

Molekulargenetische Untersuchungen
zum Ethanol-oxidierenden System
in *Pseudomonas aeruginosa*

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Max Schobert
aus München

Vom Fachbereich 15 - Lebensmittelwissenschaft und
Biotechnologie der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Tressel

Berichter: Prof. Dr. Görisch

Berichter: Prof. Dr. Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20. Dezember 1999

Berlin 1999
D 83
FB15 Nr. 160

Abstract

Molekulargenetische Untersuchungen zum Ethanol-oxidierenden System in *Pseudomonas aeruginosa*

Einige Gram-negative Bakterien bilden beim Wachstum auf Alkohol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle interessante Enzymsysteme mit Quinoprotein-Alkoholdehydrogenasen. Diese Quinoproteine besitzen eine ungewöhnliche prosthetische Gruppe, Pyrrolochinolinchinon, sind im Periplasma lokalisiert und übertragen die Reduktionsäquivalente auf die Elektronentransportkette. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933 bildet beim Wachstum auf Ethanol ebenfalls ein Quinoprotein-Enzymsystem. Zwei Komponenten dieses Systems, die Quinoprotein-Ethanoldehydrogenase und das Cytochrom c_{550} waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannt.

Das Ziel der Arbeit war es, mit einem molekulargenetischen Ansatz weitere Komponenten des Ethanol-oxidierenden Systems zu identifizieren, die Anzahl und Organisation der beteiligten Gene abzuschätzen und ihre Regulation zu studieren.

Zur Identifizierung der beteiligten Gene wurden 21 *Pseudomonas aeruginosa* Mutanten isoliert, die nicht mehr auf Ethanol wachsen konnten. Diese Mutanten konnten biochemisch charakterisiert und gemäß ihres Phänotyps in vier Gruppen eingeteilt werden. Mit einer Cosmidgenbank wurden alle Mutanten komplementiert und zehn verschiedene Cosmide isoliert.

Das Gen des Cytochrom c_{550} wurde durch Hybridisierung mit einer Gensonde auf einem DNA-Fragment eines komplementierenden Cosmids identifiziert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies überraschenderweise nur geringe Identitäten zu anderen c-Typ Cytochromen auf. Unerwartet war auch die Umgebung des Cytochrom c_{550} Gens: Vor dem Cytochrom c_{550} Gen und zu diesem divergent orientiert liegt das Gen der Quinoprotein Ethanoldehydrogenase. Dem Cytochrom c_{550} Gen folgt ein Gen für eine cytoplasmatische NAD^+ -abhängige Aldehyddehydrogenase.

Die Regulation der divergent zueinander orientierten Promotoren von Cytochrom c_{550} und der Quinoprotein Ethanoldehydrogenase wurde durch transkriptionelle Fusionen mit dem *lacZ* Gen untersucht. Hierbei konnte ein Zwei-Komponenten System identifiziert werden, welches die Expression der Quinoprotein Ethanoldehydrogenase unabhängig vom Cytochrom c_{550} Gen kontrolliert. Insgesamt wurden sieben Regulationsmutanten identifiziert.

Die Zusammenfassung aller Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß *P. aeruginosa* zum Wachstum auf Ethanol ein unerwartet komplex aufgebautes und reguliertes Ethanol-oxidierendes System benötigt: Mindestens 17 Gene sind am Ethanol oxidierende System in *P. aeruginosa* beteiligt, davon sind sieben Gene allein für die Regulation notwendig.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Entdeckung und Einteilung der Quinoproteine	1
1.2. PQQ abhängige Quinoproteine in Bakterien	3
1.3. Genetische Organisation PQQ-abhängiger Dehydrogenase Systeme	4
1.3.1. Das <i>mx</i> a Gencluster	6
1.3.2. Das <i>mx</i> b Gencluster	8
1.3.3. Das <i>mx</i> c Gencluster	8
1.3.4. Das <i>mx</i> d Gencluster	9
1.3.5. Das <i>pqq</i> Gencluster	9
1.4. Regulation des Methanol-oxidierenden Systems in <i>Methylobacterium extorquens</i>	10
1.5. Aufgabenstellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Vektoren	13
2.2. Bakterienstämme	15
2.3. Kulturmedien und Zellzüchtung	15
2.3.1. Bestimmung von Generationszeiten	16
2.3.2. Induktionsversuch	16
2.4. Lagerung von Bakterienkulturen	17
2.5. Chemische Mutagenese mit MNNG	17
2.6. Replika-Filtertechnik	17
2.7. Bestimmung der Reversionsraten	18
2.8. DNA Isolierung	18
2.8.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.8.2. Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> oder <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.9. Reinigung und Fällung von DNA	19
2.9.1. Reinigung von DNA mit einer Silikamatrix	19
2.10. Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA	19
2.11. Enzymatische Modifizierung von DNA	19
2.11.1. Restriktionshydrolyse	19
2.11.2. 5`-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	19
2.11.3. Ligation	20
2.11.4. Auffüllen überhängender Enden mit dem Klenow-Fragment	20
2.11.5. Exonuklease III Verdau	20
2.12. Agarosegel-Elektrophorese von DNA	20
2.13. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	21
2.14. Transformation von <i>Escherichia coli</i> oder <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit Plasmid-DNA	21
2.14.1. CaCl ₂ -Methode	21
2.14.2. Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	22
2.14.3. Elektroporation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.15. Transfektion von <i>Escherichia coli</i> mit Cosmiden	22
2.15.1. <i>In vitro</i> Verpackung der Cosmide	22
2.15.2. Transfektion von <i>Escherichia coli</i> S17 λ-pir mit der verpackten Cosmid-Genbank:	23
2.16. Transfer mobilisierbarer Vektoren durch Konjugation	23
2.16.1 Transfer einer Genbank in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> durch Zweipunkt Kreuzung mit <i>Escherichia coli</i> S17 λ-pir:	23
2.16.2. Transfer eines Vektors in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> durch Dreipunkt Kreuzung	24
2.17. Identifizierung homologer DNA durch Hybridisierung	24
2.17.1. Präparation DIG-markierter DNA	24
2.17.2. Southern-Blot	25
2.17.3. Hybridisierung und immunologische Detektion	25
2.17.4. Phosphatase-Nachweis mit NBT-BCIP oder Chemilumineszenz	25
2.17.5. Entwicklung des Röntgenfilms	26
2.18. DNA-Sequenzierung	26
2.18.1. Sequenzierungsreaktion	26
2.18.2. Elektrophorese	26
2.19. DNA-Analyse Software und Internetdienste	27

2.20. Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> JM109	27
2.21. Enzymtests	28
2.21.1. Nachweis der QEDH-Aktivität in Rohextrakten oder ganzen Zellen	28
2.21.2. Nachweis der QGDH-Aktivität in ganzen Zellen	28
2.21.3. Rekonstitution der Apo-QEDH oder der Apo-QGDH in ganzen Zellen	28
2.21.4. PQQ-Bestimmung mit der Apo-QGDH aus <i>Escherichia coli</i>	29
2.21.5. Aldehyddehydrogenase-Nachweis	29
2.21.6. Ferricyanit-Test	29
2.21.7. β -Galaktosidase-Nachweis	29
2.22. Cytochrom c_{550} Nachweise und Quantifizierung	30
2.23. SDS-PAGE und Gelfärbungen	30
2.24. Quantifizierung von Promotoraktivitäten	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Isolierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Mutanten mit Defekt in der Ethanolverwertung	33
3.1.1. MNNG-Mutagenese von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17933	33
3.1.2. Isolierung der Defektmutanten	34
3.1.3. Bestimmung der Reversionsraten	34
3.2. Biochemische Charakterisierung der Mutanten	35
3.2.1. Induktionsversuch auf MM-Ethanol	36
3.2.2. Nachweis der QGDH-Aktivität auf MM-Glukose	36
3.2.3. Einteilung der Mutanten in vier Gruppen	38
3.3. Herstellung einer Genbank aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17933	39
3.3.1. Präparation der genomischen DNA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
3.3.2. Partieller Verdau der genomischen DNA mit <i>Sau3AI</i>	40
3.3.3. Größenfraktionierung der partiell verdauten DNA	41
3.3.4. Präparation der Vektor-DNA	41
3.3.5. Ligations- und Verpackungsreaktionen	41
3.4. Komplementierung der Mutanten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
3.4.1. Identifizierung überlappender Bereiche zu Cosmid pTB3001	44
3.5. Wachstumsversuche der Mutanten	45
3.5.1. Wachstum auf Acetat, Succinat oder Glukose	45
3.5.2. Wachstum der Mutanten anaerob auf LB/KNO ₃	45
3.5.3. Wachstum der komplementierten Mutanten auf MM-Ethanol-Tc	46
3.6. Klonierung und Sequenzierung des Cytochrom c_{550} Gens	48
3.6.1. Konstruktion einer Gensonde	48
3.6.2. Hybridisierung aller Cosmide mit der Cytochrom c_{550} Sonde	49
3.6.3. Subklonierung und Exonuklease III-Verdau des 3,2 kb <i>PstI-BamHI</i> Fragments	49
3.6.4. Sequenzierung des 3,2 kb <i>PstI-BamHI</i> Fragments	49
3.6.5. DNA-Sequenz des 3,2 kb <i>PstI-BamHI</i> Fragments	50
3.6.6. Analyse des <i>exaB</i> Genproduktes	59
3.6.7. Analyse des <i>exaC</i> Genproduktes	60
3.6.8. Analyse des <i>pqqA</i> Genproduktes	62
3.6.9. Analyse des <i>pqqB</i> Genproduktes	62
3.7. Heterologe Expression des Cytochrom c_{550} -und des Aldehyddehydrogenase-Gens	63
3.7.1. Konstruktion des Expressionsvektors	63
3.7.2. Expression und Charakterisierung von Cytochrom c_{550} in <i>Escherichia coli</i> JM109	64
3.7.3. Expression und Charakterisierung der Aldehyddehydrogenase in <i>Escherichia coli</i> JM109	67
3.8. Insertionsmutagenese des Cytochrom c_{550} Gens und Charakterisierung der Mutante MS25	69
3.8.1. Insertionsmutagenese des Cytochrom c_{550} Gens	69
3.8.2. Wachstum auf Ethanol und Komplementierung der Mutante MS25	70
3.8.3. Phänotypische Charakterisierung der Mutante MS25	72
3.9. Promotorstudien	72
3.9.1. Konstruktion der Promotoranalyse-Vektoren	73
3.9.2. Etablierung des Testsystems	79
3.9.3. Promotoraktivitäten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	80
3.9.4. Kontrollversuche zu den Promotoraktivitäten	83
3.9.5. Promotoraktivitäten der MNNG-Mutanten	84
3.10. DNA-Analyse und Subklone des Cosmids pTB3001	86
3.10.1. Restriktionsanalyse und Vergleich mit dem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Genomprojekt	87
3.10.2. Subklone von pTB3001 und Komplementierungsexperimente	91

4. Diskussion	97
4.1. Charakterisierung und Komplementierung der 21 Mutanten	97
4.1.1. Gruppe I	98
4.1.2. Gruppe II	100
4.1.3. Gruppe III	101
4.1.4. Gruppe IV	103
4.1.5. Regulationsmutanten	103
4.2. Die genetische Organisation des <i>exa</i> Clusters	104
4.3. Analyse der Cytochrom c_{550} Sequenz	105
4.4. Transkription des <i>exa</i> Clusters	107
4.4.1. Organisation und Motive der <i>exaA-exaB</i> Promotoren	107
4.4.2. Transkription und Regulation der <i>exaA-exaB</i> Promotoren	108
4.4.3. Transkription von <i>exaA</i> und <i>exaB</i> auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	109
4.4.4. Transkription der Aldehyddehydrogenase	110
5. Zusammenfassung	111
6. Literaturverzeichnis	115
7. Anhang	127
7.1. Eigene Veröffentlichung und Genbank-Datenbankeintrag	127
7.2. Danksagungen	128
7.3. Lebenslauf	129

Abkürzungen

AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
Cb	Carbenicillin
Cm	Chloramphenicol
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5-chloro) tricyclo [3.3.1.1. ^{3.7}] decan}-4-yl) phenylphosphat
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
d	Tag
DIG	Digoxigenin
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
h	Stunde
k.W.	kein Wachstum
kb	Kilobase
Km	Kanamycin
min	Minute
MM	Mineral-Medium
MNNG	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblautetrazolium
nt	Nukleotid
OD _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
ORF	"open reading frame" - offener Leserahmen
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
psi	pounds per square inch
QADH	Quinoprotein-Alkoholdehydrogenase
QEDH	Quinoprotein-Ethanoldehydrogenase
QGDH	Quinoprotein-Glukosedehydrogenase
QH-EDH	Quinohämoprotein-Ethanoldehydrogenase
QMDH	Quinoprotein-Methanoldehydrogenase
RBS	Ribosomen Bindestelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
t	Zeit
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung und Einteilung der Quinoproteine

Schon ab 1964 gab es Hinweise, daß neben den NAD(P) und FAD abhängigen Dehydrogenasen weitere Dehydrogenasen mit einem anderen Cofaktor existieren [1,2]. Aber erst 1979/1980 gelang es, diesen Cofaktor zu isolieren und als Pyrrolochinolinchinon (PQQ) zu identifizieren [3,4]. Dehydrogenasen mit dieser prosthetischen Gruppe wurden fortan als Quinoproteine bezeichnet. In den folgenden Jahren wurden aufgrund einer ungeeigneten Nachweismethode fälschlicherweise PQQ oder ein kovalent gebundenes PQQ als prosthetische Gruppe in einer Reihe von bakteriellen und eukaryontischen Enzymen bestimmt [5,6]. Janes *et al.* [7] konnten allerdings 1990 zeigen, daß nicht PQQ sondern Trihydroxy-Phenylalaninquinon (TPQ) die prosthetische Gruppe der Cu^{2+} -abhängigen Aminoxidase ist, welche sowohl in Gram-positiven Bakterien, Pilzen und höheren Lebewesen gefunden wurde [8]. Bis heute wurden noch zwei weitere chinoiden Cofaktoren gefunden: Tryptophan-Tryptophylchinon (TTQ) als prosthetische Gruppe der Methylamindehydrogenase methylotropher Bakterien [9] und Lysin-Tyrosylchinon (LTQ) als die prosthetische Gruppe der Lysyloxidase aus höheren Organismen [10]. Im Gegensatz zu PQQ sind TPQ, TTQ und LTQ kovalent an das jeweilige Protein gebunden, ein kovalent gebundenes PQQ konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer chinoiden Cofaktoren werden TPQ, TTQ und LTQ abhängige Enzyme aber ebenfalls zu den Quinoproteinen gezählt.

Nach heutigem Kenntnisstand kommen PQQ abhängige Dehydrogenasen nur im Periplasma Gram-negativer Bakterien vor [11]. Der Cofaktor PQQ wird zwar auch in pflanzlichen und tierischen Geweben gefunden, ist aber hier höchstwahrscheinlich bakteriellen Ursprungs [12,13].

Killgore *et al.* [14] konnten in einem Tierversuch mit Ratten zeigen, daß eine PQQ freie Ernährung bei Neugeborenen zu einer höheren Sterblichkeit, Wachstumsstörungen und zu einem fehlerhaft ausgebildetem Bindegewebe führt. Ob PQQ allerdings als Vitamin bezeichnet werden kann ist immer noch umstritten [15].

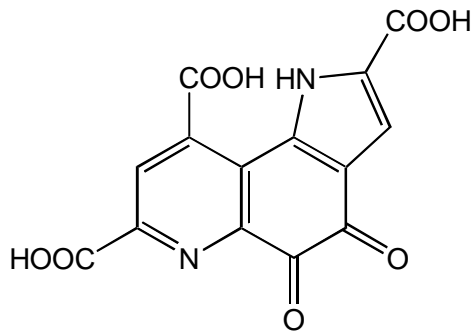
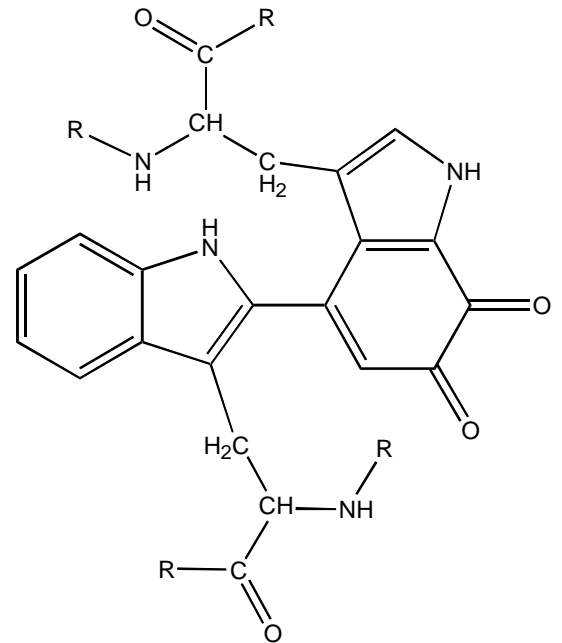
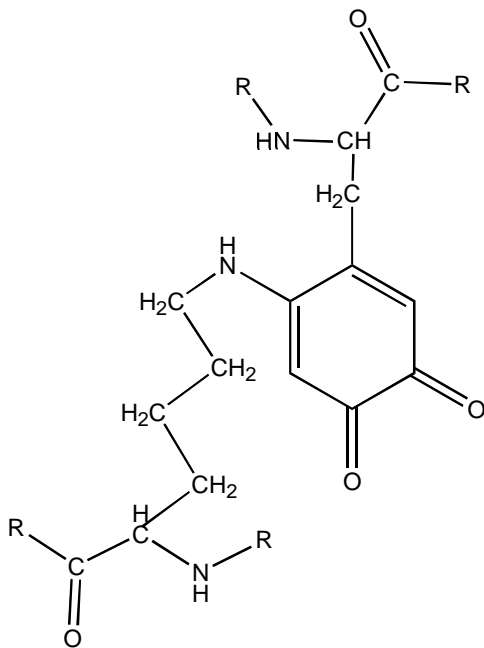
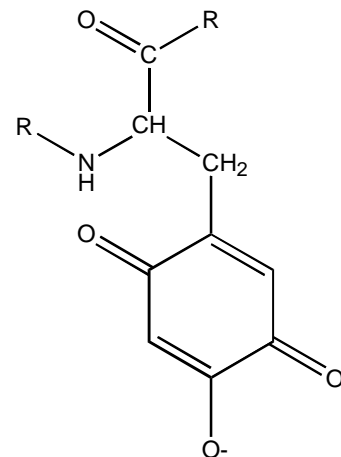
PQQ:TTQ:LTQ:TPQ:

Abb.1: Prothetische Gruppen der Quinoproteine. PQQ, Pyrrolochinolinchinon; TPQ, Trihydroxy-Phenylalaninichinon; TTQ, Tryptophan-Tryptophylchiquinon; LTQ, Lysin-Tyrosylchiquinon.

1.2. PQQ abhängige Quinoproteine in Bakterien

PQQ abhängige Quinoproteine wurden bislang nur im Periplasma Gram-negativer Bakterien gefunden. Sie können löslich oder membrangebunden, als Monomer, Homodimer oder Heterotetramer vorliegen und besitzen neben dem Cofaktor PQQ auch noch ein divalentes Kation, Ca^{2+} [11]. Quinoproteine oxidieren Alkohole oder Aldosen. Die bei der Oxidation entstehenden Reduktionsäquivalente werden entweder auf Ubichinon oder auf ein c-Typ Cytochrom übertragen. Neben membrangebundenen und einer löslichen Quinoprotein-Glukosedehydrogenase (QGDH) werden noch drei Quinoprotein-Alkoholdehydrogenase (QADH) Klassen unterschieden.

Die PQQ abhängigen Glukosedehydrogenasen sind monomer, membrangebunden und besitzen am N-terminus einen Membrananker [16]. Sie oxidieren Glukose zu Glukonat und übertragen die Elektronen auf Ubichinol [17]. Eine Ausnahme bildet die lösliche Glukosedehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus*, die als Dimer vorliegt [18].

Die Quinoprotein-Alkoholdehydrogenasen der Klasse I sind löslich und übertragen Elektronen auf ebenfalls lösliche c-Typ Cytochrome. Es sind homodimere und heterotetramere Formen beschrieben. Typische Vertreter sind die Methanoldehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* und die Ethanoldehydrogenasen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas putida* [19,20,21].

Die Quinoprotein-Alkoholdehydrogenasen der Klasse II sind monomere, lösliche Quinohämoproteine. Sie besitzen eine c-Typ Cytochrom Hämdomäne am C-terminus der Alkoholdehydrogenase auf die die Reduktionsäquivalente übertragen werden [11]. Die Quinohämoprotein-Ethanoldehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* und die beiden Quinohämoprotein-Alkoholdehydrogenasen aus *P. putida*, die auf Butanol oder Glycerol induziert werden, sind typische Vertreter der Typ II Alkoholdehydrogenasen [22,23].

Die Quinoprotein-Alkoholdehydrogenasen der Klasse III sind membrangebundene Quinohämoproteine, die bisher nur bei den *Acetobacteraceae* gefunden wurden [17,24]. Diese Alkoholdehydrogenasen bestehen aus zwei bis drei Untereinheiten. Die Untereinheit I ist ein Quinohämoprotein wie die Typ II Alkoholdehydrogenasen, allerdings mit dem Unterschied, daß die Untereinheit I nicht frei löslich ist [19,25]. Untereinheit II besitzt drei kovalent gebundene c-Typ Hämgruppen. Untereinheit III besitzt keine Hämgruppen und ist nicht bei allen Acetobakterien vorhanden [26,27,28]. Bemerkenswert ist, daß keine der Untereinheiten eine typische Transmembranhelix besitzt, sie aber einen membrangebundenen Komplex bilden, der Ubichinon in der Membran reduziert.

1.3. Genetische Organisation PQQ-abhängiger Dehydrogenase Systeme

Zwar wurden bereits die Gene des PQQ-Biosynthese Operons und der Quinoproteine aus etlichen Bakterien sequenziert [11], aber nur zum Methanol-oxidierenden System einiger methylothermer Bakterien gibt es ausführlichere Informationen über die Anzahl und Organisation der beteiligten Gene. So sind inzwischen mehr als 25 Gene bei *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium organophilum* und *Paracoccus denitrificans* bekannt, wobei die genetische Organisation des Methanol-oxidierenden Systems in *M. extorquens* AM1 am intensivsten untersucht wurde [29]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bekannten Gene in *M. extorquens*, in Abbildung 2 sind die einzelnen Gencluster schematisch dargestellt. Im Jahr 1995 wurde eine einheitliche Nomenklatur dieser Gene nach Genclustern eingeführt [29]. Neben den PQQ-Biosynthesegenen, die mit *pqqA-F* abgekürzt werden, wurden noch weitere vier Cluster entdeckt. Die Gene werden mit vier Buchstaben abgekürzt, wobei *mx* für "methanol-oxidation" steht, der dritte Buchstabe, "*a-d*", das Cluster und der vierte Buchstabe, "*A-Z*", das Gen bezeichnet.

Tab.1: Identifizierte Gene aus *Methylobacterium extorquens* AM1.

Literaturstellen, die sich ausschließlich oder zusätzlich auf gleiche Gene in anderen Organismen beziehen wurden in einer separaten Spalte aufgeführt. M.org., *Methylobacterium organophilum* XX; Hyph. X, *Hyphomicrobium* X; K.pne. *Klebsiella pneumoniae*.

Gen	Funktion	Literatur, <i>M.extorquens</i>	Literatur, sonstige
<i>mxkW</i>	unbekannt	[30]	
<i>mxwF</i>	QMDH, große Untereinheit	[33]	
<i>mxwJ</i>	periplasmatisches Chaperon?	[37]	
<i>mxwG</i>	Cytochrom c_L	[36]	
<i>mxwI</i>	QMDH, kleine Untereinheit	[34]	
<i>mxwR</i>	unbekannt	[37,38]	
<i>mxwS</i>	unbekannt	[37,38]	
<i>mxwA</i>	notwendig für Ca^{2+} Insertion in Apo-QMDH	[39,40]	
<i>mxwC</i>	unbekannt	[39,38]	
<i>mxwK</i>	notwendig für Ca^{2+} Insertion in Apo-QMDH	[39,40]	
<i>mxwL</i>	notwendig für Ca^{2+} Insertion in Apo-QMDH	[39,40]	
<i>mxwD</i>	unbekannt	[39,38]	
<i>mxwE</i>	unbekannt	[30]	
<i>mxwH</i>	unbekannt	[30]	
<i>mxwB</i>	Responseregulator	[30,41]	
<i>mxwD</i>	Sensorkinase	[42]	
<i>mxwM</i>	Responseregulator	[42,43]	
<i>mxwB</i>	unbekannt, an Regulation von <i>mxwF</i> beteiligt	[46]	
<i>mxwQ</i>	Sensorkinase	[46]	[45, 47], M. org.
<i>mxwE</i>	Responseregulator	[46]	[45, 47], M. org.
<i>mxwR</i>	unbekannt	[46]	
<i>mxwS</i>	unbekannt	[46]	
<i>pqqA</i>	PQQ-Precursor Peptid	[48,50]	[50,51], Hyph. X
<i>pqqB</i>	möglicherweise am Transport von PQQ ins Cytoplasma beteiligt	[48]	[55], K. pne.
<i>pqq(C/D)</i>	Mono/Dioxygenase ? Keine Homologien	[48,49]	
<i>pqqE</i>	unbekannt	[49]	
<i>pqqF</i>	Homologien zu Endopeptidasen	[56]	
<i>pqqG</i>	Homologien zu Endopeptidasen	[56]	

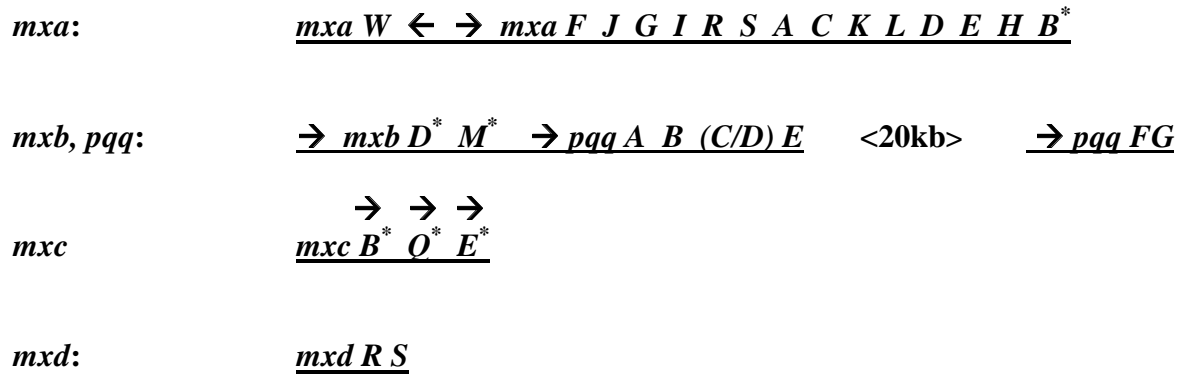


Abb.2: Schematische Darstellung der Gencluster des Methanol-oxidierenden Systems und der PQQ-Biosynthesegene aus *Methylobacterium extorquens*. Die Nomenklatur der PQQ-Biosynthesegene richtet sich nach [49]. Ein Pfeil auf gleicher Höhe der Gene zeigt die Position und Orientierung eines Promotors an. Ein Pfeil oberhalb eines Gens zeigt die vermutete Transkriptionsrichtung an. Regulationsgene sind mit einem Sternchen markiert.

1.3.1. Das *mx*a Gencluster

Das *mx*a Gencluster wurde nur bei *M. extorquens* vollständig sequenziert. Es besteht aus 15 Genen: *mx*aWFJGIRSACKLDEHB. Nur *mx*aW ist in entgegengesetzter Richtung zu den übrigen Genen orientiert [30]. Zwei Promotoren wurden zwischen *mx*aW und *mx*aF identifiziert. Ob es zwischen *mx*aF-B weitere Promotoren gibt oder ob diese 14 Gene kotranskribiert werden, ist nicht bekannt.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *mx*aW Gens zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen [30]. Es finden sich auch keine Sequenzmotive, die auf eine mögliche Funktion hindeuten. Eine Insertionsmutante, bei der eine Resistenzkassette in *mx*aW eingesetzt wurde, konnte immer noch auf Methanol wachsen. Weitere Experimente mit einem Reportergen zeigen jedoch, daß der *mx*aW Promotor beim Wachstum auf Methanol induziert wird [30,45]. Offensichtlich ist das *mx*aW Gen am Wachstum auf Methanol beteiligt, kodiert aber keine essentielle Komponente [30].

Die Gene *mx*aF und *mx*aI codieren die große und kleine Untereinheit der QMDH. Beide Gene sind für eine aktive QMDH und somit auch zum Wachstum auf Methanol notwendig [31-35]. Ungewöhnlich ist, daß zwischen den beiden Genen zwei weitere Gene liegen: *mx*aJ und *mx*aG. Das *mx*aG Gen codiert für das Cytochrom c_L und ist ebenfalls ein essentieller Bestandteil des Methanol-oxidierenden Systems [33,34,35,36]. Das von *mx*aJ codierte Protein besitzt wie die QMDH Untereinheiten und das Apo-Cytochrom c_L eine Signalsequenz zum

Transport ins Periplasma. Eine Insertionsmutante von *mxkJ* besitzt zwar ein aktives Cytochrom c_L aber weder die große noch die kleine Untereinheit der QMDH sind im Periplasma durch Western-Blot Analyse nachweisbar [37]. Da sowohl die Gene für Cytochrom c_L als auch für die kleine Untereinheit der QMDH dem *mxkJ* Gen folgen, scheint es kein negativer Effekt der Resistenskassette auf die Transkription nachfolgender Gene zu sein. Es wird vermutet, daß MxkJ an der Prozessierung der QMDH im Periplasma beteiligt ist [37]. Dem *mxkJ* Gen folgen zwei weitere Gene, *mxkRS*. Insertion von Resistenzkassetten und Komplementationsexperimente zeigten, daß auch diese Gene zum Wachstum auf Methanol notwendig sind [38]. Die Funktion beider Gene ist unklar, es finden sich auch keine Homologien zu bekannten Proteinen in den Datenbanken [37]. Bei der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *mxkR* sind Sequenzmotive vorhanden, die darauf schließen lassen, daß das Protein MgATP bindet. Bis vor kurzem war es umstritten, ob es sich bei *mxkS* um ein Gen handelt, da am 5'-Ende Codons auftreten, die in *M. extorquens* sehr selten vorkommen [37].

Die nächsten vier Gene des Clusters, *mxkACKL* codieren Proteine, die ebenfalls für das Wachstum auf Methanol notwendig sind [39]. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Genen wurden für *mxkAKL* chemisch erzeugte Mutanten komplementiert und keine Insertionsmutanten erzeugt. Mutationen in *mxkAKL* führen zu einem Phänotyp mit einer inaktiven Form der QMDH, die kein Ca^{2+} enthält [40]. Die Proteine der drei Gene sind offensichtlich am Einbau von Ca^{2+} in die QMDH beteiligt. Aus den Aminosäuresequenzen wurde abgeleitet, daß MxkA ein periplasmatisches Protein mit einem Ca^{2+} bindenden Aminosäuremotiv ist. MxkK ist vermutlich im Cytoplasma lokalisiert, MxkL ist ein integrales Membranprotein. Ob *mxkC* ebenfalls am Ca^{2+} Einbau beteiligt ist, wurde bisher experimentell nicht gezeigt. Sowohl für *mxkC* als auch für *mxkD*, welches dem *mxkACKL* Cluster folgt, wurden Insertionsmutanten erzeugt. Während *mxkC* eindeutig für das Wachstum auf Methanol notwendig ist, führt eine Mutation in *mxkD* nur zu einem verminderten Wachstum [38]. Somit ist *mxkD* am Methanol-oxidierenden System beteiligt, kodiert allerdings keine essentielle Komponente. Sequenzvergleiche zeigten weder für MxkC noch für MxkD Homologien zu bekannten Proteinen, die auf eine Funktion hindeuten [39].

Die nächsten beiden Gene des Clusters, *mxkEH* wurden durch Sequenzierung identifiziert [30]. Es gibt bislang keine Mutanten oder aussagekräftige Sequenzvergleiche aus der sich eine mögliche Funktion ableiten läßt. Da diese Gene allerdings noch im *mxk* Gencluster liegen, wurde angenommen, daß sie ebenfalls am Methanol-oxidierenden System beteiligt sind. Das *mxkB* Gen codiert einen Responseregulator und ist das letzte Gen des *mxk* Genclusters [30,41]. Üblicherweise liegt in der Nachbarschaft eines Responseregulator-Gens das Gen für

die dazugehörige Sensorkinase. Doch weder im *mx*a Gencluster noch in den Genen, die das Cluster einschließen, wurden über Sequenzvergleiche mögliche Kandidaten für eine Sensorkinase gefunden. Zum *mx*a*B* Gen wurden chemisch erzeugte Mutanten isoliert, die nicht mehr auf Methanol wachsen können [31]. Da in 3'-Richtung nach dem *mx*a*B* Gen ein Gen in entgegengesetzter Orientierung folgt, markiert das *mx*a*B* Gen das Ende des *mx*a Genclusters [30].

1.3.2. Das *mx*b Gencluster

Vom *mx*b Cluster in *M. extorquens* wurden zwei Gene sequenziert, *mx*b*DM*. Zu beiden Genen wurden chemisch erzeugte Mutanten isoliert, die nicht mehr auf Methanol wachsen können [31,32,42]. Zu *mx*b*M* existiert darüber hinaus auch noch eine Deletionsmutante [43]. Die von *mx*b*DM* codierten Proteine zeigen Homologien zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen, wobei MxbD zu Sensorproteinen vom Histidinkinase-Typ und MxbM zu Responseregulatoren vom Aspartatkinase-Typ ähnlich ist [42]. Die Gene *mx*b*DM* liegen unmittelbar vor dem PQQ-Biosynthese Operon. Ein weiteres Gen, *mx*b*A* wurde von Lee *et al.* [44] beschrieben. Es gibt jedoch keine weiteren Information zur Funktion oder Sequenz dieses Gens und ob es identisch zu *mx*b*D* oder *mx*b*M* ist.

1.3.3. Das *mx*c Gencluster

Drei Gene, *mx*c*BQE*, wurden bislang vom *mx*c Cluster in *M. extorquens* identifiziert. Zu *mx*c*BQE* wurden chemisch erzeugte Mutanten isoliert, die nicht mehr auf Methanol wachsen können [31,32,45,46]. In *Methylobacterium organophilum* XX wurden *mx*c*QE* sequenziert [47]. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen Homologien zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen, wobei *mx*c*Q* die Sensorkinase und *mx*c*E* den Responseregulator kodiert. Die genaue Funktion von *mx*c*B* ist unbekannt, eine Mutation in diesem Gen führt zu einem Phänotyp, der weder QMDH noch Cytochrom c_L besitzt [46]. Somit scheint *mx*c*B* ebenfalls an der Regulation der *mx*a*F* Transkription beteiligt zu sein.

1.3.4. Das *mxd* Gencluster

Vom *mxd* Cluster in *M. extorquens* sind zwei Gene identifiziert worden, *mxdRS* [46]. Zu beiden Genen wurden ebenfalls Mutanten isoliert, die nicht mehr auf Methanol wachsen können. Jedoch sind weder die Funktion noch die DNA Sequenz beider Gene bekannt.

1.3.5. Das *pqq* Gencluster

Das PQQ-Biosynthese Operon in *M. extorquens* besteht aus sechs Genen, *pqqAB(C/D)E* und *pqqFG* [31,32,39,48,49]. Obwohl sämtliche Gene der PQQ-Biosynthese sequenziert wurden und ebenfalls die Aminosäuren Tyrosin und Glutamat als Ausgangsmoleküle der Biosynthese bekannt sind [50,51], ist der Mechanismus der Biosynthese immer noch nicht geklärt.

Das *pqqA* Gen in *M. extorquens* codiert für ein 29 Aminosäuren langes Peptid. In *Acinetobacter calcoaceticus* und in *Klebsiella pneumoniae* wurde dieses Peptid als "Precursor" der PQQ-Biosynthese postuliert [52,53]. Sequenzvergleiche verschiedener *pqqA* Gene aus unterschiedlichen Organismen zeigen, daß die Position der Aminosäuren Tyrosin und Glutamat im Peptid konserviert ist. Außerdem wird das *pqqA* Gen weitaus stärker exprimiert als die nachfolgenden Gene, was ebenfalls für eine "Precursor"-Funktion spricht [54,55]. Mutationen im *pqqA* Gen verhinderten bei *A. calcoaceticus* und in *K. pneumoniae* die PQQ-Biosynthese. In *M. extorquens* dagegen ist selbst eine Mutante mit einem deletierten *pqqA* Gen noch in der Lage PQQ zu bilden [43]. Das dem *pqqA* Gen folgende *pqqB* Gen ist an der PQQ-Biosynthese beteiligt, aber ebenfalls keine essentielle Komponente [43]. Velterop *et al.* [55] vermuteten, daß das *pqqB* Genprodukt an dem Transport von PQQ ins Periplasma beteiligt ist. Das Gen *pqq(C/D)* wurde in *M. extorquens* von Toyama *et al.* [49] als ein Gen identifiziert, in *A. calcoaceticus* und in *K. pneumoniae* sind *pqqCD* zwei separate Gene. Obwohl es anhand von Sequenzvergleichen keine Homologien zu Monooxygenasen und Dioxygenasen gibt, vermuten Toyama *et al.*, [49], aufgrund von biochemischen Experimenten mit dem heterolog in *E. coli* exprimierten Enzym, eine Funktion von Pqq(C/D) als Mono- oder Dioxygenase, welches vielleicht den letzten Schritt der Biosynthese katalysiert. Die Funktion des nachfolgenden *pqqE* Gens ist unbekannt, die abgeleitete Proteinsequenz enthält ein Motiv, welches einen Eisen-Schwefel Cluster binden kann [49]. Die *pqqFG* Gene bilden ein eigenes Operon mehrere Kilobasen von dem *pqqAB(C/D)E* Cluster entfernt. Die Proteinsequenzen dieser Gene

zeigen Ähnlichkeiten zu Endopeptidasen und könnten ein Heterodimer bilden [56]. Sie sind möglicherweise für die Prozessierung des "Precursor"-Peptids notwendig [56].

