Oxo-penta-3-en-1,5-dicarbonsäure durch das bifunktionale Enzym HHDD-Decarboxylase/OPET-Isomerase katalysiert (PRIETO *et al.*, 1996, ROPER & COOPER, 1993, DÍAZ *et al.*, 2001). Die Fumarylacetoacetat (FAA)-Hydrolase, welche den letzten Schritt im Gentsatabbau, die Hydrolyse von Fumarylacetoacetat zu Fumarat und Acetat, katalysiert (FERNÁNDEZ-CañÓN & PEÑALVA, 1995) und die Fumarylpyruvat-Hydrolase, die eine entsprechende Reaktion an Fumarylpyruvat als Substrat katalysiert (ZHOU *et al.*, 2001), enthalten jeweils eine Strukturdomäne, welche markante Ähnlichkeiten zu der katalytischen Domäne der HHDD-Decarboxylase/OPET-Isomerase aufweist. Neben einigen konservierten Aminosäureresten ist diesen Domänen die Tertiärstruktur gemeinsam, die sich als unvollständige, aus  $\beta$ -Strängen bestehende Fass- (*barrel*-) Struktur darstellt (TAME *et al.*, 2002, BATEMAN *et al.*, 2001).

Obwohl sowohl von der HHDD-Decarboxylase/OPET-Isomerase in ihrer Decarboxylase-Funktion als auch von der FAA-Hydrolase die Spaltung von C-C-Bindungen katalysiert werden, sind die Reaktionsmechanismen der Enzyme doch unterschiedlich. Während die C-C-Bindung bei der FAA-Hydrolase durch ein aktiviertes Wassermolekül nukleophil angegriffen wird (BATEMAN *et al.*, 2001), wird für die HHDD-Decarboxylase ein Mechanismus postuliert, der auf der Anziehung des Substrates in das aktive Zentrum und gleichzeitiger Abstoßung der Substrat-Carboxylgruppe (eventuell durch einen Aspartatrest) beruht, wodurch eine Destabilisierung der C-C-Bindung erreicht wird (TAME *et al.*, 2002, WU *et al.*, 2000). TAME *et al.* (2002) interpretieren die ausgeprägte Ähnlichkeit der Domänen der beiden unterschiedlichen Enzyme so, dass die *barrel*-Struktur ein geeignetes Gerüst darstellt, in das verschiedene katalytische Zentren intergriert werden können, was dazu führt, dass Enzymmodule gleicher Faltung unterschiedliche Reaktionen katalysieren können.

Alleine anhand der Aminosäuresequenzvergleiche des ORF15 Proteins mit den entsprechenden Bereichen der HHDD-Decarboxylase/OPET-Isomerase bzw. der FAA-Hydrolase kann für dieses potentielle Enzym keine der beiden Funktionen, Decarboxylierung oder Hydrolyse, ausgeschlossen oder präferiert werden. Da ORF15 außerdem nicht in einem Gencluster für Enzyme eines Abbauweges lokalisiert ist, wie man es für die Gene *hpcE* (Gen für eine HHDD-Decarboxylase/OPET-Isomerase) oder *nagK* (Fumarylpyruvat-Hydrolase-Gen) findet (DÍAZ *et al.*, 2001, ZHOU *et al.*, 2001), können keine Rückschlüsse auf die Beteiligung dieses Proteins an einem bestimmten Abbauweg gezogen werden.

#### 4.7.7. Das ORF16 Protein: Eine potentielle Mitglied der Enolase-Superfamilie

Obwohl die Reaktionen, die von den Mitgliedern der Enolase-Superfamilie (Mandelat-Racemase (MR), Muconat-lactonisierendes Enzym (MLE), Enolase) an verschiedenen Substraten durchgeführt werden, unterschiedlich sind, ist der erste Schritt dieser Reaktionen

2001). In den Enzymen dieser Superfamilie finden sich zwei konservierte Merkmale in den katalytischen Zentren, die in den C-terminalen TIM *barrel*-Domänen lokalisiert sind: i) eine katalytische Base zur Abstraktion des Protons und ii) ein Metall-Kation, das die negative Ladung des transienten Zustandes stabilisiert (HASSON *et al.*, 1998).

In der MR aus *P. putida*, die die gleiche Reaktion an beiden Enantiomeren des Mandelates katalysiert, wirkt der Lysinrest 166 als Base zur Protonabstraktion in der Reaktion mit (*S*)-Mandelat als Substrat. Die zwei Carboxyl-Sauerstoff-Atome des Enolat-Intermediats werden zum einen durch eine Bindung zu dem divalenten Kation im aktiven Zentrum und durch eine Bindung zu einem zweiten Lysinrest (MR: K164) stabilisiert, zum anderen durch eine Bindung mit dem Glutamatrest 317. In der Reaktion des MLE aus *P. putida* übernehmen die Reste K169, K167 und E327 vergleichbare Funktionen. In die Reaktion der Enolase aus *S. cerevisiae* ist nur ein Lysinrest an der Katalyse beteiligt (K345). Die Stabilisierung des negativ geladenen Intermediats wird hier von zwei Mg<sup>2+</sup>-Ionen geleistet (HASSON *et al.*, 1998, BABBITT *et al.*, 1996). Da in der Sequenz des ORF16 Proteins ebenfalls zwei Lysinreste in dem konservierten Motiv KXX und ein konservierter Glutamatrest gefunden wurden, kann eine Zugehörigkeit dieses potentiellen Enzyms zu der Gruppe der Enolasen ausgeschlossen werden.

In der Reaktion mit (*R*)-Mandelat als Substrat, wirkt in der MR ein Histidinrest (H297) als Base. Dieser Rest ist assoziiert mit dem Aspartatrest 270. Diese beiden Reste sind in der MLE nicht konserviert, sie wurden jedoch in korrespondierender Position wie in der MR in der Sequenz des ORF16 Proteins gefunden (H351, D324) (Abb. 24).

Aufgrund signifikanter Ähnlichkeiten der Sekundärstruktur des C-terminalen Bereichs des ORF16 Proteins mit der katalytischen Domäne der Mitglieder der Enolase-Superfamilie, kann auch für den C-terminalen Bereich des ORF16 Proteins eine TIM *barrel*-Faltung postuliert werden. Da Reste, die in den bekannten Enzymen ein Metall-Ion koordinieren, in dem ORF16 Protein ebenfalls konserviert sind, kann weiterhin vermutet werden, dass ein solches Metall-Ion auch zur Katalyse dieses Enzyms essentiell ist. Der Vergleich katalytisch relevanter Aminosäurereste, die für die verschiedenen Gruppen innerhalb der Superfamilie bekannt sind, lässt letztendlich den Schluss zu, dass das potentielle Enzym aus *A. ilicis* Rü61a der Gruppe der Mandelat-Racemasen zugeordnet werden kann.

Zu dieser Gruppe gehören neben der Mandelat-Racemase auch solche Enzyme, die die Dehydratation von Zuckersäuren katalysieren, wie z. B. die (*D*)-Glucarat-Dehydratase, die (*D*)-Galactonat-Dehydratase oder die (*L*)-Rhamnonat-Dehydratase (GERLT & BABBITT, 2001). Welche physiologische Funktion das potentielle Enzym ausführt, das von dem ORF16 kodiert wird, kann allein anhand von Sequenzvergleichen jedoch nicht vorhergesagt werden.

#### 4.8. Ausblick

Mit *P. putida* KT2440 pKP1 wurde ein System zur regulierten, funktionellen Expression einer molybdänhaltigen Hydroxylase mit MCD-Cofaktor geschaffen, welches zum gerichteten Austausch von Aminosäureresten eingesetzt werden kann. Interessante Kandidaten zum Austausch sind z. B. I330 und A259 in QoxL, um deren Beteiligung an der Substratbindung im katalytischen Zentrum zu untersuchen. Die Erzeugung von weiteren Proteinvarianten, in denen der katalytisch relevante Glutamatrest 736 in QoxL gegen z. B. einen Aspartatrest bzw. gegen einen Alaninrest ausgetauscht würde, könnte die Bedeutung einer sauren Aminosäure an dieser Position endgültig klären. Kinetische Untersuchungen des angereicherten Enzyms aus *P. putida* KT2440 pKP1E736Q könnte im Vergleich zu der Proteinvariante QoxE736A weiterhin Aufschluss darüber geben, ob die Oxidation des Substrates und die Reduktion der Enzyms tatsächlich auch ohne Aktivierung des Wassermoleküls durch eine Carboxylatgruppe erfolgen kann. Die Röntgenstrukturanalyse der Qor aus *P. putida* 86 wird wahrscheinlich noch eine Fülle weiterer Informationen bezüglich der Positionierung der *N*-heterozyklischer Substrate in diesem Enzym liefern, die sich eventuell auch auf die Qox übertragen lassen. Vielleicht lässt sich durch gezielten Aminosäureaustausch auch klären, wie es der Qox möglich ist, verschiedene Substrate an unterschiedlichen Positionen in Bezug zu dem *N*-Heteroatom zu hydroxylieren.

Die Entdeckung der Gene für weitere Enzyme der Chinaldin-Degradation benachbart zu den *qox*-Genen lässt die Frage nach der transkriptionellen Regulation dieser Gene entstehen. Von Interesse wäre zu verstehen, ob die Gene *qoxLMS* einerseits und die Gene ORF2, *hod* und ORF4 andererseits als ein Operon transkribiert werden, wo entsprechende Operatorregionen zu finden sind und von welcher Art ein potentieller Effektor ist. Ob ORF5 tatsächlich ein Transporter für eines der Abbauintermediate ist, müsste durch Gendisruption in *A. ilicis* Rü61a geklärt werden. Wenn dieser ORF ebenfalls in den Chinaldin-Metabolismus involviert ist, stellt sich auch hier die Frage nach einer gemeinsamen Transkription mit den oben genannten Genen. Stromabwärts von *qoxS* wurde ein Gen (ORF1) für ein potentielles Molybdäncofaktor-inserierendes Chaperon gefunden. Die Herstellung einer ORF1-defizienten Mutante sollte Hinweise darauf geben, ob das Genprodukt an der Synthese aktiver Qox beteiligt ist. Durch Versuche zur Komplementation einer ORF1-Mutante mit einem ORF1 homologen Protein eines verwandten Stammes könnte vielleicht geklärt werden, ob diese potentiellen Chaperone systemspezifisch sind oder ein weit gefächertes Substratspektrum haben.

Sequenzierung der sich an ORF1 und ORF5 anschließenden DNA-Bereiche erschließt eventuell weitere Gene, deren Genprodukte vielleicht an der Biosynthese des Molybdo-Pyranopterin-Cofaktors beteiligt sind, wie es auf dem Plasmid pAO1 aus *A. nicotinovorans* gefunden wurde (IGLOI & BRANDSCH, 2003).

Wie unter 1.1. beschrieben, zeigten neueste Untersuchungen, dass die Gene zur Chinaldin-Degradation auf dem linearen Megaplasmid pAIL lokalisiert sind. Ob das Plasmid durch

---

Konjugation übertragen werden kann, ist noch nicht geklärt. pAIL gehört zu der Klasse linearer Plasmide, die an den 5'-Enden kovalent mit Proteinen verknüpft sind (persönliche Mitteilung von S. Sielker). Diese Klasse der linearen Plasmide wurde bis heute bei verschiedenen Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* gefunden (KINAHY & SHIMAJI-MURAYAMA, 1991, STECKER *et al.*, 2003, Le DANTEC *et al.*, 2001, POLO *et al.*, 1998). Die vollständige Sequenzierung des 90-100 kb langen Plasmids könnte über verschiedene Aspekte Aufschluss geben: 1) wie lang das Plasmid tatsächlich ist und ob noch weitere degradative Eigenschaften durch das Plasmid vermittelt werden, 2) ob das Plasmid Transposonelemente enthält, 3) ob auch bei pAIL, wie bei anderen linearen Plasmiden dieser Klasse, terminale *inverted repeats* vorliegen, und 4) ob verwandtschaftliche Beziehungen zwischen pAIL und den linearen Plasmiden dieser Klasse aus anderen Stämmen bestehen.

## 5. Zusammenfassung

Die Chinaldin-4-Oxidase (Qox) aus *Arthrobacter ilicis* R61a gehört zu den molybdänhaltigen Hydroxylasen der mononuklearen Molybdoenzyme, die einen Molybdo-Pyranopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor (MCD) enthalten. Das Enzym zeichnet sich durch eine strikte Regiospezifität bei der Hydroxylierung *N*-heteroaromatischer Substrate aus und katalysiert darüber hinaus die Oxidation verschiedener Aldehyde.

Nach Etablierung einer Genbank, die das komplette Genom von *A. ilicis* R61a umfasste, konnten die Gene, die für die Chinaldin-4-Oxidase kodieren, als Cluster in der Reihenfolge *qoxLMS* auf einem 3783 bp langen Sequenzabschnitt identifiziert werden. Anhand von Vergleichen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene *qoxL*, *qoxM* und *qoxS* mit Sequenzen strukturell analysierter molybdänhaltiger Hydroxylasen konnten in QoxL einige Aminosäurereste identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Bindung des MCD-Cofaktors beteiligt sind bzw. katalytische Relevanz haben. Der FAD-Cofaktor in QoxM wird wahrscheinlich durch Aminosäurereste gebunden, die mit Resten bekannter molybdänhaltiger Hydroxylasen korrespondieren, welche dort ebenfalls an der Koordination des FAD beteiligt sind. Die Beteiligung von acht konservierten Cysteinresten in QoxS an der Koordination der zwei unterschiedlichen, durch ESR-Spektroskopie detektierbaren, [2Fe2S]-Cluster kann postuliert werden.

Um die Beteiligung spezieller Aminosäurereste an der Katalyse zu untersuchen, wurden die *qox*-Gene in einen Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde der *qoxLMS*-Gencluster mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pJB653 inseriert; es entstand das Plasmid pKP1. *P. putida* KT2440 pKP1 war in der Lage Qox in vollständig katalytisch aktiver Form zu synthetisieren. Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1 wurde in vier chromatographischen Reinigungsschritten bei einer Anreicherung um das 85-fache zur Homogenität gereinigt. Die katalytischen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms gleichen ebenso wie das UV/Vis-Spektrum und wie ESR-Spektren denen des Wildtyp-Enzyms. Als Nukleotidanteil des Pyranopterin-Dinukleotid-Cofaktors in der Qox aus *P. putida* KT2440 pKP1 wurde Cytidinmonophosphat nachgewiesen. Damit wurde ein Werkzeug zur Herstellung von Proteinvarianten der Qox mittels gerichteter Mutagenese der *qox*-Gene geschaffen.

Ein bei den molybdänhaltigen Hydroxylasen konservierter Glutamatrest, dessen katalytische Relevanz aufgrund von Röntgenstrukturanalysen verschiedener Enzyme postuliert wird, findet in QoxL E736 ein Äquivalent. Der Austausch des Glutamatrestes 736 gegen einen Glutaminrest führte zum fast vollständigen Verlust der Qox-Aktivität, was auf eine Beteiligung des Carboxylatrestes an der Katalyse hindeutet. Die geringe, jedoch im photometrischen Enzymtest nicht quantifizierbare, Restaktivität der Proteinvariante QoxE736Q konnte erst nach 12stündiger Inkubation des Enzyms mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor Iodnitrotetrazoliumviolett

nachgewiesen werden. Während im funktionellen Enzym die Carboxylatgruppe des Glutamatrestes ein Wassermolekül durch Abstraktion eines Protons aktiviert, worauf durch einen nukleophilen Angriff des Hydroxid-Ions die Oxidation des Substrats eingeleitet wird, ist eine viel schwächere Restaktivität jedoch auch ohne Aktivierung durch den Carboxylatrest vorstellbar.

Ein 10,8 kb langes Fragment des *A. ilicis* Rü61a Genoms, kloniert in den Cosmidvektor pVK100, verleiht *P. putida* KT2440 die Fähigkeit, Chinaldin zu Anthranilat umzusetzen. Neben den Genen *qoxLMS* sind auf diesem Fragment die Enzyme für die drei nachfolgenden Schritte des Abbaus kodiert: die 1*H*-4-Oxochinaldin-3-Monooxygenase, die bereits beschriebene 1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-Dioxygenase und die *N*-Acetylanthranilat-Amidase. Die Identität der Monooxygenase und der Amidase wurde durch Insertionsmutagenese verifiziert. Die Disruption der entsprechenden Gene resultierte in einem Stoffwechselblock in der Chinaldin-Degradation nach den Zwischenprodukten 1*H*-4-Oxochinaldin bzw. *N*-Acetylanthranilsäure. Außerdem befinden sich auf dem 10,8 kb Fragment ein Gen für ein potentielles Transportprotein und ein Gen für ein hypothetisches Molybdäncofaktor-inserierendes Chaperon. Auf einem weiteren 12,2 kb langen Fragment aus *A. ilicis* Rü61a wurden elf vollständige ORFs detektiert. Sie kodieren wahrscheinlich für ein Fragment einer Glutamyl-tRNA-Synthetase, eine Esterase, zwei Oxidoreduktasen der Familie der *short-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen, einen TetR-ähnlichen Transkriptionsrepressor, eine ATPase aus der Superfamilie der AAA<sup>+</sup> ATPasen, ein Enzym, das C-C-Bindungen spaltet und der Familie der Fumarylacetoacetat-Hydrolasen angehört und ein Enzym, welches Ähnlichkeiten zu der Gruppe der Mandelat-Racemasen aufweist. Außerdem fand sich ein ORF, dessen Genprodukt eventuell die Funktion einer Phosphohydrolase hat, ein ORF, der wahrscheinlich für ein Transmembranprotein kodiert und ein weiterer ORF, für dessen Genprodukt keine Funktion postuliert werden kann. Eine Beteiligung dieser Proteine am Chinaldin-Abbau ist wahrscheinlich nicht gegeben.

---

## 6. Literatur

- ALMENDRA, M.J., BRONDINO, C.D., GAVEL, O., PEREIRA, A.S., TAVARES, P., BURSAKOV, S., DUARTE, R., CALDEIRA, J., MOURA, J.J., MOURA, I. 1999  
Purification and characterization of a tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*.  
*Biochemistry* **38**, 16366-16372
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997  
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.  
*Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402
- ANDERSON, M.L.M., BRYAN, D.Y. 1985  
Quantitative filter hybridization.  
Seiten 73-111 *In* B.D. Hames und S.J. Higgins (Eds.), *Nucleic acid hybridization – a practical approach*. IRL Press, Oxford University Press.
- ANDERSON, L.A., PALMER, T., PRICE, N.C., BORNEMANN, S., BOXER, D.H., PAU, R.N. 1997  
Characterisation of the molybdenum-responsive ModE regulatory protein and its binding to the promoter region of the *modABCD* (molybdenum transport) operon of *Escherichia coli*.  
*Eur. J. Biochem.* **246**, 119-126
- ARAVIND, L., KOONIN, E.V. 1998  
The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases.  
*Trends Biochem. Sci.* **23**, 469-472
- ASANO, Y., KATO, Y., YAMADA, A., KONDO, K. 1992  
Structural similarity of D-aminopeptidase to carboxypeptidase DD and  $\beta$ -lactamases.  
*Biochemistry* **31**, 2316-2328

---

BABBITT, P.C., HASSON, M.S., WEDEKIND, J.E., PALMER, D.R., BARRETT, W.C., REED, G.H., RAYMENT, I., RINGE, D., KENYON, G.L., GERLT, J.A. 1996

The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the  $\alpha$ -protons of carboxylic acids.

Biochemistry **35**, 16489-16501

BABSON, A.L., BABSON, S.R. 1973

Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity.

Clin. Chem. **7**, 766-769

BAGDASARIAN, M., LURZ, R., RÜCKERT, B., FRANKLIN, F.C., BAGDASARIAN, M.M., FREY, J., TIMMIS, K.N. 1981

Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*.

Gene **16**, 237-247

BAITSCH, D., SANDU, C., BRANDSCH, R., IGLOI, G.L. 2001

Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase.

J. Bacteriol. **183**, 5262-5267

BARATA, B.A., Le GALL, J., MOURA, J.J. 1993

Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio gigas*: in vitro reconstitution of an electron-transfer chain from aldehydes to the production of molecular hydrogen.

Biochemistry **32**, 11559-11568

BATEMAN, R.L., BHANUMOORTHY, P., WITTE, J.F., McCLARD, R.W., GROMPE, M., TIMM, D.E. 2001

Mechanistic inferences from the crystal structure of fumarylacetoacetate hydrolase with a bound phosphorus-based inhibitor.

J. Biol. Chem. **276**, 15284-15291

- BAUDER, R., TSHISUAKA, B., LINGENS, F. 1990  
Microbial metabolism of quinoline and related compounds.  
VII. Quinoline oxidoreductase from *Pseudomonas putida*: a molybdenum-containing enzyme.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **371**, 1137-1144
- BECKER, G., HENGGE-ARONIS, R. 2001  
What makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma^S$  dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of  $\sigma^S$ .  
Mol. Microbiol. **39**, 1153-1165
- BEIER, L., NYGAARD, P., JARMER, H., SAXILD, H.H. 2002  
Transcription analysis of the *Bacillus subtilis* PucR regulon and identification of a *cis*-acting sequence required for PucR-regulated expression of genes involved in purine catabolism.  
J. Bacteriol. **184**, 3232-41
- BERENS, C., HILLEN, W. 2003  
Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes.  
Eur. J. Biochem. **270**, 3109-3121
- BERGERON, A., D'ASTOUS, M., TIMM, D.E., TANGUAY, R.M. 2001  
Structural and functional analysis of missense mutations in fumarylacetoacetate hydrolase, the gene deficient in hereditary tyrosinemia type 1.  
J. Biol. Chem. **276**, 15225-15231
- BERGMEYER, H.U. 1975  
Neue Werte für die molaren Extinktions-Koeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium.  
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **11**, 507-508
- BETZ, A., FACEY, S.J., HAUER, B., TSHISUAKA, B., LINGENS, F. 2000  
Molecular cloning, sequencing, expression, and site-directed mutagenesis of the 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase gene from *Arthrobacter* spec. Rü61a.  
J. Basic Microbiol. **40**, 7-23

---

BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. 1979

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. **7**, 1513-1523

BLACK, G.W., LYONS, C.M., WILLIAMS, E., COLBY, J., KEHOE, M., O'REILLY, C. 1990  
Cloning and expression of the carbon monoxide dehydrogenase genes from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2.

FEMS Microbiol. Lett. **58**, 249-254

BLÄSE, M., BRUNTNER, C., TSHISUAKA, B., FETZNER, S., LINGENS, F. 1996

Cloning, expression, and sequence analysis of the three genes encoding quinoline 2-oxidoreductase, a molybdenum-containing hydroxylase from *Pseudomonas putida* 86.

J. Biol. Chem. **271**, 23068-23079

BLASCO, F., DOS SANTOS, J.P., MAGALON, A., FRIXON, C., GUIGLIARELLI, B., SANTINI, C.L., GIORDANO, G. 1998

NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*.

Mol. Microbiol. **28**, 435-447

BLATNY, J.M., BRAUTASET, T., WINTHER-LARSEN, H.C., HAUGAN, K., VALLA, S. 1997a

Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon.

Appl. Environ. Microbiol. **63**, 370-379

BLATNY, J.M., BRAUTASET, T., WINTHER-LARSEN, H.C., KARUNAKARAN, P., VALLA, S. 1997b

Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria.

Plasmid **38**, 35-51

BOLL, M., FUCHS, G., MEIER, C., TRAUTWEIN, A., EL KASMI, A., RAGSDALE, S.W., BUCHANAN, G., LOWE, D.J. 2001

Redox centers of 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase, a member of the xanthine oxidase family of molybdenum-containing enzymes.

J. Biol. Chem. **276**, 47853-47862

- 
- BOTT, G., SCHMIDT, M., ROMMEL, T.O., LINGENS, F. 1990  
Microbial metabolism of quinoline and related compounds.  
V. Degradation of 1H-4-oxoquinoline by *Pseudomonas putida* 33/1.  
Biol. Chem. Hoppe Seyler. **371**, 999-1003
- BOYER, H.W., ROULLAND-DUSSOIX, D. 1969  
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*.  
J. Mol. Biol. **41**, 459-472
- BRADFORD, M.M. 1976  
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal. Biochem. **72**, 248-254
- BRAMAN, J., PAPWORTH, C., GREENER, A. 1996  
Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates.  
Methods Mol. Biol. **57**, 31-44
- BRANDSCH, R., DECKER, K. 1984  
Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*.  
Arch. Microbiol. **138**, 15-17
- BREESE, K., FUCHS, G. 1998  
4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Prosthetic groups, electron donor, and genes of a member of the molybdenum-flavin-iron-sulfur proteins.  
Eur. J. Biochem. **251**, 916-923
- BRESLAUER, K.J., FRANK, R., BLÖCKER, H., MARKY, L.A. 1986  
Predicting DNA duplex stability from the base sequence.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3746-3750
- BUCHANAN, G., SARGENT, F., BERKS, B.C., PALMER, T. 2001  
A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif.  
Arch. Microbiol. **177**, 107-112

- 
- BUGG, T., FOGHT, J.M., PICKARD, M.A., GRAY, M.R. 2000  
Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a.  
Appl. Environ. Microbiol. **66**, 5387-5392
- BURKHARD, R. 1996  
PHD: predicting 1D protein structure by profile based neural networks.  
Meth. in Enzym. **266**, 525-539
- BURKARDT, H.J., RIESS, G., PUHLER, A. 1979  
Relationship of group P1 plasmids revealed by heteroduplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical.  
J. Gen. Microbiol. **114**, 341-348
- CANNE, C., STEPHAN, I., FINSTERBUSCH, J., LINGENS, F., KAPPL, R., FETZNER, S., HÜTTERMANN, J. 1997  
Comparative EPR and redox studies of three prokaryotic enzymes of the xanthine oxidase family: quinoline 2-oxidoreductase, quinaldine 4-oxidase, and isoquinoline 1-oxidoreductase.  
Biochemistry **36**, 9780-9790
- CANNONS, A.C., BARBER, M.J., SOLOMONSON, L.P. 1993  
Expression and characterization of the heme-binding domain of *Chlorella* nitrate reductase.  
J. Biol. Chem. **268**, 3268-3271
- CARL, B., ARNOLD, A., HAUER, B., FETZNER, S. 2004  
Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinoline degradation.  
Gene, in Revision
- CHAIYEN, P., BALLOU, D.P., MASSEY, V. 1997  
Gene cloning, sequence analysis, and expression of 2-methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 7233-7238
- CHAN, M.K., MUKUND, S., KLETZIN, A., ADAMS, M.W., REES, D.C. 1995  
Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase.  
Science **267**, 1463-1469

---

CHAUHAN, A., CHAKRABORTI, A.K., JAIN, R.K. 2000

Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **270**, 733-40

CHAUHAN, A., JAIN, R.K. 2000

Degradation of *o*-nitrobenzoate via anthranilic acid (*o*-aminobenzoate) by *Arthrobacter protophormiae*: a plasmid-encoded new pathway.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **267**, 236-244

CHRISTENSEN, B.B., STERNBERG, C., ANDERSEN, J.B., EBERL, L., MØLLER, S., GIVSKOV, M., MOLIN, S. 1998

Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community.

Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2247-55

CLARK, T.J., MOMANY, C., NEIDLE, E.L. 2002

The *benPK* operon, proposed to play a role in transport, is part of a regulon for benzoate catabolism in *Acinetobacter* sp. strain ADP1.

Microbiology **148**, 1213-1223

CLINE, J., BRAMAN, J.C., HOGREFE, H.H. 1996

PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases.

Nucleic Acids Res. **24**, 3546-3551

COLLIER, L.S., NICHOLS, N.N., NEIDLE, E.L. 1997

*benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1.

J. Bacteriol. **179**, 5943-5946

COUGHLAN, M.P. 1980

Aldehyde oxidase, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase: Hydroxylases containing molybdenum, iron-sulfur and flavin.

*In* Molybdenum and molybdenum-containing enzymes: Seiten 119-185. Pergamon Press, Oxford.

- DAVIS, R.W., BOTSTEIN, D., ROTH, J.R. 1980  
A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA
- DAVISON, J. 1999  
Genetic exchange between bacteria in the environment.  
Plasmid **42**, 73-91
- DE BEYER, A., LINGENS, F. 1993  
Microbial metabolism of quinoline and related compounds. XVI. Quinaldine oxidoreductase from *Arthrobacter spec.* R61a: a molybdenum-containing enzyme catalysing the hydroxylation at C-4 of the heterocycle.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler. **374**, 101-110
- DE HASETH, P.L., ZUPANCIC, M.L., RECORD, M.T. JR. 1998  
RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase.  
J. Bacteriol. **180**, 3019-3025
- DEMBEK, G., ROMMEL, T., LINGENS, F., HÖKE, H. 1989  
Degradation of quinaldine by *Alcaligenes* sp. and by *Arthrobacter* sp..  
FEBS Lett. **246**, 113-116
- DÍAZ, E., FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M.A., GARCÍA, J.L. 2001  
Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*.  
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**, 523-569
- DITTY, J.L., HARWOOD, C.S. 2002  
Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H<sup>+</sup> symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from *Pseudomonas putida*.  
J. Bacteriol. **184**, 1444-1448
- DIXON, M., WEBB, E.C. 1979  
Enzymes.  
3. Aufl., R. Clay (The Chaucer Press) Ltd., Bungay, Suffolk, UK

- DOBBEK, H., GREMER, L., KIEFERSAUER, R., HUBER, R., MEYER, O. 2002  
Catalysis at a dinuclear [CuSMo(=O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 15971-15976
- DOBBEK, H., GREMER, L., MEYER, O., HUBER, R. 1999  
Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing *S*-selenylcysteine.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 8884-8889
- DOWER, W. J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. 1988.  
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.  
Nucleic Acids Res. **16**, 6127-6145.
- DURLAND, R.H., TOUKDARIAN, A., FANG, F., HELINSKI, D.R. 1990  
Mutations in the *trfA* replication gene of the broad-host-range plasmid RK2 result in elevated plasmid copy numbers.  
J. Bacteriol. **172**, 3859-3867
- EATON, R.W. 1997  
*p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate.  
J. Bacteriol. **179**, 3171-3180
- EBY, D.M., BEHARRY, Z.M., COULTER, E.D., KURTZ, D.M. JR., NEIDLE, E.L. 2001  
Characterization and evolution of anthranilate 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1.  
J. Bacteriol. **183**, 109-118
- ELLIS, P.J., CONRADS, T., HILLE, R., KUHN, P. 2001  
Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å.  
Structure (Camb) **9**, 125-132

- ENROTH, C., EGER, B.T., OKAMOTO, K., NISHINO, T., NISHINO, T., PAI, E.F. 2000  
Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion.  
Proc Natl. Acad. Sci. USA **97**, 10723-10728
- EPPINK, M.H., BUNTHOL, C., SCHREUDER, H.A., VAN BERKEL, W.J. 1999b  
Phe161 and Arg166 variants of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. Implications for NADPH recognition and structural stability.  
FEBS Lett. **443**, 251-255
- EPPINK, M.H., OVERKAMP, K.M., SCHREUDER, H.A., VAN BERKEL, W.J. 1999a  
Switch of coenzyme specificity of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase.  
J. Mol. Biol. **292**, 87-96
- EPPINK, M.H., SCHREUDER, H.A., VAN BERKEL, W.J. 1997  
Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding.  
Protein Sci. **6**, 2454-2458
- EPPINK, M.H., SCHREUDER, H.A., VAN BERKEL, W.J. 1998a  
Lys42 and Ser42 variants of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens* reveal that Arg42 is essential for NADPH binding.  
Eur. J. Biochem. **253**, 194-201
- EPPINK, M.H., SCHREUDER, H.A., VAN BERKEL, W.J. 1998b  
Interdomain binding of NADPH in *p*-hydroxybenzoate hydroxylase as suggested by kinetic, crystallographic and modeling studies of histidine 162 and arginine 269 variants.  
J. Biol. Chem. **273**, 21031-21039
- FERNÁNDEZ-CAÑÓN, J.M., PEÑALVA, M.A. 1995  
Fungal metabolic model for human type I hereditary tyrosinaemia.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 9132-9136
- FETZNER, S. 2002  
Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. **60**, 243-57

FETZNER, S., MÜLLER, R., LINGENS, F. 1992

Purification and some properties of 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase, a two-component enzyme system from *Pseudomonas cepacia* 2CBS.

J. Bacteriol. **174**, 279-290

FETZNER, S., TSHISUAKA, B., LINGENS, F., KAPPL, R., HÜTTERMANN, J. 1998

Bacterial degradation of quinoline and derivatives - Pathways and their biocatalysts.

Angew. Chem. Int. Ed. **37**, 576-597

FISCHER, F., FETZNER, S. 2000

Site-directed mutagenesis of potential catalytic residues in 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase, and hypothesis on the catalytic mechanism of 2,4-dioxygenolytic ring cleavage.

FEMS Microbiol. Lett. **190**, 21-27

FISCHER, F., KÜNNE, S., FETZNER, S. 1999

Bacterial 2,4-dioxygenases: New members of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily of enzymes functionally related to serine hydrolases.