1.4. Regulation des Methanol-oxidierenden Systems in *Methylobacterium extorquens*

Von den 28 beschriebenen Genen in *M. extorquens* wurden fünf Regulationsgene identifiziert. Darunter fallen zwei Zwei-Komponenten-Systeme, *mxbDM* und *mxcQE*, die jeweils aus einem Sensor kinase-/ Responseregulator-Genpaar bestehen, und einem einzelnen Responseregulator-Gen, *mxkB*, ohne benachbartes Sensor kinase-Gen. Die zwei Sensor kinasen, *MxbD* und *MxcQ* haben unterschiedliche periplasmatische Aminosäureschleifen und sprechen wahrscheinlich auf unterschiedliche Signale an [42]. Alle fünf Gene sind essentiell für das Wachstum auf Methanol und die Transkription des *mxAF* Promotors. Die genaue Funktion der Gene und der Mechanismus der Regulation sind bislang nicht vollständig verstanden. Springer *et al.* [42] konnten zeigen, daß *MxcQE* auch für die Expression von *MxbDM* notwendig ist und postulieren eine Hierarchie der Regulationsgene: *MxcQE* kontrolliert die Expression von *MxbDM*, welches wiederum die Expression einer Reihe weiterer Gene kontrolliert, die an der Methanoloxidation beteiligt sind. Ob die Responseregulatoren beider Systeme oder nur *MxbM* an den *mxAF* Promotor binden können, wurde bisher nicht gezeigt. Eine Mutation im Responseregulator-Gen *mxkB* zu dem es kein benachbartes Sensor kinase-Gen gibt, verhindert ebenfalls die Expression des *mxAF* Promotors [41]. Auch hier fehlen bisher Bindungsstudien, die eine direkte Wechselwirkung zwischen *MxB* und dem *mxAF* Promotor zeigen. Außer dem *mxAF* Promotor, der neben den Strukturgenen der QMDH und des Cytochrom c_L vielleicht auch noch für die Expression aller Gene bis zum *mxkB* Gen notwendig ist, ist auch die Induktion des *pqqA* Promotors des PQQ-Biosyntheseoperons für eine aktive QMDH erforderlich. Die Befunde zur Regulation des *pqqA* Promotors sind bislang ebenfalls nicht eindeutig interpretierbar. *MxbDM* scheinen für die Transkription des *pqqA* Promotors notwendig zu sein. Aber während Mutationen in *mxBD* oder *mxBM* die Expression der QMDH fast vollständig unterbinden, synthetisieren diese Mutanten immer noch PQQ, auch wenn die Transkription des *pqqA* Promotors deutlich vermindert ist [43, 54]. Eine Mutation in *mxkB* vermindert die Transkription des *pqqA* Promotors und die PQQ Produktion ebenfalls nur um die Hälfte [54]. Mutationen in *mxcQE*, die für eine Transkription des *mxAF* Promotors notwendig sind, haben keinen Effekt auf den *pqqA* Promotor [54]. Dieser Befund widerspricht in

Bezug auf die Regulation der PQQ Biosynthesegene einer hierarchischen Ordnung von *mxbDM* und *mxcQE*. Springer *et al.* [42] erklären dieses Ergebnis mit einer Grundexpression der *mxbDM* Gene in den *mxcQE* Mutanten, die für eine Induktion der PQQ-Biosynthesegene noch ausreicht, aber zu niedrig für die Induktion des *mxoF* Promotors ist.

1.5. Aufgabenstellung

Außer dem Methanol-oxidierenden System methylothermer Bakterien ist bisher kein weiteres PQQ-abhängiges Quinoprotein-Alkoholdehydrogenase System in Gram negativen Bakterien genetisch untersucht worden. Es gibt keine Erkenntnisse über den komplexen Aufbau und die komplexe Regulation dieses Systems auf das verwendete Substrat Methanol und das toxische Produkt der Methanoloxidation, dem Formaldehyd, zurückzuführen sind. Aus diesem Grund ist das Ethanol-oxidierende System in *P. aeruginosa* zur Untersuchung geeignet, da es den nächsthöheren Alkohol, Ethanol, als Substrat verwendet. *P. aeruginosa* ist außerdem nicht in der Lage auf Methanol zu wachsen und gehört zur γ -Unterabteilung der Proteobakterien, während das Methanol-oxidierende System nur bei Bakterien der α - und β -Unterabteilung der Proteobakterien beschrieben wurde. Das Ethanol-oxidierende System in *P. aeruginosa* ist auch unter weiteren Aspekten für eine genetische Untersuchung geeignet: Zwei Proteine des Ethanol-oxidierenden Systems, die QEDH und das Cytochrom c_{550} sind bereits identifiziert worden [21, 81]. Beide haben äquivalente Funktionen wie die QMDH und Cytochrom c_L in methylothermen Bakterien. Die Aminosäuresequenz des Cytochrom c_L ist bekannt und zeigt keine signifikanten Homologien zu anderen Cytochromen [36]. Unter diesem Aspekt ist auch die Sequenz des Cytochrom c_{550} von besonderem Interesse. Trotz dieser Übereinstimmungen gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen beiden Systemen: Während bei methylothermen Bakterien Cytochrom c_H die Elektronen von Cytochrom c_L auf die Endoxidase überträgt, sind bei *P. aeruginosa* die Komponenten der Elektronentransportkette, die sich an das Cytochrom c_{550} anschließen, nicht bekannt. Jedoch kann ein weiteres lösliches Cytochrom c , analog zum Cytochrom c_H in methylothermen Bakterien, ausgeschlossen werden. Mit einem genetischen Ansatz könnten auch weitere Komponenten dieser Elektronentransportkette identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Quinoprotein-Ethanoldehydrogenase System aus *Pseudomonas aeruginosa* genetisch untersucht werden. Durch Isolierung und Charakterisierung von Mutanten, die nicht mehr auf Ethanol wachsen können, sollte ein erster Hinweis auf das

Spektrum der erzeugbaren Mutanten erhalten werden. Durch Komplementierung dieser Mutanten mit einer Genbank aus *P. aeruginosa* kann weiterhin die Anzahl mutagenisierter Gene abgeschätzt werden. Außerdem sollte das Gen des Cytochrom c_{550} sequenziert und die genetische Organisation und die Regulation benachbarter Gene aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Vektoren

pBluescript ist ein 2,9 kb großer Klonierungsvektor der Firma Stratagene (Heidelberg) mit Carbenicillinresistenz, der auch nur in *E. coli* repliziert werden kann, im Gegensatz zu pUC18/19 aber eine anders zusammengesetzte "multiple cloning site" besitzt.

pEDY305 ist ein Promotoranalyse-Vektor, mit einem promotorlosen *lacZ* Gen vor dem sich eine "multiple cloning site" befindet. Der mobilisierbare Vektor mit einem breiten Wirtsspektrum ist ca. 20 kb groß und besitzt eine Tetracyclinresistenz (Schwarz, persönliche Mitteilung).

pLAFR3 ist ein 22 kb großer, mobilisierbarer Vektor mit breitem Wirtsspektrum und Tetracyclinresistenz. Die *cos*-Stelle ermöglicht das Verpacken von 38-52 kb großen DNA-Fragmenten in Lambda-Phagen [61].

pRK2013 ist ein mobilisierbarer *ColE1* Vektor mit Kanamycinresistenz und *tra*-Genen, der nicht in *P. aeruginosa* repliziert werden kann [62].

pSUP1021 ist ein "suicide" Vektor zur Transposonmutagenese. Er enthält das Transposon Tn5 und trägt die Resistenzgene für Tc, Km und Cm [64].

pTB4003 ist ein pUC18-Derivat und enthält ein 6,4 kb großes *Bam*HI-Fragment aus dem Cosmid pTB3001 [66].

pUC18, pUC19 sind 2,7 kb große Klonierungsvektoren mit Carbenicillinresistenz, die nur in *E. coli* repliziert werden [63].

pUCP20T ist ein carbenicillinresistenter, mobilisierbarer Vektor mit breitem Wirtsspektrum, der sich vom pUC18 ableitet [65].

pBluescript-Derivate:

Vektor pTB3134 enthält das *Hin*DIII-*Age*I Fragment aus pTB3070 im *Hin*DIII-*Sma*I verdauten pBluescript. Vor der Ligation wurde die *Age*I Schnittstelle aufgefüllt.

pEDY305-Derivate:

Bei pTB3138 wurde das 0,89 kb *PstI-SalI* Fragment aus pTB3070 in die *PstI-XhoI* Schnittstellen des pEDY305 kloniert. Bei pTB3139 wurde das 0,89 kb große *PstI-XbaI* Fragment in den *PstI-XbaI* verdauten pEDY305 kloniert. pTB3140 und pTB3141 leiten sich beide von pTB3134 ab. Bei pTB3140 wurde das 1,1 kb *XhoI-XbaI* Fragment aus pTB3134 zwischen die *XhoI-XbaI* Schnittstellen des pEDY305 kloniert, bei pTB3141 das 1,7 kb *PstI-XbaI* Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des pEDY305.

pLAFR3-Derivate:

Die Vektoren pTB3001, pTB3018, pTB3021, pTB3035, pTB3040, pTB3050, pTB3052, pTB3055, pTB3057 und pTB3064 sind pLAFR3 Derivate, die ein ca. 20 kb großes DNA-Insert aus *P. aeruginosa* besitzen.

pUC18/19-Derivate:

Die Vektoren pTB3070 und pTB3071 leiten sich von pUC18 und pUC19 ab und enthalten ein 3,2 kb großes *BamHI-PstI* Fragment aus pTB3001. In pTB3071 sind die *exaBC* Gene in gleicher, in pTB3070 in entgegengesetzter Orientierung zum *lac* Promotor der pUC-Vektoren.

Die Vektoren pTB3074, pTB3075, pTB3076, pTB3077, pTB3078, pTB3079, pTB3081, pTB3083 und pTB3084 sind mit Exonuklease III verkürzte Derivate des Vektors pTB3070.

Der Vektor pTB3106 leitet sich von Vektor pTB4003 ab. Er enthält ein 2,4 kb großes *XhoI-XhoI* Fragment aus dem Transposon Tn5 des Vektors pSUP1021 mit dem Kanamycinresistenz-Gen, welches in die *XhoI-XhoI* Schnittstellen des *exaB* Gens kloniert wurde.

Der Vektor pTB3135 enthält das 0,89 kb *HinDIII-SalI* Fragment aus pTB3070 in pUC19.

pUCP20T-Derivate:

Der Vektor pTB3109 enthält das 3,2 kb *BamHI-PstI* Fragment aus pTB3070 in pUCP20T, pTB3110 das 2,7 kb große *XhoI-BamHI* Fragment aus pTB3070, pTB3111 enthält das ca. 1 kb große *EcoRI-PstI* geschnittene Insert mit dem *exaB* Gen aus pTB3081.

Die folgenden pUCP20T-Derivate enthalten verschiedene *PstI* Fragmente aus pTB3001. pTB3112 enthält ein 6,2 kb, pTB3129 ein 4,9 kb, pTB3115 ein 2,6 kb und pTB3124 ein 1,1 kb Fragment.

Die Vektoren pTB3142, pTB3143 und pTB3144 sind Subklone von pTB3112. Vektor pTB3142 enthält den unvollständigen ORF881. Hierzu wurde das 3 kb *NotI-HinDIII* Frag-

ment ausgeschnitten, die Enden aufgefüllt und religiert. Bei pTB3143 wurde das 2,5 kb *SacI* Fragment ausgeschnitten, dieser Vektor enthält die Gene *glpS*, *agmR* und *exaDE*. Plasmid pTB3144 enthält nur die Gene *exaDE*, hier wurde das 4,2 kb *MluI-SmaI* Fragment ausgeschnitten, die Enden aufgefüllt und religiert.

Der Vektor pTB3145 enthält das 6,4 kb *BamHI* Fragment aus pTB4003 in pUCP20T. Bei pTB3146 wurde das 1,1 kb große *HinDIII-NotI* Fragment ausgeschnitten, die Enden aufgefüllt und religiert.

2.2. Bakterienstämme

Für die genetische Untersuchung des Ethanol-oxidierenden-Systems wurde *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933 [67] verwendet.

Die Stämme MS1-MS21 sind, mit dem Mutagen MNNG erzeugte, chemische Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933, die nicht mehr auf Ethanol wachsen können. MS23, MS24 und MS25 sind Insertionsmutanten, bei denen das Gen des Cytochrom c_{550} (*exaB*) durch eine Kanamycinkassette aus dem Transposon Tn5 unterbrochen wurde.

Für molekularbiologische Arbeiten wurden folgende *Escherichia coli* K12-Derivate verwendet:

E. coli S17 λ -pir [68] enthält die *tra*-Gene und ist für Zweipunkt Kreuzungen geeignet. Dieser Stamm wurde als Träger für die Genbank aus *P. aeruginosa* ausgewählt.

E. coli HB101 [69] enthält das mobilisierbare Helfer-Plasmid pRK2013 mit den *tra*-Genen für Dreipunkt Kreuzungen.

Die *E. coli* Stämme JM109 [63] und DH5 α [70] wurden für allgemeine Klonierungsarbeiten und Proteinexpressionen verwendet.

Zur Präparation von Membranen mit Apo-QGDH für den PQQ-Nachweis nach Geiger & Görisch [71] wurde *E. coli* ATCC 10798 verwendet.

2.3. Kulturmedien und Zellzüchtung

Alle Nährmedien wurden 20 min bei 121 °C sterilisiert. Für feste Nährböden wurde 1,5 % Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren dem abgekühlten Medium in der entsprechenden Konzentration steril zugegeben. Für *P. aeruginosa* und *E. coli* wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carbenicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$; Kanamycin, 50 $\mu\text{g/ml}$; Rifampicin, 20 $\mu\text{g/ml}$; Tetracyclin 20 $\mu\text{g/ml}$.

Für *P. aeruginosa* Kulturen, die zu Promotoranalyse Versuchen mit pEDY305-Derivaten eingesetzt wurden, wurde statt der üblichen Stammlösung von 2 mg/ml Tetracyclin in 50 % Ethanol eine frisch hergestellte 20 mg/ml Tetracyclinlösung in H₂O verwendet.

E. coli wurde auf LB-Medium bei 37 °C kultiviert.

P. aeruginosa wurde bei 37 °C auf LB-, HNB- [72] oder Minimalmedium [72] mit verschiedenen Kohlenstoffquellen kultiviert. Succinat (40 mM) und Acetat (20 mM) wurden vor dem Autoklavieren zugegeben. Glukose wurde nach dem Autoklavieren als sterile Lösung mit einer Endkonzentration von 40 mM hinzugefügt. Alle Alkohole wurden 0,5 % ig (v/v) nach dem Autoklavieren zugegeben.

Für anaerobe Kultivierungen wurde dem entsprechenden Medium 5g/l KNO₃ zugesetzt. Die Kulturgefäße wurden zu 95 % gefüllt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Die OD₆₂₀ der Kulturen wurde mit einem Digital Photometer LPW1 der Firma Dr. Lange gemessen.

LB-Medium: 10 g/l Casein pankreat. verdaut (Merck, Darmstadt)
 5 g/l Hefeextrakt (Merck, Darmstadt)
 5 g/l NaCl
 pH 7,0 mit konz. NaOH

2.3.1. Bestimmung von Generationszeiten

Zur Ermittlung der Generationszeiten wurden entweder 2 ml Kulturen in kleinen Glasröhrchen geschüttelt, die direkt im Dr. Lange Photometer gemessen werden konnten oder 10 ml Kulturen in 100 ml Photometerkolben. Die Vorkultur wurde auf LB-Medium gezüchtet. Die Hauptkultur wurde mit 1/100 Vol. der Vorkultur angeimpft, die zuvor einmal in dem entsprechenden Minimalmedium gewaschen wurde.

2.3.2. Induktionsversuch

HNB-ÜN Kulturen von *P. aeruginosa* Wildtyp und Mutanten wurden zweimal mit MM-Ethanol gewaschen und anschließend in MM-Ethanol resuspendiert. 1 ml Zellsuspension wurde mit 3 ml MM-Ethanol verdünnt und 6 h mit 75 rpm bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf 0 °C abgekühlt und für QEDH oder PQQ-Nachweis verwendet. Zur Promotoranalyse von *P. aeruginosa* Mutanten mit pTB3138 oder pTB3139 wurden die Vorkulturen in LB-Tc gezüchtet. Davon wurden 0,5 ml mit 1,5 ml MM-Ethanol-Tc verdünnt.

Nach einer Inkubation über 6 h mit 75 rpm bei 37 °C wurden die Zellen wie unter 2.24. beschrieben abgeerntet und zur Messung der β -Galaktosidase nach 2.21.1.7. vorbereitet.

2.4. Lagerung von Bakterienkulturen

P. aeruginosa wurde in HNB- oder LB- Medium mit 10 % (v/v) Glycerol bei -80 °C, *E. coli*-Stämme in LB-Medium mit 15 % (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert.

2.5. Chemische Mutagenese mit MNNG

Zur Mutagenese von *P. aeruginosa* wurde die Vorschrift von Miller [73] etwas modifiziert. 20 ml LB-Medium wurden mit 250 μ l einer ÜNK beimpft und bei 37 °C und 125 rpm bis zu einer $OD_{600}=1,0$ inkubiert. 2 ml Kultur wurden zweimal mit je 2 ml CP-Puffer gewaschen und in 0,5 ml CP-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Saline folgte eine 5 minütige Inkubation bei 37 °C unter schwachem Schütteln. 50 μ l der Zellsuspension wurden für die Zellzahlbestimmung entnommen, anschließend folgte die Zugabe von 10 μ l MNNG-Lösung. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C unter schwachem Schütteln wurden die Zellen zweimal mit 2 ml CP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l in 4 ml HNB-Medium pipettiert und 4,5 h bei 37 °C und 100 rpm geschüttelt, danach bei -80 °C oder bei 4 °C (ÜN) gelagert. Weitere Aliquots der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Überlebensrate und der Zunahme der Rifampicinresistenz entnommen. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Aliquots auf HNB-Platten mit und ohne Rifampicin ausplattiert.

CP-Puffer:	7,6 g/l	Citronensäure, Monohydrat
	22,6 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O

Saline: 5 g NaCl und 0,12 g MgSO₄ x 7 H₂O

2.6. Replika-Filtertechnik

Die Zellen des Mutationsversuchs wurden im gleichen Volumen Saline gewaschen und in einer entsprechenden Verdünnung (ca. 200 Kolonien pro Platte) auf MM-Succinat ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C ÜN wurden die Kolonien mit einem Replika-Filter (steriles Whatman 3MM Papier) zuerst auf eine Platte mit MM-Ethanol und anschließend auf eine mit MM-Succinat übertragen. Nach Inkubation ÜN bei 37 °C wurden diejenigen Mutanten ausgewählt, die auf Succinat, aber nicht auf Ethanol wachsen konnten.

2.7. Bestimmung der Reversionsraten

Zur Bestimmung der Reversionsraten wurden die Mutanten auf LB-Medium über Nacht gezüchtet oder Zellen aus dem Induktionsversuch (2.3.2.) eingesetzt. Ein Aliquot der Kultur wurde zweimal mit MM-Ethanol gewaschen (Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge, 14000 rpm, 30 s). Verdünnungsreihen wurden anschließend sowohl auf LB- als auch auf MM-Ethanol-Agar-Platten ausplattiert.

2.8. DNA Isolierung

2.8.1. Isolierung genomischer DNA aus *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa wurde in 100 ml MM-Ethanol bis zur späten log. Wachstumsphase gezüchtet. Die Zellen wurden 20 min bei 5000 g abzentrifugiert und in 9,5 ml TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 ml 10 % SDS-Lösung und 50 µl (20 mg/ml) Proteinase K (Sigma; Deisenhofen) wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde mit 1,8 ml 5 M NaCl vermischt und nach Zugabe von 1,5 ml vorgewärmter CTAB-Lösung 20 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform und zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe des gleichen Volumens eiskalten Isopropanols ausgefällt und konnte mit einem Glasstab aufgespult werden. Die DNA wurde am Glasstab 5 min in 70 % Ethanol inkubiert, anschließend ca. 15 min getrocknet und ÜN bei 4 °C in 1,5 ml TE-Puffer gelöst.

CTAB-Lösung: 10 % CTAB
 0,7 M NaCl

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

2.8.2. Plasmidpräparation aus *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa*

Plasmid-DNA wurde nach der in Sambrook *et al.* [74] beschriebenen Methode von Birnboim und Doly isoliert. Für Sequenzierungsreaktionen wurde Plasmid-DNA mit dem "Qiaprep Spin Miniprep"-Kit der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt.

2.9. Reinigung und Fällung von DNA

Reinigung der DNA durch Extraktion mit Phenol/Choroform sowie Fällung der DNA mit Ethanol oder Isopropanol wurde, wie in [75] beschrieben, durchgeführt.

2.9.1. Reinigung von DNA mit einer Silikamatrix

Aus Agarosegelen und aus Lösungen wurde DNA auch mit dem Prep-A-Gene DNA Purification System der Firma BioRad (München) gereinigt.

2.10. Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Reinheit und Konzentrationen von DNA-Lösungen wurden spektrophotometrisch, wie in Sambrook *et al.* [74] beschrieben, bestimmt. Geringe DNA-Mengen und kleine Volumina wurden durch Vergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz mit einem DNA-Standard quantifiziert [74].

2.11. Enzymatische Modifizierung von DNA

2.11.1. Restriktionshydrolyse

Restriktionshydrolysen wurden nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Freiburg; Boehringer, Mannheim; Fermentas, Vilnius; Takara, Heidelberg; Biolabs, Schwalbach) durchgeführt. Üblich waren 1,5-2 h Inkubation bei 37 °C im Wasserbad in einem Mindestvolumen von 20 µl.

2.11.2. 5`-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Restriktionsenzyme wurden vorab nach Angaben des Herstellers durch Hitze inaktiviert. Anschließend wurde 1 U alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert, danach weitere 20 min bei 52 °C.

2.11.3. Ligation

Durchführung nach Vorschrift des Herstellers (Boehringer, Mannheim). Das Reaktionsvolumen von 11 µl mit 1 U Ligase wurde 16 h bei 16 °C inkubiert.

2.11.4. Auffüllen überhängender Enden mit dem Klenow-Fragment

Die 5'-überhängenden Enden geschnittener DNA wurde mit dem Klenow-Fragment nach der in Sambrook *et al.* [74] beschriebenen Vorschrift aufgefüllt.

2.11.5. Exonuklease III Verdau

Zur Verkürzung von Insert-DNA mit Exonuklease III wurde die Vorschrift in Sambrook *et al.* [74] verwendet.

2.12. Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Die Agarosegel-Elektrophoresen wurden, wie bei Sambrook *et al.* [74] beschrieben, mit TAE-Puffer durchgeführt.

Die Agarose-Konzentrationen und die Elektrophoresebedingungen richteten sich nach der Größe der eingesetzten DNA. Im Bereich zwischen 5-40 kb wurde ein 0,35 % iges Agarosegel eingesetzt und 16-20 h mit 15 V bei 4 °C elektrophoretisch getrennt. Im Größenbereich von 1-20 kb betrug die Agarosekonzentration 1 %, die Elektrophorese wurde ca. 1-3 h bei RT mit 70-100 V durchgeführt.

Vor der Elektrophorese wurde der DNA-Lösung 1/5 Vol. Auftragspuffer [74] mit Bromphenolblau zugegeben. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel 30-60 min in Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) inkubiert. Unter UV-Licht war die DNA durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar.

Als Größenstandard wurde λ-DNA (Pharmacia, Freiburg), mit *HinDIII* oder mit *EcoRI*-*HinDIII* verdaut, eingesetzt.

2.13. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation kann die partiell hydrolysierte genomische DNA nach Größe aufgetrennt werden. Dieser Schritt soll kleinere DNA Fragmente (<16 kb) abtrennen und dadurch bei der Ligation die Ausbeute an verpackungsfähiger DNA erhöhen. Die Polyallomerröhrchen (12 ml PK50) wurden mit Ethanol ausgespült und getrocknet. Anschließend wurden sie bis ca. 4 mm unter den Rand mit der Saccharose-Lösung gefüllt, 3 h bei -20 °C eingefroren und danach bei 4 °C aufgetaut. Um die Qualität des Gradienten zu überprüfen, wurde ein Tropfen der ursprünglichen Saccharose-Lösung zugetropft, der idealerweise bis zum ersten Drittel der Röhrchenlänge einsinken sollte. 100 µl DNA-Lösung (130 µg) wurden vorsichtig auf den Gradienten aufgegeben. Anschließend wurde der Gradient 16 h bei 51600 g und 15 °C im TH-641 Rotor zentrifugiert. Zur Fraktionierung des Gradienten wurde der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und Fraktionen zu 400 µl aufgefangen. 40 µl jeder dritten Fraktion wurde zur Kontrolle der Trennleistung auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente elektrophoretisch getrennt.

Saccharose-Lösung: 10% (w/v) Saccharose in Gradientenpuffer

Gradientenpuffer:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,9
	2 mM	EDTA, pH 8,0
	200 mM	NaCl
	0,1 % (w/v)	Sarkosyl

2.14. Transformation von *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* mit Plasmid-DNA

2.14.1. CaCl₂-Methode

2.14.1.1. Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂ Methode.

50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer ÜNK von *E. coli* JM109 beimpft und bei 37 °C und starkem Schütteln bis zur OD₆₀₀=0,25 gezüchtet. Anschließend wurde die Kultur 10 min bei 0 °C inkubiert und bei 4 °C 5 min mit 2000 g abzentrifugiert. Die Überstand wurde dekantiert und die Zellen vorsichtig in 30 ml eiskalter CaCl₂ Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 20-24 h in einem Eisbad im Kühlschrank inkubiert. 27 ml der CaCl₂ Lösung wurden vorsichtig abpipettiert, die sedimentierten Zellen in den restlichen 3 ml vorsichtig resuspendiert und in Anteilen von 200 µl bei -80 °C eingefroren.

CaCl₂-Lösung: 60 mM CaCl₂
 15 % (v/v) Glycerol

2.14.1.2. Transformation kompetenter Zellen

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µl Plasmid-DNA Lösung vorsichtig vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 0 °C wurden die Zellen 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 5 min bei 0 °C inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen 1-1,5 h bei 37 °C und 100 rpm geschüttelt, danach auf LB-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.14.2. Elektroporation von *Escherichia coli*

Für die Elektroporation von *E. coli* wurde der Genepulser II der Firma BioRad (München) verwendet. Die Züchtung und Vorbereitung der Zellen sowie die Elektroporation mit 0,2 cm Küvetten wurden nach dem Protokoll des Herstellers (BioRad) durchgeführt. Es wurden entweder 1-2 µl ungereinigter Ligationsansatz für die Elektroporation von 100 µl Zellen verwendet oder der gesamte Ligationsansatz nach 2.10.1. gereinigt, in H₂O bidest. aufgenommen und komplett zur Elektroporation eingesetzt.

2.14.3. Elektroporation von *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa wurde nach der Vorschrift von Smith & Iglewski [76] gezüchtet und zur Elektroporation mit 0,2 cm Küvetten eingesetzt. Verwendet wurde ebenfalls der Genepulser II (BioRad, München) mit folgenden Einstellungen: 200 Ω, 25 µF und 1,6 kV.

2.15. Transfektion von *Escherichia coli* mit Cosmiden

2.15.1. *In vitro* Verpackung der Cosmide

Die Verpackung der Ligationsprodukte aus Cosmid- und Gesamt-DNA erfolgte mit dem "DNA Packaging Kit" der Firma Boehringer (Mannheim), nach Angaben des Hersteller. Die verpackte DNA (24 µl) wurde mit 480 µl SM Puffer verdünnt und nach Zugabe von 20 µl Chloroform bei 4 °C gelagert.

SM-Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM	MgSO ₄
	100 mM	NaCl
	0,01 %	Gelatine

2.15.2. Transfektion von *Escherichia coli* S17 λ -pir mit der verpackten Cosmid-Genbank:

Die Vorbereitung der Bakterienkultur (*E. coli* S17 λ -pir) erfolgte nach Herstellerangaben (Boehringer, Mannheim). Je 20 μ l der Phagensuspension wurden mit 200 μ l *E. coli* S17 λ -pir vermischt und 20 min mit 100 rpm bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium wurde nochmals 1,5 h mit 100 rpm bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach auf Agarplatten mit LB-Tc ausplattiert und ÜN bei 37 °C bebrütet.

Die Kolonien wurden mit LB-Medium abgeschwemmt und vereinigt. Nach Zugabe von 15 % (v/v) Glycerol wurde die Genbank in mehreren Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.16. Transfer mobilisierbarer Vektoren durch Konjugation

2.16.1 Transfer einer Genbank in *Pseudomonas aeruginosa* durch Zweipunktkreuzung mit *Escherichia coli* S17 λ -pir:

E. coli S17 λ -pir besitzt die zur Konjugation notwendigen *tra*-Gene. Vektoren mit einem breiten Wirtsspektrum und mob-Bereich können durch Konjugation von *E. coli* S17 λ -pir in *P. aeruginosa* übertragen werden.

5 ml LB-Medium wurden mit einer *P. aeruginosa* Mutante beimpft und bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. 2-5 ml LB-Tc Medium wurden mit tiefgefrorenen *E. coli* S17 λ -pir, welche die Cosmide der Genbank enthielten, mit einer OD₆₂₀=0,05 angeimpft. Anschließend wuchsen die Zellen 2 h bei 37 °C bis zu einer OD₆₂₀=0,3-0,6. Um das Antibiotikum zu entfernen, wurden die Zellen in der Eppendorfzentrifuge kurz abzentrifugiert und im gleichen Volumen LB-Medium resuspendiert. Danach wurden 0,5 ml der Genbank mit 0,5 ml der stationären *P. aeruginosa* ÜNK in einem Eppi vermischt und die Suspension beider Organismen auf eine LB-Platte ausplattiert. Nach 6-12 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit Saline von der Platte abgeschwemmt und in einem Endvolumen von 1,0 ml resuspendiert. 1:10 und 1:100 Verdünnungen wurden auf Selektivmedium (MM-Ethanol-Tc) zur Isolierung komplementierter Mutanten ausplattiert. Auf Kontrollplatten (MM-Succinat-Tc) wurde die

Gesamtzahl der Konjugationsereignisse bestimmt. Hier konnten alle *P. aeruginosa* Mutanten wachsen, die ein Cosmid durch Konjugation erhalten hatten.

2.16.2. Transfer eines Vektors in *Pseudomonas aeruginosa* durch Dreipunkt Kreuzung

Je 300 µl der stationären ÜNKs des *P. aeruginosa* Rezipienten, des *E. coli* Donorstammes und des Helferstammes *E. coli* HB101-pRK2013 wurden mit LB-Medium gewaschen und 6 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung komplementierender Mutanten erfolgte wie unter 2.16.1. beschrieben.

Zur Kontrolle, ob eine Komplementierung *in trans* erfolgte, wurde, sofern der Vergleich der Gesamt-Konjugationsereignisse und der komplementierten Konjuganten nicht eindeutig war, die Plasmid-DNA aus drei komplementierten Konjuganten isoliert (2.8.2.), damit *E. coli* transformiert (2.14.) und die Transformanten erneut zur Komplementierung (wie oben) eingesetzt.

2.17. Identifizierung homologer DNA durch Hybridisierung

Zur Identifizierung homologer DNA mit einer DIG-markierten Gensonde oder einem DIG-markierten Oligonukleotid wurde der "DIG DNA Labeling and Detektion Kit" der Firma Boehringer (Mannheim) eingesetzt. Die zu untersuchende DNA wird einzelsträngig auf eine Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) transferiert und mit der Gensonde hybridisiert. Anschließend kann die DIG-Markierung durch einen Antikörper immunologisch detektiert werden. Durch eine alkalische Phosphatase, die an den Antikörper gebunden ist, kann entweder eine Farbreaktion mit NBT und BCIP ausgelöst werden oder durch Chemilumineszenz mit dem Substrat CSPD ein Röntgenfilm belichtet werden.

2.17.1. Präparation DIG-markierter DNA

Das DIG-markierte Oligonukleotid (Cyto 01) wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

Zur Markierung eines gesamten DNA-Fragments wurde dieses nach einer Restriktionshydrolyse und Trennung über eine Agarosegel-Elektrophorese aus dem Agarosegel nach 2.9.1.

eluiert. Mindestens 3 µg DNA wurden zur Markierungsreaktion eingesetzt, die nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

2.17.2. Southern-Blot

Zum Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran wurde der "Downward Capillary Blot" nach Chomcynski [77] verwendet. Die Denaturierung der DNA vor dem Transfer sowie die Fixierung der DNA auf der Nylonmembran durch Inkubation bei 120 °C wurden nach Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) durchgeführt.

2.17.3. Hybridisierung und immunologische Detektion

Zur Hybridisierung wurde das Protokoll des Herstellers (Boehringer, Mannheim) verwendet. Die Membran wurde in einem Plastikbeutel eingeschweißt und in einem Hoefer HB400 Hybridisierungssofen (Pharmacia, Freiburg) inkubiert.

Das degenerierte Oligonukleotid (Cyto 01) zur Identifizierung des Cytochrom c_{550} Gens wurde 4 h bei 45 °C und einer Konzentration von 10 pmol/ml zur Hybridisierung eingesetzt. Markierte DNA-Fragmente als Gensonden wurden ÜN bei 68 °C in einer Konzentration von 25 ng/ml hybridisiert.

Die immunologische Detektion wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) durchgeführt.

2.17.4. Phosphatase-Nachweis mit NBT-BCIP oder Chemilumineszenz

Die Farbreaktionen der am Anti-DIG Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase mit NBT-BCIP oder die Chemilumineszenzreaktion mit CSPD wurden beide nach Protokollen des Herstellers (Boehringer, Mannheim) ausgeführt. Die Farbreaktion wurde nach 16 h beendet. Um die Chemilumineszenzreaktion sichtbar zu machen, wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie (Roan-Fol, Merseburg) eingewickelt und an einen Röntgenfilm (Kodak BIOMAX MR1; Sigma, Deisenhofen) gepreßt. Die Lichtentwicklung hält ca. 24 h an. Die optimale Exposition des Röntgenfilms wurde durch Variation der Inkubationsdauer ermittelt.

2.17.5. Entwicklung des Röntgenfilms

Zur Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser nach der Exposition 3-5 min in Entwickler-Lösung (GBX Developer; Sigma, Deisenhofen) gelegt, anschließend kurz in H₂O gewaschen und schließlich 1-3 min in Fixierungslösung (GBX Fixer; Sigma, Deisenhofen) geschwenkt. Danach wurde nochmals kurz mit H₂O gewaschen und der entwickelte Film getrocknet.

2.18. DNA-Sequenzierung

DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger [78] mit Didesoxynukleotiden und ³⁵S-dATP (Amersham Buchler, Braunschweig) sequenziert. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der "Sequense 7-deaza dGTP Sequencing Kit" der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einem Hoefer SQ3 Sequencer (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

2.18.1. Sequenzierungsreaktion

Für eine Sequenzierungsreaktion wurden 5 µg denaturierte DNA eingesetzt. Dazu wurde 5 µg doppelsträngiger DNA in einem Volumen von 30 µl mit 7,5 µl Denaturierungslösung vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 6,6 µl 3 M Natriumacetatlösung, pH 4,6 und 120 µl eiskalter Ethanol zugegeben und 20 min bei -80 °C inkubiert. Die denaturierte DNA wurde durch 15 min Zentrifugation bei 15000 rpm sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Die Sequenzierungsreaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham Buchler, Braunschweig) mit ³⁵S-dATP (Amersham Buchler, Braunschweig) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Pharmacia (Freiburg) bezogen. Die radioaktiv markierte DNA wurde bis zur Elektrophorese bei -20 °C aufbewahrt.

Denaturierungslösung: 2 M NaOH
 2 mM EDTA

2.18.2. Elektrophorese

Der Zusammenbau des Hoefer SQ3 Sequencers erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Damit sich das Gel nach der Elektrophorese leichter von der Glasplatte löst, wurde auf die In-

nenseite einer der Glasplatten Repel-Silane (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die filtrierte Gellösung wurde nach Zugabe von 1 ml 10 % APS und 25 µl TEMED zwischen die Glasplatten gegossen und ÜN bei RT polymerisiert. Nach dem Einsetzen der Glasplatten in die Apparatur wurde in einem Vorlauf das Gel bei 60 W auf 55 °C erwärmt. Vor dem Auftragen wurden die Proben 2 min bei 75 °C inkubiert. Die Elektrophorese lief 1,5-6 h bei 60 W. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier in einem Hoefer SE1160 Geltrockner (Pharmacia, Freiburg) bei 80 °C im Vakuum getrocknet. Um die radioaktiv markierte DNA sichtbar zu machen wurde das getrocknete Gel mindestens 2 Tage an einen Kodak BIOMAX MR1 Röntgenfilm (Sigma, Deisenhofen) gepreßt und wie in 2.17.5. beschrieben entwickelt.

Gellösung: 30 ml Protogel (Biozym, Oldendorf)
7,5 ml 20x TBE-Puffer
63 g Harnstoff (Roth, Karlsruhe)
ad 150 ml H₂O

Tankpuffer: 1x TBE

20xTBE-Puffer 216g Tris
110g H₃BO₃
80 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1 l H₂O

2.19. DNA-Analyse Software und Internetdienste

Die Ergebnisse der Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Programm ESEE [57] bearbeitet. Datenbankvergleiche wurden mit dem Programm BLAST [58], Proteinalignments mit dem Programm Clustal W [59] durchgeführt. Zur Suche nach Sequenzmotiven in Proteinsequenzen wurde die PROSITE Datenbank [60] verwendet. Für allgemeine DNA-Analysen wurde das Programm OMIGA der Firma Oxford Molecular Ltd. eingesetzt.

2.20. Heterologe Expression in *Escherichia coli* JM109

Zur heterologen Expression des Cytochrom *c*₅₅₀ Gens wurde *E. coli* JM109-pTB3071 unter semianaeroben Bedingungen auf LB-Cb mit KNO₃, wie bei Ubbink *et al.* [79] beschrieben, kultiviert. Es wurden 500 ml Photometerkolben zu 85 % befüllt und die Wattestopfen mit zwei Lagen Nescofilm (Roth, Karlsruhe) umwickelt. Nach Züchtung im Wasserbad-Rund-

schüttler bei 37 °C und 100 rpm wurde ein Periplasmaaufschluß nach Ubbink *et al.* [79] durchgeführt.

Zur heterologen Expression des Aldehyddehydrogenase-Gens wurde *E. coli* JM109-pTB3071 aerob auf LB-Cb ÜN kultiviert. Die Zellen wurden 15 min bei 0 °C gekühlt und nach dem Sedimentieren in 1/10 Vol. Aufschlußpuffer [80] resuspendiert. Die Zellen wurden mittels zweimaliger Passage durch eine French-Press bei 20000 psi aufgeschlossen.

2.21. Enzymtests

2.21.1. Nachweis der QEDH-Aktivität in Rohextrakten oder ganzen Zellen

Vom Induktionsansatz (2.3.2.) wurde 1 ml Kultur zweimal mit Puffer 1 gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 9000 g), in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und bis zur Messung bei 0 °C aufbewahrt.

Das Testvolumen in der Küvette betrug 1 ml. Es wurde die Extinktionsabnahme bei 600 nm und 25 °C gemessen. Die Testlösung enthielt: 50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 5 mM Ethylamin, 0,1 mM PMS, 0,05 mM DCPIP, 12,5 mM KCN. Zur Testlösung wurden 10-50 µl Zellsuspension oder Rohextrakt pipettiert. Nach dem Abklingen der endogenen Rate wurde die Reaktion mit 100 µl 10 mM Ethanol gestartet.

Puffer 1: 50 mM Tris/HCl, pH 7,9;
 10 mM CaCl₂

2.21.2. Nachweis der QGDH-Aktivität in ganzen Zellen

Von einer MM-Glukose ÜN Kultur wurde 1 ml entnommen, mit Puffer 1 (2.21.1.) gewaschen (Zentrifugation: 5 min bei 9000 g), in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und bis zur Messung bei 0 °C inkubiert. Die Messung der QGDH erfolgte, wie bei Geiger & Görisch [71] beschrieben, in einer 1 ml Küvette. Statt NaN₃ wurde 2,5 mM KCN verwendet, 10-50 µl Zellsuspension wurden pro Messung eingesetzt.

2.21.3. Rekonstitution der Apo-QEDH oder der Apo-QGDH in ganzen Zellen

Zellsuspensionen, die beim QEDH- oder QGDH-Nachweis (2.21.1.; 2.21.2.) keine Aktivität zeigten, wurden mit 300 ng PQQ (Fluka) 30 min bei 25 °C Inkubiert. Anschließend wurde der

QEDH-, bzw. QGDH-Nachweis wiederholt. Zeigte sich hier keine Aktivität, wurde die Rekonstitution mit 600 ng PQQ wiederholt und die Inkubation auf 1h verlängert.

2.21.4. PQQ-Bestimmung mit der Apo-QGDH aus *Escherichia coli*

Apo-QGDH aus *E. coli* wurde wie bei Geiger & Görisch [71] beschrieben präpariert und bei -20 °C gelagert.

Der PQQ-Nachweis wurde mit Kulturüberständen der Induktionsansätze aus 2.3.2. nach der Vorschrift von Geiger & Görisch [71] durchgeführt. Konnte kein PQQ nach 10 min Inkubation mit der Apo-QGDH nachgewiesen werden, wurde der Test mit einer 4 h Inkubation wiederholt.

2.21.5. Aldehyddehydrogenase-Nachweis

Die NAD⁺-abhängige Aldehyddehydrogenase-Aktivität wurde mit dem Test von v.Tigerstrom & Razzel [80] mit 1 mM Acetaldehyd als Substrat bestimmt.

2.21.6. Ferricyanit-Test

Die Messung einer Cytochrom c₅₅₀ abhängigen Ferricyanit-Reduktase Aktivität der QEDH in Gegenwart von Ethanol wurde nach dem von Reichmann & Görisch [81] beschriebenen Test durchgeführt.

2.21.7. β -Galaktosidase-Nachweis

Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde nach Miller [73] bestimmt, wobei die Vorschrift etwas modifiziert wurde.

Die Zellen wurden nach 2.24. permeabilisiert und in einem Volumen von 500 μ l 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 100 μ l ONPG-Lösung die Enzymreaktion gestartet und nach 5 min Inkubation bei 30 °C durch Zugabe von 250 μ l 1 M Na₂CO₃ beendet. Zur Sedimentation der permeabilisierten Zellen wurde die Suspension 5 min bei 14000 rpm in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Absorption bei

420 nm in einem Unicam 8625 Spectrophotometer gemessen. Lag die Absorption zwischen 0,05 und 0,9 wurde die Aktivität nach Miller [73] mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{1000 * (OD_{420})}{t * v * (OD_{620})} = U$$

OD_{420} ist die gemessene Absorption bei 420 nm, t bezeichnet die Dauer der Enzymreaktion (5 min), v die Verdünnung der Zellsuspension und OD_{620} die gemessene OD bei 620 nm der Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Ernte.

Z-Puffer:

60 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$
40 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 * \text{H}_2\text{O}$
10 mM	KCl
1 mM	$\text{MgSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$
2,7 ml	β -Mercaptoethanol ad 1l H_2O

ONPG-Lösung: 4 mg/ml ONPG in Z-Puffer

2.22. Cytochrom c_{550} Nachweise und Quantifizierung

Cytochrom c_{550} wurde spektrophotometrisch mittels Differenzspektren, wie in [82] beschrieben, quantifiziert und identifiziert. Der Hämperoxidasetest zum Nachweis einer kovalent gebundenen Hämgruppe wurde nach Francis & Becker [83] durchgeführt.

2.23. SDS-PAGE und Gelfärbungen

SDS-PAGE mit 10 bzw. 15 % Acrylamidkonzentration im Trenngel wurden in einer Mini-Protean II Kammer (BioRad, München) nach Laemmli [84] durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie [85] oder mit Silbernitrat [86] gefärbt.

Als Molekulargewichtstandard wurden die Protein-Standards IV und VIII (Merck, Darmstadt) verwendet.

2.24. Quantifizierung von Promotoraktivitäten

Promotoraktivitäten wurden mit dem Vektor pEDY305 durch Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität nach Miller [73] bestimmt.

Ein DNA-Fragment mit dem zu untersuchenden Promotor wurde vor das promotorlose Gen der β -Galaktosidase kloniert. Anschließend wurde der Vektor in *P. aeruginosa* gekreuzt (2.16.2.) und die Zellen ÜN in einer 2 ml Kultur auf MM-Succinat-Tc bei 37 °C gezüchtet. Die Hauptkulturen mit den entsprechenden Kohlenstoffquellen (2.3) wurden jeweils mit 1/100 Vol. der MM-Succinat-Tc Vorkultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer $OD_{620}=0,5$ gezüchtet. Die Zellen wurden 5 min bei 0 °C gekühlt anschließend 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge sedimentiert, im gleichen Volumen Aufschlußpuffer resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Zur Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurden die Zellen nach dem Auftauen 1 min auf dem Vortex resuspendiert und bei 0 °C gekühlt. Zur Permeabilisierung mit Toluol wurden die Zellen entweder unverdünnt oder 1:10 bzw. 1:100 in Z-Puffer (2.21.7.) verdünnt eingesetzt. Nach Zugabe von einem Tropfen Toluol (20-50 μ l) wurde 10 s auf dem Vortex geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend mit Z-Puffer verdünnt und in einem Endvolumen von 500 μ l zum β -Galaktosidase-Test nach 2.21.7. eingesetzt.

Aufschlußpuffer:	20 mM	KPP, pH 7,2
	1 mM	EDTA

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung von *Pseudomonas aeruginosa* Mutanten mit Defekt in der Ethanolverwertung

3.1.1. MNNG-Mutagenese von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933

Das chemische Mutagen MNNG methyliert Basen der DNA. Bei der Methylierung der Base Guanin entsteht u.a. O⁶-Methylguanin, das eine Falschpaarung verursacht, die nach 2 Replikationen zu einem Basenaustausch G:C zu A:T führt.

Um eine hohe Mutantenausbeute zu erhalten, mußte für *P. aeruginosa* die MNNG-Konzentration und Inkubationsdauer bestimmt werden. Aus Erfahrungswerten ist bekannt, daß eine Abtötungsrate zwischen 80-99 % für die Mutantenausbeute optimal ist. Eine erfolgreiche Mutagenese wird zusätzlich durch die Zunahme der Rifampicin-Resistenz bei den mutagenisierten Zellen bestätigt. Die Anzahl resistenter Bakterien sollte nach der Mutagenisierung um den Faktor 1000 steigen [73].

Zunächst wurde die Abtötung bei verschiedenen MNNG-Konzentrationen und Inkubationszeiten bestimmt, Tabelle 2a und 2b.

Tab. 2a: Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* bei verschiedenen MNNG-Konzentrationen und Inkubationszeiten:

MNNG-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Abtötung [%], 30 min	Abtötung [%], 60 min
50	99,9	99,9
25	97,6	99,3
12,5	64,7	95,6
6,25	15,8	68,5

Tab.2b: Abtötung und Zunahme der Rifampicin-Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ MNNG nach 45, 60 und 75 min:

Inkubationsdauer [min]	Abtötung [%]	Rifampicin-resistente Mutanten [pro ml Kultur]
0	0	$4,8 \times 10^{-8}$
45	96,6	$6,3 \times 10^{-5}$
60	98,1	$2,0 \times 10^{-4}$
75	99,0	$8,0 \times 10^{-5}$

Bei einer 60 minütigen Inkubation in Gegenwart von 12 µg/ml MNNG betrug die Abtötungsrate 98%, während die Rifampicin-Resistenz um den Faktor 4000 zunahm. Unter diesen Bedingungen wurden auch die nachfolgenden Mutagenisierungen durchgeführt.

3.1.2. Isolierung der Defektmutanten

Um *P. aeruginosa* Mutanten zu erhalten, die nicht mehr auf Ethanol wachsen konnten, wurden Zellen zweimal nach 2.5. mutagenisiert und Ethanolabbau-defekte *P. aeruginosa* Mutanten nach der Replika-Filtertechnik (2.6.) isoliert. Hierzu wurden mutagenisierte Zellen auf MM-Succinat ausplattiert, um das Wachstum auxotropher Mutanten zu unterbinden.

Im ersten Ansatz betrug die Abtötungsrate 99,9 %. Von insgesamt 2000 Kolonien wurden 9 für die biochemische Charakterisierung ausgewählt. Diese 9 Mutanten zeigten sowohl auf MM-Ethanol-Agarplatten als auch in Flüssigkultur kein oder geringes Wachstum.

Im zweiten Ansatz betrug die Abtötungsrate 90 %. Aus insgesamt 3000 Kolonien wurden 12 Mutanten ausgewählt, die kein oder geringes Wachstum auf MM-Ethanol aufwiesen.

Die isolierten Mutanten wurden MS1 bis MS21 benannt.

3.1.3. Bestimmung der Reversionsraten

Bei keiner der isolierten Mutanten war ein Wachstum in einer MM-Ethanol Flüssigkultur innerhalb von drei Tagen zu beobachten. Hingegen zeigten 8 Mutanten auf MM-Ethanol Agarplatten innerhalb von zwei Tagen Kolonien, die jedoch kleiner als beim Wildtyp waren. Die restlichen Mutanten zeigten kein Restwachstum und hatten Reversionsraten zwischen 10^{-6} und 10^{-9} , Tabelle 3.

Tab.3: Reversionsraten der 21 Ethanolabbau-defekten *Pseudomonas aeruginosa* Mutanten.

Mutante Nr.	Reversionsrate	Mutante Nr.	Reversionsrate	Mutante Nr.	Reversionsrate
1	10^{-6}	8	10^{-6}	15	10^{-9} , Restwachstum
2	10^{-9}	9	10^{-9} , Restwachstum	16	10^{-9}
3	10^{-9} , Restwachstum	10	10^{-9}	17	10^{-9} , Restwachstum
4	10^{-6}	11	10^{-9}	18	10^{-9}
5	10^{-9} , Restwachstum	12	10^{-9} , Restwachstum	19	10^{-9}
6	10^{-9} , Restwachstum	13	10^{-9}	20	10^{-9} , Restwachstum
7	10^{-9}	14	10^{-9}	21	10^{-8}

3.2. Biochemische Charakterisierung der Mutanten

Mit der biochemischen Charakterisierung sollten die Funktionen der defekten Gene in den einzelnen Mutanten weiter eingegrenzt werden. Von Vorteil ist hierbei, daß sich QEDH und QGDH auch in ganzen Zellen nachweisen lassen. Die prosthetische Gruppe der Quinoproteine, das PQQ, wird beim Wachstum auf Ethanol oder Glukose in den Kulturüberstand ausgeschieden und ist dort ebenfalls leicht nachweisbar. Ein Defekt in der PQQ-Biosynthese sollte die Expression der Apo-QEDH oder Apo-QGDH nicht beeinflussen, da van Schie *et al.* [87] zeigen konnten, daß einige Bakterien ohne eigene PQQ-Biosynthese Apo-Quinoproteine exprimieren. Diese können mit externem PQQ rekonstituiert werden. Mutzel & Görisch [88] zeigten, daß auch die Apo-QEDH mit PQQ rekonstituierbar ist.

Da die Mutanten nicht auf Ethanol wachsen und auch nicht bekannt war, ob Komponenten des Ethanol-oxidierenden Systems in Gegenwart anderer Substrate induzierbar sind, wurde die Expression dieser Komponenten durch Inkubation der Zellen auf MM-Ethanol induziert. Ein Defekt im Ethanol-oxidierenden System sollte das Wachstum auf Glukose nicht beeinträchtigen. Selbst wenn ein Defekt in der PQQ-Biosynthese zu einer inaktiven QGDH führt, kann *P. aeruginosa* weiterhin über den Entner-Doudoroff Weg Glukose verwerten und 6-Phosphoglukonat über Phosphorylierung der Glukose mit der Hexokinase erzeugen [89]. Mit dem Nachweis der QGDH auf MM-Glukose soll somit nochmals unabhängig vom Induktionsversuch auf MM-Ethanol eine intakte PQQ-Biosynthese bestätigt werden.

3.2.1. Induktionsversuch auf MM-Ethanol

Alle Mutanten von *P. aeruginosa* ATCC 17933 und der Wildtyp wurden in einem Induktionsversuch (2.3.2.) eingesetzt. Die beschriebene Inkubationsdauer der Zellen im Induktionsansatz von 6 h wurde zuvor ermittelt. Nach dieser Zeit waren beim Wildtyp PQQ- und QEDH-Aktivität deutlich nachweisbar. Mit dem Kulturüberstand der Mutanten wurde eine PQQ-Bestimmung nach 2.21.4. durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden für die Bestimmung der QEDH-Aktivität nach 2.21.1. verwendet. Mutanten, bei denen weder QEDH-Aktivität noch PQQ nachgewiesen werden konnten, wurden dem Rekonstitutionsversuch nach 2.21.3. unterzogen. Lag die QEDH-Aktivität unter 10 % der Wildtyp Aktivität, wurden diese Mutanten als QEDH negativ eingestuft, analog wurde bei der PQQ-Bestimmung vorgegangen. Sowohl vor als auch nach der 6 stündigen Inkubation der Mutanten auf Ethanol wurde ein Aliquot der Kulturen auf MM-Ethanol Agar-Platten ausplattiert, um zu beobachten, ob die Ergebnisse durch eine Zunahme von Revertanten beeinflusst wurden. Bei Mutante MS15 und MS20 war nach der Inkubation in MM-Ethanol das Wachstum auf MM-Ethanol Agar nicht mehr deutlich vom Wildtyp zu unterscheiden. Daher können Revertanten bei beiden Mutanten die Ergebnisse verfälscht haben. Beide Mutanten wurden jedoch nicht verworfen, da sie bei Komplementierungsexperimenten (3.4) eindeutige Ergebnisse zeigten. Bei allen übrigen Mutanten trat während der Inkubation keine deutlich erkennbare Zunahme der Reversionsrate oder des Restwachstums auf. Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung für die einzelnen Mutanten sind in Tabelle 4 dargestellt.

3.2.2. Nachweis der QGDH-Aktivität auf MM-Glukose

Zum Nachweis der QGDH-Aktivität nach 2.21.2. wurden alle Mutanten auf MM-Glukose gezüchtet und nach 16 h in der stationären Phase geerntet. Konnte keine QGDH-Aktivität nachgewiesen werden, wurden die Mutanten zum Rekonstitutionsversuch nach 2.21.3. eingesetzt und die QGDH-Aktivität anschließend nochmals bestimmt. Die Mutanten MS9 und MS11 wuchsen nicht auf Glukose. Die Ergebnisse der übrigen Mutanten sind in Tabelle 4 dargestellt. Auch hier wurde die Zunahme der Revertanten oder des Restwachstums vor der Sedimentation der Zellen überprüft. Wie bei der Inkubation auf MM-Ethanol (3.2.1) war auch hier bei den Mutanten MS15 und MS20 das Restwachstum nicht mehr deutlich vom Wildtyp zu unterscheiden.

Tab. 4: Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* mit Defekt im Ethanolabbau.

PQQ-Gehalt und QEDH-Aktivität wurde nach der Induktion auf Ethanol bestimmt. QGDH-Aktivität der Mutanten wurde nach Wachstum auf Glukose gemessen. Nach Rekonstitution mit PQQ wurden QEDH, bzw. QGDH-Aktivität erneut bestimmt.

"+", dunkelgrau schattiert : PQQ Menge, bzw. QEDH- oder QGDH-Aktivität größer 10 % der Wildtyp-Aktivität; "-" : PQQ Menge, bzw. QEDH- oder QGDH-Aktivität geringer als 10 % der Wildtyp-Aktivität; "+/-", hellgrau schattiert: PQQ Menge, bzw. QEDH- oder QGDH-Aktivität lagen nahe 10 % der Wildtyp-Aktivität

Mutante Nr.:	Induktionsversuch auf Ethanol			Wachstum auf Glukose	
	PQQ- Bestimmung	QEDH- Aktivität	QEDH-Aktivität nach Rekonstitution	QGDH Aktivität	QGDH-Aktivität nach Rekonstitution
1	+	+	n.b.	+	n.b.
2	-	-	+	-	+
3	+/-	-	+/-	-	+
4	+	+	n.b.	+	n.b.
5	+	+	n.b.	+	n.b.
6	+	+	n.b.	+	n.b.
7	+	+	n.b.	+	n.b.
8	+	+	n.b.	+	n.b.
9	+	-	-	k.W.	k.W.
10	-	-	+	-	+
11	+	-	-	k.W.	k.W.
12	+	-	-	+	n.b.
13	+	-	-	+	n.b.
14	-	-	+	-	+
15	+/-	-	-	-	+
16	+	-	-	+	n.b.
17	+	+	n.b.	+	n.b.
18	+	-	-	+	n.b.
19	-	-	+	-	+
20	+	+	n.b.	+	n.b.
21	-	-	-	-	+

3.2.3. Einteilung der Mutanten in vier Gruppen

Die Ergebnissen des Induktionstests auf MM-Ethanol und des QGDH-Nachweises ermöglichen die Einteilung der Mutanten in vier Gruppen.

Zur Gruppe I wurden Mutanten zugeordnet, bei denen eine aktive QEDH, eine aktive QGDH und PQQ gefunden wurde. Bei Mutanten dieser Gruppe könnte ein Gen defekt sein, welches für ein Protein der Elektronentransportkette oder des Metabolismus von Acetaldehyd kodiert oder die Expression eines solchen Gens reguliert.

Die Mutante MS20 wurde in diese Gruppe eingeordnet, obwohl u.U. Revertanten oder starkes Restwachstum zu dem beobachteten Phänotyp geführt haben könnten.

Zur Gruppe II gehören Mutanten, die keine aktive QEDH besitzen. Dennoch wurde in Kulturüberständen PQQ nachgewiesen und beim Wachstum auf Glukose eine aktive QGDH gebildet. Offensichtlich muß hier das Strukturgen der QEDH, ein Regulationsgen für die Expression der QEDH oder ein Protein zu ihrer Reifung defekt sein. Die Mutanten MS9 und MS11 wurden in diese Gruppe eingeordnet, obwohl sie nicht auf MM-Glukose wachsen.

Zur Gruppe III zählen Mutanten, die kein PQQ produzieren und bei denen folglich auch keine aktive QEDH oder QGDH gefunden wurde. Nach dem Rekonstitutionsversuch war aber die Aktivität beider Quinoproteine nachweisbar. Dies spricht für einen Defekt in einem Regulations- oder Strukturgen für die PQQ-Biosynthese. Diese Mutation würde die Expression einer rekonstituierbaren Apo-QEDH bzw. Apo-QGDH nicht beeinflussen.

Zur Gruppe IV zählende Mutanten produzieren wie Mutanten der Gruppe III kein PQQ und besitzen eine rekonstituierbare QGDH. Die QEDH Aktivität ist jedoch auch nach dem Rekonstitutionstest nicht nachweisbar. Hier könnte ein Regulationsgen defekt sein, daß sowohl die Expression der QEDH als auch der PQQ-Biosynthesegene reguliert. Die Mutante MS15 wurde in diese Gruppe eingeordnet, da beim Wachstum auf Glukose kein PQQ nachweisbar war.

Tab.5: Einteilung der charakterisierten Mutanten in vier Gruppen.

Gruppe	Mutanten	Anzahl der Mutanten	Phänotyp	Vermutete Funktion des mutierten Gens
I	1,4,5,6,7,8,17,20	8	aktive QEDH, aktive QGDH, PQQ im Kulturüberstand.	Regulationsgen oder Komponente der Elektronen-transportkette oder des Metabolismus von Acetaldehyd?
II	9,11,12,13,16,18	6	keine aktive QEDH, keine Apo-QEDH, aktive QGDH, PQQ im Kulturüberstand.	Regulations- oder Strukturgen der QEDH, weitere Proteine, die für die Reifung der QEDH notwendig sind
III	2,10,14,19	4	kein PQQ im Kulturüberstand, Apo-QEDH vorhanden, Apo-QGDH vorhanden.	Gene für Proteine und Regulation der PQQ-Biosynthese
IV	3 ^{a)} ,15,21	3	kein PQQ im Kulturüberstand, keine Apo-QEDH vorhanden, Apo-QGDH vorhanden.	Regulationsgen für PQQ-Biosynthese und QEDH ?

a) Aufgrund der Ergebnisse aus den Komplementierungsexperimenten (3.10.2.) und der Promotoraktivitäten (3.9.3.) wird MS3 in der Diskussion in Gruppe III eingeordnet.

3.3. Herstellung einer Genbank aus *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933

Durch Komplementierung der Mutanten mit einer Cosmid-Genbank aus *P. aeruginosa* ATCC 17933 sollten Cosmide isoliert werden, die es den Mutanten ermöglichen, wieder auf MM-Ethanol zu wachsen. Zusammen mit der biochemischen Charakterisierung und den Wachstumsversuchen ist es damit möglich, die Anzahl defekter Gene abzuschätzen. Durch Subklonierung und Sequenzierung kleinerer komplementierender DNA-Fragmente aus den Cosmiden können die defekten Gene der jeweiligen Mutanten identifiziert werden.

Für die Herstellung der Genbank wurde der Cosmidvektor pLAFR3 verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die Verpackung von DNA in Lambda-Phagen. Hierfür muß allerdings die Insert-DNA nach der Ligation mit zwei pLAFR3 Vektoren verbunden sein und der Abstand zwi-

schen den *cos*-Stellen der Vektoren 38-52 kb betragen [61]. Da die Größe des pLAFR3 22 kb beträgt, sollte die Insert-DNA 16-30 kb lang sein.

3.3.1. Präparation der genomischen DNA aus *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa wurde auf 100 ml MM-Ethanol bis zu einer $OD_{620}=0,5$ gezüchtet (2.3.). Vor der Zellernte wurde die QEDH-Aktivität (2.21.1.) bestimmt. Genomische DNA wurde wie unter 2.8.1. beschrieben isoliert und in 1,5 ml TE-Puffer ÜN bei 4 °C gelöst. Nach der spektrophotometrischen Untersuchung der DNA (2.10.) betrug der Quotient $OD_{260}/OD_{280} = 1,9$. Damit lagen keine Verunreinigungen in Form von Phenol oder Proteinen vor [74]. Die Konzentration wurde zu 360 ng/ μ l bestimmt, insgesamt wurden 540 μ g DNA isoliert. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der DNA auf einem Agarosegel (2.12.) war neben der genomischen DNA noch schwach die Bande eines großen Plasmids zu erkennen.

3.3.2. Partieller Verdau der genomischen DNA mit *Sau3AI*

Für die Ligation mit dem Cosmid wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* geschnitten, welches die DNA sehr häufig (statistisch alle 256 bp) schneidet. Die entstehenden DNA Fragmente können mit dem *Bam*HI geschnittenen pLAFR3 Vektor ligiert werden, da *Sau3AI* und *Bam*HI zueinander kompatible Enden erzeugen.

Zuerst wurde die Konzentration an *Sau3AI* und die Inkubationsdauer bestimmt, mit der beim partiellen Verdau die maximale Ausbeute an DNA-Fragmenten mit einer Größe von ca. 20-30 kb erzeugt werden.

Es wurden 3 Versuchsreihen mit 0,1; 0,01 und 0,001 U *Sau3AI* pro μ g DNA durchgeführt. Je 10 μ g genomische DNA wurden in einer Konzentration von 125 ng/ μ l pro Ansatz eingesetzt. Die einzelnen Ansätze wurden 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min bei 37 °C inkubiert. Um den Größenbereich zwischen 20 und 30 kb aufzutrennen, wurde ein 0,35 % iges Agarosegel verwendet. Nur bei 0,001 U Restriktionsenzym pro μ g DNA verlief der partielle Verdau so langsam, daß die Größenverteilung der Fragmente ein Maximum zwischen 20 und 30 kb zeigte. Die Inkubationszeit lag zwischen 15 und 20 min. Für den präparativen Verdau wurden in 15 parallelen Ansätzen je 10 μ g DNA 17 min mit 0,001 U *Sau3AI* pro μ g DNA eingesetzt. Nach dem Verdau wurde die DNA sofort mit Phenol/Chloroform (2.9.) extrahiert, mit Ethanol gefällt (2.9.) und in 100 μ l TE-Puffer aufgenommen.

3.3.3. Größenfraktionierung der partiell verdauten DNA

Da die partiell verdaute DNA noch einen erheblichen Anteil sowohl an unverdauter als auch an zu kleiner DNA enthielt, wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zur Größenfraktionierung durchgeführt. DNA größer als 30 kb und kleiner als 20 kb sollte abgetrennt werden, um so die Ausbeute bei der Verpackungsreaktion zu erhöhen. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.13. beschrieben mit 130 µg DNA. Nach der Fraktionierung des Gradienten wurden 40 µl jeder 3. Fraktion mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Fraktionen 6-15 wurden gepoolt und mit Isopropanol (2.9.) gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl 10 % TE-Puffer (TE-Puffer 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde nach 2.10. bestimmt, die Gesamtmenge betrug 20 µg. Bis zur Ligation wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.4. Präparation der Vektor-DNA

Der Stamm *E. coli* S17 λ-pir mit dem Vektor pLAFR3 wurde nach 2.3. in 100 ml LB-Tc Medium vermehrt. Der Vektor wurde wie unter 2.8.2. beschrieben präpariert. 20 µg der Vektor-DNA wurden mit *Bam*HI geschnitten, anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 50 µl 10% TE-Puffer aufgenommen. Die Restriktionshydrolyse wurde mit 1 µg der geschnittenen DNA durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Weitere 1 µg DNA wurden für die Kontrollligation bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die geschnittene Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase (2.11.2.) dephosphoryliert, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt (2.9.). Schließlich wurden 14 µg DNA in 20 µl 10 % TE-Puffer aufgenommen.

Die erfolgreiche Dephosphorylierung des Vektors wurde mit Kontrollligationen überprüft. Je 1 µg der *Bam*HI geschnittenen Vektor DNA mit und ohne Phosphatasebehandlung wurden mit sich selbst ligiert (2.11.3.). Die DNA wurden nach der Inkubation auf einem 0,35 % igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (15 V, 16 h, 4 °C). Während die mit Phosphatase behandelte Vektor-DNA nicht ligiert wurde und als eine Bande bei 22 kb erkennbar war, wurde die unbehandelte Vektor-DNA ligiert und hatte zirkuläre DNA und Multimere gebildet, die deutlich größer als 22 kb waren. Nicht ligierte DNA war hier nur sehr schwach zu erkennen.

3.3.5. Ligations- und Verpackungsreaktionen

Für die Ligation von pLAFR3-*Bam*HI mit der partiell verdauten Gesamt-DNA aus *P. aeruginosa* wurde ein molares Verhältnis von ca. 1:1 gewählt. 6 µl (2,4 µg) der partiell verdauten genomischen DNA und 3 µl (2,1 µg) der Vektor-DNA wurden mit 1 µl Ligati-

onspuffer und 1 µl Ligase nach 2.11.3. ligiert. Der Ligationsansatz wurde bis zur Verpackungsreaktion bei -20 °C gelagert.

Für die Verpackungsreaktion wurde der "DNA Packaging Kit" der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet. Für eine Reaktion wurden 4 µl des Ligationsansatzes eingesetzt. Die Verpackungsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (2.15.1.), die Transfektion von *E. coli* S17 λ-pir wie unter 2.15.2. beschrieben. Insgesamt wurden ca. 1900 Kolonien auf 25 LB-Tc Platten erhalten, von denen 20 Kolonien zur Kontrolle der Genbank überimpft wurden. Um zu überprüfen, ob die *E. coli* Zellen Cosmide mit unterschiedlichen Inserts enthielten, wurden die Cosmide der 20 Kolonien mit einer Minipräparation nach 2.8.2. isoliert und mit *HinDIII* geschnitten. Anschließend wurden die Fragmente auf einem 0,35 % igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Bei 4 Cosmiden war entweder zuwenig DNA präpariert worden oder der Restriktionsverdau unvollständig. Die übrigen 16 Cosmide zeigten ein unterschiedliches Fragmentmuster. Damit enthielten ungefähr 80 % der Kolonien Cosmide mit verschiedenen Inserts. Die Anzahl von Klonen, die mit 99% iger Wahrscheinlichkeit eine gesuchte Sequenz enthalten, läßt sich mit folgender Formel [74] abschätzen, wobei f der Quotient der Insertgröße der Genbank (hier 20 kb) über der Gesamtgröße der *P. aeruginosa* Genoms (5000 kb) ist.

$$N = \frac{\ln (1 - 0.99)}{\ln (1 - f)}$$

Die benötigte Zahl von Klonen N beträgt somit 1150. Die in der Genbank enthaltene Anzahl von 1500 unterschiedlicher Klone ist somit ausreichend.

3.4. Komplementierung der Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa*

In Vorversuchen zur Konjugation zeigte sich, daß die in der Literatur beschriebenen Vorschriften für die Kreuzung von *P. aeruginosa* und *E. coli* S17 λ-pir nur geringe Ausbeuten lieferten. Durch Variation der Wachstumsphase, aus der heraus *E. coli* und *P. aeruginosa* zur Zweipunktkreuzung eingesetzt wurden, konnte Methode 2.16.1. etabliert werden, die zu erheblich besseren Ausbeuten führte.

Die Mutante MS13 wies eine geringe Reversionsrate und auch kein Restwachstum auf und wurde zuerst für die Komplementierung mit der Genbank aus 3.3.5. ausgewählt. Nach dem Transfer der Genbank in MS13 wurden die Konjuganten, wie unter 2.16.1. beschrieben, auf Selektivmedium ausplattiert. Obwohl 80000 Konjuganten auf den Selektivplatten ausplattiert wurden, konnten nur 9 Kolonien auf Selektivmedium wachsen und vereinzelt werden. Aus allen 9 Konjuganten wurden die Cosmide nach 2.8.2. isoliert und mit ihnen *E. coli* JM109 nach 2.15.2. transformiert. Mit 6 Cosmiden wurden Transformanten erhalten, die in einer

Dreipunkt Kreuzung nach 2.16.2. mit der Mutante MS13 eingesetzt wurden. Nur mit einem Cosmid, im Folgenden pTB3001 benannt, konnte die Mutante MS13 komplementiert werden. In weiteren Dreipunkt Kreuzungen (2.16.2.) wurde pTB3001 mit den restlichen Mutanten gekreuzt. Plasmid pTB3001 konnte noch weitere 9 Mutanten aus allen vier Gruppen komplementieren (Tabelle 6).

Analog zu MS13 wurden die Mutanten MS1, MS7, MS9 und MS11 mit der Genbank gekreuzt und komplementierende Cosmide isoliert. Cosmid pTB3018 komplementiert MS1, pTB3021 MS7, pTB3035 MS9 und pTB3040 MS11. Auch mit diesen vier Cosmiden wurden alle Mutanten gekreuzt, Tabelle 6.

Schließlich wurden die letzten fünf noch nicht komplementierten Mutanten, MS6, MS14, MS16, MS20 und MS21 mit der Genbank gekreuzt. MS6 wurde von pTB3064 komplementiert, MS14 von pTB3050, MS16 von pTB3052, MS21 von pTB3057 und MS20 von pTB3055. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse aller Komplementierungsexperimente.

Die Cosmide pTB3052 und pTB3057 komplementieren beide die Mutanten MS6, MS16 und MS21. Beide Cosmide weisen auch ein fast identisches Restriktionsmuster auf (ohne Abbildung), wurden jedoch aus zwei unterschiedlichen Mutanten isoliert.

Tab.6: Komplementierung der 21 Mutanten mit 10 Cosmiden.

("+", grau schattiert: Komplementierung; - keine Komplementierung)

Gruppe Nr.	Mutante Nr.	Cosmide									
		pTB 3001	pTB 3018	pTB 3021	pTB 3035	pTB 3040	pTB 3050	pTB 3052	pTB 3055	pTB 3057	pTB 3064
I	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
	7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
II	9	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

3.4.1 Identifizierung überlappender Bereiche zu Cosmid pTB3001

Keine der zehn Mutanten, die von Cosmid pTB3001 komplementiert werden, können von anderen isolierten Cosmiden komplementiert werden. Durch Southern-Blot und anschließende Hybridisierung sollte überprüft werden, ob andere Cosmide mit pTB3001 überlappende Bereiche teilen.

Das gesamte Cosmid pTB3001 wurde mit dem "DIG DNA Labeling and Detektion Kit" (Boehringer, Mannheim) markiert (2.17.1.) und als Sonde eingesetzt. Da somit auch der Vektor pLAFR3 markiert wurde, der in allen anderen Cosmiden ebenfalls enthalten ist, muß-

ten alle Cosmide mit *Pst*I und *Eco*RI verdaut werden, um die Insert-DNA vollständig vom Vektor trennen zu können. Die geschnittenen Cosmide wurden auf einem 0,5 % igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt mittels Southern-Blot auf eine Nylonmembran transferiert (2.17.2.) und mit der pTB3001 Sonde hybridisiert (2.17.3.). Beim Nachweis der hybridisierenden DNA-Fragmente mittels Chemilumineszenz (2.17.4.;2.17.5.) gab ein 2 kb großes Fragment aus Cosmid pTB3050 ein Signal.

Zur Kontrolle wurde pTB3052 als Sonde zur Hybridisierung eingesetzt, da aus den Komplementierungsexperimenten 3 weitere Cosmide mit überlappenden Bereichen vorhanden sein sollten. Allerdings gab hier nur pTB3057 ein Signal in allen Fragmenten, die auch in pTB3052 vorhanden sind.

3.5 Wachstumsversuche der Mutanten

3.5.1. Wachstum auf Acetat, Succinat oder Glukose

In Wachstumsversuchen zur Ermittlung der Generationszeiten (2.3.1.) wurden alle Mutanten auf MM-Acetat, MM-Succinat und MM-Glukose gezüchtet. Mutanten, die in wiederholten Experimenten eine um 40% längere Generationszeit als der Wildtyp aufwiesen, wurden insgesamt dreimal angezüchtet und die Standardabweichung errechnet.

Mutanten, die auf einer der Kohlenstoffquellen gar nicht oder langsamer als der Wildtyp wuchsen, wurden nach Komplementierung mit den entsprechenden Cosmiden nochmals zu den Wachstumsversuchen eingesetzt, Tabelle 7.

3.5.2. Wachstum der Mutanten anaerob auf LB/KNO₃

P. aeruginosa induziert beim Wachstum anaerob mit Nitrat als Elektronenakzeptor ein lösliches Cytochrom *c*₅₅₁. Eine Mutation im Gen des Cytochrom *c*₅₅₁ führt zu einem Phänotyp, der im Gegensatz zum Wildtyp mit längeren Generationszeiten und zu einer niedrigeren End-OD₆₂₀ wächst [90]. Cytochrom *c*₅₅₁ wird aerob auf MM-Ethanol nicht induziert. Sollten die Mutanten ein langsames Wachstum auf LB/KNO₃ aufweisen, ist dies ein Hinweis auf einen Defekt in der Cytochrom *c* Biogenese.

Alle Mutanten der Gruppe I wurden anaerob auf LB/KNO₃ gezüchtet. Nur die Mutante MS6 wuchs mit einer verlängerten Generationszeit von 4,75 h im Gegensatz zum Wildtyp und den übrigen Mutanten dieser Gruppe, deren Generationszeit bei 2,6 h lag.

3.5.3. Wachstum der komplementierten Mutanten auf MM-Ethanol-Tc

Alle komplementierten Mutanten wurden in einem Wachstumstest auf MM-Ethanol-Tc nach (2.3.1.) eingesetzt, Tabelle 7. Während bei allen komplementierten Mutanten auf Agar-Platten mit MM-Ethanol-Tc innerhalb von 2 Tagen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Mutante mit leeren pLAFR3) Kolonien sichtbar waren, fielen die Wachstumstest in Flüssigkulturen nicht so eindeutig aus. Fünf Stämme (MS11-pTB3040; MS18-pTB3001; MS6-pTB3050; MS6-pTB3052; MS6-pTB3057) zeigten innerhalb von drei Tagen kein Wachstum in Flüssigkulturen. Bei der Mehrzahl der übrigen Mutanten mußten mehr als drei Wachstumsversuche angesetzt werden, da auch hier hin und wieder Kulturen nicht auf MM-Ethanol-Tc anwuchsen.

Tab. 7: Generationszeiten mit Standardabweichung der Mutanten auf MM-Acetat (MM-A), MM-Succinat (MM-S) und MM-Glukose (MM-G) und der komplementierten Mutanten auf den gleichen Medien zusätzlich mit Tetracyclin (Tc). Kein Eintrag, Generationszeit liegt innerhalb +/- 40 % der Wildtyp-Generationszeit; "-", kein Wachstum. Die Generationszeiten stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die mit "*" markierten Generationszeiten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Gruppe Nr.	Generationszeit [h], Mutanten				Generationszeit [h], komplementierte Mutanten			
	Nr.	MM-S	MM-A	MM-G	MM-S-Tc	MM-A-Tc	MM-G-Tc	MM-E-Tc
I	1		-		n.b.	1,03 +/- 0,08	n.b.	1,8*
	4		-		n.b.	1,37 +/- 0,04	n.b.	1,95 +/- 0,15
	5				n.b.	n.b.	n.b.	5,15 +/- 0,35
	6				n.b.	n.b.	n.b.	3,95 +/- 0,05*
	7		-		n.b.	1,17 +/- 0,04	n.b.	1,6*
	8		-		n.b.	2,45 +/- 0,55*	n.b.	2,63 +/- 1,34
	17				n.b.	n.b.	n.b.	1,7 +/- 0,22
	20		1,68 +/- 0,33	1,66 +/- 0,31	n.b.	2,3 b)*	2,5 a)* 2,12 +/- 0,42b)*	2,7 +/- 0,54 a) 3,2 +/- 0,94 b)
II	9	2,21 +/- 0,51	-	-	1,24 +/- 0,11	1,04 +/- 0,11	1,24 +/- 0,09	2,0 +/- 0,1
	11	1,52 +/- 0,19	-	-	-	-	-	-
	12				n.b.	n.b.	n.b.	1,93 +/- 0,34
	13				n.b.	n.b.	n.b.	2,1 +/- 0,85
	16		-		n.b.	1,22 +/- 0,1 1,48 +/- 0,16	n.b.	2,0 c)* 1,55 +/- 0,05 d)
	18				n.b.	n.b.	n.b.	-
III	2			1,86 +/- 0,16	n.b.	n.b.	1,93 +/- 0,25	3,9 +/- 0,7*
	10			1,42 +/- 0,33	n.b.	n.b.	1,39 +/- 0,11*	2,0*
	14			1,59 +/- 0,18	n.b.	n.b.	1,85 +/- 0,05*	1,6 +/- 0,16
	19			1,54 +/- 0,18	n.b.	n.b.	1,8 +/- 0,1*	2,43 +/- 0,7
IV	3				n.b.	n.b.	n.b.	1,7*
	15				n.b.	n.b.	n.b.	2,67 +/- 0,61
	21		-		n.b.	1,45 +/- 0,15 e)* 1,32 +/- 0,09 f)*	n.b.	2,07 +/- 0,39 e) 1,83 +/- 0,4 f)
WT	22	0,98 +/- 0,07	1,0 +/- 0,1	1,07 +/- 0,07	0,99 +/- 0,01	1,1 +/- 0,13	1,2 +/- 0,07	1,9 +/- 0,1*

a)MS20-pTB3040

b)MS20-pTB3055

c)MS16-pTB3052

d)MS16-pTB3057

e)MS21-pTB3052

f)MS21-pTB3057

3.6. Klonierung und Sequenzierung des Cytochrom c_{550} Gens

3.6.1. Konstruktion einer Gensonde

Die N-terminale Sequenz des Cytochrom c_{550} wurde von Donner & Görisch (unveröffentlicht) bestimmt und lautete: HGDVT PQAVD TKGLE PLGKE WRDTN PYRKP YAK. Sie stimmt bis auf die erste Aminosäure mit der von Schrover *et al.* [91] publizierten Sequenz überein: AGDVT PQAVD TKGLE PLGK. Eine Sequenz von 6 Aminosäuren KEWRDT schien zur Konstruktion degenerierter Oligonukleotide geeignet, Tabelle 8. Basierend auf der von West & Iglewski [92] veröffentlichten Codonwahrscheinlichkeiten in *P. aeruginosa* wurde ein degeneriertes 17 nt langes Oligonukleotid abgeleitet: : 5'-AAG GAR TGG CGS GAY AC-3' (R=A oder G; S=C oder G; Y=C oder T). Um das Oligonukleotid zur Hybridisierung nach 2.17.3. einsetzen zu können, enthielt es am 5'-Ende eine Digoxigenin-Markierung (2.17.1.).