J. Bacteriol. **181**, 5725-5733

FISCHER, B., NIETER BURGMEYER, S.J. 2002

Models for the pyranopterin-containing molybdenum and tungsten cofactors.

In Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Ed.), Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 265-316, Marcel Dekker, New York

FOGHT, J.M., WESTLAKE, D.W. 1996

Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*.

Biodegradation **7**, 353-366

FOURNAND, D., ARNAUD, A. 2001

Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity.

J. Appl. Microbiol. **91**, 381-393

FRAAIJE, M.W., VAN BERKEL, W.J., BENEN, J.A., VISSER, J., MATTEVI, A. 1998

A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain.

Trends Biochem. Sci. **23**, 206-207

---

FREIST, W., GAUSS, D.H., SÖLL, D., LAPOINTE, J. 1997

Glutamyl-tRNA synthetase.

Biol. Chem. **378**, 1313-1329

FRERICHS-DEEKEN, U. 2000

Molybdo-Eisen/Schwefel-Flavoproteine: Klonierung und heterologe Expression der Gene der Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* 86.

Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

FRERICHS-DEEKEN, U., GOLDENSTEDT, B., GAHL-JANßEN, R., KAPPL, R., HÜTTERMANN, J., FETZNER, S. 2003

Functional expression of the quinoline 2-oxidoreductase genes *qorMSL* in *Pseudomonas putida* KT2440 pUF1 and in *Pseudomonas putida* 86-1  $\Delta qor$  pUF1 and analysis of the Qor proteins.

Eur. J. Biochem. **270**, 1567-77

FREUDENBERG, W., KÖNIG, K., ANDREESEN, J.R. 1988

Nicotine dehydrogenase from *Arthrobacter oxidans*: a molybdenum-containing hydroxylase.

FEMS Microbiol. Lett. **52**, 13-18

FURUKAWA, K., CHAKRABARTY, A.M. 1982

Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls.

Appl. Environ. Microbiol. **44**, 619-626

GALLEGOS, M.T., MARQUÉS, S., RAMOS, J.L. 1996

Expression of the TOL plasmid *xylS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a  $\sigma^{70}$ -dependent promoter or from  $\sigma^{70}$ - and  $\sigma^{54}$ -dependent tandem promoters according to the compound used for growth.

J. Bacteriol. **178**, 2356-2361

GARRETT, R.M., RAJAGOPALAN, K.V. 1994

Molecular cloning of rat liver sulfite oxidase. Expression of a eukaryotic Mo-pterin-containing enzyme in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **269**, 272-276

GE, Y., VAILLANCOURT, F.H., AGAR, N.Y., ELTIS, L.D. 2002

Reactivity of toluate dioxygenase with substituted benzoates and dioxygen.

J. Bacteriol. **184**, 4096-4103

GERLT, J.A., BABBITT, P.C. 2001

Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies.

Annu. Rev. Biochem. **70**, 209-246

GIBSON, J, DISPENSA, M., HARWOOD, C.S. 1997

4-Hydroxybenzoyl coenzyme A reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases.

J. Bacteriol. **179**, 634-642

GLATIGNY, A., HOF, P., ROMÃO, M.J., HUBER, R., SCAZZOCCHIO, C. 1998

Altered specificity mutations define residues essential for substrate positioning in xanthine dehydrogenase.

J. Mol. Biol. **278**, 431-438

GNIDA, M., FERNER, R., GREMER, L., MEYER, O., MEYER-KLAUCKE, W. 2003

A novel binuclear [CuSMo] cluster at the active site of carbon monoxide dehydrogenase: characterization by X-ray absorption spectroscopy.

Biochemistry **42**, 222-230

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.M., MARQUÉS, S., DOMINGUEZ-CUEVAS, P., RAMOS, J.L. 2002

XylS activator and RNA polymerase binding sites at the *Pm* promoter overlap.

FEBS Lett. **519**, 117-122

GREATED, A., LAMBERTSEN, L., WILLIAMS, P.A., THOMAS, C.M. 2002

Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*.

Environ. Microbiol. **4**, 856-871

GRETHER-BECK, S., IGLOI, G.L., PUST, S., SCHILZ, E., DECKER, K., BRANDSCH, R. 1994

Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*.

Mol. Microbiol. **13**, 929-936

---

GUSE, A., STEVENSON, C.E., KUPER, J., BUCHANAN, G., SCHWARZ, G., GIORDANO, G., MAGALON, A., MENDEL, R.R., LAWSON, D.M., PALMER, T. 2003  
Biochemical and structural analysis of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MobA.  
*J. Biol. Chem.* **278**, 25302-25307

GUTTERIDGE, S., TANNER, S.J., BRAY, R.C. 1978  
Comparison of the molybdenum centres of native and desulpho xanthine oxidase. The nature of the cyanide-labile sulphur atom and the nature of the proton-accepting group.  
*Biochem. J.* **175**, 887-897

HABE, H., MIYAKOSHI, M., CHUNG, J., KASUGA, K., YOSHIDA, T., NOJIRI, H., OMORI, T. 2003  
Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 44-54

HADDAD, S., EBY, D.M., NEIDLE, E.L. 2001  
Cloning and expression of the benzoate dioxygenase genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2507-25014

HAMES, B.D. 1990  
One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.  
Seite 1-147. *In* B.D. Hames und D. Rickwood (Eds.), *Gel electrophoresis of proteins - a practical approach*, 2. Aufl., IRL Press, Oxford University Press.

HANES, C.S., 1932  
Studies on plant amylase. I The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley.  
*Biochem. J.* **26**, 1406-1421

HÄNZELMANN, P., MEYER, O. 1998  
Effect of molybdate and tungstate on the biosynthesis of CO dehydrogenase and the molybdopterin cytosine-dinucleotide-type of molybdenum cofactor in *Hydrogenophaga pseudoflava*.  
*Eur. J. Biochem.* **255**, 755-765

- HARWOOD, S., NICHOLS, N.N., KIM, M.K., DITTY, J.L., PARALES, R.E. 1994  
Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate.  
J. Bacteriol. **176**, 6479-6488
- HASSON, M.S., SCHLICHTING, I., MOULAI, J., TAYLOR, K., BARRETT, W., KENYON, G.L., BABBITT, P.C., GERLT, J.A., PETSKO, G.A., RINGE, D. 1998  
Evolution of an enzyme active site: the structure of a new crystal form of muconate lactonizing enzyme compared with mandelate racemase and enolase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 10396-10401
- HAYATSU, M., HIRANO, M., NAGATA, T. 1999  
Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. strain RC100.  
Appl. Environ. Microbiol. **65**, 1015-1019
- HETTRICH, D., LINGENS, F. 1991  
Microbial metabolism of quinoline and related compounds. VIII. Xanthine dehydrogenase from a quinoline utilizing *Pseudomonas putida* strain.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **372**, 203-211
- HICKEY, W.J., SABAT, G., YUROFF, A.S., ARMENT, A.R., PÉREZ-LESHER, J. 2001  
Cloning, nucleotide sequencing, and functional analysis of a novel, mobile cluster of biodegradation genes from *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2.  
Appl. Environ. Microbiol. **67**, 4603-4609
- HIGGINS, D.G., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. 1996  
Using CLUSTAL for multiple sequence alignments.  
Methods Enzymol. **266**, 383-402
- HILLE, R. 1996  
The mononuclear molybdenum enzymes.  
Chem. Rev. **96**, 2757-2816
- HILLE, R. 2002  
Molybdenum enzymes containing the pyranopterin cofactor: an overview.  
*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.), Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 187-226, Marcel Dekker, New York

- 
- HIROKAWA, T., BOON-CHIENG, S., MITAKU, S. 1998  
SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins.  
*Bioinformatics* **14**, 378-379
- HOHN, B. 1979  
*In vitro* packaging of  $\lambda$  and cosmid DNA.  
*Methods Enzymol.* **68**, 299-309
- HOLTEL, A., MARQUÉS, S., MÖHLER, I., JAKUBZIK, U., TIMMIS, K.N. 1994  
Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid.  
*J. Bacteriol.* **176**, 1773-1776
- HOMBURG, S. 2002  
Nachweis und Charakterisierung von Abbauplasmiden in Isochinolin, Chinolin und Chinaldin verwertenden Bakterien.  
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- HOPWOOD, D.A., BIBB, M.J., CHATER, K.F., KIESER, T., BRUTON, C.J., KIESER, C.M., LYDIATE, C.P., WARD, J.M., SCHREMPF, H. 1985  
Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual.  
The John Innes Foundation, Norwich, U. K.
- HUBER, R., HOF, P., DUARTE, R.O., MOURA, J.J., MOURA, I., LIU, M.Y., LeGALL, J., HILLE, R., ARCHER, M., ROMÃO, M.J. 1996  
A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 8846-8851
- HUGHES, R.K., DOYLE, W.A., CHOVNICK, A., WHITTLE, J.R., BURKE, J.F., BRAY, R.C. 1992  
Use of rosy mutant strains of *Drosophila melanogaster* to probe the structure and function of xanthine dehydrogenase.  
*Biochem. J.* **285**, 507-513

---

HUND, H.K., DE BEYER, A., LINGENS, F. 1990

Microbial metabolism of quinoline and related compounds. VI. Degradation of quinaldine by *Arthrobacter* sp..

Biol. Chem. Hoppe-Seyler **371**, 1005-1008

IBUKA, A.S., ISHII, Y., GALLEN, M., ISHIGURO, M., YAMAGUCHI, K., FRERE, J.M., MATSUZAWA, H., SAKAI, H. 2003

Crystal structure of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion.

Biochemistry **42**, 10634-10643

IIDA, T., MUKOUZAKA, Y., NAKAMURA, K., KUDO, T. 2002

Plasmid-borne genes code for an angular dioxygenase involved in dibenzofuran degradation by *Terrabacter* sp. strain YK3.

Appl. Environ. Microbiol. **68**, 3716-3723

IGLOI, G.L., BRANDSCH, R. 2003

Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system.

J. Bacteriol. **185**, 1976-1986

ISRAEL, I., SOHNI, M., FETZNER, S. 2002

Expression of the *iorAB* genes from *Brevundimonas diminuta* 7 encoding the molybdenum hydroxylase isoquinoline 1-oxidoreductase in *Pseudomonas putida*.

FEMS Microbiol. Lett. **210**, 123-127

IWASAKI K., UCHIYAMA, H., YAGI, O., KURABAYASHI, T., ISHIZUKU, K., TAKAMURA, Y. 1994

Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation.

Biosci. Biotech. Biochem. **58**, 851-854

JERPSETH, B., GREENER, A., SHORT, J.M., VIOLA, J., KRETZ, P. L. 1992

XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: *mcrA*' , *mcrCB*' , *mcrF*' , *mrr*' , *hsdR*' derivatives of XL1-Blue cells.

Stratagies Mol. Biol. **5**, 81-83

- JESSEN-MARSHALL, A.E., PARKER, N.J., BROOKER, R.J. 1997  
Suppressor analysis of mutations in the loop 2-3 motif of lactose permease: evidence that glycine-64 is an important residue for conformational changes.  
J. Bacteriol. **179**, 2616-2622
- JIMÉNEZ, J.I., MINAMBRES, B., GARCÍA, J.L., DÍAZ, E. 2002  
Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440.  
Environ. Microbiol. **4**, 824-841
- JISHAGE, M., ISHIHAMA, A. 1997  
Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110.  
J. Bacteriol. **179**, 959-963
- JISHAGE, M., KVINT, K., SHINGLER, V., NYSTRÖM, T. 2002  
Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp.  
Genes Dev. **16**, 1260-1270
- JONES, D., COLLINS, M.D. 1986  
*In* Bergey's Manual of Systematic Microbiology (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharp, M. E., and Holt, J. G., Eds.), Vol. 2, Seiten 1261-1434, Williams & Wilkins, Baltimore
- JÖRNVALL, H., PERSSON, B., KROOK, M., ATRIAN, S., GONZALEZ-DUARTE, R., JEFFERY, J., GHOSH, D. 1995  
Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR).  
Biochemistry **34**, 6003-6013
- KALLBERG, Y., OPPERMANN, U., JÖRNVALL, H., PERSSON, B. 2002  
Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes.  
Eur. J. Biochem. **269**, 4409-4417
- KANG, B.S., KIM, Y.M. 1999  
Cloning and molecular characterization of the genes for carbon monoxide dehydrogenase and localization of molybdopterin, flavin adenine dinucleotide, and iron-sulfur centers in the enzyme of *Hydrogenophaga pseudoflava*.  
J. Bacteriol. **181**, 5581-5590

- KAPPL, R., HÜTTERMANN, J., FETZNER, S. 2002  
The molybdenum-containing hydroxylases of quinoline, isoquinoline and quinaldine.  
*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.),  
Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 481-537, Marcel Dekker, New York
- KIM, D., KIM, Y.S., KIM, S.K., KIM, S.W., ZYLSTRA, G.J., KIM, Y.M., KIM, E. 2002  
Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17.  
Appl. Environ. Microbiol. **68**, 3270-3278
- KIM, E., ZYLSTRA, G.J. 1999  
Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and *m*-xylene  
degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1.  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **23**, 294-302
- KINASHI, H., SHIMAJI-MURAYAMA, M. 1991  
Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*.  
J. Bacteriol. **173**, 1523-1529
- KISKER, C., HINRICHS, W., TOVAR, K., HILLEN, W., SAENGER, W. 1995  
The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg<sup>2+</sup> reveals mechanism of  
antibiotic resistance.  
J. Mol. Biol. **247**, 260-280
- KISKER, C., SCHINDELIN, H., PACHECO, A., WEHBI, W.A., GARRETT, R.M.,  
RAJAGOPALAN, K.V., ENEMARK, J.H., REES, D.C. 1997  
Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase.  
Cell **91**, 973-983
- KNAUF, V.C., NESTER, E.W. 1982  
Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid.  
Plasmid **8**, 45-54
- KOJIC, M., AGUILAR, C., VENTURI, V. 2002  
TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters.  
J. Bacteriol. **184**, 2324-2330

---

KOSONO, S., MAEDA, M., FUJI, F., ARAI, H., KUDO, T. 1997

Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation.

Appl. Environ. Microbiol. **63**, 3282-3285

KOWALCHUK, G.A., HARTNETT, G.B., BENSON, A., HOUGHTON, J.E., NGAI, K.L., ORNSTON, L.N. 1994

Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus pca* operon.

Gene **146**, 23-30

KURNASOV, O., JABLONSKI, L., POLANUYER, B., DORRSTEIN, P., BEGLEY, T., OSTERMAN, A. 2003

Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase.

FEMS Microbiol. Lett. **227**, 219-227

KUSANO, S., DING, Q., FUJITA, N., ISHIHAMA, A. 1996

Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E  $\sigma^{70}$  and E  $\sigma^{38}$  holoenzymes. Effect of DNA supercoiling.

J. Biol. Chem. **271**, 1998-2004

KUSANO, S., ISHIHAMA, A. 1997

Stimulatory effect of trehalose on formation and activity of *Escherichia coli* RNA polymerase E $\sigma^{38}$  holoenzyme.

J. Bacteriol. **179**, 3649-3654

KYTE, J., DOOLITTLE, R.F. 1982

A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.

J. Mol. Biol. **157**, 105-132

LAEMMLI, U. K. 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680-685

- LAKE, M.W., TEMPLE, C.A., RAJAGOPALAN, K.V., SCHINDELIN, H. 2000  
The crystal structure of the *Escherichia coli* MobA protein provides insight into molybdopterin guanine dinucleotide biosynthesis.  
J. Biol. Chem. **275**, 40211-40217
- LAWSON, D.M., SMITH, B. E. 2002  
Molybdenum nitrogenase: A crystallographic and mechanistic view.  
*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.),  
Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 75-119, Marcel Dekker, New York
- LEE, S.J., GRALLA, J.D. 2001  
Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides.  
J. Biol. Chem. **276**, 30064-30071
- Le DANTEC, C., WINTER, N., GICQUEL, B., VINCENT, V., PICARDEAU, M. 2001  
Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems.  
J. Bacteriol. **183**, 2157-2164
- LEHMANN, M., TSHISUAKA, B., FETZNER, S., LINGENS, F. 1995  
Molecular cloning of the isoquinoline 1-oxidoreductase genes from *Pseudomonas diminuta* 7, structural analysis of *iorA* and *iorB*, and sequence comparisons with other molybdenum-containing hydroxylases.  
J. Biol. Chem. **270**, 14420-14429
- LEHMANN, M., TSHISUAKA, B., FETZNER, S., ROGER, P., LINGENS, F. 1994  
Purification and characterization of isoquinoline 1-oxidoreductase from *Pseudomonas diminuta* 7, a novel molybdenum-containing hydroxylase.  
J. Biol. Chem. **269**, 11254-11260
- LEIMKÜHLER, S., KLIPP, W. 1999  
Role of XDHC in Molybdenum cofactor insertion into xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus*.  
J Bacteriol. **181**, 2745-2751

---

LESK, A.M. 1995

NAD-binding domains of dehydrogenases.