Tab. 8: N-terminale Proteinsequenz des Cytochrom c_{550} und ausgewählte Codons

Position	Proteinsequenz	Anzahl möglicher Codons	ausgewählte Codons, bzw. Nukleotide
1	H	2	
	G	4	
	D	2	
	V	4	
5	T	4	
	P	4	
	Q	2	
	A	4	
10	V	4	
	D	2	
	T	4	
	K	2	
15	G	4	
	L	4	
	E	2	
	P	4	
20	L	4	
	G	4	
	K	2	AAG
	E	2	GAA; GAG
25	W	1	TGG
	R	6	CGC; CGG
	D	2	GAC; GAT
	T	4	AC
30	N	2	
	P	4	
	Y	2	
	R	6	
33	K	2	
	P	4	
	Y	2	
	A	4	
	K	2	

3.6.2. Hybridisierung aller Cosmide mit der Cytochrom c_{550} Sonde

Southern-Blotting (2.17.2.) und Hybridisierung (2.17.3.) aller 10 *PstI* verdauten Cosmide mit dem Digoxigenin markierten Oligonukleotid zeigte nur bei pTB3001 ein Signal in einem 4,9 kb großen *PstI*-Fragment. In der zur Kontrolle mit *PstI* verdauten genomischen DNA von *P. aeruginosa* wurde ebenfalls nur bei 4,9 kb eine schwache hybridisierende Bande beobachtet. Um ein zur Sequenzierung geeignetes kleineres Fragment zu identifizieren, wurde pTB3001 mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und nach einem Southern-Blot erneut mit dem Oligonukleotid hybridisiert. Dies führte zur Identifizierung eines 3,2 kb *PstI*-*BamHI* Fragments, welches zur Sequenzierung geeignet erschien.

3.6.3. Subklonierung und Exonuklease III-Verdau des 3,2 kb *PstI*-*BamHI* Fragments

Das 3,2 kb *PstI*-*BamHI* Fragment wurde in einen *PstI*-*BamHI* verdauten pUC18 kloniert. Das entstehende Plasmid, pTB3070 wurde zur Kontrolle nochmals mit der Cytochrom c_{550} Sonde hybridisiert. Zur Sequenzierung wurde das Insert aus pTB3070 mit Exonuklease III nach (2.11.5.) verkürzt. Neun Plasmide mit abnehmender Insertgröße wurden auf diese Weise erhalten: pTB3074, pTB3075, pTB3076, pTB3077, pTB3078, pTB3079, pTB3081, pTB3083, pTB3084.

3.6.4. Sequenzierung des 3,2 kb *PstI*-*BamHI* Fragments

Alle neun durch Exonuklease III Behandlung erzeugten Plasmide wurden mit dem "Reverse Sequencing"-Primer ansequenziert (2.18.1.), pTB3070 zusätzlich noch mit dem "Universellen"-Primer. Von den erhaltenen DNA-Sequenzen wurden Oligonukleotide abgeleitet, um den Gegenstrang zu sequenzieren, schwer sequenzierbare Bereiche zu überprüfen oder um Lücken zwischen den neun verkürzten Plasmiden zu schließen. Die DNA-Sequenzen wurde mit dem Programm " ESEE " zusammengesetzt und mit Einträgen in den Datenbanken verglichen (2.19.).

3.6.5. DNA-Sequenz des 3,2 kb *Pst*I-*Bam*HI Fragments

Das Insert aus pTB3070 (Abbildung 4) umfaßt 3152 bp und weist einen für *P. aeruginosa* typischen GC Gehalt von 67.4 % auf [93]. Es enthält drei vollständige und zwei partielle offene Leserahmen (Abbildung 3).

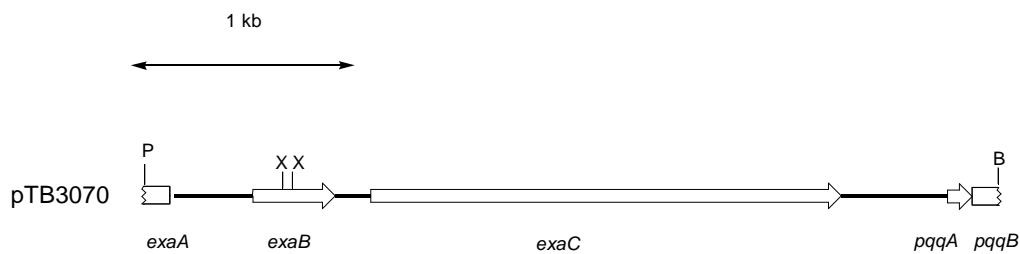


Abb. 3: Das sequenzierte Insert aus pTB3070.

exaA, 3'-Ende des QEDH Gens; *exaB*, Gen des Cytochrom c_{550} ; *exaC*, Gen einer NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenase; *pqqA*, Gen des PQQ-Precursors; *pqqB*, 3'-Ende eines weiteren PQQ-Biosynthesegens. B, *Bam*HI; P, *Pst*I; X, *Xho*I.

```

G CAC GTC GCC GGT GGT CTT GTC GTC GAT GGC GAT GTC CTC CCA GGT CAC ATC CTT GGC CAG 61
C GTG CAG CGG CCA CCA GAA CAG CAG CAA CCG CTA CAG GAG GGT CCA GTG TAG GAA CCG GTC
18 Val Asp Gly Thr Thr Lys Asp Asp Asn Ala Ile Asp Glu Trp Thr Val Asp Lys Ala Leu -2

CGC GGC GCC AGC AGC GCT GCC CAG GGC GAC GGC GAA GGC GAG GCA GTG CAG GCT CGG GCG CAG 121
GCG CCG CGG TCG CGA CGG GTC CCG CTG CCG CTT CCG CTC CAG GTC CGA GCC CGC GTC
Ala Ala Gly Ala Ser Gly Leu Ala Val Ala Phe Ala Leu Cys His Leu Ser Pro Arg Leu -22

GAG GCC GGC AGG GGC GGG TGA GGT ICT TGT IGT CAl GATCGGGTTC CCGTTGGAG TGAGGGTCTGA 187
CTC CGG CCG TCC CCG CCC ACT CCA AGA ACA ACA GTA
Leu Gly Ala Pro Ala Pro Ser Thr Arg Thr Thr Met
← exaA

GAAACGGCAG GCCGCTGCTC GGGCCCGCGC GGCCTTCATGG TGGAAAGTGG GCGCGCCGAC GGGAAACGGAA 257

GATCGCCCCGA TTCGTCCGGG AAGTCTTCCC GGACGGGGCA TGACTTGGAC TTGCTGCCAA ACCCCCCGT 327
----- -> <-----
.....
AAGGCCCTTCC GAGGCTCTAC TCCGAAAGGA GTAGGCGAGG ACGCCCAAAG CAGGATTCCG GCGCGCGCGCG 397

GAGCTTCCTA GGATGGCGAT GAGCGCCGTT TGGCGCCCGT GCCTTGTCTT GTCTCCCGCG AGGAATGAAG TG ATG
exaB → RBS Met
-24 472

Asn Lys Asn Asn Ala Leu Arg Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser Leu Ser Leu -4
AAC AAG AAC AAC GCC TTG CGC GGC GTC CTG GTG CTG GGC GGT CTC AGC CTC TCG AGC CTG 532
XhoI

```

Abbildung 4 wird fortgesetzt.

```

Ala Leu Ala Ala His Gly Asp Val Thr Pro Gln Ala Val Asp Thr Lys Gly Leu Glu Pro Leu 17
GCG CTG GCC CAC GGC GAT GTG ACC CCC CAG GCA GTG GAC ACC AAG GGA CTC GAG CCG CTG 592
                                     XhoI

Gly Lys Glu Trp Arg Asp Thr Asn Pro Tyr Arg Lys Pro Tyr Ala Lys His Asp Leu Ala 37
GGC AAG GAA TGG CGC GAC ACC AAC CCC TAC CGC AAG CCC TAC GCC AAG CAC GAC CTC GCC 652

*****

Val Glu Ile Gly Ala Ser Ala Tyr Asn Gln Asn Cys Ala Arg Cys His Gly Leu Glu Ala 57
GTC GAG ATC GGC GGC TCC GCC TAC AAC CAG AAC TGC GCG CGC TGC CAC GGC CTG GAA GCC 712

Lys Ser Gly Gly Ile Ala Pro Asp Leu Arg Leu Glu Thr Gly Ala Glu Gly Asp Glu 77
AAG TCC GGC GGC ATC GCC CCG GAC CTG CGC CTG GAG ACC GGC GCC GAG GGC GAC GAA 772

Trp Phe Lys Glu Arg Val Ile Asn Gly Ala Val Arg Asp Gly Ala Val Tyr Met Pro Lys 97
TGG TTC AAG GAG GAG CGG GTC ATC AAC GGC GCG GTG CGC GAT GGC GCG GTG TAC ATG CCG AAG 832

Met Ala Asp Phe Ile Ser Gln Glu Gly Leu Trp Ala Ile Arg Ser Tyr Leu Glu Ser Val 117
ATG GCC GAC TTC ATC AGC CAG GAA GGC CTC TGG GCG ATC CGC AGC TAT CTG GAA AGC GTG 892

His Val Asp Glu ***          ----->          <----- -          121
CAC GTC GAC GAG TGA CGGCCCCGAC CCTTCGCGC CGACCGCGC GCCCTTGCAC GAGTCCGCGC CGCCACGGCG 967

                                     RBS
                                     exaC->
GAACCGACCAC ACAGGAGACC TTCCGC ATG ATC TAC GCA GCG CCC GGA ACC CCC GGT GCC GTC 1029

```

Abbildung 4 wird fortgesetzt.

Val Thr Phe Lys Pro Arg Tyr Gly Asn Tyr Ile Gly Gly Glu Phe Val Pro Pro Val Lys 32
 GTC ACC TTC AAG CCT CGC TAC GGC AAC TAC ATC GGC GGC GGC GAG TTC GTG CCT CCG GTC AAG 1089

Gly Gln Tyr Phe Thr Asn Thr Ser Pro Val Asn Gly Gln Pro Ile Ala Glu Phe Pro Arg 52
 GGC CAG TAC TTC ACC AAC ACC TCG CCG GTG AAC GGC CAG CCG ATC GCC GAG TTC CCC CGT 1149

Ser Thr Ala Glu Asp Ile Asp Lys Ala Leu Asp Ala Ala His Ala Ala Asp Ala Trp 72
 TCC ACC GCC GAG GAC ATC GAC AAG GGC CTC GAT GCC GCC CAC GCC GGC GAC GCC TGG 1209

Gly Arg Thr Ser Val Gln Glu Arg Ser Asn Ile Leu Leu Lys Ile Ala Asp Arg Ile Glu 92
 GGC CGT ACC TCG GTG CAG GAG CGT TCG AAC ATC CTG CTG AAG ATC GCC GAC CGC ATC GAG 1269

Gln Asn Leu Glu Leu Leu Ala Val Thr Glu Thr Trp Asp Asn Gly Lys Ala Val Arg Glu 112
 CAG AAC CTG GAA CTG CTC GCC GTC ACC GAG ACC GAG ACC TGG GAC AAC GGC AAG GCC GTG CGC GAG 1329

Thr Leu Asn Ala Asp Ile Pro Leu Ala Ala Asp His Phe Arg Tyr Phe Ala Gly Cys Ile 132
 ACC CTC AAC GCC GAC ATC CCC CTG GCC GGC GGC GAC CAC TTC CGC TAC TTC GCC GGC TGC ATC 1389

Arg Ala Gln Glu Gly Ser Ala Ala Glu Ile Asn Asp Ser Thr Val Ala Tyr His Ile His 152
 CGC GCC CAG GAA GGC TCC GCC GCC GAG ATC AAC GAC AGC ACC GTG GCC TAC CAC ATC CAC 1449

Glu Pro Leu Gly Val Val Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Leu Met Ala Ala 172
 GAG CCC TTG GGC GTA GTC GGG CAG ATC ATC CCG TGG AAC TTC CCG CTG CTG ATG GCT GCC 1509

Abbildung 4 wird fortgesetzt.

Trp Lys Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Cys Val Val Lys Pro Ala Glu Gln 192
 TGG AAG CTG GCT CCG GCG CTG GCT GCC GGC AAC TGC GTG GTG CTC AAG CCG GCC GAG CAG 1569

Thr Pro Leu Gly Ile Cys Val Leu Leu Leu Ile Gly Asp Leu Leu Pro Pro Gly Val 212
 ACC CCG CTG GGC ATC TGC GTG CTG GAA CTC ATC GGC GAC CTG CTG CCG CCG GGC GTG 1629

Leu Asn Val Val Gln Gly Phe Gly Arg Glu Ala Gly Glu Ala Leu Ala Thr Ser Lys Arg 232
 CTC AAT GTC GTC CAG GGC TTC GGC AGG GAG GCC GGC GAG GCC CTG GCC ACC AGC AAG CGC 1689

Ile Ala Lys Ile Ala Phe Thr Gly Ser Thr Pro Val Gly Ser His Ile Leu Lys Cys Ala 252
 ATC GCC AAG ATC GCC TTC ACC GGT TCC ACC CCG GTC GGC TCG CAC ATC CTC AAG TGC GCG 1749

Ala Glu Ser Ile Ile Pro Ser Thr Val Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Asn Ile Tyr Phe 272
 GCG GAG AGC ATC ATT CCC TCC ACC GTC GAG TTG GGC GGC AAG AGC CCG AAC ATC TAI TTC 1809

Glu Asp Ile Met Gln Ala Glu Pro Ala Phe Ile Glu Lys Ala Ala Glu Gly Leu Val Leu 292
 GAA GAC ATC ATG CAG GCC GAG CCG GCG TTC ATC GAG AAG GCC GGC GAG GGC CTG GTG CTG 1869

Ala Phe Phe Asn Gln Gly Glu Val Cys Thr Cys Pro Ser Arg Ala Leu Val Gln Glu Ser 312
 GCC TTC TTC AAC CAG GCC GAG GTG TGC ACC TGC CCG TCC CGC GCG CTC GTC CAG GAG TCG 1929

Ile Tyr Pro Ala Phe Met Glu Glu Val Leu Lys Lys Val Arg Ala Ile Lys Arg Gly Asp 332
 ATC TAC CCG GCG TTC ATG GAA GAG GTG CTG AAA AAG GTC AGG GCG ATC AAG CGC GGC GAC 1989

Abbildung 4 wird fortgesetzt.

Pro Leu Asp Thr Glu Thr Met Val Gly Ala Gln Ala Ser Gln Gln Gln Tyr Glu Lys Ile 352
 CCG CTG GAC ACC GAG ACC ATG GTC GGC GCC CAG GCT TCC CAG CAG CAG TAC GAG AAG ATC 2049

Leu Ser Tyr Leu Asp Ile Ala Gln Glu Gly Ala Glu Leu Ala Gly Glu Ser Val 372
 CTC TCC TAC CTC GAC ATC GCC CAG CAG GAA GGC GCC GAG CTG CTC GCC GGC AGC GTC 2109

Glu Lys Leu Glu Gly Asn Leu Ala Ser Gly Tyr Tyr Ile Gln Pro Thr Leu Leu Lys Gly 392
 GAG AAG CTC GAA GGC AAC CTG GCC AGC GGC TAC TAC ATC CAG CCG ACC CTG CTC AAG GGG 2169

His Asn Gly Met Arg Val Phe Gln Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Gly Val Thr Thr 412
 CAC AAC GGC ATG CGC GTG TTC CAG GAG GAA ATC TTC GGC CCG GTG GTC GGC GTC ACC ACC 2229

Phe Lys Asp Glu Ala Glu Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Gly Leu Gly Ala 432
 TTC AAG GAC GAA GCC GAG GCC CTG GCC ATC GCC AAC GAC ACC GAG TAC GGC CTC GGC GCC 2289

Gly Leu Trp Thr Arg Asp Ile Asn Arg Ala Tyr Arg Met Gly Arg Gly Ile Lys Ala Gly 452
 GGC CTC TGG ACC CGT GAC ATC AAC AAC CGC GCC TAC CGC ATG GGT CGC GGC ATC AAG GCC GGT 2349

Arg Val Trp Thr Asn Cys Tyr His Leu Tyr Pro Ala His Ala Ala Phe Gly Glu Tyr Lys 472
 CGC GTG TGG ACC AAC TGC TAC CAC CTG TAC CCG GCC CAC GCC GCG TTC GGC GGC TAC AAG 2409

Lys Ser Gly Val Gly Arg Glu Thr His Lys Met Met Leu Asp His Tyr Gln Gln Thr Lys 492
 AAG TCC GGC GTC GGT CGC GAG ACC CAC AAG ATG ATG CTC GAC CAC TAC CAG CAG ACC AAG 2469

Abbildung 4 wird fortgesetzt.

Asn Leu Leu Val Ser Tyr Asp Ile Asp Pro Leu Gly Phe Phe *** -----> **506**
 AAC CTG CTG GTG AGC TAC GAC ATC GAC CCG CTG GGC TTC TTC TGA GCGGTCCTCA GCCGCCGCGG 2534

 <-----
 ATCGCTCCGA CCCGCGGCCT TTCCGCCAAG GCACCTGCGG GTGGCTCGT CCCGCGTCCC GACGCGGCTT 2604

 -----> <-----> <----->
 TCCCCATGGC GGGTTCGTGC GCGACGCGGC CCTGGCCGGG TCCTTTTTTTT CGCCTCGCCG CCGCCCCCTGC 2674

 ATGGACTAGG CTTCTGCCCT GCACCAGGGC GAACCAGGGG GGCGCAACGG CGTTCCTCCC GCGAACCTTG 2744

 GCGGGGACAG GCAGTCCCTA **CCAAATC**AGG GGGAAACTC CTTCGAAAGT CTCATTCCGA GCGAGCCCCG 2814

 . **pgqA**→
 CTGATGTTTA ACTCGACCTG CCGGAATCGC CCGGCCCCAC CAGAGAGGAT CGACCCC ATG TGG ACC AAG CCC AGC 2889

RBS

Met Trp Thr Lys Pro Ser **6**

Phe Thr Asp Leu Arg Leu Gly Phe Glu Val Thr Leu Tyr Phe Ala Asn Arg *** ---- **23**
 TTC ACC GAC CTG CGT CTC GGT TTC GAA GTG ACC CTC TAC TTC GCC AAC CGC TGA TCCGTTCCGC 2953

 -----> <-----> **pgqB**→
 CCGGTCTTC CCGGGCCCTCC CTCAGCCCCG CCGGGCAGAC CC ATG CAC ATC CGT ATT CTC GGT TCG 3019

RBS

Ala Ala Gly Gly Gly Phe Pro Gln Trp Asn Cys Asn Cys Arg Asn Cys Arg Gly Val Arg **28**
 GCC GCC GGC GGC TTC CCC CAG TGG AAC TGC AAC TGC CGC AAC TGT CGC GGA GTC CGC 3079

Abbildung 4 wird fortgesetzt.

Asp Gly Ser Val Ala Ala Gln Pro Arg Thr Gln Ser Ser Ile Ala Leu Ser Asp Asp Gly 48
 GAC GGC AGC GTA GCG GCC CAG CCA CGC ACC GAA TCC TCC ATC GCC CTG TCC GAC GAC GGC 3139

Glu Arg Trp Ile 52
 GAG CGC TGG ATC C 3152

Abb. 4: DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenzen des *PstI-BamHI* Fragments aus pTB3070. Mögliche Ribosomen-Bindestellen sind unterstrichen und mit RBS beschriftet, Haarnadelschleifen sind mit je zwei zueinander weisenden Pfeilen markiert. Die Signalsequenz des Apocytochrom *c550* ist unterstrichen. Die zwei *XhoI* Erkennungssequenzen sind ebenfalls unterstrichen und beschriftet. Das Hämbindemotiv des Cytochrom *c550* wurde mit Sternen markiert. Mehrfach auftretende Heptanukleotidsequenzen zwischen *exaA* und *exaB* sowie vor *pqqA* sind schwarz schattiert (CCAAANN bzw. NNTTTGG) oder mit Punkten markiert (GCCCCCGC).

Der erste offene Leserahmen ist nur partiell vorhanden und 157 bp lang. Er ist in entgegengesetzter Orientierung zu den anderen vier ORFs angeordnet und wurde von Diehl *et al.* [66] vollständig sequenziert und als das Gen (*exaA*) der QEDH identifiziert. Der zweite ORF beginnt mit Start-Codon ATG bei Position 470 und ist 438 bp lang. Eine potentielle Ribosomen-Bindestelle (RBS) GGAGG liegt 9 bp vor diesem Startcodon. Ein anderes mögliches Start-Codon wäre aber auch GTG an Position 467 mit derselben RBS. Die Startcodons an Position 410 und 416 erscheinen eher unwahrscheinlich, da sie das Protein um 17 bzw. 19 Aminosäuren verlängern würden, wobei 4 Aminosäuren von Codons codiert werden, die in *P. aeruginosa* selten verwendet werden [92]. Dieses Gen (*exaB*) enthält eine Sequenz von 33 Aminosäuren, die identisch zu dem sequenzierten N-terminus des Cytochrom c_{550} ist.

Der Bereich zwischen *exaA* und *exaB* umfaßt 312 bp und enthält die Promotoren beider Gene. Eine Haarnadelschleife ist bei Position 270 vorhanden. Insgesamt befinden sich in diesem Bereich fünf Heptanukleotidsequenzen, die auch vor anderen Genen (*pqqA*, siehe unten und *exaD* siehe Kapitel 3.10.1.) des Ethanol-oxidierenden-Systems auftreten. Das Motiv CCAAACG befindet sich zweimal auf dem Gegenstrang an den Positionen 169 und 424 (CGTTTGG). Das Motiv CCAAAGC befindet sich an den Positionen 314 und 372, das Motiv GCCCCGC nur einmal an der Position 319.

Der dritte ORF (*exaC*) beginnt 90 bp hinter dem *exaB* Gen und umfaßt 1521 bp. Das Start-Codon ATG liegt bei Position 994 mit einer mögliche RBS GGAGAG 7 bp davor. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Gens zeigt hohe Homologien zu NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenasen von Gram-negativen Bakterien. Eine intrinsische Terminatorschleife, der sich 8 Thymidinnukleotide anschließen, findet sich 114 bp hinter diesem Gen bei Position 2627. Weitere Haarnadelschleifen sind zwischen *exaB* und *exaC* bei Position 922 und zwischen *exaC* und der Terminatorschleife bei Position 2528 vorhanden.

Das Start-Codon des vierten ORF (*pqqA*), der 72 bp umfaßt, ist ATG bei Position 2872. Die mögliche RBS GAGAG liegt 10 bp davor. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hat hohe Ähnlichkeiten zu dem *pqqA* Gen Gram-negativer Bakterien. Vor dem *pqqA* Gen befinden sich zwei Heptanukleotidsequenzen: An Position 2765 das Motiv CCAAATC und an Position 2809 das Motiv GCCCCGC.

Der letzte ORF (*pqqB*) liegt 55 bp hinter *pqqA* und ist nur teilweise auf dem Insert vorhanden. Er beginnt mit ATG bei Position 2996 und umfaßt 156 bp. Eine mögliche RBS, GGGG liegt 7 bp davor. Zwischen beiden Genen liegt ebenfalls eine Haarnadelschleife bei Position 2951.

3.6.6. Analyse des *exaB* Genproduktes

Das Gen *exaB* codiert für ein Protein von 145 Aminosäuren, das alle Merkmale eines c-Typ Cytochroms aufweist. Es besitzt eine Signalsequenz über 24 Aminosäuren mit einem positiv geladenen Anfang, einem hydrophoben Mittelteil und einer Peptidase Erkennungssequenz ALA, Abbildung 5. Das Hämbindemotiv CXXCH findet sich bei der Aminosäureposition 49. Zwei weitere Methionine M95 und M98 könnten als der sechste Ligand für das Eisen des Porphyrinrings in Frage kommen. Das reife Protein besteht aus 121 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 13 985 Da, der nahe an dem von Reichmann & Goerisch [81] bestimmten Wert von 15 000 Da liegt. Auch der theoretische pI-Wert liegt mit 4,98 nah bei dem experimentell bestimmten Wert von 4,8 [81]. Eine BLAST-Datenbankrecherche (2.19.) ergab die höchste Ähnlichkeit zu Cytochrom *c*₆ aus *Chlamydomonas reinhardtii* [94]. 33 % Identität wurden über 87 AS gefunden. Weitere Ähnlichkeiten fanden sich zu den Häm-domänen von einigen Quinohämoprotein Ethanoldehydrogenasen (QH-EDH) aus den Acetobacteriaceae. So wurden über 78 Aminosäuren 33 % Identität zur QH-EDH aus *Gluconobacter suboxydans* [95] und zu weiteren QH-EDHs aus *Acetobacter* gefunden, Abbildung 5.

```

cytc550  -24  .....
          MNKNNALRGLLVLAGLSLSSLALAHGDVTPQAVDTKGLEPLGKEWRDTNP

          .....
          YRKPYAKHDLAVEIGAS-AYNQNCARCHGLEAKSGGIAFDLRLLETGAEGL
cytc550   27  YRKPYAKHDLAVEIGAS-AYNQNCARCHGLEAKSGGIAFDLRLLETGAEGL
cytc6     2   DLA--LGAQ-VFNGNCAACH-MGGRNS-VMPEKTLDKAALAQ
qh-edh    632  DEARQKDG YFM YQTFCSACHGDNAISGGVLPDLRWSGRPRGR
          .....
          *
          DEWFKERVINGAVRDGAVYMPKMA DFISQEGLWAI RSYLESVHVDE--
cytc550   76  --DEWFKERVINGAVRDGAVYMPKMA DFISQEGLWAI RSYLESVHVDE--
cytc6     39  YLDGGFKVESIIYQVENGKGA MPADRLSEEEIQAVAEYVFKQATDAAW
qh-edh    674  --ESFYK---LVGRGALTAYGMDFRFDTSMTPEQIEDIRNFI-----

```

Abb. 5: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *Pseudomonas aeruginosa* Apo-Cytochrom *c*₅₅₀ (cytc550) mit 87 Aminosäuren des Cytochrom *c*₆ aus *Chlamydomonas reinhardtii* (cytc6) [94] und 78 Aminosäuren der Häm-domäne der Quinoprotein-Alkoholdehydrogenase aus *Gluconobacter suboxydans* (qh-edh) [95]. Identische Reste zu cytc550 sind mit einem schwarzen Kasten eingeschlossen. Die Signalsequenz vom Apo-Cytochrom *c*₅₅₀ wurde mit Punkten, das Hämbindemotiv mit Kreuzen und der mögliche sechste Ligand des Hämeisens wurde mit einem Sternchen markiert.

3.6.7. Analyse des *exaC* Genproduktes

Das Gen *exaC* codiert ein Protein aus 506 Aminosäuren. Eine Datenbankrecherche zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu Aldehyddehydrogenasen aus anderen Gram-negativen Bakterien. So wurden 65 % Identität zur Chloroacetaldehyddehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. NI86/21 [96], 64 % Identität zur Acetaldehyddehydrogenase II aus *Alcaligenes eutrophus* [97], 61 % Identität zur Aldehyddehydrogenase aus *Vibrio cholerae* [98] und 62 % Identität zur Aldehyddehydrogenase B aus *E. coli* [99] gefunden, Abbildung 6. Die vier aufgeführten Aldehyddehydrogenasen stimmen auch in Bezug auf ihre Größe mit dem *exaC* Genprodukt überein: *Alcaligenes eutrophus*, 506 AS; *Rhodococcus* sp. NI86/21, 505 AS; *Vibrio cholerae*, 506 AS und *E. coli*, 512 AS.

Eine PROSITE Datenbankrecherche zeigte weiterhin das Vorhandensein zweier Motive, die für NAD⁺-abhängige Aldehyddehydrogenasen typisch sind. Die Consensus Sequenz des ersten Motivs mit einem konservierten Glutaminsäurerest [LIVMFGA]-E-[LIMSTAC]-[GS]-G-[KNLM]-[SADN]-[TAPFV] wurde bei Aminosäureposition 261 gefunden und lautet VELGGKSP. Die Consensus Sequenz des zweiten Motivs [FYLVA]-X(3)-G-[QE]-X-C-[LIVMGSTANC]-[AGCN]-X-[GSTADNEKR] enthält einen konservierten Cysteinrest, der für die Aktivität notwendig ist. Dieses Motiv wurde bei Position 294 mit der Sequenz FFNQGEVCTCPS gefunden. Der konservierte Cysteinsäurerest befindet sich bei Position 301. Außerdem konnte noch eine mögliche NAD⁺-Bindestelle GXGX₃G [100] bei Position 218 mit der Sequenz GFGREAG identifiziert werden, Abbildung 6.

Sowohl die gleiche Größe als auch die hohen Ähnlichkeiten zu anderen NAD⁺-abhängigen Aldehyddehydrogenasen, und auch die Präsenz der typischen Aldehyddehydrogenase Motive sprechen dafür, daß es sich bei *exaC* um eine NAD⁺-abhängige Aldehyddehydrogenase handelt.

```

p.aeru. 1 MIYAAPGTPGAVVTF-----KPRYGN YIGGEFVPPVKGYFTNTSPVNGQPIAEFPRST
a.eutr. 1 MNMAEIAQLGVSNPY-----KQQYEN YIGGAWVPPAGGEYFESTTPTITGKPFTRVPRSG
r.sp. 1 MNKPEIA-ITKQSPF-----KARYGN FIGGKFEVPEVGGRYFDNTSPVTGGKICETARSD
v.chol. 1 MIYPIPNSETSTVHF-----KDVYDN YIGGQWMKPHSGEYFESNTSPVNGLVFCRVARSS
e.coli 1 MTNPNPESAQIKPGEYGFPLKLKARYDN FIGGEWVAPADGEYQNLTPVTGQLLCEVASSG

p.aeru. 55 AEDIDKALDAAHAAADAWGRTSVQERSNILLK IADRIEONLELLAVTETW DNGKAVRETL
a.eutr. 55 QQVDAAALDAAHAAKAAWARTSTTERANILN RIADRIEANLKLAVAESIDNGKPVRETT
r.sp. 54 ADDIEKALDAAHAAKDAWGKTSAAVRALILN RIADRMEENLDDLALAE TW DNGKPIRETT
v.chol. 55 SQDVELALDAAHNALESWSTTS AVERS NILLRIADRIE S NLETLAIVE S W DNGKPIRETT
e.coli 61 KR DIDLALDAAHKVKDKKWAHTSVQDR AAILFKIADRMEQNLELLATAETW DNGKPIRETS

p.aeru. 115 NADIPLAADHFRYFAGCIRAQEGSAAEINDS TVAYHIHEPLGVVGGQIIPWNFP LLMAAWK
a.eutr. 115 AADLPLAVDHFYFAGCIRAQEGGISEIDAD TIAYHFHEPLGVVGGQIIPWNFP LLMATWK
r.sp. 114 AADMPLAIDHFRYFAGAVRAQEGGISEIDHD TVAYHFHEPLGVVGGQIIPWNFP LLMAVWK
v.chol. 115 AADLPLTIDHFRYFAACIRSOEGAASELDSRT LTYHLP EPIGVVGGQIIPWNFP LLMAAWK
e.coli 121 AADVPLAIDHFRYFASCIRAQEGGISEVDSE TVAYHFHEPLGVVGGQIIPWNFP LLMASWK

p.aeru. 175 LAPALAAGNCVVLKPAEQTPGLICV LLELIGDLLP PGVLNVVQGFGR EAGEALATSKRIA
a.eutr. 175 LAPALAAGNCVVLKPAEQTPASILV LMEVIGDLLP PGVNVVINGFGL EAGKPLASSPRIA
r.sp. 174 LAPALAAGNCVVLKPAEQTPASILV LAELIADLLP PGVLNVVINGFGL EAGKPLASSRIA
v.chol. 175 LAPALAAGCTVVLKPAEQTPVSILFLMEIIGDLIPAGVINVVNGF GSEAGNALATSORID
e.coli 181 MAPALAAGNCVVLKPARLTPLSV LLLMEIIVGDL LPPGVNVVNGAGGV IGEV LATS KRIA

p.aeru. 235 KIAFTGSTPVGSHILKCAAESIIPSTV ELGGKSPNIYFEDIMQAEPAFIEKAAEGLV LAF
a.eutr. 235 KVAFTGETTTGRLIMQYASONLIPV TLELGGKSPNIF FEDVLAADDAFFDKALEGFAMFA
r.sp. 234 KIAFTGETTTGRLIMQYASONLIPV TLELGGKSPNIF FADVVAEDDDFFDKAVEGFVMFA
v.chol. 235 KLAFTGST EIGNHILKCAADNLIPSTI ELGGKSPNIYFPDIFSHEDQYLDKCI EGAL LAF
e.coli 241 KVAFTGST EVGQQIMQYATQNLIPV TLELGGKSPNIF FADVMD EEDAFDKALEGFALFA

p.aeru. 295 FNQGEVCTCPSRALVQESIYP AFMEEV LKKVRAIKRGDPLDTETM VCAQASQQOYEKILS
a.eutr. 295 LNQGEVCTCPSRALIQESIYDRFMERALKRVA AIRQGHPLDTGTMI GAQASAEQLEKILS
r.sp. 294 LNQGEVCTCPSRALIQESIYDRFM EKALKRVA AIVQGSPLDFATMIGA QASAEQLEKILS
v.chol. 295 FNQGEVCTCPSRILVHESIYEKFI AKI IERVALIKQGNPLDTETQ IGAQVSKEOYDKILG
e.coli 301 FNQGEVCTCPSRALVQESIYERFMERAIRRVES I RSCNPLDSV TQMGAQVSHGQLE TILN

p.aeru. 355 YLDIAQQOEGAELLAGGSVEKLEGNLAS GYYIQPTLLKGHNGMRVFQEEIFGPVVGVTTFK
a.eutr. 355 YIDLGRKEGAQCLTGGERNVLDGDLAG GYYVKPTVFA GHNKMRI FQEEIFGPVVSVTTFK
r.sp. 354 YIDIGKQOEGA EVLIGGERNTFGDLAG GYYVKPTVFKGHNKMRI FQEEIFGPVVSVTTFK
v.chol. 355 YIQIGKDEGAELIFGGHPNNQENYLSGGYYIKPTLFFGHNQMHIFQEEIFGPVIAITKFK
e.coli 361 YIDIGKKEGADVLTGGRKLEGE LKDCYYLEPTILFGQNNMRVFQEEIFGPVLA VTTFK

p.aeru. 415 DEAEALAIANDTEYGLGAGLWTRDINRAYRMGRGIKAGRVW TNCYHLYPAHAAFGGYKKS
a.eutr. 415 DEEALAIANDTLYGLGAGVWTRD GARAF RMGRGIQAGRVW TNCYHAYPAHAAFGGYKQS
r.sp. 414 DDAEALHAIANDTLYGLGAGVWTRDGNRAYR FGRALQAGRVW TNCYHAYPAHAAFGGYKQS
v.chol. 415 DEIEALHLANDTVYGLGAGVWTRDINIAHRMAKNIKAGRVW VNCYHAYPAHAAFGGYKKS
e.coli 421 TMEAEALELANDTQYGLGAGVWSRNGNLAYK MGRGIQAGRVW TNCYHAYPAHAAFGGYKQS

p.aeru. 475 GVGRETHKMMLDHYQQTKNLLVSYDIDPLGFF
a.eutr. 475 GIGRENHRMMLDHYQQTKNLLVSYSPNALGFF
r.sp. 474 GIGRENHKMMLDHYQQTKNMLVSYSPKKLGFF
v.chol. 475 GIGRETHKLTLSHYQNIKNVLSHETHP LGLF
e.coli 481 GIGRETHKMMLEHYQQTCKLLVSYSDKPLGLF

```

Abb.6: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Pseudomonas aeruginosa* Aldehyddehydrogenase (p.aeru.) mit anderen Aldehyddehydrogenasen Gram-negativer Bakterien. a.eutr., Aldehyddehydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* [97]; r.sp., Aldehyddehydrogenase aus *Rhodococcus sp.* NI86/21 [96]; v. chol. Aldehyddehydrogenase aus *Vibrio cholerae* [98]; e.coli Aldehyddehydrogenase B aus *Escherichia coli* [99]. Identische Reste zur Aldehyddehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* sind mit einem schwarzen Kasten

eingeschlossen. Die mögliche NAD⁺-Bindestelle der Aldehyddehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde mit Kreuzen markiert, die PROSITE Sequenzmotive mit Sternchen (Glutaminsäure-Motiv) oder mit einer gestrichelten Linie (Cystein-Motiv).

3.6.8. Analyse des *pqqA* Genproduktes

Das *pqqA* Gen codiert ein Peptid von 23 Aminosäuren. Eine Datenbankrecherche zeigte hohe Identitäten zu den Peptiden anderer *pqqA* Genen aus Gram-negativen Bakterien. So wurden 78 % Identität mit dem Peptid aus *Acinetobacter calcoaceticus* [101], 74 % Identität zu dem PqqA Peptid aus *Pseudomonas fluorescens* [102] und ebenfalls 74 % Identität zu dem PqqA Peptid aus *Klebsiella pneumoniae* [53] gefunden, Abbildung 7. Das Peptid des *pqqA* Gens ist vermutlich der Vorläufer zur PQQ-Biosynthese [52,53]. Es enthält zwei konservierte Aminosäurereste, die vermutlich das Grundgerüst für PQQ bilden: Glutamat bei Position 15 und Tyrosin bei Position 19, Abbildung 7.

P.aeru.	1	M -WTKPS S FTDLRLGFEVTLYFANR	*	*
P.fluo.	1	MTW S KPAYTDLR I GFEVT M YFASR		
A.calc.	1	MQWTKPA F TDLR I GFEVT M YFEAR		
K.pneu.	1	M-W K KPA F IDLRL G LEV T LYISNR		

Abb.7: Alignment der abgeleiteten *pqqA* Peptidsequenz aus *Pseudomonas aeruginosa* (P.aeru.) mit PqqA Peptiden aus *Pseudomonas fluorescens* (P.fluo.) [102], *Acinetobacter calcoaceticus* (A.calc.) [101] und *Klebsiella pneumoniae* (K.pneu.) [53]. Die konservierten Aminosäuren Glutamat und Tyrosin sind mit Sternchen markiert. Identische Aminosäuren zur Sequenz aus *Pseudomonas aeruginosa* sind mit einem schwarzen Kästchen umrandet.

3.6.9. Analyse des *pqqB* Genproduktes

Die 52 N-terminalen Aminosäuren des partiell vorhandenen *pqqB* Gens zeigen hohe Identitäten zu N-terminalen Domänen von *pqqB* Genprodukten anderer Gram-negativer Bakterien. Es wurden 75 % Identität zu den 52 N-terminalen Aminosäuren des *pqqB* Genprodukt von *P. fluorescens* [102], 71 % Identität zu 52 N-terminalen Aminosäuren von PqqB aus *Klebsiella*

pneumoniae [53] und 67 % Identität zu 52 N-terminalen Aminosäuren von PqqB aus *A. calcoaceticus* [101] gefunden, Abbildung 8. Alle bisher sequenzierten *pqqB* Gene liegen in einem Operon mit dem *pqqA* Gen und folgen diesem unmittelbar [11]. Das vom *pqqB* Gen codierte Protein ist vermutlich am Transport des PQQ in das Periplasma beteiligt [55].

```

P.aeru.      1  MHIRILGSAAGGGFPQWNCNCRNCRGVVDGSAVAAPRTQSSIALSDDGERWI
K.pneu.      1  MFIKVLGSAAGGGFPQWNCNCANCGLRDGTIQAAPRTQSSILVSDNGKEWV
P.fluo.      1  MFDVILGSAAGGGFPQWNCNCVNCAGFRDGLRAQARTQSSIALSDDGVNWV
A.calc.      1  MYIYVLGSAAGGGFPQWNCNCFNCHGVRTGTIQAKARTQSSIAVSENGTDWV

```

Abb.8: Alignment der abgeleiteten 52 N-terminalen Aminosäuren des *pqqB* Gens aus *Pseudomonas aeruginosa* (P.aeru.) mit den N-terminalen Bereichen der PqqB Proteine aus *Klebsiella pneumoniae* (K.pneu.), *Pseudomonas fluorescens* (P.fluo.) und *Acinetobacter calcoaceticus* (A.calc.). Identische Aminosäuren zur Sequenz aus *Pseudomonas aeruginosa* sind mit einem schwarzen Kästchen umrandet.

3.7. Heterologe Expression des Cytochrom c_{550} -und des Aldehyddehydrogenase-Gens

Um zu beweisen, daß *exaB* tatsächlich Cytochrom c_{550} und *exaC* eine Aldehyddehydrogenase codiert, mußten beide Gene in *E. coli* JM109 exprimiert und die Genprodukte biochemisch charakterisiert werden.

3.7.1. Konstruktion des Expressionsvektors

Zur Expression wurde das Insert aus pTB3070 in pUC19 kloniert. In diesem Vektor, pTB3071 kann die Transkription von *exaB* und *exaC* durch den *lacZ* Promotor des Vektors induziert werden, Abbildung 9. Zwischen dem *lacZ* Promotor und dem Start-Codon für das Cytochrom c_{550} Gen befinden sich noch ein Stop-Codon welches die Transkription eines *lacZ α* -Fusionsproteins abbricht.

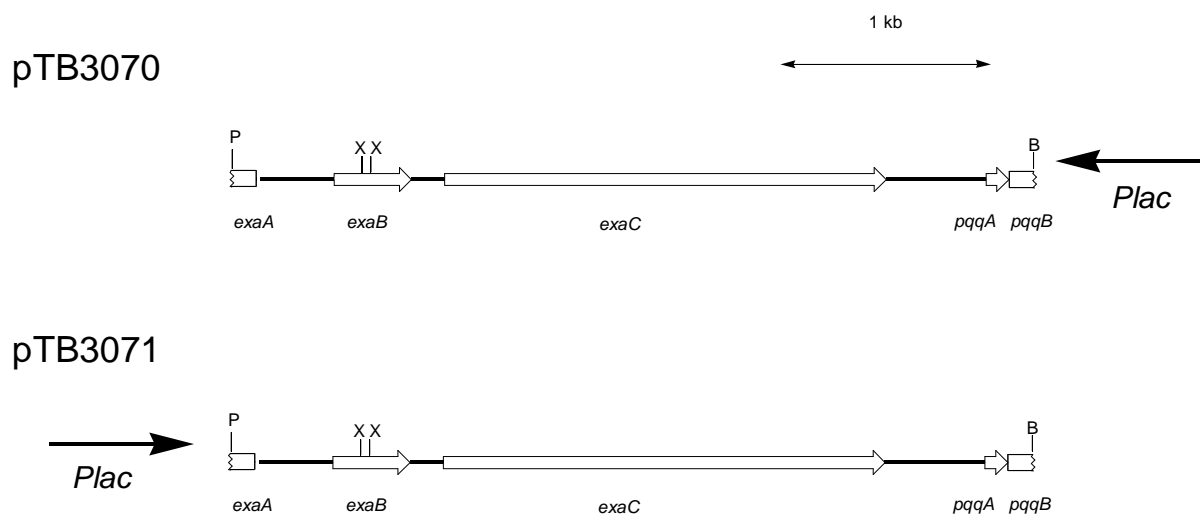


Abb. 9: Insert-DNA aus pTB3070 und pTB3071. Die jeweilige Position und Orientierung des *lacZ* Promotors (*Plac*) aus dem pUC-Vektoren ist mit einem schwarzen Pfeil dargestellt.

3.7.2. Expression und Charakterisierung von Cytochrom c_{550} in *Escherichia coli* JM109

Die Bildung eines Cytochrom c_{550} konnte nur mit pTB3071 unter sauerstofflimitierenden Bedingungen (2.20.), wie von Ubbink *et al.* [79] beschrieben, nachgewiesen werden. Die spezifische Konzentration (2.22.) in der Periplasmafraktion betrug 1.9 nmol pro mg Protein. In Kontrollexperimenten mit *E. coli* JM109-pTB3070 oder *E. coli* JM109-pUC19 konnte kein Cytochrom in der Periplasmafraktion nachgewiesen werden (Abbildung 10a). Das heterolog in *E. coli* exprimierte Cytochrom c_{550} zeigt ein identisches Differenzspektrum (2.22.) wie das native Cytochrom aus *P. aeruginosa* (Abbildung 10b). Auch die Größe beider Cytochrome wurde mittels SDS-PAGE und Hämperoxidase Färbung verglichen (2.22.) und stimmte überein. Im Ferricyanit Test (2.21.6.) kann in Gegenwart von QEDH eine ethanolabhängige Reduktion von Hexacyanoferrat nur in Anwesenheit von Cytochrom c_{550} verfolgt werden. Lediglich die Periplasmafraktion von *E. coli* JM109-pTB3071 zeigte eine ethanolabhängige Ferricyanit-Reduktase Aktivität der QEDH. Die bestimmte Aktivität war genauso groß wie beim Einsatz einer identischen Menge Cytochrom c_{550} aus *P. aeruginosa*. In weiteren Kon-

trollansätzen ohne QEDH oder Ethanol wurde keine Aktivität gemessen. Auch zeigten die Periplasmafraktionen von *E. coli* JM109-pTB3070 oder *E. coli* JM109-pUC19 erst nach der Zugabe von Cytochrom c_{550} aus *P. aeruginosa* eine Ferricyanit Reduktase Aktivität der QEDH.

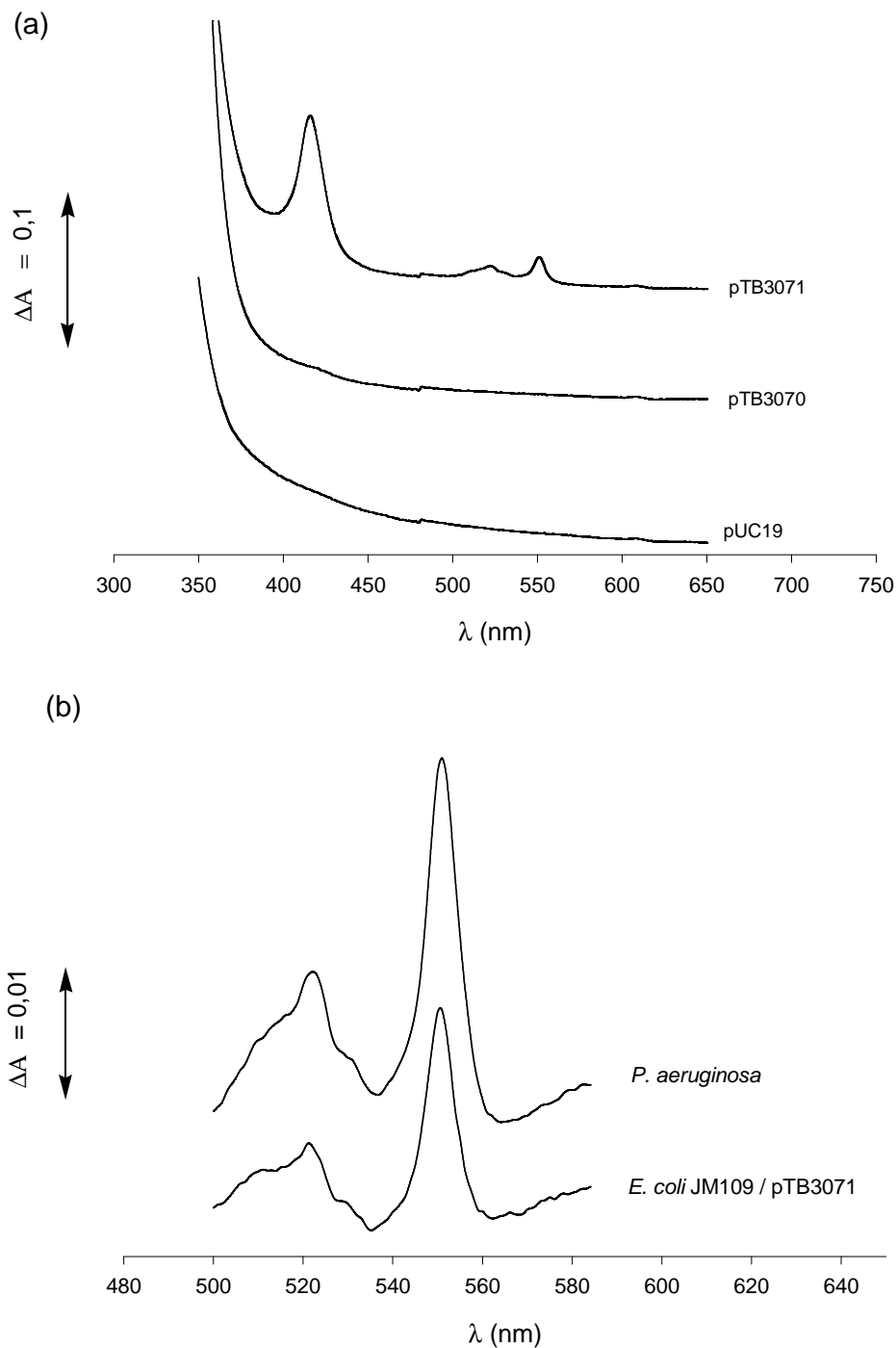


Abb.10: Absorptions- und Differenzspektren zur Cytochrom c_{550} Expression in *Escherichia coli* JM109.

a) Absorptionsspektren der Periplasmafraktionen von *E. coli* JM109 mit dem Plasmid pTB3071, pTB3070 oder pUC19. Die Stämme wurden semianaerob gezüchtet (2.20.) und periplasmatische Fraktionen (40 $\mu\text{g/ml}$) mit Dithionit reduziert.

b) Differenzspektren (2.22.) der Periplasmafraktion von *E. coli* JM109-pTB3071 und dem gereinigten Cytochrom c_{550} aus *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933.

3.7.3. Expression und Charakterisierung der Aldehyddehydrogenase in *Escherichia coli* JM109

Um zu überprüfen, daß *exaC* eine Aldehyddehydrogenase codiert, wurde das Gen ebenfalls heterolog in *E. coli* exprimiert (2.20.) und die Aldehyddehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten gemessen (2.21.5.). Wie bei den Expressionsversuchen des *exaB* Gens konnte eine Aldehyddehydrogenase-Aktivität nur mit *E. coli* JM109-pTB3071 nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität im Rohextrakt betrug 1,0 U pro mg Protein. Bei den Kontrollen, *E. coli* JM109-pUC19 und *E. coli* JM109-pTB3070 war keine Aldehyddehydrogenase-Aktivität nachweisbar. In einer 10 % igen SDS-PAGE war ebenfalls nur bei *E. coli* JM109-pTB3071 eine zusätzliche Proteinbande bei 56 000 Da sichtbar, die mit dem erwarteten Molekulargewicht des *exaC* Genproduktes (54 862 Da) übereinstimmt, Abbildung 11.

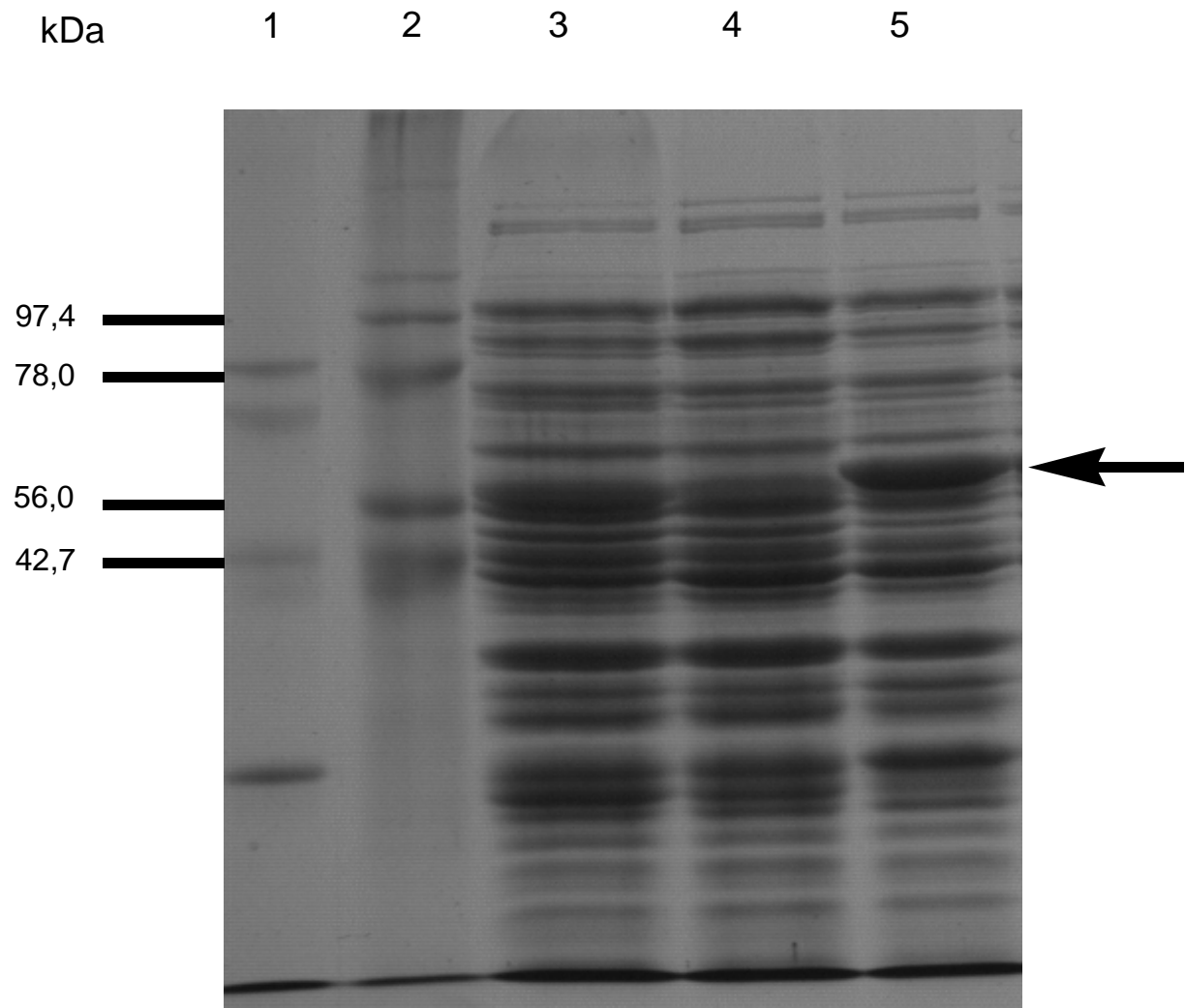


Abb. 11: Expression der Aldehyddehydrogenase in *Escherichia coli* JM109. Die Zellen wurden aerob gezüchtet (2.20.) und nach dem Sedimentieren 3 min in Treatment-Puffer gekocht [74]. Die Molekulargewichte beziehen sich auf den Größenstandard in Spur 2. Spur 1, Größenstandard IV; Spur 2, Größenstandard VIII; Spur 3, *E. coli* JM109-pUC19; Spur 4, *E. coli* JM109-pTB3070; Spur 5, *E. coli* JM109-pTB3071. Der Pfeil zeigt die Position der Aldehyddehydrogenase in Spur 5 an.

3.8. Insertionsmutagenese des Cytochrom c_{550} Gens und Charakterisierung der Mutante MS25

Gene könne durch Insertionsmutagenese mit einer Kanamycinkassette unterbrochen werden. Der resultierende Phänotyp ist stabil, da diese Mutante im Gegensatz zu den chemisch hergestellten Mutanten nicht revertieren kann.

Für eine Insertionsmutagenese muß die Kanamycinkassette in eine geeignete Schnittstelle des bereits klonierten Gens eingesetzt werden. Wenn, wie z.B. bei pUC19-Derivaten dieser Vektor nur in *E. coli* aber nicht in *P. aeruginosa* repliziert wird, kann man diesen als "suicide"-Vektor einsetzen. Mittels Elektroporation wird dieser Vektor mit der inserierten Kanamycinkassette in *P. aeruginosa* eingeführt. Anschließend werden Mutanten isoliert, bei denen durch eine homologe Rekombination das intakte Gen im Genom durch das von der Kanamycinkassette unterbrochene Gen des eingeführten Vektors ausgetauscht wurde.

Durch Insertionsmutagenese des Cytochrom c_{550} Gens sollte untersucht werden, ob dieses Protein ein essentieller Bestandteil des Ethanol-oxidierenden Systems ist.

3.8.1. Insertionsmutagenese des Cytochrom c_{550} Gens

Plasmid pTB4003 wurde zur Inaktivierung des *exaB* Gens ausgewählt, da hier sowohl vor und hinter dem *exaB* Gen mehrere Kilobasen genomischer DNA vorhanden sind, die eine homologe Rekombination begünstigen. Eine Restriktionsanalyse von pTB4003 zeigte, daß sich die zwei einzigen *XhoI* Schnittstellen im *exaB* Gen befinden, Abbildung 12. Ein 2.4 kb *XhoI*-Fragment mit der Kanamycinkassette aus dem Transposon Tn5 wurde aus dem Plasmid pSUP1021 ausgeschnitten und in die *XhoI* Schnittstellen des *exaB* Gens kloniert. Die Orientierung der Kassette konnte durch das Restriktionsenzym *HindIII* gezeigt werden, Abbildung 12. Plasmid pTB3106 enthielt die Kanamycinkassette in der gleichen Orientierung wie das *exaB* Gen und wurde mittels Elektroporation (2.14.3.) in *P. aeruginosa* eingebracht. Die genomische DNA von Km^R Cb^S Mutanten wurde zu Southern-Blot-Analysen (2.17.) mit der Kanamycin Kassette und dem Cytochrom c_{550} Gen als Sonden eingesetzt. Es wurden drei Mutanten isoliert, MS23, MS24 und MS25, bei denen die Insertion der Kanamycinkassette durch Hybridisierung (2.17.4.) gezeigt werden konnte. MS25 wurde für die weiteren phänotypischen Charakterisierungen ausgewählt.

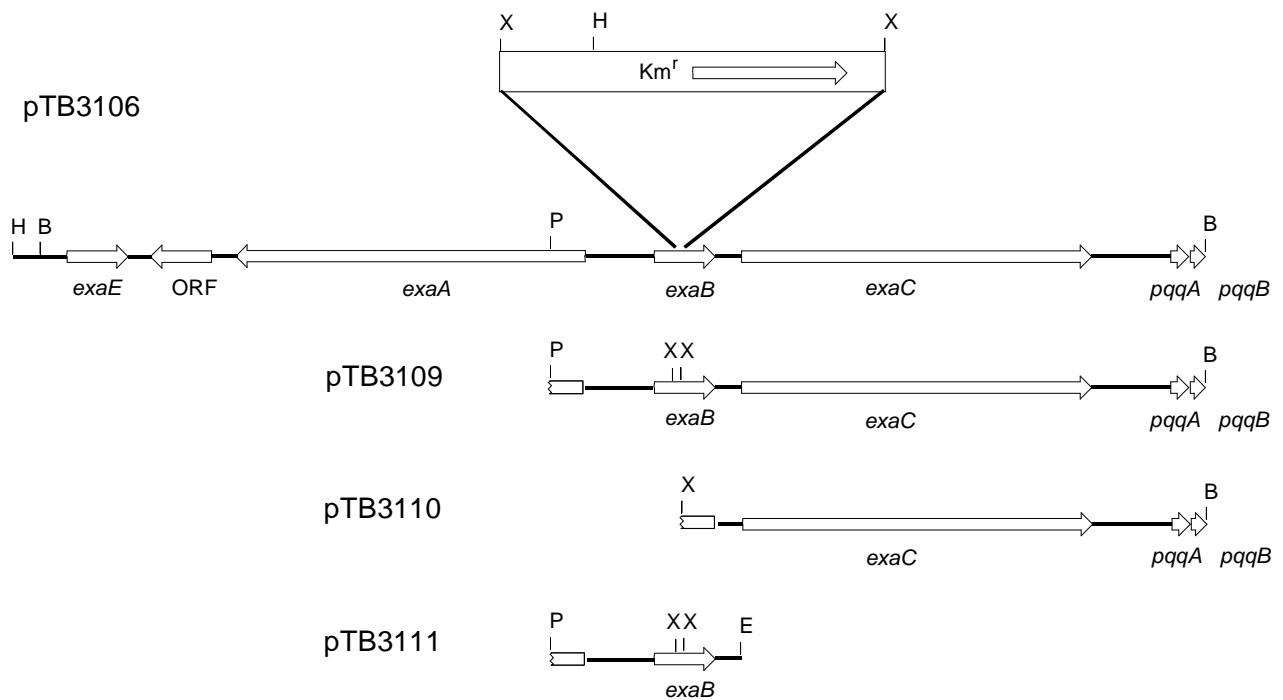


Abb. 12: Position und Orientierung der Kanamycinkassette in pTB3106 und die Insert-DNA der Plasmide pTB3109, pTB3110 und pTB3111. Nur die relevanten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt. Das 2,4 kb *XhoI*-Fragment aus Tn5 ist als Balken dargestellt, das Kanamycinresistenz-Gen als Pfeil darin. Die *EcoRI* Schnittstelle in pTB3111 stammt aus dem Polylinker des Vektors pUC18. Km^r , Kanamycinresistenz-Gen; B, *Bam*HI; E, *EcoRI*; H, *HinDIII*; P, *PstI*; X, *XhoI*.

3.8.2. Wachstum auf Ethanol und Komplementierung der Mutante MS25

Mutante MS25 zeigte kein Wachstum auf Ethanol, weder in Flüssigkulturen noch auf festem Nährboden. Es waren auch keine Revertanten zu beobachten.

Mit Komplementierungsexperimenten wurde untersucht, ob die Insertion im *exaB* Gen allein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, oder ob sie einen negativen Effekt auf die Expression des nachfolgenden Aldehyddehydrogenase-Gens verursachte. Die Mutante MS25 wurde mit den Vektoren pTB3109, pTB3110 und pTB3111 (Abbildung 12) komplementiert (2.16.2.). Der Vektor pTB3109 enthält das gesamte 3,2 kb Insert aus pTB3070 in dem "broad host range"-Vektor pUCP20T. Der Vektor pTB3110 enthält das *XhoI-Bam*HI Fragment aus dem 3,2 kb Insert von pTB3070 mit dem vollständigen *exaC* und *pqqA* Genen, während pTB3111 das ca. 1 kb große Insert aus pTB3081 enthält. Dieses Insert enthält nur das *exaB* Gen vollständig.

In Wachstumsversuchen auf MM-Ethanol-Cb Flüssigkulturen komplementierten sowohl pTB3109 als auch pTB3111 die Mutante MS25 *in trans* (2.16.2.) und ermöglichten ein Wachstum wie der Wildtyp, Abbildung 13. Plasmid pTB3110, ohne das *exaB* Gen, konnte MS25 nicht komplementieren. Durch die Komplementierung mit pTB3111 konnte gezeigt werden, daß die eingeführte Kanamycinkassette keinen negativen Einfluß auf das nachfolgende *exaC* Gen hat und daß der Phänotyp von MS25 auf das unterbrochene Cytochrom *c*₅₅₀ Gen zurückzuführen ist.

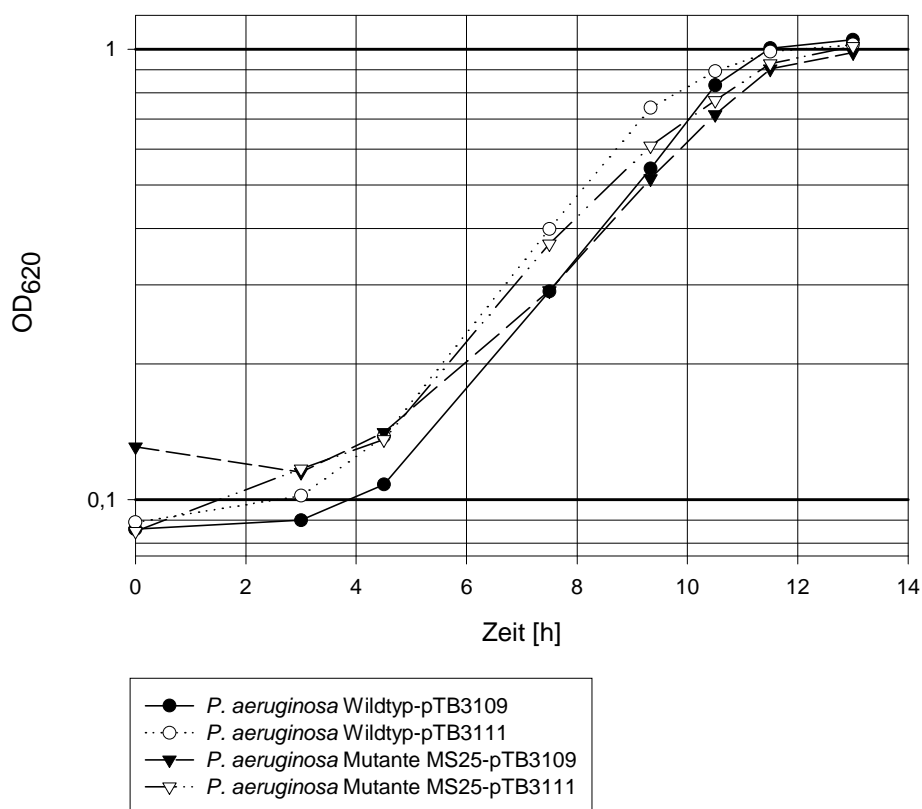


Abb.13: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyp und der Mutante MS25 mit den Plasmiden pTB3109, bzw. pTB3111 auf MM-Ethanol-Cb.

3.8.3. Phänotypische Charakterisierung der Mutante MS25

In weiteren Wachstumsversuchen (2.3.1.) mit der Mutante MS25 und dem *P. aeruginosa* Wildtyp wurde untersucht, ob das Cytochrom c_{550} auch für das Wachstum auf anderen Kohlenstoffquellen essentiell ist.

Neben Ethanol zeigte MS25 auch auf Propanol und 1,2-Propandiol kein Wachstum. Auf Butanol wurde ein langsames Wachstum als beim Wildtyp beobachtet. Die Generationszeit von MS25 auf Butanol betrug 4,5 h, die des Wildtyps 1,5 h. Hingegen scheint Cytochrom c_{550} für das anaerobe Wachstum auf Ethanol nicht notwendig zu sein, ebensowenig wie für das aerobe Wachstum auf Succinat, Acetat, Glycerol und Glukose.

Tab. 9: Wachstum von MS25 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. "++", Generationszeit wie der Wildtyp; "+" Generationszeit größer als beim Wildtyp; "-", kein Wachstum.

Substrat	Mutante MS25
Succinat	++
Glukose	++
Acetat	++
Ethanol	-
Propanol	-
1,2-Propanediol	-
Glycerol	++
Butanol	+
Ethanol, anaerob + NO ₃	++

3.9. Promotorstudien

Mittels Promotoranalyse-Vektoren sollte die Transkription der *exaA*, *exaB* und *exaC* Gene unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden. Weiterhin können mit diesen Vektoren auch Regulationsmutanten identifiziert werden, bei denen die Transkription von *exaA* und *exaB* defekt ist. Hierzu wird das promotorlose Reportergen, hier das Gen der β -Galaktosidase, in das zu untersuchende Gen kloniert. Das Reportergen besitzt vor der eigenen Ribosomen-Bindestelle Stop-Codons in allen drei Leserahmen, welche die Translation des zu untersuchenden Gens beenden. Anhand der β -Galaktosidase Aktivität läßt sich dann die Promotoraktivität quantifizieren.

3.9.1. Konstruktion der Promotoranalyse-Vektoren

Als Promotoranalyse-Vektor wurde pEDY305 eingesetzt, der sich wie pLAFR3 vom Plasmid pRK290 ableitet (Schwarz, persönliche Mitteilung) und ebenfalls eine Tetracyclinresistenz besitzt. Der Vektor pEDY305 ist ebenfalls sehr groß, besitzt aber nur wenige geeignete Schnittstellen, was das Klonieren der zu untersuchenden Gene erschwert. Konstrukte für die Gene *exaB* und *exaC* mußten zuerst in andere Vektoren kloniert werden, um geeignete Schnittstellen einzufügen. Um das Klonieren kleiner DNA-Fragmente aus diesen Vektoren in pEDY305 zu erleichtern, wurden zuerst Fusionsplasmide aus pEDY305 mit den carbenicillin-resistenten Vektoren, die die zu untersuchenden Gene enthielten, erzeugt. So konnten positive Klone leicht durch Selektion mit zwei verschiedenen Antibiotika identifiziert werden. Durch Restriktionsanalysen mußte die korrekte Orientierung der fusionierten Vektoren zueinander überprüft werden. Aus den positiven Klonen wurde anschließend der carbenicillinresistente Vektor ausgeschnitten.

Zur Klonierung des QEDH-Promotors und eines Teils des *exaA* Gens wurde pTB3070 mit *SalI* geschnitten und in den *XhoI* verdauten pEDY305 ligiert. Nach der Transformation und Isolierung des pEDY305-pTB3070 Fusionsplasmids wurde mit *PstI* der Vektor pTB3070 bis auf das 0,89 kb lange *PstI-SalI* Fragment ausgeschnitten. Der pEDY305 Vektor mit dem verbleibenden Insert wurde über eine Gelelektrophorese gereinigt (2.9.1.), religiert und mit ihm *E. coli* DH5 α transformiert. Dieser Vektor, pTB3138, enthält den QEDH-Promotor mit 157 bp des *exaA* Gens, dem das *lacZ*-Reportergen der β -Galaktosidase folgt, Abbildung 14.

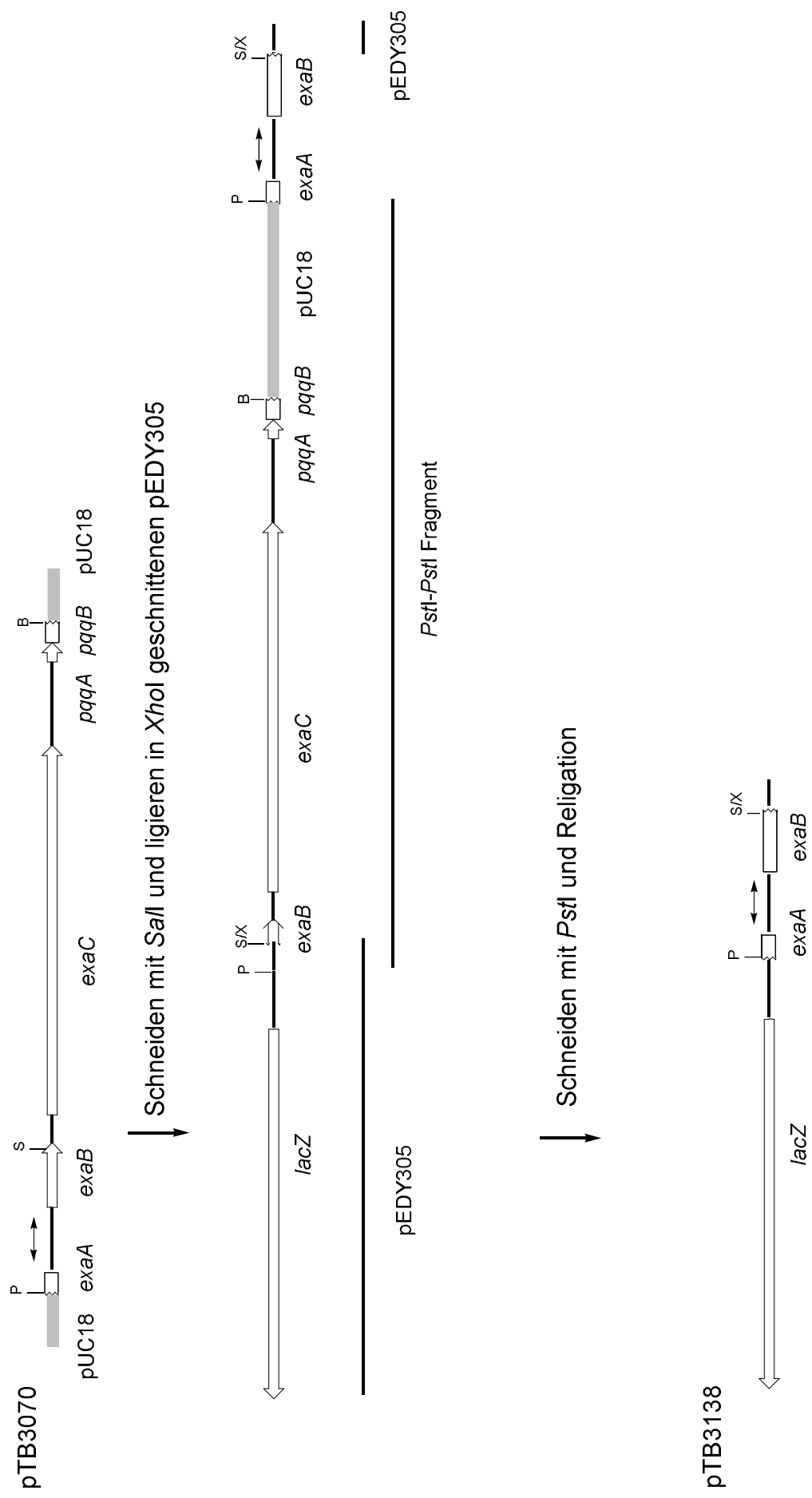


Abb. 14: Klonierungsschema für pTB3138. Beim Fusionsplasmid zwischen pTB3070 und pEDY305 ist der pEDY305 Vektor und das *PstI-PstI* Fragment mit schwarzen Linien unterstrichen. *lacZ*, Gen der β -Galaktosidase; B, *BamHI*; P, *PstI*; S, *Sall*; X, *XhoI*; S/X, fusionierte *Sall-XhoI* Schnittstelle. Der vermutete divergente Promotor ist durch zwei entgegengesetzte Pfeile markiert

Zur Untersuchung der Transkription von *exaB* sollte ein Teil dieses Gens mit dem Cytochrom c_{550} Promotor kloniert werden. Dazu wurde das *exaB* Gen über die *SalI* und nicht über die *XhoI* Schnittstellen ausgeschnitten, da das mit *XhoI* entstehende Fragment des *exaB* Gens für *P. aeruginosa* toxisch ist. Dies wurde bei Subklonierungen beobachtet. *P. aeruginosa* kann zwar mit Subklonen, die den *exaB* Promotor und das *exaB* Gen bis zur *XhoI* Schnittstelle enthalten, auf LB-Medium wachsen, aber nicht mehr auf MM-Ethanol.

Das *HinDIII-SalI* Fragment wurde aus pTB3070 in einen *HinDIII-SalI* verdauten pUC19 kloniert. Damit wurde eine *XbaI* Schnittstelle dem nur noch partiell vorliegenden *exaB* Gen angefügt. Dieses Plasmid, pTB3135, konnte über die *XbaI* Schnittstelle mit dem *XbaI* verdauten pEDY305 ligiert werden. Mit *PstI* wurde anschließend der pUC19 Vektor aus pTB3135 ausgeschnitten, der restliche pEDY305 mit dem verbleibenden 0,89 kb Insert wurde religiert und pTB3139 benannt. Hier folgt das *lacZ*-Reportergen dem partiell vorliegenden *exaB* Gen, vor dem allerdings noch der vollständige Cytochrom c_{550} Promotor liegt, Abbildung 15.

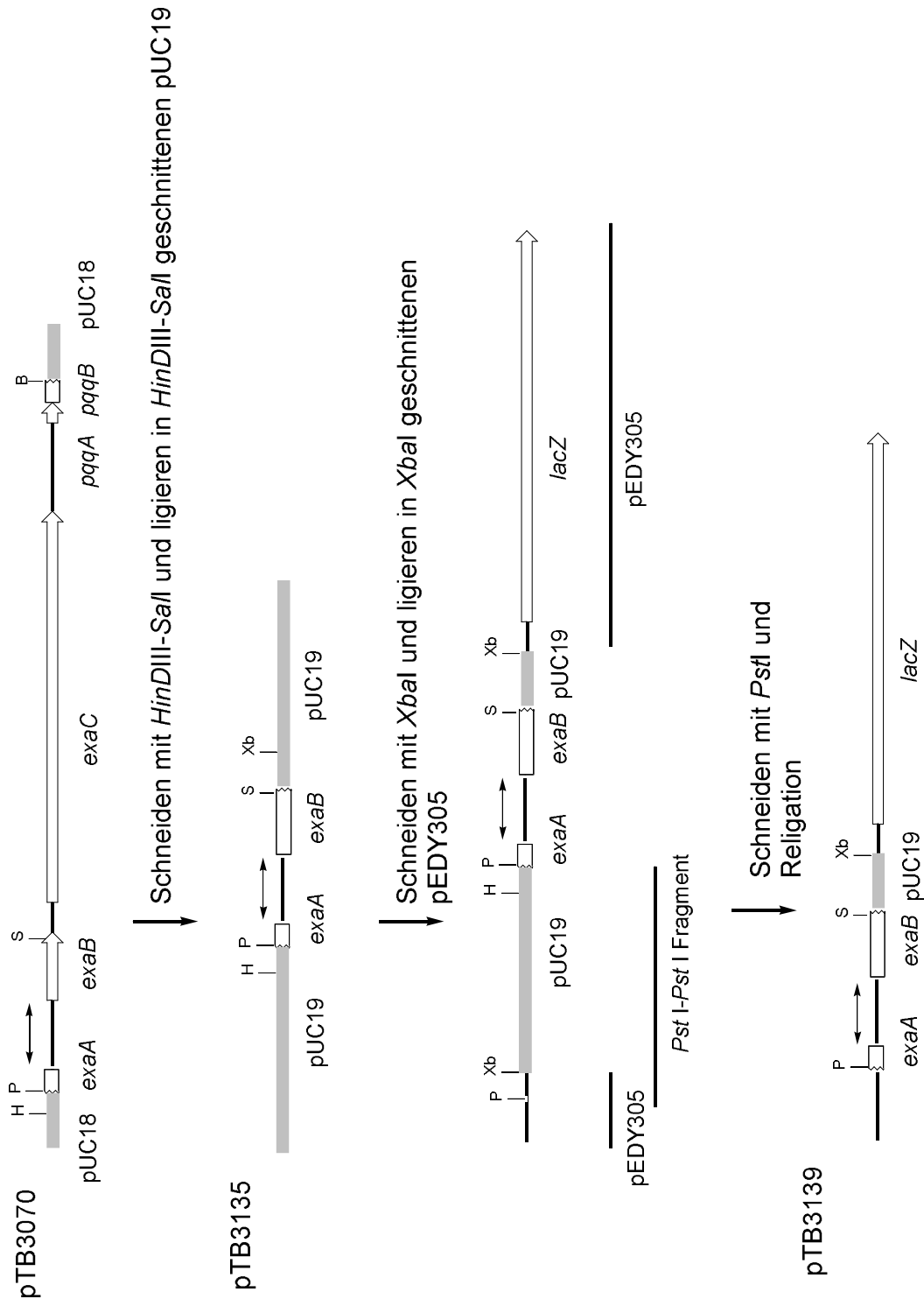


Abb. 15: Klonierungsschema für pTB3139. Beim Fusionsplasmid zwischen pTB3070 und pEDY305 ist der pEDY305 Vektor und das *PstI-PstI* Fragment mit schwarzen Linien unterstrichen. *lacZ*, Gen der β -Galaktosidase; B, *BamHI*; P, *PstI*; H, *HindIII*; S, *SalI*; Xb, *XbaI*. Die Position des vermuteten divergenten Promotors ist durch zwei entgegengesetzte Pfeile markiert.