Curr. Opin. Struct. Biol. **5**, 775-783

LIU, X., DeMOSS, J.A. 1997

Characterization of NarJ, a system-specific chaperone required for nitrate reductase biogenesis in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **272**, 24266-24271

LOWE, D.J. 2002

Enzymes of the xanthine oxidase family: The role of molybdenum.

In Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.), Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 455-479, Marcel Dekker, New York

LOWE, D.J., RICHARDS, R.L., BRAY, R.C. 1997

Role of Mo-C bonds in xanthine oxidase action.

Biochem. Soc. Trans. **25**, 774-778

LUCAS, C.E., BALTHAZAR, J.T., HAGMAN, K.E., SHAFER, W.M. 1997

The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*.

J. Bacteriol. **179**, 4123-4128

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, 2001

NucleoSpin<sup>®</sup> Extrakt 2 in 1, User manual

MARGER, M.D., SAIER, M.H. 1993

A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport.

Trends Biochem. Sci. **18**, 13-20

MARQUÉS, S., RAMOS, J.L. 1993

Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways.

Mol. Microbiol. **9**, 923-929

---

MARQUÉS, S., GALLEGOS, M.T., MANZANERA, M., HOLTEL, A., TIMMIS, K.N., RAMOS, J.L. 1998

Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*.

J. Bacteriol. **180**, 2889-2894

MARQUÉS, S., MANZANERA, M., GONZÁLEZ-PERÉZ, M.M., GALLEGOS, M.T., RAMOS, J.L. 1999

The XylS-dependent *Pm* promoter is transcribed *in vivo* by RNA polymerase with  $\sigma^{32}$  or  $\sigma^{38}$  depending on the growth phase.

Mol. Microbiol. **31**, 1105-1113

MAX, N., BETZ, A., FACEY, S., LINGENS, F., HAUER, B., FETZNER, S. 1999

Cloning, sequence analysis, and expression of the *Pseudomonas putida* 33/1 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase gene, encoding a carbon monoxide forming dioxygenase.

Biochim. Biophys. Acta. **1431**, 547-552

McLUSKEY, K., HARRISON, J.A., SCHÜTTELKOPF, A.W., BOXER, D.H., HUNTER, W.N. 2003

Insight into the role of *Escherichia coli* MobB in molybdenum cofactor biosynthesis based on the high resolution crystal structure.

J. Biol. Chem. **278**, 23706-23713

MENDEL, R.R., SCHWARZ, G. 2002

Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco).

*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.), Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 317-368, Marcel Dekker, New York

MENÉNDEZ, C., IGLOI, G., HENNINGER, H., BRANDSCH, R. 1995

A pAO1-encoded molybdopterin cofactor gene (*moaA*) of *Arthrobacter nicotinovorans*: characterization and site-directed mutagenesis of the encoded protein.

Arch. Microbiol. **164**, 142-151

MISHRA, V., LAL, R., SRINIVASAN 2001

Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria.

Crit. Rev. Microbiol. **27**, 133-166

---

MÖLLER, W., AMONS, R. 1985

Phosphate-binding sequences in nucleotide-binding proteins.

FEBS Lett. **186**, 1-7

NAKADA, Y., JIANG, Y., NISHIJYO, T., ITOH, Y., LU, C.D. 2001

Molecular characterization and regulation of the *aguBA* operon, responsible for agmatine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

J. Bacteriol. **183**, 6517-6524

NARDINI, M., DIJKSTRA, B.W. 1999

$\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing.

Curr. Opin. Struct. Biol. **9**, 732-737

NEEDLEMAN, S.B., WUNSCH, C.D. 1970

A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins.

J. Mol. Biol. **48**, 443-453

NEUWALD, A.F., ARAVIND, L., SPOUGE, J.L., KOONIN, E.V. 1999

AAA<sup>+</sup>: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes.

Genome Res. **9**, 27-43

NISHIZAWA, M., SHIMIZU, M., OHKAWA, H., KANAOKA, M. 1995

Stereoselective production of (+)-*trans*-chrysanthemic acid by a microbial esterase: cloning, nucleotide sequence, and overexpression of the esterase gene of *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli*.

Appl. Environ. Microbiol. **61**, 3208-3215

NORRANDER, J., KEMPE, T., MESSING, J. 1983

Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis.

Gene **26**, 101-106

NUDLER, E., GOTTESMAN, M.E. 2002

Transcription termination and anti-termination in *E. coli*.

Genes Cells. **7**, 755-768

---

OEFNER, C., D'ARCY, A., DALY, J.J., GUBERNATOR, K., CHARNAS, R.L., HEINZE, I., HUBSCHWERLEN, C., WINKLER, F.K. 1990

Refined crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for  $\beta$ -lactam hydrolysis.

Nature **343**, 284-288

OGURA, T., WILKINSON, A.J. 2001

AAA<sup>+</sup> superfamily ATPases: common structure-diverse function.

Genes Cells **6**, 575-597

OHKUMA, M., MAEDA, Y., JOHJIMA, T., KUDO, T. 2001

Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation.

Riken Review **42**, 39-42

OLSON, J.S., BALLOU, D.P., PALMER, G., MASSEY, V. 1974

The mechanism of action of xanthine oxidase.

J. Biol. Chem. **249**, 4363-4382

ORESNIK, I.J., LADNER, C.L., TURNER, R.J. 2001

Identification of a twin-arginine leader-binding protein.

Mol. Microbiol. **40**, 323-331

ORTH, P., SCHNAPPINGER, D., HILLEN, W., SAENGER, W., HINRICHS, W. 2000

Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system.

Nat. Struct. Biol. **7**, 215-219

PABARCUS, M.K., CASIDA, J.E. 2002

Kynurenine formamidase: determination of primary structure and modeling-based prediction of tertiary structure and catalytic triad.

Biochim. Biophys. Acta **1596**, 201-211

PAI, E.F., NISHINO, T. 2002

The molybdenum-containing xanthine oxidoreductase and picolinate dehydrogenase.

*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.),

Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 431-454, Marcel Dekker, New York

---

PALMER, T., BERKS, B.C. 2003

Moving folded proteins across the bacterial cell membrane.

Microbiology **149**, 547-556

PALMER, T., SANTINI, C.L., IOBBI-NIVOL, C., EAVES, D.J., BOXER, D.H., GIORDANO, G. 1996

Involvement of the *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*.

Mol. Microbiol. **20**, 875-884

PAO, S.S., PAULSEN, I.T., SAIER, M.H. 1998

Major facilitator superfamily.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**, 1-34

PAU, R.N., LAWSON, D.M. 2002

Transport, homeostasis, regulation, and binding of molybdate and Tungstate to proteins.

*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.), Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 31-74, Marcel Dekker, New York

PEARSON, D.M., O'REILLY, C., COLBY, J., BLACK, G.W. 1994

DNA sequence of the *cut* A, B and C genes, encoding the molybdenum containing hydroxylase carbon monoxide dehydrogenase, from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2.

Biochim. Biophys. Acta **1188**, 432-438

PERONA, J.J., ROULD, M.A., STEITZ, T.A. 1993

Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase.

Biochemistry **32**, 8758-8771

PHEIFFER, B.H., ZIMMERMAN, S.B. 1983

Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions.

Nucleic Acids Res. **11**, 7853-7871

---

POLLOCK, V.V., BARBER, M.J. 1997

Biotin sulfoxide reductase. Heterologous expression and characterization of a functional molybdopterin guanine dinucleotide-containing enzyme.

J. Biol. Chem. **272**, 3355-3362

POLO, S., GUERINI, O., SOSIO, M., DEHÒ, G. 1998

Identification of two linear plasmids in the actinomycete *Planobispora rosea*.

Microbiology **144**, 2819-2825

POMMIER, J., MÉJEAN, V., GIORDANO, G., IOBBI-NIVOL, C. 1998

TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine *N*-oxide reductase enzyme (TorA) in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **273**, 16615-16620

PRIETO, M.A., DÍAZ, E., GARCÍA, J.L. 1996

Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster.

J. Bacteriol. **178**, 111-120

QIAGEN GmbH, 1997

QIAGEN Plasmid Purification Handbook 01/97

QIAGEN GmbH, 1999

QIAGEN Genomic DNA Handbook 08/99

RAJAGOPALAN, K.V., HANDLER, P. 1967

Purification and properties of chicken liver xanthine dehydrogenase.

J. Biol. Chem. **242**, 4097-4107

RAMOS, J.L., MARQUÉS, S., TIMMIS, K.N. 1997

Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators.

Annu. Rev. Microbiol. **51**, 341-373

- RAMOS, J.L., MICHAN, C., ROJO, F., DWYER, D., TIMMIS, K. 1990  
Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of *xylS*, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon.  
*J. Mol. Biol.* **211**, 373-382
- RAMOS, J.L., STOLZ, A., REINEKE, W., TIMMIS, K.N. 1986  
Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8467-8471
- REAMS, A.B., NEIDLE, E.L. 2003  
Genome plasticity in *Acinetobacter*: new degradative capabilities acquired by the spontaneous amplification of large chromosomal segments.  
*Mol. Microbiol.* **47**, 1291-1304
- REBELO, J., DIAS, J.M., HUBER, R., MOURA, J.J., ROMÃO, M.J. 2001  
Structure refinement of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* (MOP) at 1.28 Å.  
*J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 791-800
- REBELO, J., MACIEIRA, S., DIAS, J.M., HUBER, R., ASCENSO, C.S., RUSNAK, F., MOURA, J.J., MOURA, I., ROMÃO, M.J. 2000  
Gene sequence and crystal structure of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.  
*J. Mol. Biol.* **297**, 135-146
- REED, K.C., MANN, D.A. 1985  
Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes.  
*Nucleic Acids Res.* **13**, 7207-7221
- REITZER, L., SCHNEIDER, B.L. 2001  
Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 422-444
- ROBERTS, A.N., HUDSON, G.S., BRENNER, S. 1985  
An erythromycin-resistance gene from an erythromycin-producing strain of *Arthrobacter* sp..  
*Gene* **35**, 259-270

ROBERTS, R.C., HELINSKI, D.R. 1992

Definition of a minimal plasmid stabilization system from the broad-host-range plasmid RK2.  
J. Bacteriol. **174**, 8119-8132

ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS 1995

*In* The DIG system user's guide for filter hybridization (ISBN 3-88630-200-8)  
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany

ROHDE, M., MAYER, F., MEYER, O. 1984

Immunocytochemical localization of carbon monoxide oxidase in *Pseudomonas carboxydovorans*. The enzyme is attached to the inner aspect of the cytoplasmic membrane.  
J. Biol. Chem. **259**, 14788-14792

ROMÃO, M.J., ARCHER, M., MOURA, I., MOURA, J.J., LeGALL, J., ENGH, R., SCHNEIDER, M., HOF, P., HUBER, R. 1995

Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*.  
Science **270**, 1170-1176

ROMÃO, M.J., CUNHA, C.A., BRONDINO, C.D., MOURA, J.J. 2002

Molybdenum enzymes in reactions involving aldehydes and acids.  
*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.),  
Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 539-570, Marcel Dekker, New York

ROMÃO, M.J., HUBER, R. 1998

Structure and function of the xanthine-oxidase family of molybdenum enzymes.  
*In* Metal sites in proteins and models for redox centres (Hill, P.J., Sadler, A.J., Thomas, A.J., Eds.),  
Structure and Bonding, Vol. 90, Springer Verlag Berlin, Heidelberg

ROMÃO, M.J., RÖSCH, N., HUBER, R. 1997

The molybdenum site in the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* and a catalytic mechanism for this class of enzymes.  
J. Biol. Inorg. Chem. **2**, 782-785

---

ROMINE, M.F., STILLWELL, L.C., WONG, K.K., THURSTON, S.J., SISK, E.C., SENSEN, C., GAASTERLAND, T., FREDRICKSON, J.K., SAFFER, J.D. 1999  
Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199.

J. Bacteriol. **181**, 1585-1602

ROPER, D.I., COOPER, R.A. 1993

Purification, nucleotide sequence and some properties of a bifunctional isomerase/decarboxylase from the homoprotocatechuate degradative pathway of *Escherichia coli* C.

Eur. J. Biochem. **217**, 575-580

ROY, R., ADAMS, M.W.W. 2002

Tungsten-dependent aldehyde oxidoreductase: A new family of enzymes containing the pterin cofactor.

*In* Molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes (Sigel, A., Sigel, H., Eds.), Metal Ions in Biological Systems Vol. 39, Seiten 673-697, Marcel Dekker, New York

RUIZ, R., MARQUÉS, S., RAMOS, J.L. 2003

Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS protein, the positive transcriptional regulator of the TOL *meta*-cleavage pathway, are involved in dimerization.

J. Bacteriol. **185**, 3036-3041

RUIZ, R., RAMOS, J.L. 2001

Residues 137 and 153 of XylS influence contacts with the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **287**, 519-521

RUIZ, R., RAMOS, J.L. 2002

Residues 137 and 153 at the N terminus of the XylS protein influence the effector profile of this transcriptional regulator and the  $\sigma$  factor used by RNA polymerase to stimulate transcription from its cognate promoter.

J. Biol. Chem. **277**, 7282-7286

- RUIZ, R., RAMOS, J.L., EGAN, S.M. 2001  
Interactions of the XylS regulators with the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit influence the expression level from the cognate *Pm* promoter.  
FEBS Lett. **491**, 207-211
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. 1988  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase.  
Science **239**, 487-491
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. 1985  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
Science **230**, 1350-1354
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989  
Molecular cloning: a laboratory manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- SAMUELS, A.L., LANKA, E., DAVIES, J.E. 2000  
Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli*.  
J. Bacteriol. **182**, 2709-2715
- SANTIAGO, B., SCHÜBEL, U., EGELSEER, C., MEYER, O. 1999  
Sequence analysis, characterization and CO-specific transcription of the *cox* gene cluster on the megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*.  
Gene **236**, 115-124
- SCHENK, S., HOELZ, A., KRAUSS, B., DECKER, K. 1998  
Gene structures and properties of enzymes of the plasmid-encoded nicotine catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans*.  
J. Mol. Biol. **284**, 1323-1339
- SCHINDELIN, H., KISKER, C., HILTON, J., RAJAGOPALAN, K.V., REES, D.C. 1996  
Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination.  
Science **272**, 1615-1621

- SCHMITZ, A., GARTEMANN, K.H., FIEDLER, J., GRUND, E., EICHENLAUB, R. 1992  
Cloning and sequence analysis of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU.  
Appl. Environ. Microbiol. **58**, 4068-4071
- SCHNEIDER, F., LÖWE, J., HUBER, R., SCHINDELIN, H., KISKER, C., KNÄBLEIN, J. 1996  
Crystal structure of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* at 1.88 Å resolution.  
J. Mol. Biol. **263**, 53-69
- SCHÜBEL, U., KRAUT, M., MÖRSDORF, G., MEYER, O. 1995  
Molecular characterization of the gene cluster *coxMSL* encoding the molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*.  
J. Bacteriol. **177**, 2197-2203
- SCHÜHLE, K., JAHN, M., GHISLA, S., FUCHS, G. 2001  
Two similar gene clusters coding for enzymes of a new type of aerobic 2-aminobenzoate (anthranilate) metabolism in the bacterium *Azoarcus evansii*.  
J. Bacteriol. **183**, 5268-5278
- SCHUMACHER, M.A., MILLER, M.C., GRKOVIC, S., BROWN, M.H., SKURRAY, R.A., BRENNAN, R.G. 2002  
Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR.  
EMBO J. **21**, 1210-1208
- SEKINE, S., NUREKI, O., DUBOIS, D.Y., BERNIER, S., CHENEVERT, R., LAPOINTE, J., VASSYLYEV, D.G., YOKOYAMA, S. 2003  
ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is switched to the productive mode by tRNA binding.  
EMBO J. **22**, 676-688

---

SHIMAMURA, T., IBUKA, A., FUSHINOBU, S., WAKAGI, T., ISHIGURO, M., ISHII, Y., MATSUZAWA, H. 2002

Acyl-intermediate structures of the extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase, Toho-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin.

J. Biol. Chem. **277**, 46601-46608

SHIMIZU, S., KOBAYASHI, H., MASAI, E., FUKUDA, M. 2001

Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1.

Appl. Environ. Microbiol. **67**, 2021-2028

SHINE, J., DALGARNO, L. 1974.

The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosomal binding sites.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 1342-1346.

SIA, E.A., ROBERTS, R.C., EASTER, C., HELINSKI, D.R., FIGURSKI, D.H. 1995

Different relative importance of the *par* operons and the effect of conjugal transfer on the maintenance of intact promiscuous plasmid RK2.

J. Bacteriol. **177**, 2789-2797

SIMON, R., PRIEFER, U., PÜHLER, A. 1983

A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.

Bio/Technology **1**, 784-791

SODERGREN, E.J., HSU, P.Y., DE MOSS, J.A. 1988

Roles of the *narJ* and *narI* gene products in the expression of nitrate reductase in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **263**, 16156-16162

SOUTHERN, E.M. 1975

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. **98**, 503-517

- 
- STECKER, C., JOHANN, A., HERZBERG, C., AVERHOFF, B., GOTTSCHALK, G. 2003  
Complete nucleotide sequence and genetic organization of the 210-kilobase linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2.  
J. Bacteriol. **185**, 5269-5274
- STEPHAN, I. 1993  
Untersuchungen zur Optimierung der Reinigung der Chinaldin-4-oxidoreduktase aus *Arthrobacter spec.* Rü61a.  
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim
- STEPHAN, I., TSHISUAKA, B., FETZNER, S., LINGENS, F. 1996  
Quinaldine 4-oxidase from *Arthrobacter* sp. Rü61a, a versatile procaryotic molybdenum-containing hydroxylase active towards N-containing heterocyclic compounds and aromatic aldehydes.  
Eur. J. Biochem. **236**, 155-162
- STICHT, H., RÖSCH, P. 1998  
The structure of iron-sulfur proteins.  
Prog. Biophys. Mol. Biol. **70**, 95-136
- St MAURICE, M., BEARNE, S.L. 2000  
Reaction intermediate analogues for mandelate racemase: interaction between Asn 197 and the  $\alpha$ -hydroxyl of the substrate promotes catalysis.  
Biochemistry **39**, 13324-13335
- SUBRAMANIAN, V., VAIDYANATHAN, C.S. 1984  
Anthranilate hydroxylase from *Aspergillus niger*: new type of NADPH-linked nonheme iron monooxygenase.  
J. Bacteriol. **160**, 651-655
- TAMAKI, T., HORINOUCI, S., FUKAYA, M., OKUMURA, H., KAWAMURA, Y., BEPPU, T. 1989  
Nucleotide sequence of the membrane-bound aldehyde dehydrogenase gene from *Acetobacter polyoxogenes*.  
J. Biochem. **106**, 541-544

---

TAME, J.R., NAMBA, K., DODSON, E.J., ROPER, D.I. 2002

The crystal structure of HpcE, a bifunctional decarboxylase/isomerase with a multifunctional fold.

Biochemistry **41**, 2982-2989

TAN, H.M. 1999

Bacterial catabolic transposons.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**, 1-12

TATUSOV, R.L., FEDOROVA, N.D., JACKSON, J.J., JACOBS, A.R., KIRYUTIN, B., KOONIN, E.V., KRYLOV, D.M., MAZUMDER, R., MEKHEDOV, S.L., NIKOLSKAYA, A.N., RAO, B.S., SMIRNOV, S., SVERDLOV, A.V., VASUDEV, A.N. S., WOLF, Y.I., YIN, J.J., NATALE, D.A. 2003

The COG database: an updated version includes eukaryotes.

BMC Bioinformatics **4**, 41-55

TEMPLE, C.A., GRAF, T.N., RAJAGOPALAN, K.V. 2000

Optimization of expression of human sulfite oxidase and its molybdenum domain.

Arch. Biochem. Biophys. **383**, 281-287

TEMPLE, C.A., RAJAGOPALAN, K.V. 2000

Mechanism of assembly of the Bis(Molybdopterin guanine dinucleotide)molybdenum cofactor in *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase.

J. Biol. Chem. **275**, 40202-40210

TERAO, M., KUROSAKI, M., DEMONTIS, S., ZANOTTA, S., GARATTINI, E. 1998

Isolation and characterization of the human aldehyde oxidase gene: conservation of intron/exon boundaries with the xanthine oxidoreductase gene indicates a common origin.

Biochem. J. **332**, 383-393

THOENES, U., FLORES, O.L., NEVES, A., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J.J., HUBER, R., ROMÃO, M.J., LEGALL, J., MOURA, J.J., RODRIGUES-POUSADA, C. 1994

Molecular cloning and sequence analysis of the gene of the molybdenum-containing aldehyde oxido-reductase of *Desulfovibrio gigas*. The deduced amino acid sequence shows similarity to xanthine dehydrogenase.

Eur. J. Biochem. **220**, 901-910

---

THOMAS, C.M. 1981

Molecular genetics of broad host range plasmid RK2

Plasmid **5**, 10-19

TSHISUAKA, B., KAPPL, R., HÜTTERMANN, J., LINGENS, F. 1993

Quinoline oxidoreductase from *Pseudomonas putida* 86: an improved purification procedure and electron paramagnetic resonance spectroscopy.

Biochemistry **32**, 12928-12934

TRUGLIO, J.J., THEIS, K., LEIMKÜHLER, S., RAPPA, R., RAJAGOPALAN, K.V., KISKER, C. 2002

Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*.

Structure (Camb) **10**, 115-125

VAN DER MEER, J.R., DE VOS, W.M., HARAYAMA, S., ZEHNDER, A.J. 1992

Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.

Microbiol. Rev. **56**, 677-694

VAN DER MEER, J.R., VAN NEERVEN, A.R., DE VRIES, E.J., DE VOS, W.M., ZEHNDER, A.J. 1991

Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51.

J. Bacteriol. **173**, 6-15

VIEIRA, J., MESSING, J. 1982

The pUC plasmids, a M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.

Gene **19**, 259-268

WATANABE, T., FUJIHARA, H., FURUKAWA, K. 2003

Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707.

J. Bacteriol. **185**, 3575-3582

---

WEHMEIER, L., SCHÄFER, A., BURKOVSKI, A., KRÄMER, R., MECHOLD, U., MALKE, H., PÜHLER, A., KALINOWSKI, J. 1998  
The role of the *Corynebacterium glutamicum rel* gene in (p)ppGpp metabolism.  
*Microbiology* **144**, 1853-1862

WIERENGA, R.K., TERPSTRA, P., HOL, W.G. 1986  
Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint.  
*J. Mol. Biol.* **187**, 101-107

WINTHER-LARSEN, H.C., JOSEFSEN, K.D., BRAUTASET, T., VALLA, S. 2000  
Parameters affecting gene expression from the *Pm* promoter in gram-negative bacteria.  
*Metab. Eng.* **2**, 79-91

WITTICH, R.M. 1998  
Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 489-499

WOLF, Y.I., ARAVIND, L., GRISHIN, N.V., KOONIN, E.V. 1999  
Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases-analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events.  
*Genome Res.* **9**, 689-710

WOODCOCK, D.M., CROWTHER, P.J., DOHERTY, J., JEFFERSON, S., DECRUZ, E., NOYER-WEIDNER, M., SMITH, S.S., MICHAEL, M.Z., GRAHAM, M.W. 1989  
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.  
*Nucleic Acids Res.* **17**, 3469-3478

WU, N., MO, Y., GAO, J., PAI, E.F. 2000  
Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2017-2022

WYNDHAM, R.C., CASHORE, A.E., NAKATSU, C.H., PEEL, M.C. 1994  
Catabolic transposons.  
*Biodegradation* **5**, 323-342

---

XI, H., SCHNEIDER, B.L., REITZER, L. 2000

Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage.  
J. Bacteriol. **182**, 5332-41

XIANG, Q., EDMONDSON, D.E. 1996

Purification and characterization of a prokaryotic xanthine dehydrogenase from *Comamonas acidovorans*.  
Biochemistry **35**, 5441-5450

YAMAGUCHI, M., FUJISAWA, H. 1980

Purification and characterization of an oxygenase component in benzoate 1,2-dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1.  
J. Biol. Chem. **255**, 5058-5063

YAMAUCHI, S., OKUYAMA, H., MORITA, E.H., HAYASHI, H. 2003

Gene structure and transcriptional regulation specific to the *groESL* operon from the psychrophilic bacterium *Colwellia maris*.  
Arch. Microbiol. **180**, 272-278

YEN, K.M., SERDAR, C.M. 1988

Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads.  
Crit. Rev. Microbiol. **15**, 247-268

ZAITSEV, G.M., TSOI, T.V., GRISHENKOV, V.G., PLOTNIKOVA, E.G., BORONIN, A.M. 1991

Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepedonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains.  
FEMS Microbiol. Lett. **65**, 171-176

ZHANG, X., FULLER, J.H., McINTIRE, W.S. 1993

Cloning, sequencing, expression, and regulation of the structural gene for the copper/topa quinone-containing methylamine oxidase from *Arthrobacter* strain P1, a gram-positive facultative methylotroph.  
J. Bacteriol. **175**, 5617-5627

---

ZHOU, N.Y., FUENMAYOR, S.L., WILLIAMS, P.A. 2001

*Nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism.

J. Bacteriol. **183**, 700-708

ZOR, T., SELINGER, Z. 1996

Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.

Anal. Biochem. **236**, 302-308

ZUNIGA, M.C., DURHAM, D.R., WELCH, R.A. 1981

Plasmid- and chromosome-mediated dissimilation of naphthalene and salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1.

J. Bacteriol. **147**, 836-843

## Anhang 1

Nukleotidsequenz des 23 kb Fragmentes / EMBL Accession Number: AJ537472

```
1  AAGCTTTCGA CGTCGTCCGC GTTACGTTGC GGGTGTACCC CGTCAACGGT GAAGTCGGGG TGGTGCCAGT CGATGAGCGA GTGATAGAAG CCGACCTTCA
101  GCCCCTCGGC CCGGAGTGCT TCCACATAGG GCGCGATCAG GTCGCGGCCA GCGGGTGTGT TGGTGGCTTT GTAGTCCGTG AGGGCTGAAT CCCACAGGCA
201  GAAGCCGTCA TGGTGCTTGG TGGTCAGGAC CACGTACTTC ATACCGGCGT CCCGGGCGGC ACGGGCCCAT TCCCAGGGGT CGTAAAGATC GGGATCGAAG
301  CGCTGGAAGT ACTTGGAGTA CTCCTCCACC GTAGTTTCCT CGATGTTTCAT GACCCACTCA TGCCGGGCGG GCAGGGCGTA GATGCCCCAA TGAACGAACA
401  TTCCAAAACG GGCCTCTTCA AACCAGGGTG CGTGCTGGAT CAACGGGGTT CCTTCCAGAT GGGGCCGTTC GGAAAGCTGT ACGCGGCCAG TGTTTCACGG
501  AGCATTTTCGT TTCCTGCACC TGGCGCAGCA GGCGGCCAGT AGGCGCCGTC GTGGACTACA ACGGGCGTGA TGAAGTGTTT GTGGAGGTGG TCCACGAACT
601  CGATGGTCCT ACCCTCTTTG GTCCCGGATA CAGCGATGTA GTCGAACATG GACAGGTGCT GCACTGCCTC GCACAGCCCA ACACCGCCGG CGTGCGGACA
701  AACCCTCACG CCGAACTTGG CAGCGAGGAG GAGGATGGCG ATGTTCTCGT TCACCCCGC TACCCGGGCG GCGTCAATCT GCAAGACCTG AAGCGAACCA
801  GCTTGGAGCA TCTGTTTGAA CACCACCCGG TTCTGGACGT GTTCCCCGGT GGCCACGGGA ATGGGCGCCA CTCCGCGGGC GATGGCGGCA TGTTCCAGGA
901  TGTCGTCCGG GCTGGTGGGC TCTTCGATCC AGGCGATGTG GTACGGGGCG AGGTGGGCCA TCCAGTCGAT GGCTTGTTGG ACATCCCAGC GCTGGTTGGC
1001  ATCCACCGCG ATCTTGATGT CGGGACCCAC GGCAGCGCGT GCAGTTCGAA CGCGGCGGAT GTCGTCCTCC AAGGACGCAC CCACTTTGAG CTTGATCTGG
1101  GCAAATCCGT CAGCCACAGC TTCCTTGGCC AGCCGCGTCA GTTTCTCGTC GCTGTAACCC AGCCACCCCG GCGTCGTGGT GTACGCGGGG TAACCCTCAG
1201  CGCGAAGTGC CGCTGCGCGG GTTTCCCTTC CGGGTTGAGC GGTGCGAAGG ATGGTGAGAG CTTCGTCCGG AGTGAGCGCG TCCGTGAGGT AGCGGAAGTC
1301  GACGAGCGCT ACCAGCTCTT CGGGGGTCAT GCCGGCGAGC AACTCCCACA GCGGCAGGCC CGCACGTTTG GCCTTCAAAT CCCACAGCGC ATTGACCACG
1401  GCGCCGATAG CCATATGCAT GACGCCCTTC TCGGGACCCA GCCAGCGGAG TTGGGAGTCG TGGGCCAGCA GCTTCCACGT GGCGCCATG TCATCCAGCA
1501  GTGTCTCAAC GTCCCGGCC AGGATGTGCC CACGCAGTGC ATCAAGTGCT GCGGTTTCCA CTTCATTGCC ACGCCCTATG GTGAACACGA AGCCGTGGCC
```



3401 GCCCTCAATG CCCGCCAACC GCACGGCCGG ATGGTGGTCC CCGCTGAAGT AGCCGGCGCC GTCGCCTACC TGGCGAGCCC GCTGTCCGGG TCGACGACGG  
 3501 GAACCTCGCT GCGGGTCGAC GCGGCATGC AGGGACTGCG GTTGAGGCCA GTTCAGTAGG GAGCCAGTTC CGTAGGGGGC CAGTTCGGTA GGGACGGGTG  
 3601 AGGGGCTGGA TCAGTAGAGC GCGTTGAAGA TGTTCCAGCC CCATCCGACG GTTTCGACGC CTTTCCAACC ACCGCGTCCA TCGCCGTAGT ACATCAGCAG  
 3701 CTCACCGGCG CTGTTGACGC CGTGGACATC ATTGAAGCCA TCACGGTTGA AGTCCCCGGC GCTTCCGATC TTGCTCAGGG CATTCAGCC CTGGCCAACG  
 3801 AGTCGGGGAG ACAGCCACCC GCCCCTGCCG TTCCCGCCGT ACAAGAACAG TCCGCC TACC TTGTCCCTTG CGAGGATGTC CACTGTGCCG TCACCGTTGA  
 3901 AATCGCCTGG AGTGATGAGC AGGTCCATCA CGTTCCAGCC CTGGCCAACG TGTACCCGGG GAGTCCAACC CCGTGCGGCC TTCGGATACA GGTAGAGGTT  
 4001 CCCGTTGGGC TCGGTTGCCA GGAGGTCGTT ATATCCATCG CCGTCGAAGT CTCCGGGGCC CACCACTTTG TCCATCGCAT TCCACCCCA GCCGATCTCG  
 4101 GATGGATAGG CATTGGACGG AAACGTGCCA TCGCCGCGAC CCCAGAACAT CCACAGCCTC CCTGACCCGT CAGTGGTCAG GAGCTCGGTC TTACCGTCGC  
 4201 TGGTGAGGTC CCCGCCGCCG ATAATCCGCG TGTACGAGCC CCAATTCGGG CCGATGAGCC GTGGTGGCTT CCAGCCCTGT GCACCATCCT GGCCCGGGTA  
 4301 CAGCAGCAGG GCTCCATCAT GCGGGCGTCC CAGCAACTCA AAGACACCCC TCCCGCGCAA CCCCTCGGCA CGCATCGGTT GGCTCCGGAC GACGTCGGAC  
 4401 TCCGGGACAA CAACTTGCGC AGGTTACAG GCATTCGATC CCGTCACCAC GGCAGAGATG CGGCTCCCAA CGTCTTCGAT GTCCAGGTCA TAAAACTGCG  
 4501 AGAAGTTCGG CTCGGGGTAT ACCGGCTGTC CATCACGAAG CCACTGGACG GAGTAGCTCG GCTGCGCATT CGGGTCACAC GCGGAGAAGT ACTCGTAGGC  
 4601 ACCCTTGACT GACAGCCCAG AGCCCACAAA TGCCGGGCCCT TGGATGCTGA AGTCCTCCCC ATCCACCGCA TGCGCGGACG GCACCAGCGT GGTGCTCAAA  
 4701 AGCATTGCCG CGAGCACCCC CGCGGCACTG CTCGTGAC CA TGCACTTCCC GGAAAACCAG CCCACAATC TCCTTCACGG TGCACCACAA CCGGTGTTGC  
 4801 GCTCATCTTA GGTGGGAGGT ACGACGCCGG AGCGAACCGG CGCGCCGACA GGCCGCCGTC GTGCGTTGCT TCGTAACGCA ACGGGCCCGC AACGTCCGGC  
 4901 AGCGGTCGTT CGCCTATGCT CAACTCCAAG GAATCAACGG CGACTCACTT AGCAGACTCA GGAGATACAG CCATGAGCAA CTGGCGCATC AGGGACTTCC  
 5001 ACTCGTCCGA CTTGGACGGC ATCCTGCACC TCTGGGAGTC ACTCAAGGCT GACGGCGTGG AACCGGTGTA CGCGTTGTCC GAGGTCCTGG CGTCTGCGA  
 5101 GAAGGACCAC GCCGTGGTGG CGGTCCAAGG TGACCAGGTA GTGGGTGCCG CCGTCGGACG AGCAGCGCAC GATCAAGGCT GGATCGTTTTT CCTGGCCACG  
 5201 CTGACGGAGT TCCCGGGCG CGGCATCGGC ACTTCGCTGC TGTCCGCCGT CGAGAA ATG GCGCCCGC ACGGGCTCAA CAAACTCTCC GCACTGATGC

Start ORF13

Start ORF12

5301 CGGAAACCGA AACGAGGGTG GAAGCGTTCC TGGGGCGCGG GTTCGTGGTG AAGAAGAACC TCCGCTACTT TGAGCGGACC ATCCCCGTGC AGCGGCAGGA  
5401 GCTTGGCGCA TTGGGGCTGC TGGGCGGGCG CATCCTGGCT CGGGATCTAT GGGAGAACGT GGCCGGCATG CGTCGTGAGA AGGAGCTGCT GGAACGGCGG  
5501 CTGGTTCTCC CGCTGGCTGA GGCCGACCTC GCCGACGAAT ACGGAGTTGT ACCGCCCAGG GCCGTGGTAC TTTTCGGTCC TCCGGGCACC GGCAAAACCA  
5601 CCTTCGCCAA GGCCATCGCG TCGCGCCTGG AGTGGCCGTT CGTTGAGGTC TTCCCGTCTC GCCTGGCCGC TGACCCCAAG GGCTTGGCCG GTGCGCTCCG  
5701 CGAAACGTTT CTGGAATCG CCGAGCTGGA ACATGCCGTG GTGTTTCATCG ACGAAGTAGA GGAGATCGCG TCGCAGCGTG CCGGTGATCC GCCGTGCGCG  
5801 CTGCAGGGCG TCACCAATGA ACTCCTCAAG ATCATCCCGG CCTTCCGTGA ACAGCCCGGC CGGTTGCTGG TGTGCGCCAC CAACTTCATC CGTGCCCTTG  
5901 ATACCGCGTT CCTGCGCCAC GGCCGATTCG ACTACGTCAT CCCCATCGGG CTCCCCGACG TGCACGCCCC CGAAGCAATG TGGCAGCGGT TTATCCCCGC  
6001 CACGGTGGTG GACTCGGTTG ACATCGCCCA GCTGGTGGAA CGGACCGAGG GCTTCTCGCC GCGGACATC GAGTTCGCTG CCCGCAGCGC CTCCCAGCGG  
6101 GCTCTGGAAG AAGCAGTGTA CGACGACGAC GGCTCCGGTC TTGCGTCCAA CGGGCGTAAG GGGCCGGTCA CCCAGGACTA CCTCGACGCA ATCGGTGACA  
6201 CCCGCACGAC GGTGAGCCCC GAAGTGCACC AGGACTTCCT GGAAGACATC GACGTGCTGG GCGCGTGTA GTTTTTGCTT CCTTGAACTC GCTGGAACCG  
6301 TGCGGGGTTG CTGGAACCCT GCGCGATCGC CGGAACGTTT CAGTCGATCT GGACATATTC CGGCGATCTC GCGGCGGCG GTAAATCTTTG AGCCATGTTCC  
6401 TCGAATCCCC TTCGCCATGC GCTCTCCCGC ATGGGCGGCC GCGATCCCCA CGAAAAACAC CGCACCGCCA CCCCCTTGA ACTGTTCTTC GACCTGACGT  
6501 TTGTTATTGC CTTCCGGTGT GCCGGCAGCC AGTTCGCGCA CGCTGTGGCG GAAGCGCATT TCGGGGCGGG CCTTCTGGGC TTTGGCTTCG CCATGTTTCG  
6601 GGTGATTTGG GCCTGGATTA ACTTCACCTG GTTCGCCAGC GCCTACGACA CCGATGACTG GGTGTTTCCAGG GTGGTCACCA TGATCCAGAT GGTGCGGTC  
6701 CTCATCCTGG CCATGGGCAT TGAGCCGATG TTCCACTCGA TTGTGGAAGG GGATCATGTC AACAAATGTGG CCATCCTCAT CGGCTACATC ATCATGCGCG  
6801 TAGCTCTAAT CTTCCAGTGG CTGCGCGCCG CCCGCCAAGA CCCGGAACGC CGCGAGACAT GCCTCCGTTA CGCGAAGTAC CTGGCAATTG TGCAGGTTGG  
6901 CTGGGTCATC GCGTTGGTGA TCGAAACCGA TGTCTCACA ACGTTCCTCC TGGCTGCTCC GCTGTTTCATC CTGGAGATGG CGACTCCCTA CTTGCGGGAA  
7001 CGCAAGATCC GTACGCCCTG GCATGCGCAC CACATCGCAG AGCGCTACGG CCTGCTTGCC ATCATCGCCT TGGGTGAATG CTTGATTGGT GCCATCGAAA

Start ORF1

7101 CACTCCGGGC GATTGTTGCC ACACACAGTT GGTCCCTTGA CGCCGCCCTG GTGGGCTTGA GTGGAACCGG GCTCGCCTTC GCTATGTGGT GGATCTACTT  
 7201 CATCCTGCCC TCAGGCCCGG CGCTCCACGT CCAGCGGCAT CGCTCATGGG TGT'TTGGCTA TGGCCACATG CCGGTCTTCG CAGCCATCGC GGCTACAGGG  
 7301 GCGGGACTTC ACGTCGCTGC GTACTTCATC GATCATGAGA CACATATCCC GGCGGCCGCT GCCGTGGCCT CCATCGCCGT CCCGGTCATC CTGTTCAAGG  
 7401 CCTCGCTCAC CACCCTTTAC TGCATCATGT TAGGTCCGGA TCGCGACCTT ATCTGGAGTT CCGCACTGGT GGTCCCTTGGC CTGGCTGCGA CCATTGCGCT  
 7501 GGCCGCGGCA GGTGCATCCG TACCGATCTG CATGCTGGTC ATGATGCTGG TGATGGGTTT GTCCATCGCG TACGACGAAC GACGCGGGCA CAAAGCCCGC  
 7601 TCAGCTGCTC TCCGGCGTTT GGAAACCGCC GCGGGCTAAA GAGGCAACCC CTTGCGTTGC GAGGTCTACT CAGGGACGAT CTCGTCCAGT TCCCGGAGCA  
 7701 AGTATGGGTT GATCCGTTCC AGGATCATCC GGACCTCTTC GCGGGGAACG GCCGTGTACA GCACCGGGCG GGCATCGGCG TAGCGGGTTA CCGGCGGCTT  
 7801 GTCCGGCCAC TTCTCGGCCA GCGCTTTGAC CCTCTCGGGC AGCGAGTTGT GGGCGTTGTC GGCATCTTC ACCAACGTTG CGTCGTGGTC CTCCGCAACG  
 7901 AAACGGATGC CGGCGTCGTA ATCGTCCGGG TCCTCGTGGA AGCGGCGGGT GACACGTTTC ATGATGTCTA CCGCCCGTTC GGACACCCCC ATTTCCAGCA  
 8001 GGGCTTGCCG GGTGATGGGC GTGTCTTCAG CGATGTCTGT AAGGTAGCCT GCGATCTGGA TGTCTTCGTC AAAGTCGGCG AGCGCATCGC CCACGGCCAG  
 8101 AACGTGCTCC CGATAGGGTC GTTTGAGCTT GTCCTTCTGC CGGTTGTGAG CCACCTCGGC CAAAACCTGG GCTGTCTCTA CGGTAAAGCG TGGTTGGGTC  
 Start ORF10  
 8201 ATGCTGGCCT CCGGCTTGAA GAGGGACCGA CGGGGATCGG TCCTCACCTT CAGGCTATCC GCTGTTTCGG AGCCTCGGCA CCGAGCTACC TTTCCTGCCC  
 8301 GTCTTACCAG TCCTGTACAG CGCGTGCAGC GATGGCGACG GTGACGGCCC TGGGCAGACG CTGCGCGAAT CCGGCCGCAA CGCGGTTAAC CCAGCCCGAG  
 8401 ACCACGCTGC CGGGTGTGTC CTTGCGGTTC AGGGCCTTGA GAGCAGTGCC CACAACCTGT GCAGAGGTCT GCATCTTGCC CACTGCTGCG GAGTCACCGC  
 8501 CGAGCACATC GAAGAATTCT GTTCTTGTTC CACCGGGCA AAGGGCCAGG ACGTTAGTCC GGACTTTTTG GTTTCGTGGG CCACGGCTTC GGTGAAGCTG  
 8601 AGGACGAAGG CCTTGGTTGC GCCGTAAACG GCCATGCCGG GAATGGGTTG GAACGCGGCA GTGCTGGCTA CGTTCACCAA TGCTCCCTTC CCCGAGGCGA  
 8701 GCAGTTCCGG CAGGAAGGCC CGGGTAATGT CCACGAGGGC GGCCACGTTT AAGGAAATCT CAGACGCAAT GGTCTCCGGG TCTTCTCAA TCAAGGGACC  
 8801 GTGGGTGCCA AAGCCTGCGT TGTTGATTAA GGTGTCCACG GAGATTCCGC GGCCGGCCAG TTCGTGAAG AGCTCGCGTC CCACTCCTGC AAGGCCCAGG  
 8901 TCCTTGGGGA GCACGGTCAC TGTGACACCG TGCCGGGAAC GCAATTCCTG AGCCAACCTC TCCAGACGGT CTCCACGCCT TGCCACCAGA ACAAGGTTGG

Start ORF9

9001 AGCCACGGGC AGCAAATTGT CCTGCAAACCT CAGCGCCGAG GCCGGAGCTG GCACCCGTAA TGAGGGCAGT GGTACCTGCG TAGGTCATGG TCATGGCTGA

9101 ATCCCATCGG TTGAGGCGGG GACTAATGTA GTCGCTGTCT ACATGGTAGG CAGTGACTAC ATTGTTGTCA ATGACTACAT TGACCTAGAC TGATGGCATG

9201 ACTGACCAGC CCTACCACCA CGGCAAACCTC AGGGAAGCCC TGCTGGAACG CGCCATGGAA ATCATTTGAAG AAGCTGGCGT GGACGGACTC TCCCTGCGGC

9301 AACTGGCCCCG CGATGTTAAT GTCAGTCACG GCGCCCCGGC CAAGCACTTC CGCGACAAGC AGGCACCTGGT CGATGCCATG GCACTGGCCG GCTTTGAGTC

9401 GATGAACCGC CTCATCCAGA ATGCCGCCCA ATCCGGCGAT GACCTCAGAG GCCGTTTCGT GAGTGTGGC AAGGCCTACG TCCACTTTGC CGTGGCGCAT

9501 CCCGCCCTGC TGACCGTGAT GTACTCCACC AAGCACCACC CCGATTCCAG CGTTGAACTG CGAAGCACCG GCGAGCAAGG AATACACCTG GCCCAAGCCA

9601 TGATCGCCGA GGCGCAAAAA GCCGGCGCGC TGGCCGCCGG CGACCCCGAA AACTGGCCA CGGTGTGCTT TGTGAGCCTT CACGGCGCGG CTCTTCTGGC

9701 AGCGGGCGGG CAGCTGGACG GGAAGTCAGT GGACGACGTC ATCACCGCCA CCACCGATAC CCTGTGGGCA GGCATGACGG CCGGAGTCCC GGCCGCGCAG

9801 CGCAACTAAG CGCCGCTCAG CTCAGCGCCG CCCAGCTCAG CGCCGCGCAG CTCAGCGCCG CTCAGCTCAG CTAAGCCGCG AAACCGGCGA TAACTTCCCT  
\*\*\* \*\*

9901 TACTGCCGAG CTCAGCTGGA AGTTACGGCA GCCCACCCCT CCAGGCTCAG CCGTCTGCGG GACATATCCA AAGCCGAGTT CATAACAGG GTCGGCGAAC

10001 CCCAACGATG CGCTGGCGCC GTCGTGCCCG AACGCGCGGT AACTGCCGAA CGGCATCCTG GTGTGGGACT TCATGAAAAC GGTGCCGAAG CATCCGGTCT

10101 CACCAAAAAAC GCGATCGATT CCGAACACCT GCTCAGCCGA CACCGTCCGG ATAGTCTCCT CGGTCAGGAG GGGCGGCATG GCGGATTTAC CCTCCAAGCC

10201 AGTCAATGCC GCCGCGTAGA TCCGCGCCAT GCCTTCCGCG CTGGCCACGC CGGCCGCCGA GCTCAGGCCC GCGGCCCGGA CTTCCTGGAT GTTGGGCAGA

10301 TCCAGGATGT CGCCCCTGC CGCGTTGGCA GCCAGGCCAA AGTGGCTGGC CGGGTCTACC CAAGGCCATG ACGGATCGGC CGCCCAGCGG AACTGCGCGA

10401 AGCGGGACTC TTCGGACTCG GGCAAACCAA GGTAGAAGTT CGCACCAGTC ACCGCACGGA TCGCTGCTC GAAGACCTCC TGCAGCGTGG AGCCGGTGAT

10501 GCGCCGGCAC AGCTCTTCCA TGAAGATGCC AATGGTCAGC GCGTGGTAAC CGAACGCGGT ACCGGGTTTC CATAGGGGCG GCAGCTCGGC GAGTTTGGCT

10601 GCTGCGAGCT CAGAGTTGTT GACCTCGTGG AGCGTCAGGC CGCCTTCCAC TCCAAGAGC CCCGCTCGGT GCGAAAGCAG CTGCGCAACC GTGATGGAGG

10701 ACTTGCCCTC AACGCCGAAC TCGGGCCAGT ACTTGACCAC CTCGGCTTCA AGGTCCAGTT CGCCGTCTG AACGAGCAAC GCCATGACCA AACCGGCCAT

Start ORF8

10801 GCCTTTGGAA CACGAGAAGA CGCCGGTGAC TGAATCCGGG CGGATGTGGG GGCCGCCGCT GAGGTCCAGC ACTTTGACGC CACGGTGATA CGCGGCCACT  
 10901 TGCGCAGAGT AGTCCGGATC CTGCTCAAGA AAGACGCCGA AGAGTTCGGC GACGGGTTCG AAACCTGGGG CGATCACCTG TGAATGCATC CAGACAGCCT  
 11001 ACGCGGTGGG CGGGTCAGGC CCGGGGAGTT GTCCACACCC AAGGCGTCTT CGGCACATTC TGGGGGGTGA AGTGCGGCAG GGCATCCAGC AACGGCGCGG  
 11101 CAGGCAATTG CAGGGACTCC AATATCAGGT CGCGCACCCG CTCGGCAGGA ATTCCGACGG CGGCGAGGTC GCCCAGCGTG ACCGCACCGT CGCGCTTCGC  
 11201 CAGCCTGACG CCGTCGTGGT TTACCACCAG CGGAACGTGG GCGTATTTCG GCACGGGCAG CCCCAGGAGC GTCGCCAGAT ACGCCTGCCG CGGGGTGGAT  
 11301 GAGAGGAGGT CGTCGCCGCG CACTACTTGG TCGATTCCCT GCTGGGCGTC GTCAACAACCT ACCGCGAGGT TGTAAGCGGT GACGCCGTCG TTGCGGCGAA  
 11401 GCACAAAGTC ATCCACAACA CCCACATAGT GTCCGTGCAA CTGGTCCTCA ACACCCATT CCGAGACCTC TGCCCACAAG CGAATGGAAG CAGGCCGCGT  
 11501 CGCACGCCTG ATCTCGCGTT CGGCGTGCGA AAGCCGCCTG CATGTCCCCG GGTAGGCGCC CTGCGGCGCG TCGGGCGCGG ACGGCGCCTC TTGGATTTTCG  
 11601 CGTCGCGTGC AGAAGCATT C ATAGGTTTCGG CCTTCGGCCG TTAGGCTTCC AATCGCCTGG TGGTACAGCT CCGCGCGCTC AGTCTGGCGT ACGACGGCGG  
 11701 CGTCCCAACC AACGCCTACG GCCTGCAGGT CGCGGAGCTG CTCCTCTTCA GCGCCGGAGC GGGCGCGGTC CAGATCCTCG ACGCGCAGCA GAAAATTCCG  
 11801 GCCGCTGGAC TTAGCGAACA GCCAAGCGAG AATTGCGGTG CGAAGGTTGC CGACGTGCAG TTCGCCGGAG GGGCTCGGGG CGAAGCGGCC AGCAGAAGTC  
 11901 ATGATCCAAG CCAACCACAA GAGCCCCCTCA GCTACCGCAA CGATCCGGTA GCTCAGGGGC TCTTGCTGTG GCGCCCGGGT GATAGGGCGG GTGCGGAATG  
 12001 ACAATGCTGT GAACAAGAGT CAATCAGCGG CTGTTTCCTT GCGGGAAACC TGTGCAGGGC TCCGGGTGGT GTTCCGGGGT CCTGGTGCCT GCGGGGTTCG  
 12101 GCGGTAGCCT CGCCCTGTTT CGTTGTACCC ATTTACAGCAG GAGACGTACA GTTGGTGCAA CGGACATCAT AATGATTGGT CGATCTGACC AGTCTGTTGC  
 12201 GAAAGCTTCT CGGCAAGGTG GGACGGCGGC AGGGCGGCCA GTAATGCGCT AAGTGAGGCA ACCATCGGCA GCTTCCGACG AACCGCCGTA AGTGCGCCGC  
 12301 CTAAGTAGTG TCAAATATTC AGAGTTGCGC CCATTGCCGG GTGGGTCCA GGCCTCAGGA GAGGCGGTCA GGGATCATGT CAGCAATGTC CGTTAATTTT  
 12401 GGGGCATCA TTGTGCATC GCCAACGTTG GTGCTGCCTT CAGGAATCGC GAGACAGTCA CGGGACAGAG GCACGTCCGC CAGTGAGCTG GTGATACTTT  
 12501 TCAGACGCCG TCCCTGGAGA CAGCAACCGG TTTGTCCACC TGCTCGCCGT GGGAGGTAGC GGCCGCGTTT GCCGAGGCC GGGCGAAAAG ACATATCACC  
 12601 GACACGACAG CCGTGCTTAT GCCCAAGAAG ATCCATGCCG CCGTATAGCC GCTTTTCTCG ACCAGCTGGC CGAATGCCCA GGAAGGATA ACTCCACCGA

Start ORF7

Start ORF6

HindIII

12701 TGGCTGAGAT GCTCAGCATC AGGCCACGA CCGTGCCGAT GTTTTCTGGT GAGATGCCTC GACTCCTGCC TGGTACTGTC GCCCAAATAG CCAAGGTGAA  
 12801 GTTGAGGATG AATCCTAGGC CGAGCGCGAG GAGCCAGAAG AGAGTCGGAC CCGCGAAGGG CAGGAGCGCC AAGAAGAGCG CTTCAAGAAG CACACCGGTG  
 12901 AGGAACAACG CGCGCAGGTT AGCAATGCGG TCAGCTACCA AACCAGCCAC AACGCTACCG GAACTCCGG CCAGGCCGAT CAGGAGTGCG GCCAACCGGA  
 13001 CCACGTCACC GCTGAAGCCA CGGGTTCCGC CGTAACCACT GATCAGTTGG GTAGCAGCAA AGTAGGATCC GTAGGCCCCG AGGAAGGCAA TACCGTACAG  
 13101 CCAGGCGTTC CTGGCGCCAA GGGCTTCTTT CAACCCCTGT TTAGTCAGAC GCGTCCCGGC GAGGGAGTCA ATACCCGTCG GGACCCGGAA CCAAATCGCG  
 13201 ATGATCACCG CGATAACAAG GCAAACCTCA CCGCCAATGG CCATCGACGT ACGCCACCCC GTCAGGAACG TGATCTCGGC CCACGTGTAC AGCCCGAGCG  
 13301 CGAAGCCCC ACTGAATGCG CCGACAACGA TGCCGACCGC CAATGCATGA TGT'TTGCTCT CGCGGAACCA AATGCTTGCG GCGGCGATGC CCACGGCAGC  
 13401 GAGCACGGCC GCGCCTGCAC CAGCCACGCC ACGCCAAAAG ATTAGCCAGA CAAACGATGT GGATGTCGCT GACATCAGTA CGCCGATTGC CTCGACCGTC  
 13501 AGACCCCATG CCATCGCACG CTTTAGCCCC CACCTGGTGG CAACGAAGCC TCCGGGAACG TGGAGGATTC CGTAGGTCAG AACAAAGACG GAGATAAGGA  
 13601 GTGCAACGTC TGAGATTGCA AGCCCGAATT CGGCGCTGAT TTCACCGAAA CCTGTTGAAA TATTCACTTG GTTAGCGGCC ATGGCGATGA AGCCCGCCGA  
 13701 GACGATAGCA AGCATGCCCC ATTTAGTGCT GGGTCGATTT GGGCTGATGG AGCCGGGAGT AGGGTATGAC ATATCGACGC TCCTGGGAAG GATGCTAAGC  
 13801 GAAGTGCTCT GGTGGGAGCA TCCGCAAGGA CTAATGGATT TAGGGGTGCG AGGGGTTTAC CAGATGCAGC AAGGTCCGGG TCAGGGTCTGA TTCCGGATTA  
 13901 GCAAGATCGA GGAAGACATC AAAATGATTG CCGTCTGGGA CAACAATCAG CTCGCTCTCG TGATTAACGC CCCACTCGCG CTGAAAAGTCA CGGCCCTGCG  
 14001 ACGTGAAAGC TGACGCTTCA GTCTCGGCAA GCGCCACGAT AACCGGCGTA TCTGAGCTGG GCGCAAGGAG TATTGGGCTG AGGGCGGCAG CTCGGGTCTG  
 14101 GTCGAGGGAC AACCCTCAT TGGGAAACGC GTCGACCAAG GGCCGAAGGT CATAACAGCC GCTTATCGTC ATGGCGCCTT TCACTACGTT GTCGGGCAGT  
 14201 CCGAATTCGG GCTGCCACCC CGTGGCTGCG GTCATCGCCG TGAGGTGCC TCCAGCCGAG CTGCCGATGA CGTAGATCCG CTCCGGATCC AGCCCATGGC  
 14301 CAGCGCCATG GCGAAATACC CACGCGACCG ATGCCCGTAC CTGCCGAACT ATTTCTTCGA GCGTCGCATG GGGGGAGAGA GTGTAATCCA CCGTGACCGT  
 14401 AGCGATTCCG TGTTTCGGCCA GGACCTCGGC CATAAAGGCG GTGTCGTGGC GTGACAGCAT ACGCCAGTAG CCGCCGTGGA TTGCAATCAC CACGGGCCGC

Start ORF5

14501 AGGGTCCCTT CCTTCACCCC CCAGACATCG AGGCACTCGT CGCTGTTGGG GTCGTAGGTG ATGTCGCGGT GTCCGGCGAG CCCAGCAATG GCGCGCAAGG  
 14601 ACTCCGCGCG GTACGCGTCC ATGATCGCGG TGAAGTCATC CTGGCTCACG GTGCCGAGG CGTTGTACTC CTCATCGAGT GAGGGATCCC TCGTGGCGGT  
 14701 GTCTCCCGT CCTGTCGTCA TCGGGAAGTT **Start ORF4** ACTGGCCTTG GCGGATTGCC GTGGCAAATT CACGGATATG GACTGCCGCT CGGTCCGGGA CGTCGATGGC  
 14801 GGGGAAGTGG GTCGGCCCGC CCAACTTGGC GTAGGAGAAC CAGGGATGCT GCTCGGCGAA ATCGGAGTTG ATTTTCTCGT ATTCAGGCTC TGTGCTGC  
 14901 GAGAAGATGT GCCGGATCGG TCGCGTCTTG GTGAGGTTTG CCATCATCTG CATTGGTGAC CCGTTCCCTGCGTAAGCGTC CTCGATGACC CTTCCGGATC  
 15001 GTCCCCAGCA GTCGTAGCCG TAGTCTGCCA TCTCCTCCAG GAGGTGATGA CGGACTCGTT TCTCGTCATG CCCGTCAAGC CAGACGTCGA ACAGGCCGTG  
 15101 CGTTCCCTCG CGCCACCGCT CGGGGTCTTT TAGTAGGGTC AAGCTCTTGG CGAAGTCCGG CTTGGGTGCC CACATTAGCC AGTCCATGAT GATGCCTCGC  
 15201 GGCGCCCGTT CGGGGCCGGC CTGCTCAAGC AGCTCTACAA GAACCCAGCC GCCGTGAGAA TGAGATACCG GAAGAAAGGT CTCCACGCCG AGTTGGTTCGA  
 15301 GAATCTCAA CGCGTCCTTC ACCTGTTCTT GATAGCCAAA GTCTGGGACC TCGCAGGGCG AGAGTCCGTG ACCCCGCCAG TTAGGGACAA TTACCCTGAA  
 15401 GTCTGCGTCA AGCTCCTGGA TCAGGTACTT GTAGACGCGG TGGTCGTGGC ACCACCCGGG TAGGAGGAGG ATCGCGGGGCGTCGGTGTGTC CCGCTGATTG  
 15501 TCGATATAGG AGAGCTTGTT GTCGAAGACT AGCGTTTCAT GCAGATATGT GTCGGT **Start hod** CATG ATGAATCTCC TTCGTGAATG GAGTCGAGGT GGATGACGCC  
 15601 GGAGTCACGG GCTGGTCCTC AGTTCGTGAG GTTGGTTAGC CAGGCCATGT CAGTTGGTTG AGAGACCGAC AGCGCCTACT CCGTGTGGTC TAGAGGATGC  
 15701 GGCGCGGAGG CGGGAGCGGC CAAATGCAGC GGAGTGTCCC AGCGCGCGGA GGATTGTTGT TCTGGGGGTG TCGGGAACGT TGTTCATACG TCCCAGCCAG  
 15801 TATGAGAACC GCTGTGTGTG CTCAATCAGG GGACGCTCCC GGCGTTCCCA GTCGCGAAGT TGGGTAGTCA GGGCGCCGGG GCTCTGGAGC GCCTCCGCGA  
 15901 GGCCAGCGC GGCCCCATT GCGCATCCGC CGCCCTGTCC CAAGTAGGGG GTTGTGCAT GAGCCGCGTC ACCGATCACA GCAACCTTTC CCTTCGACCA  
 16001 CGAGTGCAGA TCGACGCGCT CGAAGTCATC CCACCGGTGG ATCGGGGCCG GGCCGATGGT GGTGAAGAGG TTCTCAAGTT GGGGAAGGA GTCGATCCAT  
 16101 GAACGGAACG GAAGGGTGTC CCCAACGCC TGACGGTCTG TGCTTGCGC CACAAGCGCA AGATAACAATT CGTCGGCGCT GGTGGGGGTG TAGAGGACGA  
 16201 AACGCTTTC GGAGTAGAGC TCTACGTAGT CGTCTTCCCA TTCCTTGCC ACCAATCCGG GCTCACGCCG GATCATGACG CGTGCGCAGC TCTGCCAAG  
 16301 GCGCCGGCGC CCGTGCACCA GGTCCAGCTG GTCACGTAGC CGGGAGTTCA CGCCGTTGGC TACCACTACA AGGTCCGCCG CCGATTGCGT CCCGTCCGGC

16401 AACTCCAGGT TACCGTCGGG ATCGACGCGT GAAACAGTGG AGCTGGCCAC CACATCGACC CCCGCCGTGG TCGCAGCCGA AAGCAAGGAA CTAATGAGGC

16501 GCTCTCGCAG GATCGTCACC ACCTGTGTCC CGCTGTTCGT GTTTACCGGG TGACGGCCCA GGTCTCGGTC CCGATGGTCC CGCGTCCTGA ACGCGCGGCC

16601 ATAGTGGGCA CCTTCAAGAG CGAAGTCAAG GACACCAAAC TCCCAAGGA CGGCTAAGCC GTTTCCCCAA AGGTAAATTC CAGATCCGCT GGC GCGCACT

16701 TCAGCGGATC GTTCATGGAC CCGCACTGAC CATCCGCGAC GTGCTAACGC GGTCGCCGCC GACAGGCCAG AAATACCTGC GCCTATCACT TCTGCGTGCC

16801 GTGGCTTTGT ACCCATATAG TTATCTCCGG TCGTGAGGGG AAGCGGTTGG CTAGGGTGCCT CTAGCTCGTC AATCTAAAGC CGAGGTATCC GTAACCTATT

16901 CGGATTAAAC ACTGTGCGAGA GAAGACCAAG TGTTGTCCAA GTCACTTATT TATATACCCG ATTTGTGACG GCGTCAATA GTAGAACACA AACCAGCTCT

17001 GCCGATCGGC GGGACGCCGC AGCGGCGGAG GCGCCAGCGC CAAGATGCCT GCACGTACAG CCGCCGTGAC GAGGGCATCG CCAGAATCTG GCGATTGTGT

17101 TTCTATGCTC ATGGGTGCAG TCCCGCCTCG TCCGTGCTCG ATTTCCCATG ACTGCAACCA CCTTCCTCCC CGATGCGGCT CGAACTTCCG GCGCAAGTAC

17201 GGGCGACGAC TGCTTCGCAG CCAGAAGCTG GCCCTTGGGT TCGATTCGCG TCTCTGAGTT GCGTCGCGGG GGGCATGCCT TGCATGGGAA AACATGCAGG

17301 GGATCCGCGG GTCCACTGAT CGATTGCGGC CGGCATAACG GCAGGCGAGG ACAAGATGAA GAACAATTGC TTGACGTGCG TCACATAAGC GCGACATACT

17401 TCCAAGAACT CATCGTCTGA TTCGTACACG CATGGGAAAC AGATCAGAGA TTCAAGTTAC CAACCTTCGC ATCGGCGCGG TCGGGCCGTG CGTGGCGAAG

17501 TTAAGGAGAC CGAGAGATGG TTGAATCCAT TAGCGCACCA AAGATGGTCG GCCAAGCGAT TCCTCGTAAG GAAAATGCTG GCTTATTGAC CGGCGCTGCC

17601 CTCTTCGTGG ACGACGTGGT CTTGGAAGGG ATGCTGCACG CCAAGATTCT GCGCAGCCCG ACTGCGCACG CGAATCTTTT GTCAGTCGAT GCTTCGCGGG

17701 CTAGGACCAT GCCTGGGGTT CACGACGTTG TCACCGGTCC CGAGATGACC GGTGTCTTGA AGCGATTCCG TGGACTGGTT AAAGGTCTCC CGTTCAACGA

17801 CCGCATTGTG ATGGCAGACG ACAAGGTTGT ATTCGAGGGC CAGGAAATTG CAGCCGTTGC TGCCGAGTCC CCGTATGAAG CATGGGATGC TGTGAGGCG

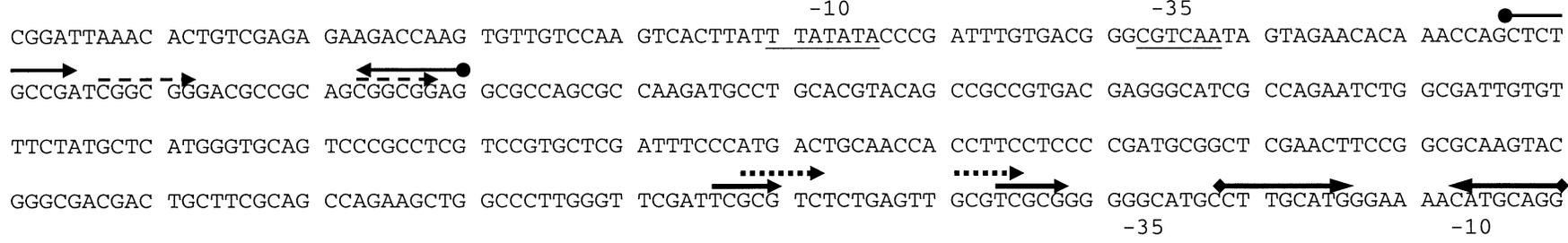
17901 ATTAAGGTCG CTTACGACGA GCTCGAGCCG GTCGTTGACA TTGAGTTTCG CGCTTCATCC GAGGCTAAAG CAATTTGGGA TTACAACGGC ACCAACGTCT

18001 GGGAAAATA CAAGCTCAAG ATAGGCGATG CGCAGTCCGC CCATGGTGCC GTGACGGTGG GAGGCAAGTT CCGCACGAAC CGTCCGGCAG CTGTTGCCAT

18101 GGAACCCAC GTATGTATTG CAGACTTTGA CCGATAACG AAGAGCCTCA CGCTCTACAC CTCCACCAG TTCACCACC TCTTGGTCCG CATCATTGCT

Start ORF2

Start *goxL*



18201 GACGTGCTAC AAATACCTCC TGCAAAAAGTC AGGGTTGCTA CGCTCAACGT CGGTGGTAGC TTCGGCTCGA AGGGAGACCT GTTCCCACAC GAAGTCATCG  
 18301 CCTGTCTGCT CTCACTGCGG ACCGGTCCGG CAGTTAAGCT CGTGCTCAGC CGTGAGGAGG TCTTCAAGGC CGTGGGTGGG CGGTGCGCCC AGGTAACCAC  
 18401 AGCCGAACTA AAGATGGACC AAGACGGCAG CATCGTGAGT TACGGAGCGA AGGTGCTACA CAATACCGGG GCTGTGTCGC CCTTCGGGGG CCAGATCATG  
 18501 AAGATTGGCC TTCATATCGG AATGCTGCCC TACCCCATAC CGAACATTGA TATTAATGCC TCTGCAGTCT CCACGACCAC GATCAGTGGT GGCCCCGTCC  
 18601 GGGGGTTCGG TGTCCCACAG GTGCTTTTTCG TCAAAGAGCA GCTCATTGAC ATGGCGGCAG AGGAACTCGG ACTGGACCCG ATCGAGGTGC GGCTGAAGAA  
 18701 CATCCCCGCA AATGCGGAAG AGGGTTACGT TACGCCCTCC GGCATCAGGA TTGACAGCAC GACGGCTCAC TTCTGCTTGC GGAAGGTGGC CGACGAGATC  
 18801 GGGTGGTGGG ACCGCCACGA GAAGCGGGAA GCCTACGTCG GCTACGGCGC CGGCCTGGCA GTGAAGTACA CAAGCGCCCG ACACCCCTCC CTTGACACCG  
 18901 ACCTTTCCAC AATCCGACTG CTCTCACAC CCGACGGACG AGTGACCATC TTCTCTGGCG ACGTGCCCCA CGGACAGGGA CACCACACGA TGCTGTGCGA  
 19001 AATCGTGGCC GATGCGACCG GCGCCAAGTT CGACGAAATC GGCCTTGTCG CAGCGGACAC CGCTACAACG CCGTTCAGTC TAGGCACGTT CGGCAGCCGA  
 19101 TCAGCCGAG TTCTTGCTC GCGCGGATG CGGCAGGCG AATTACTGGC CGAGCGGATC CGCACCGTCG CAGCCAGCAT CATGAAGTGC CCGGCGGACA  
 19201 TCTTGAGCT GCGCGAGAGC ATGGTCTGGG TCAAAGGCAG CACCGAGCCC GCTCTTCCGT TTGAGGCCGT CGCCGCGGTG GCGCTGTTCG CCACGAGCGG  
 19301 GTTATCCGGT GGCAGCGTGG CCGGTCCCAT CGAGGCCAG GCCACCTATG ACACCCCGAC TGAGCGCGAG CGGGAGGATG GGGGCGGCAA TTGGGCGGCA  
 19401 ACTTACTCCG CTGGGGCTCA TGCGGCCCGT GTAGAGGTCG ACCCTTCTAC AGGCCAATTC AAAATTCTTG ACTACGTCAT GGCCCATGAC TCGGGTAACA  
 19501 TCATCAACCC CCTCATAGTT GAGGGGCAGC ACCATGGAGG CTTTGCCAC GGCTTAGCCA TGGTTACCGA GGACCTCCAA ATTGGGTCCG ACGGCAAACCT  
 19601 GCTCAATGCC AGCCTGGCAA CGTACGGGGT CCTCACCGCG CACGACGTCC CCAATCTCCA CCAACTCTAC GATGTTGATG TCCCCTCAAC CGTCATTCGG  
 19701 ATCGGTTCCA AGGGTGCAGG AGAGACGGCA ACAGGTGCGG TACCAGCAGT GATTGCGAAC GCGTTGGCGG ACGCGACAGG TATCCGCTTC ACCCGCTTC  
 19801 CCATCACCCC AGAGGACGTC GTGCTCGCAC TGGCCGAGAA GGAGCGCCAG GCGTCGACC GCCTTGTTGTG GCCGCTCACT GAGACGCAAG GAGACACACA  
 19901 ATGAGGCCGT TCCAGTTCAT CACGCCGCAT TCAGCAGCGG AAGCCAGGGA GCACCTGGCT ACGCACGGTG CCGAAGCCGC CGTCTTGGCA GGTGGGCAGA  
 \*\*\*  
 20001 CGCTCCTGCT GCAGATGAAG CCCCAGG TAGCCCCGGG TTTCTCGTG AACATCGGCC GCCTCGCTGA GTTGCCTGGG TGAAGTATG AGGGCGGGCA

Start *goxM*

ATG

\*\*\*

20101 ACTGCTCTTG GGGGCCACAA CAACCTATGC CGATCTGGAA GACGCGGACC CACTAAATGG TGCACACGAT CTCCTGAGAT CAGTGGCGAG CAATCTGGCG  
 20201 GACCGAGCTG CCCGCAATCT CGGCACAATT GGGGGAGCGC TGAGCGCAGC CCTGTCCGTG TACGACGTAC CCGCCGCGCT GCTAGCACTC GACGCCGAAT  
 20301 TAGTGCTGCG CAGTTCAACG GGCAGCGGA AGCTGAAAGT CGACGAGTAC ATCGTCGGCA ACGGCGTCAC CGCCAGGGGG GCCGATGAAT TACTCGAGGC  
 20401 GATCATTATT TCACCGCAGG ACGGCTGGCG ATGGTCCTTC CAAAAGTACC GCCGGCGGCT GGCCGATCCC GCAATCGCCT CCGTAACAGT AGTAGCTAGT  
 20501 CCCTCCCCGG ACGGTGCCAT AGCCGATGCC CGCGTTGTAA TTGGTGCCGT CACCGACGTG CCATCACGTC TGCCGGAAGT AGAGGCTGCC TTGGCCGGAA  
 20601 CGAATCTCGA TGA CTCCAGT ATCACCCAAA TCGCGGCGCT AATCGGTACC GAGGCCCGAG CGCGGCTCGG TGCAGCCTTC AAGTACAAGC CCGACTATGC  
 20701 CGAGCGCCTG GTCAGCGGAC TGGCGTCGAA AGCACTTGCG CACGTTTCGC AGGAATGGAC TAAGGGAGTA TAGGAATGCG TGAAGTAACC ATCAGTGTTA  
 20801 ATGGGCGGCC TGT TACCGCA GAGATTGACG AGCGAACACT GCTGGTCGAT TTCGTAAGGA GAACGGCACA GCTCACCGGG ACCAAAGCCG GTTGCCTTGA  
 20901 AGCGCGGTGT GGCAGTTGCA GCGTCCATGT CGACGGCCGG CTCATCAAGG CCTGCAACGT ACTAGCGCTG CAGTGCAGAC GCACATCAGT GACGACAGTA  
 21001 GAAGGTTTGA CGGGTAACTC CGCCGAAACC ACCGAGGTCA GTCTGGCGCA CATCGTTGGC GTGCAGGAGG AGCCTGAACT GACCCCGCTG CAAAAGTCAT  
 21101 TTCATAAGCA CGGCGCGTTG CAGTGTGGCT ACTGCACGCC GGGTATGCTC ATGTGCCTAA CCGACCTTCT CGCACGTTGT GAAGGGCCGT CTGAAGAAGA  
 21201 TGTCAGGCGC GGACTTACCG GCAATCTGTG CAGGTGCACC GGCTATCAGA CCATCGTCGA CGCTACGCTC GCTGTGGCGC AGGCGGACGC GCAAGAATGA  
 21301 CAGCGCCTGG AGATTAGAAA CCTCCGGGAA CCACACACAC CTAACCGTGA CGCCAGGGAG GAGCGTGCCC CATCGCAAAT CTCCTCACTG CGCATTCCAA  
 21401 ACCCGGCTTC ATCCTTCCCC AGGGATCTAC CACCCTTACC CACGGGCGCC GCCGGGGCCA AACCGGGCAC GCCGATCGAC ATACAGCCAA CACAGCTTCG  
 21501 GGGCCGGCGT TGCTGGACCT CTGCGAACTT CTTTCTAACC TGGACGAGAA CACTAAATTT GCATCGGCGG ATTAGCCCCA TGCCCGCCTA TCCGAAAGCT  
 21601 GTCAACGCC TCTTTCAGGC AGGACTCCGA AGTTCCGGAA AGACAAGGCA CAAAGGTAAG GCGAGCACAG CCTTGACCAG CCGTCTTGAA TACGACGAGA  
 21701 CATTCGAGAC GTATGAGGAA GACAGCCGCC GGAAGACCGA TCGACTTCTT GTGGTCCCAA AACGTCCCCT TGGCCCCGTA CAGCCCCGGC AATTCATACA  
 21801 AAAAAGTTCC GTAACATCAA GCGCTCGAAC TGCTCGAGGA TCGGTTCCAC TAATGACTTG AGGAGAAAGCC CGTATGCGAG ATGTTTTGCC TGAGTTGATT

Start *goxS*

\*\*\*

Start ORF1

21901 GAGCGGTGGA ACGCGGGGA GACGGTGGGT ATAGCCACAG TTGTCGCGAC GTTCCGTTCC GCACCCCGCT TGCCGGGCGC CGCTATGCTC GTCTGCCCCG  
 22001 ACGGGTCCGC GGTTCGGGTCA GTCTCAGGGG GCTGTGTGGA GGGTGTGTGTC TATGACCTGG CCCAGGCAAC AGTCCGGAGC GGGGCACCAG TGTTGCAACG  
 22101 CTACGGCGTT TCGGACGAGG ACGCCTTCGG AGTAGGACTC ACATGCGGCG GTACTCTCGA TATTTACATT GAGGCCATGA GTCAAGCAAC CTCCCCGAG  
 22201 CTGGGTGATA TCGCAGCCGA TGCAGAGGCA GGGCGACCAG TTGCGCTGGC CTGCATCGTT GACCACCCCG AAGCGTCACA CATCGGCCGA AAGATCGTAG  
 22301 TGAGGCCCCA GTCCGTCGAG GGCGACCTTG GCTCCAGGAA CATCAACACT ACGGTACGTC GGGACGTACT GGGCTACTTG GCACAGGAA AGAACGGCAT  
 22401 TATCGCCTAC GGGCCGGAAG GCCAGCCTCA CGGTGACACC ATACGCGTCT TCGTTACCTC CTTCGCCCCC GCTCCACGCA TGATCGTGTT CGGCGCCATC  
 22501 GATTTTCGAG CCGCCGTCGC ACGGGCGGGC AGCTTCCTGG GCTATCACGT CACGATTTGT GATGCGCGCC CGGTTTTTAC TACAAGTAGC CGCTTCCCTG  
 22601 ACGCGGACGA AGTCATCGTC GATTGGCCGC ACCGCTACCT GAAAAGTGAG GTGGAGGCCG GGCATCGA CGACCGCACA GTCATCACGG TACTTACCCA  
 22701 CGACCCGAAG TTCGACATTC CGCTACTCGA GGTGGCTCTC AAGTTGCCGG CGGTAGGGTA CGTAGGAGCC CTCGGGTCGC GGAGGACTGA TGAGGACCGA  
 22801 CGGCGCCGTC TGCAGGAAGC AGGTCTCAAC TCAGTCGAAA TTGGGCGACT GTACAGTCCA ATCGGTCTTG ACTTGGGGGG GAACACTCCA GAGGAGACGG  
 22901 CAATCTCGAT CGTCGCTGAG GTCATCGCAA ATAAGTGAA TGGAAGTGGC GCCCGCTGA GTGCAACAGA ATTGCCAATT CACCGCTCCC ATCAGGCAGG  
 23001 CAGCGACATG AGTGA

### Sequenz des 23 kb Fragmentes aus pVK55B/5

Die (potentiellen) Startcodons der bekannten Gene und der hypothetischen ORFs sind benannt, die Stopcodons der Gene sind durch Sternchen (\*) unter der Sequenz bezeichnet. Potentielle Ribosomen-Bindestellen sind grau hinterlegt, die *HindIII*-Schnittstelle zwischen dem 10,8 kb und dem 12,2 kb langen Fragment ist schwarz hinterlegt. Die hypothetischen Promotorsequenzen vor ORF2 und *qoxL* sind unterstrichen.

In den intergenischen Bereichen zwischen ORF8 und ORF9 und zwischen ORF2 und *qoxL* sind direkte Wiederholungssequenzen und *inverted repeats* durch Pfeile angedeutet.

**Anhang 2**

Primer, die zur Sequenzierung der Inserts von pUC4,5, pUC55/3 und pUC55/12 von Herrn Dr. B. Hauer eingesetzt wurden.

Neben dem M13(-21)- [TGT AAA ACG ACG GCC AGT] und dem M13(-49) reverse-Standard-Sequenzierprimer [GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG], wurden folgende Primer zur Sequenzierung von pUC4,5 eingesetzt:

[GAG CAT GGT CTG GGT CAA], [GCG ACG GCC TCA AAC GG], [CGT GAG CCC GGA TTG GT], [AAC GCT TTC CGG AGT AGA], [CCA GTT AAG CTC GTG CTC A], [CGC ACC GCC CAC CCA C], [GGA GGA AGG TGG TGG CAG], [CGA TTG TGT TTC TAT GCT CA], [GAC ACA GCC CCG GTA TTG], [AGG ACA CCG GTC ATC TCG], [TTA AAG GTC TCC CGT TCA A], [CAT CCG CGA CGT GCT AA], [GTT GAA CGG GAG ACC TTT AA].

Zur Sequenzierung von pUC55/3 wurden neben dem M13(-21)- und dem M13(-49) reverse-Standardprimern folgende Primer eingesetzt:

[CCT TCC TTC ACC CCC CA], [CCT ACG ACC CCA ACA GC], [GAT TCC GTA GGT CAG AAC A], [AAC AGG TTT CGG TGA AAT CA], [GGT GAG ATG CCT CGA CTC], [CGC TCG GCC TAG GAT TCA].

Zur Sequenzierung von pUC55/12 wurden neben dem M13(-21)- und dem M13(-49) reverse-Standardprimern folgende Primer eingesetzt:

[GCC CAC CAG CCC GGA C], [CCG CGG GGT GGA TGA GA], [GTG TTC CCC GGT GGC C], [GCG GTA GTT GTT GAC GAC], [AGC TCT AGT GTG ATG TTT CA], [AGG CCC ATG ACG GAT CG], [GTG ACT GGT GCG AAC TTC], [TCA CCA CCG AGC CTA AAC A], [GAT TTC CAG TTC AAC CAC A], [CAC CTC AGC CAG TAC ATG], [CCG ATT CCA GCG TTG AAC], [CAC CGT GGC CAG TTT TTC], [AGT GTC AGC GAC AAG ACT G], [AGA GCT CGC GTC CCA AT], [CGC AGC GTG CTC TGT ACT], [GTC ACA GTG ACC GTG CTC], [AGC GGC GGG TGA CAC GT], [ACA TCA TCG AAC GTG TCA C], [ACC CCA GAA CAT CCA CAG], [GAG GCT GTG GAT GTT CTG], [ACG CCG TCA GCC TTG AGT], [TTC CAC TCG TCC GAC TTG], [GCA CCA CAT CGC AGA GC], [ACC AAT CAA GCA TTC ACC CA], [CTC AGC CAG CGG GAG AA], [TGG CTC GGG ATC TAT GGG], [CTG GGG CGC GTG TAG TTT], [GAG ATC GCC GGA ATA TGT C].

## **Erklärungen**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation weder in ihrer Gesamtheit, noch in Teilen einer anderen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Münster, den 14. Januar 2004

## LEBENS LAUF

persönliche Daten:	Katja Parschat geboren am 21.02.1972 in Wuppertal
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1978-1982	Grundschule Hoya
1982-1984	Orientierungsstufe Hoya
1984-1991	Johannes-Althusius-Gymnasium Emden Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am: 27.05.1991
1991-1998	Studium in Diplomstudiengang Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
18.03.1994	Vordiplom
28.10.1998	Diplom Diplomarbeit zum Thema: Reinigung und Untersuchung einer bakteriellen Xanthindehydrogenase
11/1998-01/2004	Promotion
11/1998-10/2002	Doktorandin in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
11/2002-01/2004	Doktorandin am Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie der Westfälischen Wilhelms- Universität, Münster

Münster, den 16.01.2004