Um die Transkription des Aldehyddehydrogenase-Gens zu untersuchen, wurden zwei Konstrukte hergestellt. Das längere Konstrukt sollte den vollständigen Cytochrom c_{550} Promotor und das komplette *exaB* Gen enthalten, mit dem zweiten Konstrukt sollte nach einem separaten Promotor vor dem *exaC* Gen gesucht werden. Dieses Konstrukt enthielt nur den 0,4 kb umfassenden Bereich bis zur *XhoI* Schnittstelle vor dem *exaC* Gen und somit weder den Cytochrom c_{550} Promotor noch das vollständige *exaB* Gen. Für beide Konstrukte wurde zunächst pTB3070 mit *AgeI* geschnitten und die überhängenden Enden aufgefüllt (2.11.4.). Anschließend wurde mit *HinDIII* geschnitten, das 1,7 kb Fragment über eine Gelelektrophorese gereinigt (2.9.1.) und in einen *HinDIII-SmaI* geschnittenen pBluescript Vektor kloniert. Dieser Vektor, pTB3134, enthält neben dem Cytochrom c_{550} Promotor das vollständige *exaB* Gen und das *exaC* Gen bis zur *AgeI* Schnittstelle, der nun eine *XbaI* Schnittstelle folgt, Abbildung 16. Über diese Schnittstelle wurden pTB3134 und pEDY305 fusioniert. Für das erste Konstrukt wurde aus dem Fusionsvektor mit *PstI* der gesamte pBluescript Vektor ausgeschnitten. Der so erhaltene Vektor, pTB3141 enthält das partielle Aldehyddehydrogenase-Gen mit dem Cytochrom c_{550} Promotor und Cytochrom c_{550} Gen. Dem partiellen Aldehyddehydrogenase-Gen folgt das *lacZ*-Reportergen des pEDY305. Für das kürzere Konstrukt ohne Cytochrom c_{550} Promotor wurde der Fusionsvektor aus pTB3134 und pEDY305 mit *XhoI* geschnitten und ohne die herausgeschnittenen Fragmente religiert. Dieser Vektor, pTB3140 enthält, wie auch pTB3141 das Aldehyddehydrogenase-Gen vor dem *lacZ*-Reportergen des pEDY305. Jedoch fehlt der Cytochrom c_{550} Promotor und ein Teil des *exaB* Gens bis zur zweiten *XhoI* Schnittstelle, Abbildung 16.

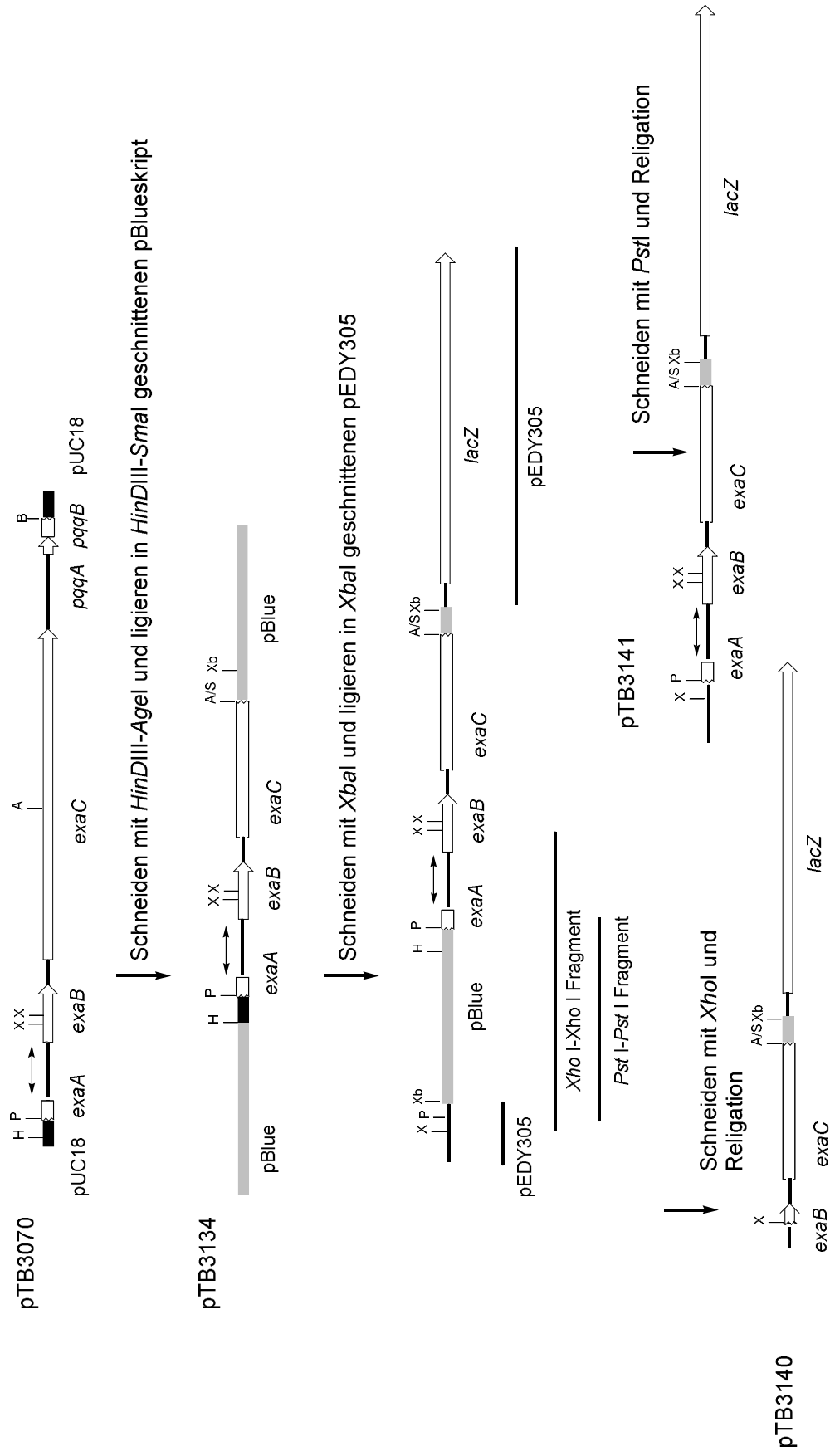


Abb. 16: Klonierungsschema für pTB3140 und pTB3141. Beim Fusionsplasmid zwischen pTB3134 und pEDY305 ist der pEDY305 Vektor, das *XhoI*-*XhoI* Fragment und das *PstI*-*PstI* Fragment mit schwarzen Linien unterstrichen. *lacZ*, Gen der β -Galaktosidase; pBlue, pBlueskript-Vektor; A, *AgeI*; B, *BamHI*; P, *PstI*; H, *HindIII*; X, *XbaI*; Xb, *XbaI*; A/S, aufgefüllte *AgeI*-Schnittstelle mit *SmaI* ligiert. Der divergente Promotor ist mit zwei entgegengesetzten Pfeilen markiert.

3.9.2. Etablierung des Testsystems

Zunächst wurden die vier Promotoranalyse-Vektoren und der leere pEDY305 durch Mating in den *P. aeruginosa* Wildtyp überführt. Bei der Etablierung des Testsystems wurde festgestellt, daß reproduzierbare Ergebnisse nur dann erhalten wurden, wenn die Vorkultur auf MM-Succinat-Tc gewachsen war. Für den Enzymtest wurde festgestellt, daß ein Einfrieren der Zellen vor dem Permeabilisieren durch Toluol für reproduzierbare Ergebnisse notwendig ist. Weiterhin ist für den gesamten Enzymtest auch wichtig, daß die Promotoraktivität proportional über den OD Bereich ist, in dem die Kultur geerntet wird. Dazu wurde mit *P. aeruginosa*-pTB3138 die β -Galaktosidase Aktivität auf MM-Ethanol-Tc in verschiedenen Wachstumsphasen bestimmt, Tabelle 10a. Dieses Experiment wurde auch mit dem Stamm *P. aeruginosa*-pTB3141 durchgeführt, wofür es noch folgenden Grund gab: In *E. coli* ist eine Aldehyddehydrogenase beschrieben, die erst mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase induziert wird [99], dies sollte mit der Aldehyddehydrogenase aus *P. aeruginosa* ebenfalls untersucht werden. Hierbei wurde keine Veränderung der Promotoraktivität beim Eintritt in die stationäre Phase festgestellt, Tabelle 10b.

Tab. 10a: β -Galaktosidase Aktivität von *Pseudomonas aeruginosa*-pTB3138 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.

OD ₆₀₀	Miller kU
0,056	125
0,136	74,2
0,231	61,4
0,324	60,4
0,428	62,6
0,500	60,8
0,581	53,1
0,681	60,4

Tab. 10b: β -Galaktosidase Aktivität von *Pseudomonas aeruginosa*-pTB3141 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.

OD ₆₀₀	Miller kU
0,191	46,0
0,360	35,5
0,459	38,9
0,524	35,4
0,592	32,4
0,694	38,3
0,739	36,6
0,825	38,9
0,911	39,2
0,985	44,3
1,001	40,8

3.9.3. Promotoraktivitäten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Mit den vier hergestellten Promotoranalyse-Vektoren und dem leeren pEDY305 Plasmid wurden die β -Galaktosidase Aktivitäten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt. Neben Ethanol wurden die Promotoraktivitäten auch in Kulturen gemessen, die aerob auf den Alkoholen Propanol, 1,2-Propandiol, Glycerol und Butanol wuchsen (2.24.) mit den unter 2.3 aufgeführten Konzentrationen dieser Alkohole. Daneben wurde auch die Induktion der Promotoren beim anaeroben Wachstum auf Ethanol und beim aeroben Wachstum auf Acetat, einem möglichen Folgeprodukt bei der Ethanoloxidation, bestimmt. Als Negativkontrolle wurden die β -Galaktosidase Aktivitäten der verschiedenen Stämme beim aeroben Wachstum auf Succinat bestimmt.

Die Meßergebnisse sind in der Tabelle 11 aufgeführt und in der Abbildung 17 dargestellt. Die β -Galaktosidase Aktivität des leeren pEDY305 Vektors lag bei fast allen Experimenten zwischen 40 und 60 Miller Units, was darauf hindeutet, daß die Kopienzahl des Vektors unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen gleich blieb. Die β -Galaktosidase Aktivität des pTB3140 Konstruktes war zwar zwischen 3-30 fach höher als die des leeren Vektors, aber immer noch um den Faktor 100-600 niedriger als die Aktivität der induzierten Promotoren auf Ethanol. Somit wurde kein separater Promotor vor dem Aldehyddehydrogenase-Gen unter diesen Wachstumsbedingungen induziert. Daß das Aldehyddehydrogenase-Gen wie das Cytochrom *c*₅₅₀ Gen vom Cytochrom *c*₅₅₀ Promotor abgelesen werden, zeigt auch der Vergleich der Ergebnisse mit den Vektoren pTB3139 und pTB3141. Die β -Galaktosidase Akti-

vität mit pTB3139, mit dem die Transkription des Cytochrom c_{550} Gens gemessen wurde, ist bei identischen Wachstumsbedingungen entweder gleich oder größer als die von pTB3141, mit dem die Transkription des Aldehyddehydrogenase-Gens nachgewiesen wurde. Der Cytochrom c_{550} - und der QEDH-Promotor wurden immer gleichzeitig induziert, wobei die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität des Cytochrom c_{550} Promotors um 20-50% niedriger war als die β -Galaktosidase-Aktivität des QEDH-Promotors. Die Induktion beider Promotoren ist beim aeroben Wachstum auf Ethanol am größten.

Tab. 11: Promotoraktivitäten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Substrat	Vektoren				
	pTB3138 ^a	pTB3139 ^a	pTB3140 ^b	pTB3141 ^a	pEDY305 ^b
Ethanol	71,50 +/- 10,07	50,04 +/- 5,39	0,14	50,64 +/- 16,39	0,04
Propanol	59,86 +/- 1,78	32,11 +/- 0,75	0,21	31,59 +/- 3,69	0,05
1,2,-Propandiol	51,96 +/- 6,66	44,82 +/- 9,00	0,124	34,80 +/- 3,35	0,03
Butanol	41,54 +/- 4,21	22,71 +/- 2,58	0,314	19,89 +/- 0,31	0,053
Ethanol, anaerob	39,34 +/- 8,41	44,67 +/- 8,93	0,381	27,76 +/- 1,54	0,069
Succinat	3,42 +/- 0,02	3,61 +/- 0,01	0,81	2,33 +/- 0,09	0,03
Acetat	3,01 +/- 3,35	2,30 +/- 2,39	0,13	1,85 +/- 1,63	0,05

- a) Meßergebnisse in (kU nach Miller) resultieren aus drei unabhängigen Experimenten
 b) Meßergebnisse in (kU nach Miller) resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten

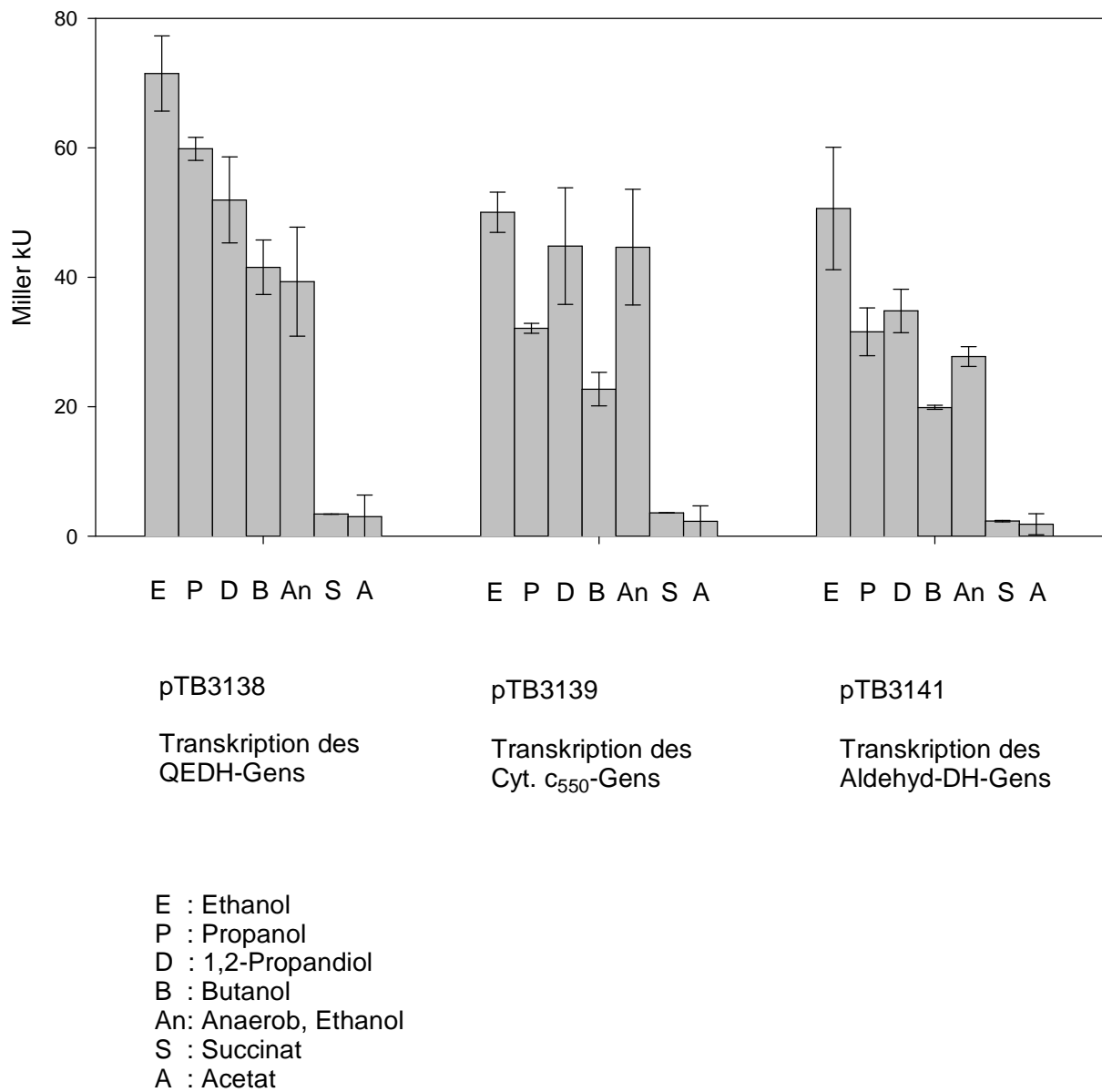


Abb. 17: Graphische Darstellung der Promotoraktivitäten.

3.9.4. Kontrollversuche zu den Promotoraktivitäten

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Schäfer [103], die beim aeroben Wachstum auf Butanol keine QEDH-Aktivität nachweisen konnte, wurde unter diesen Bedingungen eine Induktion des QEDH-Promotors gemessen. Allerdings unterscheiden sich sowohl die Kultivierungsbedingungen als auch die Wachstumsphase, bei der die Zellen geerntet wurden. Deshalb wurde zur Kontrolle auch die QEDH-Aktivität in Zellen bestimmt, die auf Ethanol und Butanol aerob unter identischen Bedingungen wie beim β -Galaktosidase-Nachweis gezüchtet wurden. Zum Vergleich wurden Zellen mit dem gleichen Volumenverhältnis von Kultur zu Kolben wie bei Schäfer [103] gezüchtet, aber nicht wie dort beschrieben bei einer $OD_{400-600}=1,0$, sondern bei einer $OD_{620}=0,5$ abgeerntet.

Um den Einfluß der Promotoranalyse-Vektoren beurteilen zu können, wurden die Versuche außerdem mit *P. aeruginosa*, der das Plasmid für den QEDH-Promotornachweis (pTB3138) enthielt, auf MM-Ethanol-Tc und MM-Butanol-Tc durchgeführt. Desweiteren wurde auf MM-Ethanol-Tc die spezifische Aktivität der QEDH mit den Stämmen *P. aeruginosa*-pTB3001 und *P. aeruginosa*-pLAFR3 bestimmt, Tabelle 12.

Tab. 12: Spezifische QEDH-Aktivitäten auf verschiedenen Substraten und Kultivierungsbedingungen. WT, *P. aeruginosa* Wildtyp. Verhältnis Kulturvolumen zu Kolbenvolumen 1:2 entspricht den Kultivierungsbedingungen in [103]; 1:10 entspricht den Kultivierungsbedingungen der vorangegangenen β -Galaktosidase Nachweise.

Stamm	Substrat	Verhältnis Kulturvol. zu Kolbenvol.	Spezifische QEDH Aktivität [U/mg]
WT	Butanol	1:10	0,48
WT	Butanol	1:2 (Schäfer)	0,19
WT-pTB3138	Butanol-Tc	1:10	0,35
WT	Ethanol	1:10	1,26
WT	Ethanol	1:2(Schäfer)	0,37
WT -pTB3138	Ethanol-Tc	1:10	0,61
WT -pLAFR3	Ethanol-Tc	1:10	1,20
WT -pTB3001	Ethanol-Tc	1:10	1,26

Zellen, die unter ähnlichen Bedingungen wie bei Schäfer [103] kultiviert wurden, enthielten nur 30-40% der spezifischen QEDH-Aktivität wie die Zellen, die auf dem gleichen Substrat mit einem größerem Kolbenvolumen gezüchtet wurden. Entgegen den Ergebnissen von Schäfer [103], die Zellen auf MM-Butanol bis zu einer $OD_{400-600} = 1,44$ züchtete und eine spezifische farbstoffabhängige Aktivität von 0,02 U/mg gemessen hatte, wurden hier eine 10 fach höhere spezifische Aktivität von 0,19 U/mg mit Zellen gefunden, die bei einer $OD_{600} = 0,5$ geerntet wurden.

Enthielt *P. aeruginosa* den Promotoranalyse-Vektor pTB3138, wurden auf MM-Ethanol-Tc nur 48 % der spezifischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf MM-Ethanol gefunden, bei der Kultivierung auf Butanol 72 %. Zur Überprüfung, ob diese Abnahme durch den Vektor oder durch das Antibiotikum bewirkt wurden, wurden die spezifischen Aktivitäten auf MM-Ethanol-Tc mit *P. aeruginosa* und den Vektoren pTB3001, der ebenfalls eine Kopie des QEDH-Promotors enthält und mit *P. aeruginosa*-pLAFR3, dem leeren Vektor bestimmt. Mit beiden Stämmen lag die spezifische Aktivität in der Größenordnung der Aktivität des Wildtyps auf MM-Ethanol.

3.9.5. Promotoraktivitäten der MNNG-Mutanten

Die Plasmide pTB3138 und pTB3139 sind dazu geeignet, Mutanten mit einem Defekt in der Regulation der Transkription des Cytochrom c_{550} - oder des QEDH-Promotors zu identifizieren.

Die beiden Plasmide wurden durch Dreipunkt Kreuzung (2.16.2.) jeweils einzeln in alle 21 Mutanten überführt. Die so erzeugten Stämme wurden in einem Induktionsversuch auf MM-Ethanol-Tc inkubiert (2.3.2.) und anschließend zum Nachweis der β -Galaktosidase (2.21.7.) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 und in Abbildung 18 dargestellt.

Insgesamt zeigten neun Mutanten eine deutlich geringere Transkription des QEDH-Promotors (pTB3138) als der Wildtyp. Sieben dieser neun Mutanten zeigten auch bei der biochemischen Charakterisierung keine QEDH-Aktivität im Induktionstest (3.2.1.) auf Ethanol. Allerdings war sowohl bei Mutante MS1 als auch bei MS14 eine QEDH, bzw. Apo-QEDH vorhanden. Bei drei dieser neun Mutanten wird der Cytochrom c_{550} Promotor scheinbar unbeeinflusst abgelesen.

Tab. 13: Promotoraktivitäten der Mutanten mit den Vektoren pTB3138 und pTB3139.

Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität in Miller kU mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Meßwerte unter 6 kU (nach Miller) wurden grau schattiert. WT - *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyp.

Mutanten	pTB3138			pTB3139		
	[kU] nach Miller			[kU] nach Miller		
1	5,03	+/-	1,71	5,71	+/-	0,70
2	68,26	+/-	2,62	39,80	+/-	5,47
3	89,90	+/-	5,07	75,94	+/-	8,32
4	33,71	+/-	1,32	26,27	+/-	0,91
5	88,27	+/-	5,80	79,38	+/-	3,92
6	36,84	+/-	1,52	32,02	+/-	1,06
7	23,36	+/-	1,31	16,34	+/-	1,15
8	39,52	+/-	2,41	9,10	+/-	0,24
9	2,96	+/-	0,33	3,40	+/-	0,22
10	103,02	+/-	7,51	90,82	+/-	2,18
11	4,02	+/-	1,10	4,03	+/-	0,49
12	1,84	+/-	0,27	69,37	+/-	2,82
13	1,45	+/-	0,18	63,40	+/-	2,83
14	7,47	+/-	0,16	72,34	+/-	0,70
15	1,05	+/-	0,16	0,92	+/-	0,12
16	3,21	+/-	0,53	1,80	+/-	0,16
17	103,29	+/-	7,38	45,71	+/-	0,55
18	43,11	+/-	5,30	76,08	+/-	5,68
19	83,23	+/-	3,50	71,75	+/-	3,43
20	35,36	+/-	2,02	29,91	+/-	1,90
21	0,58	+/-	0,14	0,74	+/-	0,02
WT	63,93	+/-	16,59	35,94	+/-	2,51

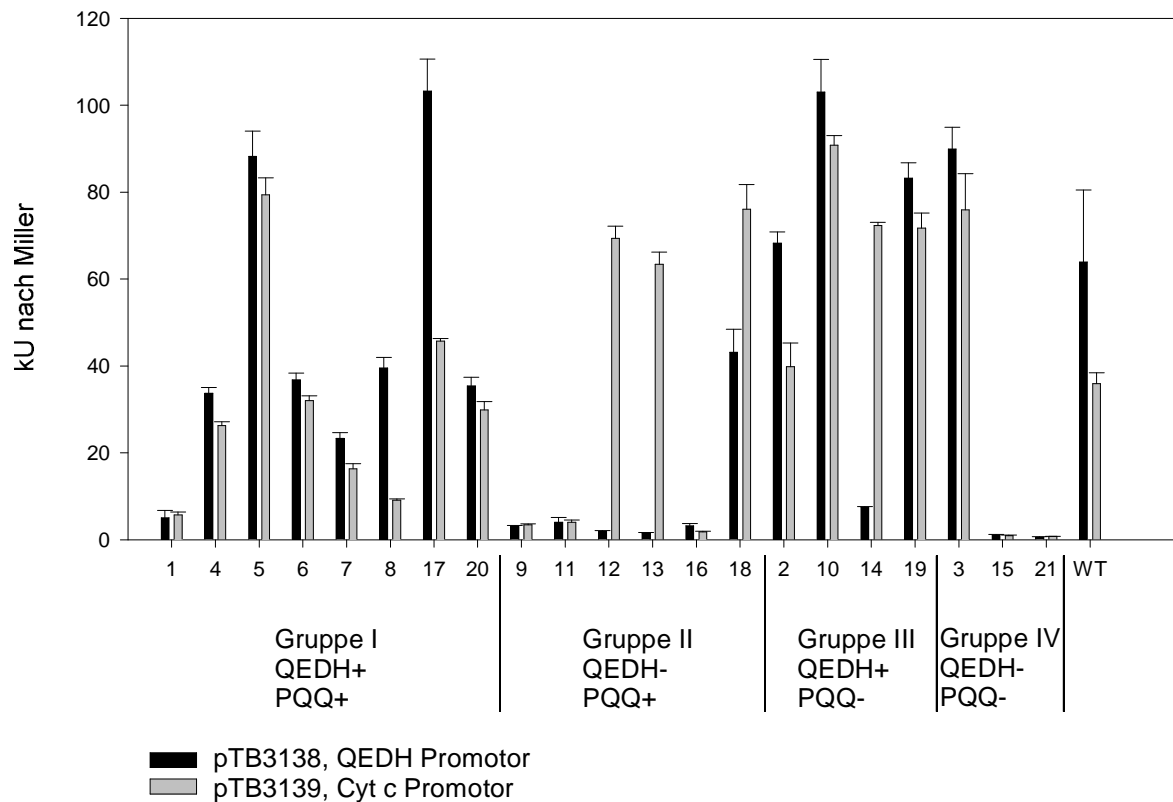


Abb. 18: Graphische Darstellung der Promotoraktivitäten aus Tabelle 13 als Balkendiagramm. (Mutante MS3 wird aufgrund der Promotoraktivität und der Komplementationsexperimente in Gruppe III eingeordnet, siehe Diskussion.)

3.10. DNA-Analyse und Subklone des Cosmids pTB3001

Seit April 1997 wird das Genom von *P. aeruginosa* PAO1 sequenziert. Vorläufige Daten sequenzierter Bereiche können aus Datenbanken über das Internet abgerufen werden. Ebenso ist es möglich, in diesen vorläufigen Daten nach bestimmten DNA-Sequenzen unter verschiedenen Kriterien wie Ähnlichkeit oder zugeordneter Funktion zu suchen. Dies eröffnet die Möglichkeit, das sequenzierte genomische DNA-Fragment von *P. aeruginosa* ATCC 17933 aus pTB3070 in dem Genomprojekt von *P. aeruginosa* PAO1 zu suchen und aus dem Genomprojekt Informationen über die flankierenden DNA-Bereiche zu entnehmen.

3.10.1. Restriktionsanalyse und Vergleich mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Genomprojekt

Durch eine BLAST-Datenbankrecherche (2.19.) wurde mit dem sequenzierten 3,2 kb DNA-Fragment aus pTB3070 das Contig 64 im *P. aeruginosa* Genomprojekt (Ausgabe 15.12.1998) gefunden. Dieses Contig enthält einen Bereich, der zum 3,2 kb DNA-Fragment aus *P. aeruginosa* ATCC 17933 über die gesamte Länge nur 27 unterschiedliche Base enthält und somit 99 % Identität aufweist. Dazu angrenzend wurde das von Diehl *et al.* [66] sequenzierte DNA-Fragment gefunden. Beim Vergleich der DNA-Sequenzen aus *P. aeruginosa* ATCC 17933 mit den Sequenzen aus dem *P. aeruginosa* PAO1 Genomprojekt wurden über eine Länge von 6,4 kb 49 unterschiedliche Basen gefunden.

Durch Vergleich der Fragmentgrößen, die beim Verdau von pTB3001 mit den Restriktionsenzymen *PstI*, *EcoRI* und *BamHI* entstehen, mit den Restriktionsschnittmuster aus dem Genomprojekt konnte das Insert aus pTB3001 auf 1-2 kb genau bestimmt werden, Tabelle 14 und Abbildung 19.

Auf diesem ca. 19 kb DNA-Fragment konnten 16 mögliche Gene identifiziert werden, Tabelle 15.

Tab. 14: Vergleich der Restriktionsfragmente von pTB3001 mit korrespondierenden Fragmenten im Genomprojekt.

DNA-Fragmente kleiner als 0,8 kb konnten nicht mehr detektiert werden. Bis zu einer Fragmentgröße von ~ 7 kb beträgt der Fehler ca. 10 %, oberhalb 7 kb ca. 20-30 %.

Fragmente mit <i>PstI</i> [kb]		Fragmente mit <i>BamHI</i> [kb]		Fragmente mit <i>EcoRI</i> [kb]	
pTB3001	Genomprojekt	pTB3001	Genomprojekt	pTB3001	Genomprojekt
6,4	6,268	6,7	6,482	12,0	10,537
5,0	4,941	4,5	4,271	5,0	5,523
2,6	2,342	1,0	0,999	1,1 a)	(1,147 ?) 1,083
2,0	2,048			1,0	0,951
1,1	1,139				

a) Möglicherweise ist hier eine Doppelbande vorhanden.

contig 64
34536 bp

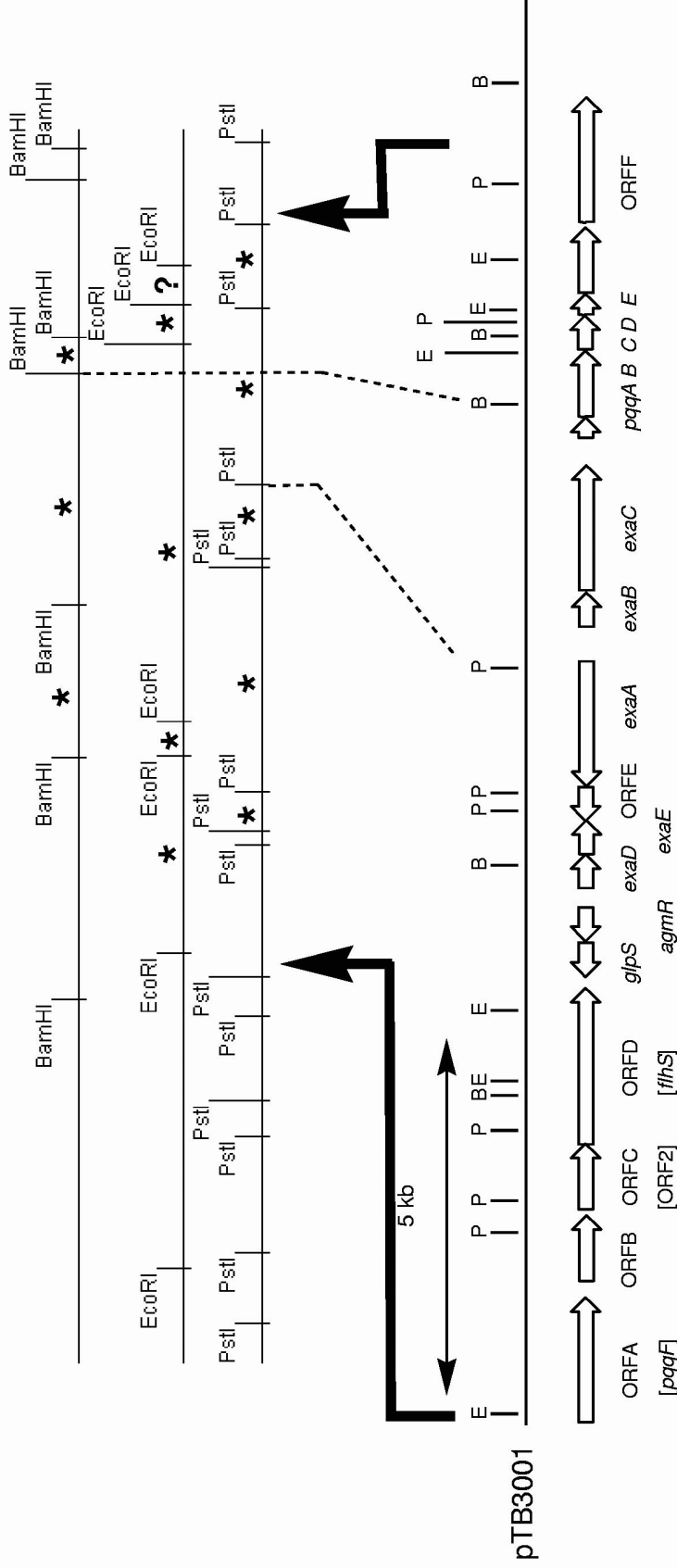


Abb.19: Contig64 und die durch Homologie- und Restriktionsvergleich abgeleitete Insert-DNA aus pTB3001. Beschreibung der Gene in pTB3001, siehe Tabelle 15. Die schwarzen Pfeile markieren die Enden des pTB3001 Inserts. B, *BamHI*; E, *EcoRI*; P, *PstI*. Die mit einem Sternchen markierten Restriktionsfragmente in Contig64 konnten durch Restriktionsanalyse in pTB3001 nachgewiesen werden. Das mit "?" markierte 1,147 kb *EcoRI*-Fragment konnte nicht eindeutig identifiziert werden, da es mit dem 1,083 kb großen *EcoRI*-Fragment in einer Doppelbande läuft. Die gestrichelten Linien zeigen die Position des homologen Bereichs zur Insert-DNA aus pTB3070.

Tab. 15: Beschreibung der 18 Gene von pTB3001:

Aufgeführte Accession-Nr. (Acc.-Nr.) beziehen sich auf die jeweiligen Proteinprodukte der Gene.

Gen	Länge [bp]/[AS]	mögliche Funktion	Referenz	Identität [%] zu:
ORFA	1983/660	PQQ-Biosynthese	Sequenzvergleich	32 %, <i>pqqF</i> [102]
ORFB	1197/398	?	Sequenzvergleich	23 %, Ic-Porin [104]
ORFC	1161/386	?	Sequenzvergleich	34 %, ORF2 Acc.-Nr.: CAA11377
ORFD	2646/881	Regulation	Sequenzvergleich	38 %, <i>flhS</i> Acc.-Nr.: CAA11376
<i>glpS</i>	231/76	Glycerol Regulatorgen, Sensor? aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Acc.-Nr.:AAA25828.1	
<i>agmR</i>	630/209	Glycerol Regulatorgen Responseregulator aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1	[106]	
<i>exaD</i>	819/272	Regulation, Sensorkinase	Sequenzvergleich	38 %, Sensorkinase (?) Acc.-Nr.: CAA22397
<i>exaE</i>	678/225	Regulation, Responseregulator	Sequenzvergleich und [66]	34 %, Responseregulator (?) Acc.-Nr.: AAD24683
ORFE	645/214	?	[105]	
<i>exaA</i>	1872/623	QEDH	[66]	
<i>exaB</i>	438/145	Cytochrom c_{550}	diese Arbeit	33 %, Cytochrom c_6 [94] und (3.6.6.)
<i>exaC</i>	1521/506	Aldehyddehydrogenase	diese Arbeit	65 % Chloracetaldehyd-DH [96] und (3.6.7.)
<i>pqqA</i>	72/23	PQQ-Biosynthese	Sequenzvergleich	78 %, <i>pqqA</i> [101] und (3.6.8.)
<i>pqqB</i>	912/303	PQQ-Biosynthese	Sequenzvergleich	73 %, <i>pqqB</i> [102] und (3.6.9.)
<i>pqqC</i>	750/249	PQQ-Biosynthese	Sequenzvergleich	73 %, <i>pqqC</i> [101]
<i>pqqD</i>	189/92	PQQ-Biosynthese	Sequenzvergleich	60 %, <i>pqqD</i> [53]
<i>pqqE</i>	1143/380	PQQ-Biosynthese	Sequenzvergleich	71 %, <i>pqqE</i> [53]
ORFF	1827/608	?	Sequenzvergleich	31 %, Acyl-Peptid Hydrolase (?) Acc.-Nr.: CAA22736

ORFA zeigt 32 % Identität zum *pqqF* Gen aus *P. fluorescens* [102] und ist möglicherweise nicht vollständig auf dem Cosmid pTB3001 enthalten. Das *pqqF* Genprodukt zeigt Homologien zu Endopeptidasen. Während *pqqF* in *P. fluorescens* unmittelbar vor dem *pqqA* Gen liegt [102], ist es in *M. extorquens* und *M. organophilum* [11] wie auch hier in *P. aeruginosa* etliche kb vom *pqqABCDE* Gencluster entfernt.

Der ORFB codiert ein Protein, welches nur eine schwache Identität von 23% über 226 Aminosäuren zum *lc* Porin Protein Gen eines Bakteriophagen aufweist [104]. Die Funktion von ORFB in *P. aeruginosa* ist unbekannt.

ORFC zeigt 34 % Identität zum ORF2 (Acc.-Nr.: CAA11377) aus *P. denitrificans*, ORFD 38 % Identität über 440 Aminosäuren zum *flhS* Genprodukt (Acc.-Nr.: CAA11376) aus *P. denitrificans*. Die genetische Anordnung von ORF2 und *flhS* in *P. denitrificans* ist identisch mit der Anordnung von ORFC und ORFD in *P. aeruginosa*. Beide Gene aus *P. denitrificans* sind bislang nur als Datenbankeinträge vorhanden. Während Sequenzvergleiche auf keine mögliche Funktion von ORF2 oder ORFC hindeuten, zeigt das *flhS* Genprodukt Identitäten zu Sensorkinasen und ist möglicherweise ein globales Regulationsgen für die Oxidation von Methanol, Methylamin und Formaldehyd in *P. denitrificans* (siehe Datenbankeintrag, Acc.-Nr.: CAA11376). Allerdings ist ORFD (2646 bp) aus *P. aeruginosa* fast doppelt so lang wie das *flhS* Gen (1323 bp). Über die gesamte Länge zeigt das ORFD Genprodukt (881 AS) aus *P. aeruginosa* eine 22 % ige Identität zum *bdfA* Genprodukt aus *Bradyrhizobium japonicum* (873 AS) bei dem es sich vermutlich ebenfalls um eine Sensorkinase handelt. Das *bdfA* Gen ist ebenfalls nur als Eintrag in der Datenbank vorhanden (Acc.-Nr.: AAB97416).

Das Gen *glpS* ist nur als Datenbankeintrag vorhanden (Acc.-Nr.: AAA25828.1) und wird dort als Glycerol-Regulationsgen bezeichnet. Es zeigt 45 % Identität zu einem hypothetischen Protein aus *E. coli* (Acc.-Nr.: I78664), jedoch keine Homologien zu anderen Regulationsgenen. Das Gen *agmR* wurden von Schweizer [106] als Regulationsgen für das Wachstum auf Glycerol identifiziert, das Genprodukt zeigt Homologien zu Responseregulatoren. Die Gene *exaDE* codieren ein Zwei-Komponenten-System, welches an der Regulation der QEDH beteiligt ist, siehe Kapitel 3.10.2. Das Gen *exaD* besitzt 30-38 % Identität zu Sensorkinasen aus *Streptomyces coelicolor* (38 % Identität, Acc.-Nr.: CAA22397) und *Erwinia amylovora*, (30 % Identität, Acc.Nr.: AAD24682).

Das von *exaE* codierte Protein wurde von Diehl *et al.* [66] als Responseregulator identifiziert und besitzt 34 % Identität zum *hprY* Gen aus *Erwinia amylovora* (Acc.Nr.: AAD24683). Zu den Genprodukten von *mxcQE*, dem Zwei-Komponenten-System in methylophilen Bakterien, zeigen die *exaDE* Genprodukte 25 % bzw. 37 % Identität [47].

ORFE ist ein vermutlich periplasmatisches Protein mit unbekannter Funktion, welches dem QEDH-Gen folgt [105], es weist 37 % Identität zu einem hypothetischen Protein unbekannter Funktion aus *Synechocystis sp.* auf.

Die Gene *exaBC* codieren das Apo-Cytochrom c_{550} und die NAD^+ -abhängige Acetaldehyddehydrogenase, Kapitel 3.6.6. und 3.6.7., die Gene *pqqAB* die in Kapitel 3.6.8. und 3.6.9. beschriebenen Gene der PQQ-Biosynthese. Ebenfalls auf dem Cosmid pTB3001 enthalten sind drei weitere Gene der PQQ-Biosynthese, *pqqCDE*. Wobei PqqC 73 % Identität zum *pqqC* Genprodukt aus *A. calcoaceticus* [101] aufweist, PqqD 60 % Identität zum *pqqD* Genprodukt aus *K. pneumoniae* [53] und PqqE 71 % Identität zum *pqqE* Produkt aus *K. pneumoniae* [53]. Die *pqqCD* Gene bilden im Gegensatz zum *pqqC/D* Gen aus *M. extorquens* zwei separate Gene, sie überlappen aber über 4 bp. Das *pqqD* Gen überlappt auch mit dem nachfolgenden *pqqE* Gen über 29 bp.

ORFF ist womöglich nicht mehr vollständig auf dem Cosmid pTB3001 vorhanden. Das Genprodukt zeigt eine 31 % Identität zu einer möglichen Acyl-Peptid Hydrolase aus *S. coelicolor* (Acc.-Nr.: CAA22736), die allerdings nur als Datenbankeintrag vorliegt und über Sequenzvergleiche identifiziert wurde. Fraglich ist, ob dieses Protein in *P. aeruginosa* an der PQQ-Biosynthese beteiligt ist, worauf die unmittelbare Nachbarschaft dieses Gens zum *pqqE* Gen und seine Funktion als Endopeptidase hindeutet. Die *pqqFG* Genprodukte aus *M. extorquens* zeigen ebenfalls Homologien zu Endopeptidasen allerdings nicht zum ORFF.

3.10.2. Subklone von pTB3001 und Komplementierungsexperimente

Durch Komplementierung mit Subklonen von pTB3001 sollten weitere Gene identifiziert werden, die am Ethanol-oxidierenden System in *P. aeruginosa* beteiligt sind.

In Kapitel 3.8.2. wurde bereits die Herstellung der Plasmide pTB3109, pTB3110 und pTB3111 beschrieben. Weiterhin wurden eine Reihe von *PstI*-Fragmenten aus pTB3001 in pUCP20T subkloniert: pTB3112 enthielt ein 6,2 kb, pTB3129 ein 4,9 kb, pTB3115 ein 2,6 kb und pTB3124 ein 1,1 kb Fragment. Ein 2 kb *PstI*-Fragment, das nur das unvollständige Gen der QEDH enthielt, wurde nicht zu den Komplementierungsexperimenten eingesetzt, Abbildung 20.

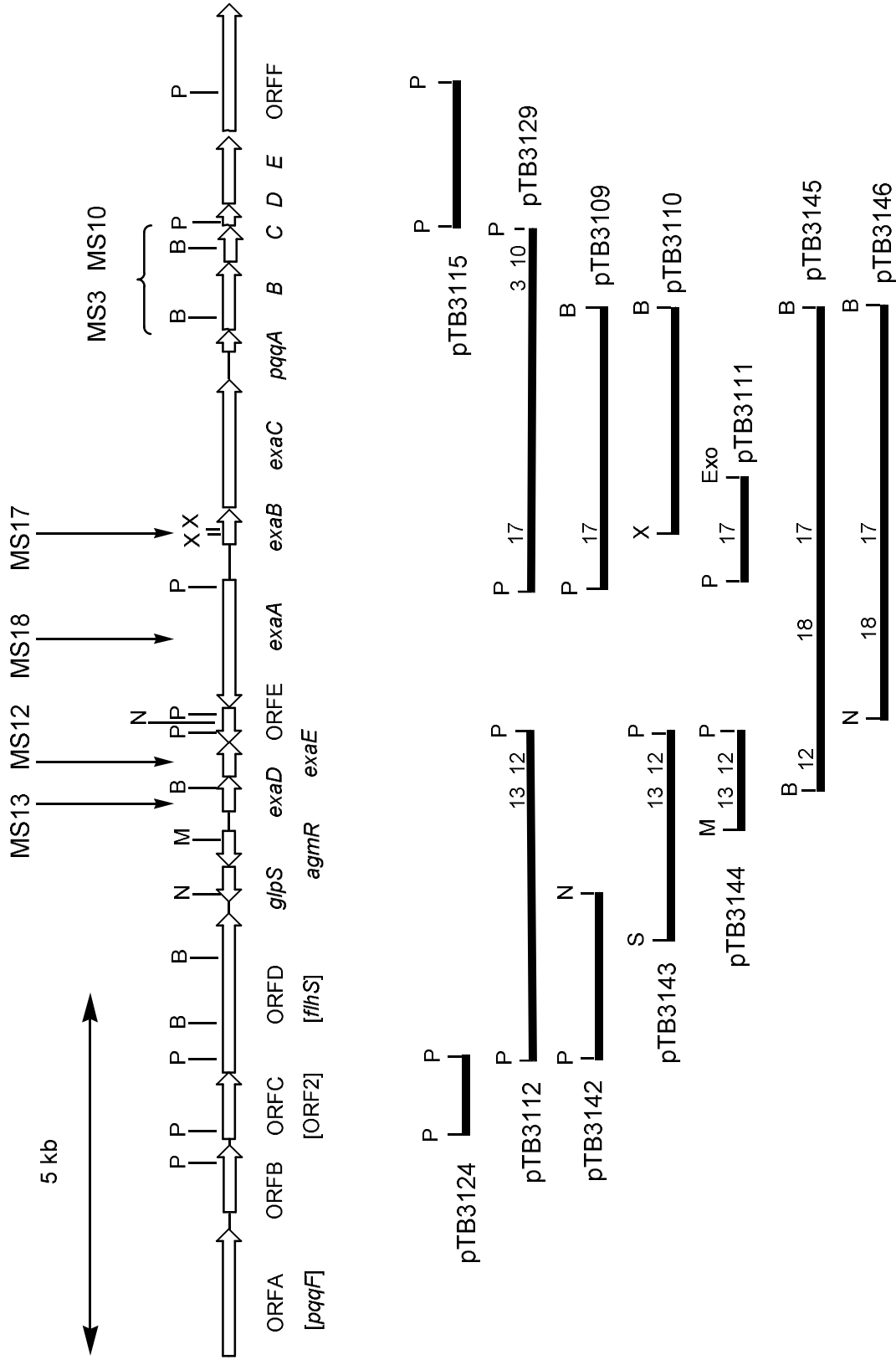


Abb.20: Darstellung der 12 pTB3001 Subklone und die Position der Mutationen von MS3, MS10, MS12, MS13, MS17 und MS18. Die von den jeweiligen Subklonen komplementierten Mutanten sind an der Position des defekten Gens auf den jeweiligen Balken der Subklone dargestellt. B, *BamHI*; M, *MluI*; N, *NotI*; P, *PstI*; S, *SacI*; X, *XhoI*; Exo, durch ExonukleaseIII Verdau erzeugtes Ende.

Aus pTB3112 wurden drei weitere Subklone hergestellt, da auf diesem Fragment zwei verschiedene Zwei-Komponenten-Systeme und ein weiteres Regulationsgen gefunden wurde, Abbildung 21. Plasmid pTB3142 enthält den partiell vorhandenen ORFD mit Homologien zu *flhS* aus *P. denitrificans*. Hierzu wurde pTB3112 mit *NotI* und *HinDIII* geschnitten und die überhängenden Enden nach 2.11.4. aufgefüllt. Der Vektor mit ORFD wurde über eine Agarosegelelektrophorese gereinigt (2.9.1.) und religiert.

Plasmid pTB3143 enthält die beiden Zwei-Komponenten-Systeme. Hierzu wurde das 2,5 kb *SacI*-Fragment aus pTB3112 ausgeschnitten und der übrige Vektor nach einer Reinigung (2.9.1.) religiert. Plasmid pTB3144 enthält nur das Zwei-Komponenten-System *exaDE*. Plasmid pTB3112 wurde hierfür mit *MluI* und *SmaI* geschnitten, die überhängenden Enden aufgefüllt und der Vektor mit den *exaDE* Genen nach einer Reinigung (2.9.1.) religiert.

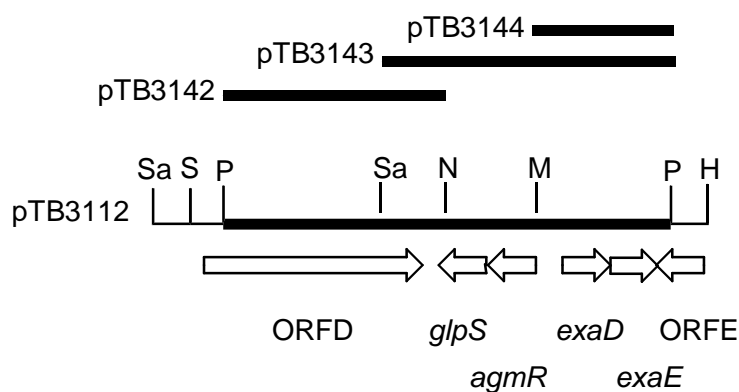


Abb.21: Das 6,2 kb Insert aus pTB3112 und die Insert-DNA aus pTB3142, pTB3143 und pTB3144. Die dünnen Linien bei pTB3112 gehören zum Polylinker aus pUCP20T. Die Gene sind in Tab. 15 beschrieben. H, *HinDIII*; M, *MluI*; N, *NotI*; S, *SmaI*; Sa, *SacI*; P, *PstI*.

Zum Nachweis, ob einige der Mutanten im QEDH-Gen oder in dem der QEDH nachfolgenden unbekanntem ORFE defekt sind, wurde das 6,5 kb Insert aus pTB4003 in pUCP20T kloniert (pTB3145). In Plasmid pTB3146 wurde der ORFE und *exaE* entfernt, indem mit *NotI* und *HinDIII* ein 1,1 kb Fragment ausgeschnitten wurde, Abbildung 22. Der restliche Vektor wurde aufgefüllt (2.11.4.) und religiert.

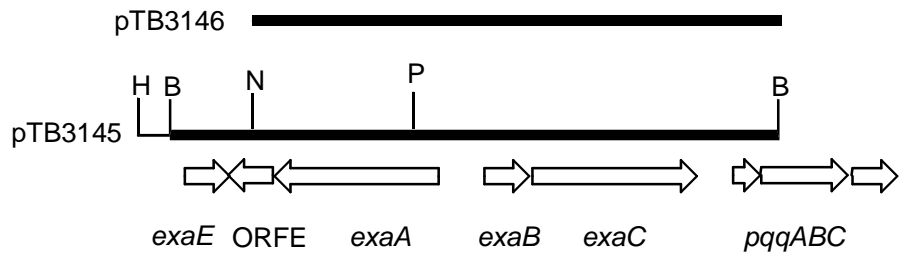


Abb.22: Insert-DNA von pTB3145 und pTB3146. Die dünne Linie bei pTB3145 gehört zum Polylinker aus pUCP20T, nur die relevanten Restriktionsschnittstellen sind angezeigt. Die Gene sind in Tab. 15 beschrieben. B, *BamHI*; H, *HinDIII*; N, *NotI*; P, *PstI*.

Alle Subklone wurden zur Komplementierung der 10 Mutanten eingesetzt (2.16.2.), die auch von pTB3001 komplementiert werden, siehe Abbildung 20.

Die Mutante MS17 wurde von fünf Subklonen komplementiert (pTB3109, pTB3111, pTB3129, pTB3145 und pTB3146). Der kleinste Subklon, pTB3111, enthält nur das *exaB* Gen des Cytochrom c_{550} . Somit ist MS17 in *exaB* defekt.

Die Mutante MS18 wird von den Plasmiden pTB3145 und pTB3146, nicht aber von pTB3109 komplementiert und ist somit im *exaA* Gen der QEDH defekt.

Die Mutanten MS12 und MS13 werden von pTB3112, pTB3143 und pTB3144 komplementiert. Plasmid pTB3144 enthält nur die Gene des Zwei-Komponenten-Systems *exaDE*. MS12 wird außerdem noch von pTB3145, aber nicht von pTB3146 komplementiert und ist somit in *exaE* defekt, während MS13 weder von pTB3145 noch von pTB3146 komplementiert wird und somit in *exaD* defekt ist, siehe Abbildung 20.

Die Mutanten MS3 und MS10 werden von pTB3129 aber nicht von pTB3109 komplementiert und sind somit entweder in *pqqB* oder *pqqC* defekt.

Die Plasmide pTB3110, pTB3115, pTB3142 und pTB3124 komplementierten keine der 10 Mutanten.

Somit wurden bei vier Mutanten die defekten Gene durch Subklonierung identifiziert. Mutante MS12 ist in *exaE*, MS13 in *exaD*, MS17 in *exaB* und MS18 in *exaA* defekt. Bei zwei weiteren Mutanten, MS3 und MS10 konnte der Defekt auf zwei Gene *pqqB* oder *pqqC* eingegrenzt werden.

Zu den Mutanten MS2, MS5, MS15 und MS19 wurden keine komplementierenden Subklone gefunden, da die erzeugten Subklone nicht alle Gene auf pTB3001 abdecken. So wurden keine Subklone mit den vollständigen ORFA, ORFB, ORFC oder ORFD konstruiert. Plasmid pTB3115 trägt zwar die vollständigen *pqqDE* Gene, jedoch nicht den dazugehörigen Promotor, da sie vermutlich ein Operon mit *pqqABCDE* bilden. Zu ORFF schließlich wurde ebenfalls kein Subklon erzeugt.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Ethanol-oxidierende System in *Pseudomonas aeruginosa* zu charakterisieren und zu klären, ob dieses System auf genetischer Ebene ähnlich komplex aufgebaut ist wie das Methanol-oxidierende System methylotropher Bakterien. Weiterhin sollte das Cytochrom c_{550} Gen kloniert, sequenziert und mit der Aminosäuresequenz des korrespondierenden Cytochrom c_L aus methylotrophen Bakterien verglichen werden.

Durch die Charakterisierung und Komplementierung von 21 Defekt-Mutanten wurden Hinweise auf die Anzahl und Art der mutierten Gene erhalten.

4.1. Charakterisierung und Komplementierung der 21 Mutanten

Für die Diskussion der einzelnen Mutanten wurde die Einteilung in vier Gruppen basierend auf den Ergebnissen der biochemischen Charakterisierung (3.2.3.) beibehalten, jedoch wurde die Mutante MS3 in eine andere Gruppe eingeordnet. Hierfür waren die Ergebnisse der Komplementierungsexperimente ausschlaggebend, die sich auch mit den Ergebnissen der Promotoraktivitäten decken. Bei einer chemischen Mutagenese muß ein Gen und das sich daraus ableitende Protein nicht unbedingt vollständig inaktiviert werden. Dies kann, ebenso wie selten auftretende Doppelmutationen die eindeutige Bestimmung der Mutanten-Phänotypen erschweren. Insgesamt 8 Mutanten zeigten trotz niedriger Reversionsrate ein Restwachstum auf MM-Ethanol, was auch die Auswertung der Komplementierungsexperimente erschwerte. Da sie jedoch alle einen eindeutigen Phänotyp aufwiesen, wurde auch mit diesen Mutanten weitergearbeitet.

Bei den Wachstumsexperimenten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (3.5.1. und 3.5.3.) fiel auf, daß eine Reihe komplementierter Mutanten in Flüssigkultur kein Wachstum zeigten, mit der gleichen Kohlenstoffquelle auf festen Nährböden jedoch nach zwei Tagen Kolonien bildeten, während die nichtkomplementierten Kontrollstämme auf festen Nährböden kein oder vermindertes Wachstum zeigten. Die Generationszeiten einiger komplementierter Mutanten sind, besonders beim Wachstum auf MM-Ethanol, erheblich länger als die des Wildtyps. Dies kann dadurch verursacht werden, daß in der komplementierten Mutante neben dem intakten Gen auf dem komplementierenden Cosmid noch das defekte Gen auf dem Genom abgelesen

wird. Ist ein Transkriptionsfaktor für dieses Gen limitierend, kann dadurch die Expression des intakten Gens deutlich gesenkt werden. Dies wurde bei den Bestimmungen der spezifischen QEDH-Aktivität von *P. aeruginosa* auf MM-Ethanol-Tc mit verschiedenen Vektoren beobachtet (3.9.4.): Die spezifische Aktivität der QEDH war konstant, gleichgültig ob die Stämme den leeren Vektor (*P. aeruginosa*-pLAFR3) oder eine weitere Kopie des QEDH-Gens auf dem Cosmid pTB3001 enthielten. Enthielt der Wildtyp jedoch ein Plasmid mit einem funktionellen QEDH-Promotor ohne QEDH-Gen, so sank die spezifische Aktivität um 50 %. Insgesamt sind die Ergebnisse der Charakterisierung und Komplementierung der 21 Mutanten so eindeutig, daß sich neben der Einteilung in vier Gruppen auch noch die Schlußfolgerung ziehen läßt, daß mindestens 17 unterschiedliche Gene in den 21 Mutanten defekt sind.

4.1.1. Gruppe I

In Gruppe I sind 8 Mutanten (MS1, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS17 und MS20) zusammengefaßt, die nach der biochemischen Charakterisierung über eine aktive QEDH, QGDH und eine intakte PQQ-Biosynthese verfügen. Damit umfaßt Gruppe I das breiteste Spektrum möglicher defekter Gene: In den Mutanten dieser Gruppe können Struktur- oder Regulationsgene von Komponenten der Elektronentransportkette oder des Acetaldehydmetabolismus enthalten sein.

Erwartungsgemäß zeigten alle Mutanten dieser Gruppe in Übereinstimmung mit der biochemischen Charakterisierung eine Induktion des QEDH-Promotors durch Ethanol. Ebenso wurde der Cytochrom c_{550} Promotor bei allen Mutanten induziert. Somit ist in diesen Mutanten kein Regulationsgen defekt, welches die Transkription des Cytochrom c_{550} Promotor unabhängig vom QEDH-Promotor reguliert.

Nur die Mutanten MS1, MS4 und MS8 werden von Cosmid pTB3018 komplementiert. Außerdem zeigen alle drei Mutanten kein Wachstum auf MM-Acetat. Weiterführende Arbeiten von Fr. Dr. Kretzschmar zeigten, daß in allen drei Mutanten das Gen einer Acetyl-CoA-Synthetase defekt ist (Kretzschmar, pers. Mitteilung). Ob die geringe Transkription der QEDH- und des Cytochrom c_{550} -Promotoren bei MS1 auch auf diese Mutation zurückzuführen sind, ist unklar. Die Mutante MS7 zeigt ebenfalls wie MS1, MS4 und MS8 kein Wachstum auf Acetat, ist aber in einem anderen Gen defekt, da sie einzig von Cosmid pTB3021 komplementiert wird. Die Funktion des Gens ist unbekannt.

Ebenfalls unbekannt ist die Funktion des defekten Gens in Mutante 20. Diese wird von Cosmid pTB3040 und pTB3055 komplementiert. Cosmid pTB3040 komplementiert zusätzlich MS11 aus Gruppe II, pTB3055 jedoch nur MS20. MS20 zeigt gegenüber dem Wildtyp ein verlangsamtes Wachstum auf MM-Acetat und MM-Glukose.

Die Mutante MS6 wird von vier Cosmiden, pTB3050, pTB3052, pTB3057 und pTB3064 komplementiert, sie zeigt normales Wachstum aerob auf MM-Succinat, MM-Acetat und MM-Glukose aber ein langsames Wachstum anaerob auf LB-KNO₃. Dies deutet auf einen möglichen Defekt in der Cytochrom c Biogenese hin. Durch diesen Defekt wird aerob kein Cytochrom c₅₅₀ gebildet, was das Wachstum auf Ethanol verhindert. Anaerob auf LB-Medium wird ein anderes Cytochrom, Cytochrom c₅₅₁ nicht mehr gebildet, was zu einem langsameren Wachstum führt [90].

Die Mutanten MS5 und MS17 werden beide von Cosmid pTB3001 komplementiert. Obwohl sie den gleichen Phänotyp aufweisen und wie der Wildtyp auf MM-Succinat, MM-Acetat und MM-Glukose wachsen, sind sie in verschiedenen Genen defekt. MS17 wird von dem pTB3001 Subklon pTB3111, welcher nur das Gen des Cytochrom c₅₅₀ enthält, komplementiert. Für MS5 wurde bisher noch kein komplementierender Subklon gefunden. Tabelle 16 gibt eine Zusammenfassung über die Mutanten dieser Gruppe. Insgesamt sind mindestens 6 verschiedene Gene in den Mutanten dieser Gruppe defekt.

Tab. 16: Eigenschaften und mögliche Gendefekte der Mutanten aus Gruppe I. "-" kein komplementierender Subklon vorhanden. Ac-, kein Wachstum auf MM-Acetat. Ac~, Gl~, LB-KNO₃~, langsames Wachstum als der Wildtyp auf MM-Acetat, MM-Glukose oder anaerob auf LB-KNO₃. Wachstum auf MM-Acetat, MM-Glukose, MM-Succinat oder LB-KNO₃ wie der Wildtyp wurde nicht extra aufgeführt.

Mutanten	komplementierende		Wachstumsversuche	Gendefekt
	Cosmide	Subklone		
1	pTB3018	-	Ac-	Acetyl-CoA Synthetase (Kretzschmar, pers. Mitteilung)
4		-	Ac-	
8		-	Ac-	
7	pTB3021	-	Ac-	?
20	pTB3040, pTB3055	-	Ac~; Gl ~	?
6	pTB3050, pTB3052, pTB3057, pTB3064	-	LB-KNO ₃ ~	vermutlich Cytochrom c Biogenese
5	pTB3001	-		?
17		pTB3111		Cytochrom c ₅₅₀

4.1.2. Gruppe II

Die Mutanten aus Gruppe II (MS9, MS11, MS12, MS13, MS16 und MS18) sind aufgrund folgender phänotypischer Eigenschaften zusammengefaßt worden: Sie besitzen keine aktive QEDH, aber eine intakte PQQ-Biosynthese und eine aktive QGDH beim Wachstum auf MM-Glukose. In dieser Gruppe ist entweder das Strukturgen der QEDH, ein Regulationsgen zur Transkription der QEDH oder ein Protein, das zur Reifung der QEDH notwendig ist, defekt. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Promotoraktivitäten (Abbildung 18, in 3.9.5.) fällt sofort auf, daß nur bei MS18 der QEDH-Promotor wie im Wildtyp induziert wird. Bei den restlichen Mutanten dieser Gruppe sind offenbar Regulationsgene defekt. Tatsächlich wird auch nur die Mutante MS18 vom QEDH-Gen (*exaA*) auf dem pTB3001-Subklon pTB3146 komplementiert (3.10.2.).

Die Mutanten MS12 und MS13 werden ebenfalls von Cosmid pTB3001 komplementiert, jedoch von anderen Subklonen: So komplementiert pTB3144, der ein Zwei-Komponenten-System enthält, sowohl MS12 als auch MS13. MS12 wird allerdings auch noch von pTB3145 komplementiert, welcher den Responseregulator des Zwei-Komponenten-Systems trägt. Dieses Zwei-Komponenten-System reguliert die Transkription des QEDH-Promotors, jedoch nicht den benachbarten Cytochrom c_{550} Promotor.

Die übrigen drei Mutanten dieser Gruppe teilen die Gemeinsamkeit, daß sowohl QEDH- als auch der Cytochrom c_{550} Promotor nur schwach induziert werden. Sie werden jedoch von drei verschiedenen Cosmiden komplementiert und unterscheiden sich teilweise in ihren phänotypischen Eigenschaften. MS9 und MS11 wachsen beide weder auf MM-Glukose noch auf MM-Acetat und nur langsam auf MM-Succinat. Trotzdem sie den gleichen Phänotyp aufweisen, werden sie von unterschiedlichen Cosmiden komplementiert und sind somit in verschiedenen Genen defekt: MS9 wird von pTB3035 und MS11 von pTB3040 komplementiert. MS16 wächst nicht auf MM-Acetat und wird von den Cosmiden pTB3052 und pTB3057 komplementiert. Die beiden Cosmide zeigen ein sehr ähnliches Restriktionsmuster und komplementieren neben MS16 auch noch die Mutanten MS6 (Gruppe I) und MS21 (Gruppe IV). Während MS6 auch noch von zwei weiteren Cosmiden komplementiert wird und sich auch phänotypisch von MS16 unterscheidet (siehe Gruppe I), zeigt MS21 einige Parallelen zu MS16 (siehe Gruppe IV, 4.1.4.).

Die Ergebnisse der Charakterisierung und Komplementierungsexperimente weisen auf 6 verschiedene Gene hin, die in den Mutanten der Gruppe II defekt sind, Tabelle 17.

Tab. 17: Eigenschaften und mögliche Gendefekte der Mutanten aus Gruppe II. "-" kein komplementierender Subklon vorhanden. Ac-, Su-, Gl-, kein Wachstum auf MM-Acetat, MM-Succinat oder MM-Glukose. Wachstum auf MM-Acetat, MM-Glukose, MM-Succinat oder LB-KNO₃ wie der Wildtyp wurde nicht extra aufgeführt.

Mutanten	komplementierende		Wachstumsversuche	Transkription des QEDH-Promotors	Transkription des Cyt. <i>c</i> ₅₅₀ Promotors	Gendefekt
	Cosmide	Subklone				
18		pTB3146		+	+	QEDH,
12	pTB3001	pTB3144 pTB3145		-	+	Regulation Response-regulator (<i>exaE</i>)
13		pTB3144		-	+	Regulation Sensorkinase (<i>exaD</i>)
16		pTB3052 pTB3057	-	Ac-	-	-
9	pTB3035	-	Ac-, Gl-, Su~	-	-	Regulation ?
11	pTB3040	-	Ac-, Gl-, Su~	-	-	Regulation ?

4.1.3. Gruppe III

Bei Mutanten dieser Gruppe wurden weder eine aktive QEDH noch eine aktive QGDH oder PQQ im Kulturüberstand nachgewiesen. Jedoch waren jeweils sowohl eine rekonstituierbare Apo-QEDH als auch eine rekonstituierbare Apo-QGDH vorhanden. In dieser Gruppe sind entweder Regulations- oder Strukturgene der PQQ-Biosynthese defekt. Insgesamt zählen 5 Mutanten zur Gruppe III: MS2, MS3, MS10, MS14 und MS19.

Die Mutante MS3, die aufgrund der biochemischen Charakterisierung in Gruppe IV eingeordnet war, wurde in Gruppe III übernommen. Maßgebend für diese Entscheidung waren die Ergebnisse der Komplementierungsexperimente und der Untersuchungen zur Promotoraktivität. MS3 zeigt normale Induktion der QEDH- und Cytochrom *c*₅₅₀ Promotoren und wird von pTB3001 Subklon pTB3129 komplementiert, der die kompletten *pqqABC* Gene aber keine Regulatorgene enthält. Unklar ist warum MS3 nach Rekonstitution im Induktionstest auf

Ethanol (3.2.1.) nur wenig QEDH-Aktivität besitzt, was zunächst zu einer Einordnung in Gruppe IV führte.

Die Mutanten MS2, MS10 und MS19 werden ebenfalls von pTB3001 komplementiert, MS10 auch vom Subklon pTB3129. Alle drei Mutanten zeigen normale Induktionen der QEDH- und Cytochrom c_{550} Promotoren. Im Gegensatz zu MS3 wachsen diese Mutanten auf MM-Glukose etwas langsamer als der Wildtyp.

Mutante MS14 wird als einzige Mutante dieser Gruppe nicht von pTB3001, sondern von pTB3050 komplementiert. Beide Cosmide überlappen in einem ca. 2 kb großen *EcoRI-PstI* Fragment auf dem der ORFA gelegen ist, der zu *pqqF* Genen ähnlich ist. Cosmid pTB3001 enthält ORFA am Ende des Inserts wahrscheinlich unvollständig. Möglicherweise ist ORFA, der Homologien zu *pqqF*-Genen zeigt, mit den dazugehörigen Promotorsequenzen vollständig auf Cosmid pTB3050 enthalten. Allerdings gibt es keinen Subklon aus pTB3050 der die Mutante MS14 komplementiert und einen Hinweis auf das defekte Gen dieser Mutante liefert. Mutante MS14 wächst wie auch MS2, MS10 und MS19 auf MM-Glukose etwas langsamer als der Wildtyp, allerdings zeigt sie bei den Promotoraktivitäten eine deutlich geringere Induktion des QEDH-Promotors.

Tab. 18: Eigenschaften und mögliche Gendefekte der Mutanten aus Gruppe III. "-" kein komplementierender Subklon vorhanden. Gl~, langsames Wachstum auf MM-Glukose, siehe Tabelle 7. Wachstum auf MM-Acetat, MM-Glukose, MM-Succinat oder LB-KNO₃ wie der Wildtyp wurde nicht extra aufgeführt.

Mutanten	komplementierende		Wachstumsversuche	Transkription des QEDH - Promotors	Transkription des Cyt. c_{550} Promotors	Gendefekt
	Cosmide	Subklone				
3	pTB3001	pTB3129		+	+	pqqB oder pqqC
2		-	Gl~	+	+	?
10		pTB3129	Gl~	+	+	pqqB oder pqqC
19		-	Gl~	+	+	?
14		pTB3050	-	Gl~	~	+

4.1.4. Gruppe IV

Die Gruppe IV umfaßt zwei Mutanten, MS15 und MS21, die den folgenden Phänotyp aufweisen: Sie besitzen weder eine intakte PQQ-Biosynthese noch eine rekonstituierbare Apo-QEDH. Beim Wachstum auf MM-Glukose wird aber eine rekonstituierbare Apo-QGDH gebildet. Bei diesen Mutanten wird eine Mutation in einem Regulationsgen vermutet, welches sowohl die QEDH als auch die PQQ-Biosynthese steuert. Die beiden Mutanten dieser Gruppe zeigen auch keine Induktion des QEDH- oder des Cytochrom c_{550} Promotors auf MM-Ethanol. Sie unterscheiden sich allerdings sowohl im Phänotyp als auch durch die komplementierenden Cosmide: MS15 wird von pTB3001 komplementiert und wächst auf MM-Acetat, während MS21 von den Cosmiden pTB3052 und pTB3057 komplementiert wird, und nicht auf Acetat wächst. Somit sind zwei verschiedene Regulationsgene in den Mutanten MS15 und MS21 defekt. Das defekte Gen in MS21 reguliert möglicherweise neben der QEDH, dem Cytochrom c_{550} und der PQQ-Biosynthese noch weitere Komponenten des Ethanol-oxidierenden Systems, die auch zum Wachstum auf Acetat notwendig sind. Zwischen der Mutante MS21 und der Mutante MS16 aus Gruppe II gibt es einige Ähnlichkeiten. Beide wachsen nicht auf MM-Acetat, werden von den gleichen Cosmiden komplementiert und zeigen keine Induktion der QEDH- und Cytochrom c_{550} Promotoren. Der einzige Unterschied liegt in der defekten PQQ-Biosynthese bei MS21.

4.1.5. Regulationsmutanten

Die identifizierten Regulationsmutanten aus *P. aeruginosa* weisen auf ein komplexes Regulationssystem, ähnlich dem Methanol-oxidierenden System methylotropher Bakterien, hin. Dort wurden zwei Zwei-Komponenten-Systeme (*mxbDM*; *mxcQE*) und ein separates Responseregulator-Gen (*mxkB*) gefunden [41, 42, 54]. Mutanten von *Methylobacterium extorquens* in *mxcQE* zeigen, analog zu den Mutanten MS12 und MS13, keine Transkription des QMDH-Promotors. *M. extorquens* Mutanten in *mxbDM* oder *mxkB* zeigen keine Transkription des QMDH-Promotors und haben eine verminderte PQQ-Biosynthese [43, 45, 54]. Die Eigenschaften dieser Mutanten würden am ehesten mit dem Verhalten der Mutante MS15 übereinstimmen, die beim Induktionstest auf MM-Ethanol wenig PQQ produziert. Der Phänotyp von MS21, die beim Induktionstest auf MM-Ethanol kein PQQ produziert, wurde bei den methylotropher Bakterien nicht gefunden. Zu den Regulationsmutanten MS16 und MS21, die

nicht auf MM-Acetat wachsen und somit vermutlich noch weitere Komponenten des Ethanol-oxidierenden Systems regulieren, sind keine äquivalenten Mutanten aus *M. extorquens* bekannt. Ebenso wenig wurden für die Mutanten MS9 und MS11 entsprechende Mutanten in *M. extorquens* gefunden. Beide Mutanten wachsen schlecht auf MM-Succinat und nicht auf MM-Acetat und MM-Glukose. Außerdem findet keine Induktion der QEDH- und Cytochrom c_{550} Promotoren statt, jedoch besitzen beide Mutanten eine intakte PQQ-Biosynthese. Dies deutet auf einen Defekt in einem globalen Regulationsgen hin, welches allerdings nicht die PQQ-Biosynthese regelt.

Tab. 19: Eigenschaften und mögliche Gendefekte aller Regulationsmutanten. "-" kein komplementierender Subklon gefunden, bzw. kein Wachstum/PQQ-Biosynthese, "~" langsames Wachstum auf MM-Succinat, siehe Tabelle 7.

Mutanten	Defekt in Promotor-Regulation	PQQ Biosynth.	Wachstum auf			komplementierende	
			Succinat	Acetat	Glukose	Cosmide	Subklone
9	QEDH/Cyt. c_{550}	+	~	-	-	pTB3035	-
11	QEDH/Cyt. c_{550}	+	~	-	-	pTB3040	-
12	QEDH	+	WT	WT	WT	pTB3001	pTB3144 pTB3145
13	QEDH	+	WT	WT	WT	pTB3001	pTB3144
15	QEDH/Cyt. c_{550}	-	WT	WT	WT	pTB3001	-
16	QEDH/Cyt. c_{550}	+	WT	-	WT	pTB3052 pTB3057	-
21	QEDH/Cyt. c_{550}	-	WT	-	WT	pTB3052 pTB3057	-

4.2. Die genetische Organisation des *exa* Clusters

Die genetische Organisation der Gene von QEDH (*exaA*), Cytochrom c_{550} (*exaB*) und der PQQ-Biosynthese (*pqqAB*) weicht deutlich von der Anordnung der korrespondierenden Gene in methylophilen Bakterien ab. Während in *P. aeruginosa* die Gene der QEDH und des Cytochrom c_{550} von zwei divergent orientierten Promotoren abgelesen werden, liegen die korrespondierenden Gene der QMDH (*mxoF*) und des Cytochrom c_L (*mxoG*), getrennt durch das *mxoJ* Gen, in einem Operon unter der Kontrolle eines Promotors [11]. Vor dem *mxoF* Pro-

motor in methylo trophen Bakterien befindet sich allerdings auch ein zweiter divergent orientierter Promotor. Bei *M. extorquens* AM1 und *M. organophilum* XX folgt diesem Promotor das *mxw* Gen [30,45], bei *P. denitrificans* das *mxz* Gen. Die Funktionen beider Gene beim Wachstum auf Methanol sind ungeklärt [114].

Eine NAD⁺-abhängige Aldehyddehydrogenase, deren Gen in *P. aeruginosa* dem Cytochrom *c₅₅₀* Gen folgt, wurde auch bei *Comamonas testosteroni* beschrieben, die dort dem Gen der Quinohämoprotein-Ethanoldehydrogenase [107] folgt.

In *P. aeruginosa* ist die enge Nachbarschaft der PQQ-Biosynthesegene zu dem *exa* Gencluster ebenfalls ungewöhnlich. In *M. extorquens* befindet sich vor den PQQ-Biosynthesegenen außerdem noch ein Zwei-Komponenten-System [42].

Nach Sequenzinformationen, die dem *P. aeruginosa* Genomprojekt entnommen wurden, finden sich in der Umgebung des *exa* Genclusters keine Gene, die Ähnlichkeiten zu dem *mxj* oder *mxl* Gen aufweisen. Beide codieren in methylo trophen Bakterien periplasmatische Proteine, Mxj ist für die korrekte Faltung der QMDH essentiell, Mxl ist die kleine Unter-einheit der QMDH. In *P. aeruginosa* folgt dem *exaA* Gen ORFE, der möglicherweise auch für ein periplasmatisches Protein codiert. Dieses weist jedoch keine Homologien zu Mxj oder Mxl auf, und ist offenbar auch zur Expression der QEDH in *E. coli* nicht essentiell.

Dem ORFE folgt ein Responseregulator der in entgegengesetzter Richtung orientiert ist und ebenfalls von Diehl *et al.* [66] sequenziert wurde. Erst im Rahmen dieser Arbeit konnte geklärt werden, daß dieser Responseregulator zu einem Zwei-Komponenten-System gehört und für die Transkription der QEDH notwendig ist. Das Gen der Sensor kinase wurde *exd*, das Gen des Responseregulators *exe* benannt.

4.3. Analyse der Cytochrom *c₅₅₀* Sequenz

Die von *exb* abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt alle Merkmale eines periplasmatischen c-Typ Cytochroms: Eine Signalsequenz, ein typisches Hämbindemotiv CXXCH, und zwei Methionine von denen eines als möglicher sechster Ligand des Hämeisens in Frage kommt. Nach Sequenzvergleichen scheint der Methioninrest an Position 98, dem ein Prolin an Position 99 folgt, diese Funktion zu übernehmen. Dieses Motiv MP mit Methionin als sechstem Liganden ist sowohl beim Cytochrom *c₆* aus *Chlamydomonas reinhardtii* als auch bei weiteren c-Typ Cytochromen aus Blaualgen an der gleichen Position konserviert [108].

Weiterhin enthält die von *exb* abgeleitete Aminosäuresequenz auch die 33 Aminosäuren umfassende N-terminale Sequenz, die von Donner (unveröffentlicht) für das gereinigte Cyto-

chrom c_{550} bestimmt wurde. Die abgeleitete Sequenz des reifen Proteins stimmt in der molekularen Masse und im theoretisch berechneten pI mit den experimentellen Daten von Reichmann & Görisch [81] überein. Auch das heterolog in *E. coli* exprimierte Cytochrom c_{550} zeigt im Spektrum und im Ferricyanit-Test keine Unterschiede zum nativen Cytochrom c_{550} aus *P. aeruginosa*, womit eindeutig gezeigt wurde, daß Cytochrom c_{550} von *exaB* codiert wird. Interessanterweise wies die abgeleitete Aminosäuresequenz des *exaB* Gens praktisch keine Ähnlichkeiten mit Cytochrom c_L aus *M. extorquens* (~20% Identität) auf. Dies war unerwartet, da beide Proteine direkte Elektronenakzeptoren eines Quinoproteins sind. Höhere Identitäten zwischen 31 und 35 % zur Cytochrom c_{550} Sequenz wiesen neben dem Cytochrom c_6 der Blaualge aus *C. reinhardtii* [94] auch die C-terminale Häm-domäne der QH-EDH aus *Glucobacter suboxydans* [95] auf. Eine nur 26 %ige Identität wurde zur Häm-domäne der löslichen QH-EDH von *Comamonas testosteroni* gefunden. Anthony [113] postulierte, daß Quinohämoproteine Fusionen zwischen Quinoproteinen und Cytochrom c_L sein könnten, jedoch gab es keine signifikanten Homologien zwischen Cytochrom c_L und den Häm-domänen der QH-EDHs. Demgegenüber zeigen die Homologien zwischen Cytochrom c_{550} und der Häm-domäne der QH-EDH aus *G. suboxydans*, daß dieses Quinohämoprotein ein Fusionsprotein zwischen einem Quinoprotein und Cytochrom c_{550} sein kann. Im Gegensatz zum Cytochrom c_{550} weist die QEDH dagegen eine höhere Identität (38 %) zur QH-EDH aus *C. testosteroni* und nur geringere Identitäten (33- 34 %) zu QH-EDHs aus *Acetobacter* und verschiedenen QMDHs auf.

Cytochrom c_L ist eine essentielle Komponente des Methanol-oxidierenden Systems. Da keine Ähnlichkeit zu Cytochrom c_{550} bestehen, trat die Frage auf, ob Cytochrom c_{550} eine essentielle Komponente des Ethanol-oxidierenden Systems in *P. aeruginosa* ist. Um diese Frage zu klären, wurde das *exaB* Gen mit einer Kanamycinkassette unterbrochen. Die so hergestellte Insertionsmutante zeigte kein Wachstum auf Ethanol und konnte mit dem *exaB* Gen *in trans* komplementiert werden. Damit kann ein negativer Effekt der eingesetzten Kassette auf das folgende Gen der NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenase ausgeschlossen werden. Aus der phänotypischen Charakterisierung der Mutante zeigt sich, daß Cytochrom c_{550} ebenfalls zum Wachstum auf Propanol und 1,2-Propandiol notwendig ist. Für das Wachstum auf Butanol scheint Cytochrom c_{550} beteiligt aber nicht essentiell zu sein, da die Mutante hier ein vermindertes Wachstum aufweist, während auf anaeroben Wachstum mit Ethanol Cytochrom c_{550} keine Rolle spielt.

4.4. Transkription des *exa* Clusters

Mit *lacZ*-Fusionen wurde zum einen die Transkription der QEDH-, Cytochrom *c*₅₅₀- und Aldehyddehydrogenase-Gene studiert und mit der Transkription vergleichbarer Gene in methylotrophen Bakterien verglichen. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob die Gene, die für die NAD⁺-abhängige Aldehyddehydrogenase und das Cytochrom *c*₅₅₀ codieren, ein Operon bilden oder ob sich ein weiterer Promotor vor dem Aldehyddehydrogenase-Gen befindet.

4.4.1. Organisation und Motive der *exaA-exaB* Promotoren

Die Promotoren des QEDH- (*exaA*) und des Cytochrom *c*₅₅₀ Gens (*exaB*) liegen eng benachbart und sind divergent zueinander orientiert. Diese Genorganisation wird häufig beobachtet [109] und auch vor dem QMDH-Gen (*mxoF*) methylotropher Bakterien findet sich ein divergenter Promotorbereich. Bei *M. extorquens* AM1 und *M. organophilum* XX liegt vor *mxoF* und in entgegengesetzter Richtung das *mxoW* Gen, bei *P. denitrificans* das *mxoZ* Gen. Die Genprodukte zeigen keine Homologie zueinander und Mutationen in den beiden Genen führen bei methylotrophen Bakterien nur zu einem vermindertem Wachstum auf Methanol. Xu *et al.* [45] beschreiben in dem *mxoW-mxoF* Promotorbereich aus *M. organophilum* XX eine Haarnadelstruktur, mit einer für Prokaryonten typischen Consensus Sequenz für die Bindestelle eines positiven Regulators [110]. In der *exaA-exaB* Promotorregion von *P. aeruginosa* findet sich ebenfalls eine Haarnadelstruktur, die jedoch keine Übereinstimmung mit der bei Xu *et al.* [45] beschriebenen Sequenz zeigt. Für *M. organophilum* XX beschreiben Xu *et al.* [45] außerdem eine Heptanukleotidsequenz AGAAATG die dreimal im *mxoW-mxoF* Promotorbereich vorkommt und auch bei *M. extorquens* gefunden wurde. Eine leicht abgewandelte Heptanukleotidsequenz AGAAACG findet sich auch vor dem *pqqA* Gen in *M. organophilum* XX. Im *exaA-exaB* Promotorbereich von *P. aeruginosa* finden sich ebenfalls zwei sehr ähnliche Heptanukleotidsequenzen (CCAAAGC und CCAAACG) die jeweils zweimal vorkommen. Vor dem *pqqA* Gen (CCAAATC) und dem *exaD* Gen (CCAAAGT, Sequenz aus dem *P. aeruginosa* Genomprojekt entnommen) finden sich zwei Varianten dieser Sequenzen. Darüber hinaus wurde bei *P. aeruginosa* eine Sequenz GCCCCGC gefunden die einmal vor dem *pqqA* Gen und einmal im *exaA-exaB* Promotorbereich vorhanden ist. Diese

Heptanukleotidsequenzen könnten Bindungsstellen für Regulationsproteine darstellen und auch vor anderen induzierbaren Genen des Ethanol-oxidierenden Systems vorhanden sein.

4.4.2. Transkription und Regulation der *exaA-exaB* Promotoren

Durch Wachstumsversuche und Nachweis der QEDH-Aktivität konnte Schäfer [103] bereits zeigen, daß die QEDH beim Wachstum auf Ethanol und Propanol induziert wird. Keine Aktivität wurde beim Wachstum auf Succinat gefunden. Da nur auf Ethanol angezüchtete Zellen in der Lage waren auf Acetaldehyd zu wachsen, liegt die Vermutung nahe, daß Ethanol und nicht Acetaldehyd der Induktor des Ethanol-oxidierenden Systems ist. Im Gegensatz hierzu fanden de Vries *et al.* [115] bei *P. denitrificans*, daß nicht Methanol, sondern vermutlich Formaldehyd die Expression der QMDH induziert. Bei *M. extorquens* und *M. organophilum* ist der Induktor nicht bekannt, da die QMDH aber auch durch Methylamin induziert wird, scheint auch hier Formaldehyd in Frage zu kommen.

Im Gegensatz zur QEDH aus *P. aeruginosa* wird die Expression der QMDH in methylo-trophen Bakterien beim Wachstum auf Succinat nicht so deutlich unterdrückt [41]. So liegt die Transkription des QMDH-Gens in *M. extorquens* und *M. organophilum* auf Succinat um 85 % niedriger als beim Wachstum auf Methanol. Bei *P. aeruginosa* liegt die Transkription des QEDH-Promotors auf Succinat um 95 % niedriger als beim Wachstum auf Ethanol.

Der *exaB* Promotor in *P. aeruginosa* wurde beim Wachstum auf Ethanol ebenfalls induziert, jedoch mit einer um ca. 40 % verminderten Aktivität als der *exaA* Promotor. Die gleiche Tendenz zeigt der *mxwW* Promotor von *M. organophilum* beim Wachstum auf Methanol, jedoch ist die Aktivität im Gegensatz zum *mxwF* Promotor um 85 % vermindert. Die divergent orientierten Promotoren in *P. aeruginosa* und methylo-trophen Bakterien werden scheinbar immer gleichzeitig induziert. Dennoch gibt es offensichtlich unterschiedliche Regulationsgene für die jeweiligen Promotorpaare. So wurden in *P. aeruginosa* zwei Mutanten gefunden (MS12; MS13) bei denen auf Ethanol keine Transkription des *exaA*- aber normale Transkription des *exaB* Promotors beobachtet wurde (siehe 3.9.5.). In 4.1.5. wurde bereits zu den Mutanten MS12 und MS13 auf die ähnlichen Phänotypen bei *mxwQE* Mutanten methylo-tropher Bakterien hingewiesen. Tatsächlich wird bei *mxwQE* Mutanten der *mxwW* Promotor auf Methanol normal induziert, während der *mxwF* Promotor keine Aktivität zeigt. Das gleiche Verhalten zeigen beide Promotoren aber auch in *mxwB* Mutanten, die zusätzlich auch noch eine verminderte PQQ-Biosynthese aufweisen. Bei den *mxwDM* Mutanten wiederum zeigen

weder der *mxw* noch der *mxF* Promotor Aktivität, was analog für die Aktivität der *exaA*-*exaB* Promotoren der *P. aeruginosa* Mutanten MS9, MS11, MS15, MS16 und MS21 gilt.

4.4.3. Transkription von *exaA* und *exaB* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Die Aktivität des *exaA* Promotors hängt vom Wachstumssubstrat ab: Die Induktion durch die verschiedenen Substraten nimmt in nachstehender Reihe ab: Ethanol>Propanol>1,2-Propan-diol >Butanol >Ethanol, anaerob. Dabei ist die Aktivität bei anaerobem Wachstum auf Ethanol um 45 % geringer ist, als bei aerobem Wachstum. Die Aktivität des *exaB* Promotors sinkt auf den gleichen Kohlenstoffquellen in folgender Reihenfolge: Ethanol>1,2-Propan-diol~ Ethanol, anaerob>Propanol>Butanol. Die Aktivität auf Butanol beim aeroben Wachstum ist um 56 % geringer als auf Ethanol. Auf Succinat und Acetat fand keine signifikante Induktion der beiden Promotoren statt.

Daß die *exaA* und *exaB* Promotoren bei aeroben Wachstum nicht nur auf Ethanol, sondern auch auf Propanol und 1,2-Propan-diol induziert werden, war nicht unerwartet, da Schäfer [103] eine QEDH-Aktivität auf Propanol gefunden hatte und Schernhorst [111] Hinweise auf eine Quinoprotein-Alkoholdehydrogenase beim Wachstum auf 1,2-Propan-diol hatte. Beim anaeroben Wachstum auf Ethanol identifizierten Kehr [112] und Schernhorst [111] eine NAD^+ -abhängige Alkoholdehydrogenase und konnten keine QEDH-Aktivität feststellen. Daß trotzdem beide Promotoren unter diesen Wachstumsbedingungen induziert wurden, war allerdings auch hier nicht gänzlich unerwartet. Ein identisches Verhalten ist von der QGDH aus *P. aeruginosa* beschrieben: Während das aktive Enzym beim aeroben Wachstum auf Glukose gebildet wird, findet unter anaeroben Wachstumsbedingungen nur die Bildung der Apo-QGDH statt, da keine PQQ-Biosynthese stattfindet. Das Apo-Enzym kann mit PQQ rekonstituiert werden [87].

Die Induktion der *exaA* und *exaB* Promotoren bei aerobem Wachstum auf Butanol stand allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen von Schäfer [103], die unter diesen Bedingungen keine QEDH-Aktivität feststellen konnte. Jedoch zeigten Versuche in der vorliegenden Arbeit, daß die Zellen geringe QEDH-Aktivität besaßen. Die spezifische Aktivität mit 0,48 U/mg ist dabei deutlich niedriger als beim Wachstum auf Ethanol mit einer spezifischen Aktivität von 1,26 U/mg. Dieses Verhältnis stimmt mit den Ergebnissen der Promotoraktivitäten überein. Der Widerspruch zu den Ergebnissen von Schäfer [103] ist möglicherweise

auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen, die sich sowohl im Volumenverhältnis Kultur:Kolben, als auch in der Wachstumsphase, bei der die Zellen geerntet wurden, unterschieden. Kontrollversuche zeigten, daß die Kultivierungsbedingungen bei Schäfer [103] nicht optimal für die Induktion der QEDH waren.

Trotzdem bei aeroben Wachstum auf Butanol sowohl die Induktion des *exaA* und *exaB* Promotors und eine aktive QEDH nachgewiesen wurde, scheint das Ethanol-oxidierende System auf MM-Butanol entweder nicht alleine oder mit zusätzlichen Komponenten induziert zu werden. Dafür sprechen die Wachstumsversuche der Insertionsmutante MS25, bei der das Cytochrom *c₅₅₀* Gen ausgeschaltet wurde und die auf Butanol trotzdem aber deutlich langsamer als der Wildtyp wächst. Auf Ethanol, Propanol und 1,2-Propandiol findet dagegen kein Wachstum statt.

4.4.4. Transkription der Aldehyddehydrogenase

Parallel zu den Untersuchungen der *exaA* und *exaB* Promotoren wurde auch die Transkription des Aldehyddehydrogenase-Gens (*exaC*) studiert um zu klären, ob *exaB* und *exaC* ein Operon bilden oder ob ein zweiter Promotor vor dem Gen der Aldehyddehydrogenase vorhanden ist. Ohne den *exaB* Promotor wurde keine signifikante Transkription des *exaC* Gens beobachtet, mit dem *exaB* Promotor war die Transkription des Aldehyddehydrogenase-Gens stets gleich groß oder wenig geringer als die Transkription des *exaB* Gens. In *E. coli* ist eine Aldehyddehydrogenase beschrieben, die erst in der stationären Phase exprimiert wird [99]. In *P. aeruginosa* dagegen ist die Transkription des *exaC* Gens unabhängig von der Wachstumsphase.

Somit konnte gezeigt werden, daß *exaB* und *exaC* ein Operon bilden und unter den beschriebenen Wachstumsbedingungen kein zweiter Promotor vor dem *exaC* Gen aktiv ist.

5. Zusammenfassung

Bei den Pyrrolochinolinchinon (PQQ) abhängigen Quinoproteinen handelt es sich um Oxidoreduktasen, die Alkohole und Aldosen oxidieren und bislang nur im Periplasma Gram-negativer Bakterien gefunden wurden. Am intensivsten wurde das Quinoprotein-Methanoldehydrogenase System aus *Methylobacterium extorquens* untersucht, welches auf genetischer Ebene erstaunlich komplex organisiert ist und aus mindestens 25 Genen besteht. Bisher gab es keine Erkenntnisse, ob Quinoprotein-Alkoholdehydrogenase Systeme in anderen Bakterien genetisch ähnlich komplex aufgebaut sind wie das Methanol-oxidierende System bei methylotrophen Bakterien. Diese Frage sollte durch die genetische Untersuchung des Ethanol-oxidierenden Systems bei *Pseudomonas aeruginosa* bearbeitet werden.

Das Ethanol-oxidierende System von *P. aeruginosa* wird bei aerobem Wachstum auf Ethanol induziert und besteht aus einer löslichen PQQ-abhängigen Quinoprotein-Ethanoldehydrogenase (QEDH) und einem löslichen Cytochrom c_{550} . Da weitere Komponenten dieses Stoffwechselweges und der beteiligten Elektronentransportkette nicht bekannt waren, sollte mit dem genetischen Ansatz auch die Grundlage geschaffen werden, bisher unbekannte Komponenten zu identifizieren.

Um Gene zu finden, die für das Wachstum auf Ethanol essentiell sind, sollten Mutanten, die nicht mehr auf Ethanol wachsen können mit einer Cosmid-Genbank komplementiert werden. Hierzu wurde *P. aeruginosa* mit MNNG mutagenisiert und 21 Mutanten isoliert, die zwar auf Succinat, aber nicht mehr auf Ethanol wachsen können. Diese Mutanten wurden biochemisch charakterisiert und in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe I mit einem möglichen Defekt in einem Regulations- oder Strukturgen einer Komponente der Elektronentransportkette oder des Metabolismus von Acetaldehyd. Gruppe II mit einem Defekt in einem Regulations- oder Strukturgen der QEDH oder einer Komponente, die für die Reifung der Apo-QEDH essentiell ist. Gruppe III mit einem Defekt in einem Regulations- oder Strukturgen der PQQ-Biosynthese und Gruppe IV mit einem Defekt in Regulationsgenen, die sowohl die QEDH als auch die PQQ-Biosynthese regulieren.

Die Mutanten konnten mit insgesamt 10 Cosmiden einer Cosmid-Genbank aus *P. aeruginosa* komplementiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch das Gen des Cytochrom c_{550} kloniert. Dazu mußte zuerst von der durch P. Donner bestimmten N-terminalen Aminosäuresequenz eine Gensonde abgeleitet werden. Mit dieser Gensonde wurde durch Southern-Blot Analysen ein 3,2 kb Fragment des komplementierenden Cosmids pTB3001 identifiziert. Sequenzierung und DNA-Analyse des 3,2 kb Fragments führten zur Identifizierung von 2 partiellen und 3 vollständigen offenen Leserahmen. Der erste, partiell vorhandene, offene Leserahmen wurde *exaA* benannt und codiert den N-terminalen Bereich der QEDH. Zu diesem Gen divergent orientiert folgt das Gen des Cytochrom c_{550} (*exaB*) dem sich das Gen einer NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenase (*exaC*) anschließt. Hinter dem *exaC* Gen liegt eine typische intrinsische Terminatorsequenz. Anschließend folgen noch zwei Gene der PQQ-Biosynthese, *pqqA* und *pqqB*, wobei das Letztere ebenfalls nur partiell vorliegt.

Während die *pqqAB* Gene nur durch Sequenzvergleiche identifiziert wurden, konnten *exaB* und *exaC* heterolog in *E. coli* JM109 exprimiert werden. Die biochemische Charakterisierung der Genprodukte bestätigte, daß es sich bei den Proteinen um Cytochrom c_{550} und eine NAD^+ -abhängige Aldehyddehydrogenase handelt.

Die Aminosäuresequenz von Cytochrom c_{550} wies überraschenderweise keine Homologien zu Cytochrom c_L aus *M. extorquens* auf, welches ebenfalls Elektronenakzeptor eines Quinoproteins ist. Um zu zeigen, daß Cytochrom c_{550} eine essentielle Komponente des Ethanol-oxidierenden Systems darstellt, wurde *exaB* in *P. aeruginosa* durch eine Insertionsmutagenese mit einer Kanamycinkassette unterbrochen. Diese Mutante zeigte kein Wachstum auf Ethanol, Propanol und 1,2-Propandiol und verlangsamtes Wachstum auf Butanol.

Um die Regulation des Ethanol-oxidierenden Systems zu studieren, wurde die Transkription der *exaABC* Gene mit Promotoranalyse-Vektoren untersucht. Hierbei wird ein promotorloses Gen der β -Galaktosidase mit eigener Ribosomen-Bindestelle in das zu untersuchende Gen kloniert. Promotoraktivitäten können dann durch Messung der β -Galaktosidase Aktivität bestimmt werden. Diese Experimente zeigten, daß die divergent zueinander orientierten Promotoren von *exaA* und *exaB* auf Ethanol am stärksten induziert werden. Aber auch auf Propanol, 1,2-Propandiol, Butanol und beim anaeroben Wachstum auf Ethanol fand eine Induktion beider Gene statt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Gene von Cytochrom c_{550} (*exaB*) und der NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenase (*exaC*) eine Transkriptionseinheit bilden.

Mit den Promotoranalyse-Vektoren für die Gene der QEDH (*exaA*) und des Cytochrom *c*₅₅₀ (*exaB*) konnten von den 21 erzeugten Mutanten sieben als Regulationsmutanten identifiziert werden. Bei fünf Mutanten wurde auf Ethanol weder *exaA* noch *exaB* abgelesen, bei zwei Mutanten waren Regulationsgene defekt, die die Transkription von *exaA* aber nicht von *exaB* regulieren. Zu diesen Mutanten konnten durch Komplementierung mit Subklonen von pTB3001 und mit Informationen aus dem *P. aeruginosa* Genomprojekt die defekten Regulationsgene als ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus Sensorkinase und Responseregulator, bestimmt werden.

Bei weiteren Komplementierungsexperimenten mit Subklonen des Cosmid pTB3001 wurden neben dem Zwei-Komponenten-System noch zwei Mutanten mit Defekten im *exaA* bzw. *exaB* Gen identifiziert. Bei zwei weiteren Mutanten konnte der Defekt auf die Gene *pqqBC* eingegrenzt werden.

Die Zusammenfassung aller Informationen zu den 21 Mutanten aus der biochemischen Charakterisierung, den Komplementierungsexperimenten und den Wachstumsversuchen ergibt, daß mindestens 17 Gene in diesen Mutanten defekt sind. Somit konnte gezeigt werden, daß das Ethanol-oxidierende System aus *P. aeruginosa* auf genetischer Ebene ebenfalls wie das Methanol-oxidierende System aus methylotrophen Bakterien komplex organisiert und reguliert ist.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Hauge, J.G. (1964) Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group. *J. Biol. Chem.* **239**, 3630-3639.
- [2] Anthony C. & Zatman, L.J. (1967) The microbial oxidation of methanol. The prosthetic group of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas sp.* M27: a new oxidoreductase prosthetic group. *Biochem. J.* **104**, 960-9.
- [3] S.A. Salisbury, Forrest, H.S., Cruse, W.B. & Kennard, O. (1979) A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature* **280** 843-4.
- [4] Duine, J.A., Frank, J., Verwiel, P.E. (1980) Structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **108**, 187-92.
- [5] Harris, E.D. (1992) The pyrroloquinoline quinone (PQQ) coenzymes: a case of mistaken identity. *Nutr. Rev.* **50**, 263-7 .
- [6] Klinman, J.P. & Mu, D. (1994) Quinoenzymes in Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 299-344.
- [7] Janes, S.M., Mu, D., Wemmer, D., Smith, A.J., Kaur, S., Maltby, D., Burlingame, A.L. & Klinman, J.P. (1990) A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science* **248**, 981-7.
- [8] McIntire, W.S. & Hartman, C. (1993) Copper-containing amine oxidases. In: *Principles and Applications of Quinoproteins* (V.L. Davidson ed.), pp 97-171. Marcel Dekker, New York.
- [9] McIntire, W.S., Wemmer, D.E., Chistoserdov, A. & Lidstrom, M.E. (1991) A new cofactor in a prokaryotic enzyme: tryptophan tryptophylquinone as the redox prosthetic group in methylamine dehydrogenase. *Science* **252**, 817-24.
- [10] Wang, S.X., Mure, M., Medzihradzky, K.F., Burlingame, A.L., Brown, D.E., Dooley, D.M., Smith, A.J., Kagan, H.M. & Klinman, J.P. (1996) A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science* **273**, 1078-84.
- [11] Goodwin, P.M. & Anthony, C. (1998) The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* **40**, 1-80.
- [12] Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A. & Suzuki, O. (1995) Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *Biochem. J.* **307**, 331-3.
- [13] Fluckiger, R., Paz, M., Mah, J., Bishop, A. & Gallop, P.M. (1993)

- Characterization of the glycine-dependent redox-cycling activity in animal fluids and tissues using specific inhibitors and activators: evidence for presence of PQQ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 61-8.
- [14] Killgore, J., Smidt, C., Duich, L., Romero-Chapman, N., Tinker, D., Reiser, K., Melko, M., Hyde, D. & Rucker, R.B. (1989) Nutritional importance of pyrroloquinoline quinone *Science* **245**, 850-2.
- [15] Bishop, A., Gallop, P.M. & Karnovsky, M.L. (1998) Pyrroloquinoline quinone: a novel vitamin? *Nutr. Rev.* **56**, 287-93.
- [16] Matsushita, K. & Adachi, O. (1993) Bacterial quinoprotein glucose-dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. In: *Principles and Applications of Quinoproteins* (V.L. Davidson ed.), pp. 47-63. Marcel Dekker, New York.
- [17] Matsushita, K., Toyama, H. & Adachi, O. (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**, 247-301.
- [18] Geiger, O. & Görisch, H. (1986) Crystalline quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochemistry* **25**, 6043-6048.
- [19] Anthony, C. (1996) Quinoprotein-catalysed reactions. *Biochem. J.* **320**, 697-711.
- [20] Görisch, H. & Rupp, M. (1989) Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*. *Antonie van Leeuwenhoek* **56**, 35-45.
- [21] Rupp, M. & Görisch, H. (1988) Purification, crystallisation and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **369**, 431-439.
- [22] Groen, B.W., van Kleef, M.A. & Duine, J.A. (1986) Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **234**, 611-5.
- [23] Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M. & Adachi, O. (1995) Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.* **177**, 2442-50.
- [24] Ameyama, M. & Adachi, O. (1982) Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane bound. *Methods Enzymol.* **89**, 450-457.
- [25] Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1989) Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J Bacteriol* **171**, 3115-3122.

- [26] Matsushita, K., Yakushi, T., Toyama, H., Shinagawa, E. & Adachi, O. (1996) Function of multiple heme c moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* **271**, 4850-4857.
- [27] Tamaki, T., Fukaya, M., Takemura, H., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1991) Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**, 292-300.
- [28] Tayama, K., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. & Beppu, T. (1989) Purification and characterisation of membrane-bound alcohol dehydrogenases from *Acetobacter polyoxogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 181-185.
- [29] Lidstrom, M.E., Anthony, C., Biville, F., Gasser, F., Goodwin, P., Hanson, R.S. & Harms, N. (1994) New unified nomenclature for genes involved in the oxidation of methanol in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **117**, 103-106.
- [30] Springer, A.L., Auman, A.J. & Lidstrom, M.E. (1998) Sequence and characterization of *mxkB*, a response regulator involved in regulation of methanol oxidation, and of *mxkW*, a methanol-regulated gene in *Methylobacterium extorquens* AM1. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 119-24.
- [31] Nunn, D.N. & Lidstrom, M.E. (1986) Phenotypic characterization of 10 methanol oxidation mutant classes in *Methylobacterium sp.* strain AM1. *J. Bacteriol.* **166**, 591-597.
- [32] Nunn, D.N. & Lidstrom, M.E. (1986) Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase structural gene of *Methylobacterium sp.* strain AM1. *J. Bacteriol.* **166**, 581-590.
- [33] Anderson, D.J. & Lidstrom, M.E. (1988) The *moxFG* region encodes four polypeptides in the methanol-oxidizing bacterium *Methylobacterium sp.* strain AM1. *J. Bacteriol.* **170**, 2254-62.
- [34] Nunn, D.N., Day, D. & Anthony, C. (1989) The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochem. J.* **260**, 857-62.
- [35] van Spanning, R.J., Wansell, C.W., De Boer, T., Hazelaar, M.J., Anazawa, H.,

- Harms, N., Oltmann, L.F. & Stouthamer, A.H. (1991) Isolation and characterization of the *moxJ*, *moxG*, *moxI*, and *moxR* genes of *Paracoccus denitrificans*: inactivation of *moxJ*, *moxG*, and *moxR* and the resultant effect on methylotrophic growth. *J. Bacteriol.* **173**, 6948-6961.
- [36] Nunn, D.N. & Anthony, C. (1988) The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the cytochrome *c_L* gene of *Methylobacterium extorquens* AM1, a novel class of c-type cytochrome. *Biochem. J.* **256**, 673-676.
- [37] Amaratunga, K., Goodwin, P.M., O'Connor, C.D. & Anthony, C. (1997) The methanol oxidation genes *mxafjg* [S] *ackld* in *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 175-1.
- [38] Toyama, H., Anthony, C. & Lidstrom, M.E. (1998) Construction of insertion and deletion *mx*a mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 1-7.
- [39] Morris, C.J., Kim, Y.M., Perkins, K.E. & Lidstrom, M.E. (1995) Identification and nucleotide sequences of *mx*aA, *mx*aC, *mx*aK, *mx*aL, and *mx*aD genes from *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **177**, 6825-31.
- [40] Richardson, I.W. & Anthony, C. (1992) Characterization of mutant forms of the quinoprotein methanol dehydrogenase lacking an essential calcium ion. *Biochem. J.* **287**, 709-15.
- [41] Morris, C.J. & Lidstrom, M.E. (1992) Cloning of a methanol-inducible *moxF* promoter and its analysis in *moxB* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **174**, 4444-9.
- [42] Springer, A.L., Morris, C.J. & Lidstrom, M.E. (1997) Molecular analysis of *mx*bD and *mx*bM, a putative sensor-regulator pair required for oxidation of methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* **143**, 1737-44.
- [43] Toyama, H. & Lidstrom, M.E. (1998) *pqqA* is not required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* **144**, 183-191.
- [44] Lee, K.E., Stone, S. & Holloway, B.W. (1991) Characterization of transposon insertion mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 (*Methylobacterium* strain AM1) which are defective in methanol oxidation. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 895-904.
- [45] Xu, H.H., Viebahn, M. & Hanson, R.S. (1993) Identification of methanol-regulated promoter sequences from the facultative methylotrophic bacterium

- Methylobacterium organophilum* XX. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 743-52 .
- [46] Springer, A.L., Chou, H.H., Fan, W.H., Lee, E. & Lidstrom, M.E. (1995) Methanol oxidation mutants in *Methylobacterium extorquens* AM1: identification of new genetic complementation groups. *Microbiology* **141**, 2985-2993.
- [47] Xu, H.H., Janka, J.J., Viebahn, M. & Hanson, R.S. (1995) Nucleotide sequence of the *mxoQ* and *mxoE* genes, required for methanol dehydrogenase synthesis in *Methylobacterium organophilum* XX: a two-component regulatory system. *Microbiology* **141**, 2543-51.
- [48] Morris, C.J., Biville, F., Turlin, E., Lee, E., Ellermann, K., Fan, W.H., Ramamoorthi, R., Springer, A.L. & Lidstrom, M.E. (1994) Isolation, phenotypic characterization, and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*. *J. Bacteriol.* **176**, 1746-55.
- [49] Toyama, H., Chistoserdova, L. & Lidstrom, M.E. (1997) Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology* **143**, 595-602.
- [50] Houck, D.R., Hanners, J.L., Unkefer, C.J., van Kleef, M.A. & Duine, J.A. (1989) PQQ: biosynthetic studies in *Methylobacterium* AM1 and *Hyphomicrobium* X using specific ¹³C labeling and NMR. *Antonie Van Leeuwenhoek* **56**, 93-101.
- [51] van Kleef, M.A. & Duine, J.A. (1988) L-tyrosine is the precursor of PQQ biosynthesis in *Hyphomicrobium* X. *FEBS Lett.* **237**, 91-7.
- [52] Goosen, N., Huinen, R.G. & van de Putte, P. (1992) A 24-amino-acid polypeptide is essential for the biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone. *J. Bacteriol.* **174**, 1426-1427 .
- [53] Meulenberg, J.J., Sellink, E., Riegman, N.H. & Postma, P.W. (1992) Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqq* operon. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 284-294.
- [54] Ramamoorthi, R. & Lidstrom, M.E. (1995) Transcriptional analysis of *pqqD* and study of the regulation of pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **177**, 206-11.
- [55] Velterop, J.S., Sellink, E., Meulenberg, J.J., David, S., Bulder, I. & Postma, P.W. (1995) Synthesis of pyrroloquinoline quinone *in vivo* and *in vitro* and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **177**, 5088-

- 5098.
- [56] Springer, A.L., Ramamoorthi, R. & Lidstrom, M.E. (1996) Characterization and nucleotide sequence of *pqqE* and *pqqF* in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **178**, 2154-7.
- [57] Cabot, E.L. & Beckenbach A.T. (1989) Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Computer Applications in the Biosciences* **5**, 233-234.
- [58] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, 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.
- [59] Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- [60] Bairoch, A., Bucher, P. & Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **25**, 217-221.
- [61] Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. & Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**, 5789-5794.
- [62] Figurski, D.H. & Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 1648-1652.
- [63] Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- [64] Simon R., O'Connell M., Labes, M. & Puhler, A. (1986) Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**, 640-659.
- [65] Schweizer, H.P., Klassen, T.R. & Hoang, T. (1996) Improved methods for gene analysis in *Pseudomonas*. In *Molecular Biology of Pseudomonads*, pp. 229-237. Edited by T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas & S. Silver. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- [66] Diehl, A., von Wintzingerode, F. & Görisch, H. (1998) Quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a homodimer-sequence of the

- gene and deduced structural properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **257**, 409-19.
- [67] Cetin, E.T., Töreci, K. & Ang, Ö. (1965) Encapsulated *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas mucosus*) strains. *J. Bacteriol.* **89**, 1432-1433.
- [68] de Lorenzo, V. & Timmis, K.N. [1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**, 386-405.
- [69] Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **14**, 459-472.
- [70] Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-80.
- [71] Geiger, O. & Görisch, H. (1987) Enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone using crude membranes from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **164**, 418-423.
- [72] Rupp, M. (1988) Quinoprotein-Ethanoldehydrogenasen aus *Pseudomonas*, Dissertation, Universität Hohenheim.
- [73] Miller, J.M. (1992) *A short course in bacterial genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [74] Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [75] In *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol.I, pp.2.4.1-2.4.5. Edited by Ausubel, F.M. John Wiley & Sons, Inc.
- [76] Smith, A.W. & Iglewski, B.H. (1989) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10509.
- [77] Chomczynski, P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **201**, 134-9.
- [78] Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-7.
- [79] Ubbink, M., van Beeumen, J. & Canters, G.W. (1992) Cytochrome c550 from *Thiobacillus versutus*: cloning, expression in *Escherichia coli*, and purification of the heterologous holoprotein. *J. Bacteriol.* **174**, 3707-3714.

- [80] von Tigerstrom, R.G. & Razzel, W.E. (1966) Aldehyde dehydrogenase. Purification and properties of the enzyme from *P. aeruginosa*. *J Biol Chem* **243**, 2691-2702.
- [81] Reichmann, P. & Görisch, H. (1993) Cytochrome c₅₅₀ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **289**, 173-178.
- [82] Rieske, J.S. (1967) The quantitative determination of mitochondrial hemoproteins. *Methods Enzymol.* **10**, 488.
- [83] Francis, R.T. Jr. & Becker, R.R. (1984) Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal Biochem* **136**, 509-514.
- [84] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- [85] Schagger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-79.
- [86] Nesterenko, M.V., Tilley, M. & Upton, S.J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, 239-42.
- [87] van Schie, B.J., van Dijken, J.P. & Kuenen, J.G. (1984) Non-coordinated synthesis of glucose dehydrogenase and its prosthetic group PQQ in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 133-138.
- [88] Mutzel, A. & Görisch, H. (1991) Quinoprotein ethanol dehydrogenase: Preparation of the apo-form and reconstitution with pyrroloquinolin quinone and Ca²⁺ or Sr²⁺ ions. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1721-1726.
- [89] Lessie, T.G. & Phibbs, P.V. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonads*. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 359-88.
- [90] Vijgenboom, E., Busch, J.E. & Canters, G.W. (1997) *In vivo* studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that azu expression is under control of *rpoS* and ANR. *Microbiology* **143**, 2853-2863.
- [91] Schrover, J.M., Frank, J., van Wielink, J.E. & Duine, J.A. (1993) Quaternary structure of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and its reoxidation with a novel cytochrome c from this organism. *Biochem. J.* **290**, 123-127.

- [92] West, S.E. & Iglewski, B.H. (1988) Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic. Acids Res.* **16**, 9323-9335.
- [93] Rothmel, R.K., Chakrabarty, A.M., Berry, A. & Darzins, A. (1991) Genetic systems in *Pseudomonas*. *Methods Enzymol* **204**, 485-514.
- [94] Hill, K.L., Li, H.H., Singer, J. & Merchant, S. (1991) Isolation and structural characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* gene for cytochrome c₆. Analysis of the kinetics and metal specificity of its copper-responsive expression. *J. Biol. Chem.* **266**, 15060-15067.
- [95] Kondo, K. & Horinouchi, S. (1997) Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1131-1138.
- [96] Nagy, I., Schoofs, G., Compennolle, F., Proost, P., Vanderleyden, J. & de Mot, R. (1995) Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl-dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**, 676-687.
- [97] Priefert, H., Kruger, N., Jendrossek, D., Schmidt, B. & Steinbuchel, A. (1992) Identification and molecular characterization of the gene coding for acetaldehyde dehydrogenase II (*acoD*) of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **174**, 899-907.
- [98] Parsot, C. & Mekalanos, J.J. (1991) Expression of the *Vibrio cholerae* gene encoding aldehyde dehydrogenase is under control of *ToxR*, the cholera toxin transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **173**, 2842-2851.
- [99] Xu, J. & Johnson, R.C. (1995) *aldB*, an RpoS-dependent gene in *Escherichia coli* encoding an aldehyde dehydrogenase that is repressed by Fis and activated by Crp. *J. Bacteriol.* **177**, 3166-3175.
- [100] Hidalgo, E., Chen, Y.M., Lin, E.C. & Aguilar, J. (1991) Molecular cloning and DNA sequencing of the *Escherichia coli* K-12 *ald* gene encoding aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **173**, 6118-6123.
- [101] Goosen, N., Horsman, H.P., Huinen, R.G. & van de Putte, P. (1989) *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **171**, 447-455.
- [102] Schnider, U., Keel, C., Voisard, C., Defago, G. & Haas, D. (1995) Tn5-directed

- cloning of *pqq* genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3856-3864.
- [103] Schäfer, K. (1988) Vorkommen von NAD-, NADP und Methoxatin-abhängigen Dehydrogenasen bei *Pseudomonas*. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.
- [104] Blasband, A.J., Marcotte, W.R. Jr. & Schnaitman, C.A. (1986) Structure of the *lc* and *nmpC* outer membrane porin protein genes of lambdaoid bacteriophage. *J. Biol. Chem.* **261**, 12723-32 .
- [105] Diehl, A. (1998). Molekularbiologische, biochemische und enzymologische Untersuchungen zur Quinoprotein-Ethanoldehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933. Dissertation, TU-Berlin.
- [106] Schweizer, H.P. (1991) The *agmR* gene, an environmentally responsive gene, complements defective *glpR*, which encodes the putative activator for glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **173**, 6798-6806.
- [107] Stoorvogel, J., Kraayveld, D.E., van Sluis, C.A., Jongejan, J.A., de Vries, S. & Duine, J.A. (1996) Characterization of the gene encoding quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase of *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 690-698.
- [108] Moore, G.R. & Pettigrew, G.W. (1990) *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- [109] Beck, C.F. & Warren, R.A. (1988) Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol. Rev.* **52**, 318-26.
- [110] Gicquel-Sanzey, B. & Cossart, P. (1982) Homologies between different prokaryotic DNA-binding regulatory proteins and between their sites of action. *EMBO J.*, **1**, 591-5.
- [111] Schernhorst, H. (1998) Verschiedene Alkoholdehydrogenasen von *Pseudomonas aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen auf Basalmedium und Minimalmedium. Diplomarbeit, TU-Berlin.
- [112] Kehr, J. (1994) Alkoholdehydrogenasen und die mit ihnen verknüpfte Elektronentransportkette bei *Pseudomonas aeruginosa* unter anaeroben Wachstumsbedingungen.
- [113] Anthony, C. (1992) The structure of bacterial quinoprotein dehydrogenases. *Int. J. Biochem.* **24**, 29-39 .
- [114] Harms, N., Reijnders, W.N., Anazawa, H., van der Palen, C.J., van Spanning,

- R.J., Oltmann, L.F. & Stouthamer, A.H. (1993) Identification of a two-component regulatory system controlling methanol dehydrogenase synthesis in *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* **8**, 457-70.
- [115] de Vries, G.E., Harms, N., Maurer, K., Papendrecht, A. & Stouthamer, A.H. (1988) Physiological regulation of *Paracoccus denitrificans* methanol dehydrogenase synthesis and activity. *J. Bacteriol.* **170**,3731-7.

7. Anhang

7.1. Eigene Veröffentlichung und Genbank-Datenbankeintrag

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schobert, M. & Görisch, H. (1999) Cytochrom c_{550} is an essential component of the quinoprotein ethanol oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrom c_{550} and an adjacent acetaldehyde dehydrogenase. *Microbiology* **145**, 471-481.

Die DNA-Sequenz des 3,2 kb *Bam*HI-*Pst*I Fragments aus pTB3070 wurde in der Genbank Datenbank hinterlegt: Acc.-Nr.: AF068264

7.2. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachgebiet Technische Biochemie am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. H. Görisch in den Jahren 1995-1999 angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Görisch für die Betreuung der Arbeit, die wertvollen Anregungen und die stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion.

Gaby Wagner danke ich besonders herzlich für ihre Mitarbeit als technische Assistentin.

Herrn Dr. P. Donner (Schering AG) danke ich für die Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuresequenz des Cytochrom c_{550} .

Für die Bereitstellung des Plasmids pUCP20T danke ich Herrn Dr. H. P. Schweizer (Colorado State University, CO, USA).

Herrn Dr. Schwartz (Humboldt Universität zu Berlin) danke ich für die Bereitstellung des Plasmids pEDY305.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Fachgebiet Technische Biochemie danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, zahlreiche Diskussionen und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Otto Geiger, Frau Dr. Isabel Lopez-Lara, Guido Epple, Barbara Weißenmeyer, Viola Röhrs, Christian Sohlenkamp und Karel de Rudder.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

7.3. Lebenslauf

Name: Max Schobert

Geburtsdatum: 22.03.1967

Geburtsort: München

1973-1977 Diesterweg-Schule in Frankfurt/Main.

1977-1986 Lessing-Gymnasium in Frankfurt/Main, Abitur.

1986-1987 Wehrdienst.

1987-1993 Studium der Chemie an der Technischen Hochschule in Darmstadt.
Thema der Diplomarbeit: Heterologe Expression des Kathepsin H Pro-peptids und Charakterisierung als Inhibitor gegenüber der humanen Cysteinproteinase Kathepsin H.

1993-1995 Zusatzstudium "Gewerblicher Rechtsschutz und Urheberrecht" an der Humboldt Universität zu Berlin.

1994 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Sfb 193 am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin. Forschungstätigkeit zum Thema: Klonierung und Überexpression der 1,4-Dichlorbenzol-Dioxygenase aus *Xanthobacter flavus*.

seit 1995 Arbeit an der Dissertation am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin.