

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
zum bakteriellen Naturkautschuk-Abbau,
sowie Charakterisierung
eines dazu befähigten Bakteriums

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität

vorgelegt von
Kirsten Kerkhoff
aus Moers

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. Dr. G. H. Braus

Korreferent: PD Dr. D. Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2001

| | |
|--|------------|
| ABKÜRZUNGEN | VII |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 2. MATERIAL & METHODEN..... | 7 |
| 2.1. Organismen und Plasmide..... | 7 |
| 2.2. Nährmedien..... | 9 |
| 2.2.1. Komplexmedien | 9 |
| 2.2.2. Mineralmedien..... | 12 |
| 2.2.3. Medien für physiologische Untersuchungen | 13 |
| 2.2.4. Polymer-Agarplatten | 15 |
| 2.3. Medienzusätze..... | 15 |
| 2.3.1. Antibiotika..... | 15 |
| 2.3.2. Polymere..... | 16 |
| 2.4. Anzucht von Streptomyceten und <i>Xanthomonas</i> sp 35Y in NR/DPNR- Flüssigkulturen | 17 |
| 2.5. Stammhaltung und Konservierung | 17 |
| 2.6. Physiologische Tests | 18 |
| 2.6.1. Aktivitäts-Test | 18 |
| 2.6.2. Gram-Färbung | 18 |
| 2.6.3. Katalase-Test | 19 |
| 2.6.4. Oxidase-Test..... | 19 |
| 2.6.5. Pigmentextraktion aus verschiedenen <i>Xanthomonas</i> -Stämmen..... | 19 |
| 2.6.6. UV-Mutagenese..... | 20 |
| 2.7. Isolierung von Nukleinsäuren | 21 |
| 2.7.1. Vorbehandlung von Lösungen und Geräten..... | 21 |
| 2.7.2. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren | 21 |
| 2.7.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion..... | 21 |
| 2.7.2.2. Alkohol-Präzipitation | 22 |
| 2.7.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten | 22 |
| 2.7.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus Gram-negativen Bakterien | 24 |
| 2.7.4.1. Schnellpräparation von Plasmid-DNA (boiling-prep)..... | 24 |
| 2.7.4.2. Plasmid-Mini-Präparation durch alkalische Lysis (Birnboim & Doly, 1979) | 24 |
| 2.7.4.3. Plasmid-Präparation mittels Säulenchromatographie | 25 |
| 2.7.4.4. Isolierung von Megaplasmiden (Kado & Liu, 1981), modifiziert | 26 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.7.4.5. | Isolierung von intakter Gesamt-DNA für analytische Zwecke | 26 |
| 2.7.5. | Isolierung chromosomaler DNA aus Streptomycceten..... | 27 |
| 2.7.6. | Isolierung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien (Ausubel et al., 1987)..... | 28 |
| 2.7.7. | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 28 |
| 2.8. | Analyse von Nukleinsäuren | 29 |
| 2.8.1. | Agarose-Gelelektrophorese | 29 |
| 2.8.1.1. | Standard-Agarose-Gelelektrophorese..... | 29 |
| 2.8.1.2. | Wechselfeld-Gelelektrophorese (Pulsed field electrophoresis, PFE), (Kalkus, 1992), modifiziert..... | 30 |
| 2.8.2. | Bestimmung von DNA-Konzentrationen..... | 30 |
| 2.8.3. | Größenbestimmung von DNA-Fragmenten | 31 |
| 2.9. | Modifikation von Nukleinsäuren | 31 |
| 2.9.1. | Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 31 |
| 2.9.2. | Dephosphorylierung von DNA | 31 |
| 2.9.3. | Ligation von DNA..... | 32 |
| 2.9.4. | Auffüllen oder Abdauen überhängender Enden (Sambrook et al., 1989).... | 32 |
| 2.9.5. | <i>in vitro</i> -Methylierung von DNA..... | 33 |
| 2.9.5.1. | Herstellung der Extrakte..... | 33 |
| 2.9.5.2. | <i>in vitro</i> -Methylierungsreaktion..... | 33 |
| 2.10. | Übertragung von DNA..... | 34 |
| 2.10.1. | Protoplastierung von Streptomycceten-Zellen | 34 |
| 2.10.1.1. | Protoplastierung von <i>S. lividans</i> (Hopwood et al., 1985), modifiziert | 35 |
| 2.10.1.2. | Protoplastierung von <i>S. griseus</i> | 35 |
| 2.10.2. | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Inoue et al., 1990)..... | 36 |
| 2.10.3. | Herstellung elektrokompeter Zellen | 36 |
| 2.10.3.1. | Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 36 |
| 2.10.3.2. | Herstellung elektrokompeter <i>Xanthomonas</i> -Zellen (Johann, 1998), modifiziert..... | 37 |
| 2.10.4. | Herstellung von Phagenlysaten | 37 |
| 2.10.4.1. | Test der lysogenen Stämme <i>E. coli</i> BHB2688 und <i>E. coli</i> BHB2690..... | 37 |
| 2.10.4.2. | Herstellung des "Freeze-Thaw"-Lysates aus <i>E. coli</i> BHB2688 | 37 |
| 2.10.4.3. | Herstellung des Ultraschall-Lysates aus <i>E. coli</i> BHB2690 | 38 |
| 2.10.5. | Transformation von Streptomycceten-Protoplasten (Hopwood et al., 1985), modifiziert | 39 |
| 2.10.6. | Transformation kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.10.7. | Transformation elektrokompeter Zellen..... | 40 |
| 2.10.8. | Verpackung und Transduktion von DNA in <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.10.9. | DNA-Übertragung durch Konjugation..... | 41 |
| 2.11. | PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten | 43 |
| 2.12. | Sequenzierung von DNA..... | 44 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 2.13. | Konzentrierung von Kulturüberständen und Proteinlösungen..... | 45 |
| 2.13.1. | Ammoniumsulfatfällung | 45 |
| 2.13.2. | Tangentialfiltration..... | 45 |
| 2.13.3. | Ultrafiltration..... | 46 |
| 2.13.4. | Einengung im Speed-vac..... | 46 |
| 2.14. | Anreicherung und Aufreinigung von Proteinen..... | 46 |
| 2.14.1. | Anionenaustausch-Chromatographie | 46 |
| 2.14.1.1. | Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephacel..... | 46 |
| 2.14.1.2. | Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ..... | 47 |
| 2.14.2. | Kationenaustausch-Chromatographie an MonoS..... | 47 |
| 2.14.3. | Gelfiltration an Superdex G200 und G75..... | 47 |
| 2.14.4. | Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) an Octyl-, Butyl- und Phenyl-Sepharose | 48 |
| 2.14.5. | Chromatofokussierung an MonoP..... | 48 |
| 2.14.6. | Dialyse..... | 48 |
| 2.14.7. | Elektroelution | 49 |
| 2.15. | Analyse von Proteinen..... | 49 |
| 2.15.1. | Proteinbestimmung..... | 49 |
| 2.15.1.1. | Proteinbestimmung (Bradford, 1976)..... | 49 |
| 2.15.1.2. | Proteinbestimmung ganzer Zellen (Lowry et al., 1951), modifiziert | 49 |
| 2.15.2. | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)..... | 50 |
| 2.15.2.1. | SDS-PAGE | 50 |
| 2.15.2.2. | Native PAGE | 51 |
| 2.15.2.3. | 2-Dimensionale PAGE | 52 |
| 2.15.3. | Unspezifische Proteinfärbungen..... | 54 |
| 2.15.3.1. | Silberfärbung (Blum et al., 1987), modifiziert | 54 |
| 2.15.3.2. | Coomassiefärbung (Thompson & Larson, 1992) | 55 |
| 2.15.4. | Spaltung von Proteinen | 56 |
| 2.15.4.1. | Chemische Spaltung durch Bromcyan (Tarr, 1986)..... | 56 |
| 2.15.4.2. | Proteolytische Spaltung | 56 |
| 2.15.5. | Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen | 57 |
| 2.15.6. | RP-HPLC-Auftrennung und N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse | 58 |
| 2.15.7. | Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)..... | 59 |
| 2.16. | Elektronenmikroskopische Methoden..... | 59 |
| 2.16.1. | Negativkontrastierung (Valentine et al., 1968), modifiziert | 59 |
| 2.16.2. | Einbettung in Kunstharz..... | 59 |
| 2.16.2.1. | Fixierung der Zellen..... | 59 |
| 2.16.2.2. | Einbettung der Zellen (Spurr, 1969)..... | 60 |
| 2.16.2.3. | Ultramikrotomie..... | 60 |
| 2.16.2.4. | Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat | 61 |
| 2.16.3. | Elektronenmikroskopische Abbildung | 61 |
| 2.16.3.1. | Hellfeldabbildung | 62 |
| 2.17. | Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien | 62 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3. | EXPERIMENTE & ERGEBNISSE | 64 |
| 3.1. | Abbau von NR durch <i>Streptomyces griseus</i> 1D und <i>Streptomyces coelicolor</i> 1A | 65 |
| 3.1.1. | Charakterisierung von <i>S. griseus</i> 1D und <i>S. coelicolor</i> 1A beim Wachstum auf NR | 65 |
| 3.1.2. | Genetische Fixierung der NR-abbauenden Eigenschaften in <i>S. griseus</i> 1D und <i>S. coelicolor</i> 1A | 67 |
| 3.1.2.1. | Herstellung von Mutanten durch ungerichtete UV-Mutagenese | 67 |
| 3.1.2.2. | Phänotyp der durch UV-Mutagenese erzeugten Mutanten von <i>S. griseus</i> 1D und <i>S. coelicolor</i> 1A | 68 |
| 3.1.3. | Strategien zur Klonierung der Strukturgene der potentiellen Polyisopren-Dioxygenase aus <i>S. griseus</i> 1D und <i>S. coelicolor</i> 1A | 72 |
| 3.1.3.1. | Konstruktion einer Genbank von <i>S. griseus</i> 1D in <i>S. lividans</i> | 73 |
| 3.1.3.2. | Komplementation der NR-Negativmutanten von <i>S. griseus</i> 1D und <i>S. coelicolor</i> 1A bzw. Transposonmutagenese der Wildtyp-Stämme | 74 |
| 3.1.4. | Proteinbiochemische Untersuchungen zum Wachstum von <i>S. griseus</i> 1D, dessen Mutanten und <i>S. coelicolor</i> 1A und dessen Mutanten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen | 77 |
| 3.2. | NR-Abbau durch <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | 81 |
| 3.2.1. | Taxonomische Einordnung des als <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y beschriebenen Stammes | 81 |
| 3.2.1.1. | Taxonomische Einordnung des Stammes aufgrund morphologischer, physiologischer und biochemischer Merkmale | 81 |
| 3.2.1.2. | Taxonomische Einordnung des Stammes aufgrund von 16S-rRNA-Sequenzdaten | 89 |
| 3.2.1.3. | Identifizierung des Pigmentes von <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y als ein Xanthomonadin-Derivat | 96 |
| 3.2.1.4. | Taxonomische Reklassifizierung von <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y als <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 98 |
| 3.2.2. | Charakterisierung von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y beim Wachstum auf NR | 99 |
| 3.2.3. | Genetische Fixierung der NR-abbauenden Eigenschaften in <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 99 |
| 3.2.3.1. | Herstellung von Mutanten durch ungerichtete Mutagenese mittels UV-Licht | 99 |
| 3.2.3.2. | Phänotyp der durch UV-Mutagenese erzeugten Mutanten von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 100 |
| 3.2.4. | Klonierung des Strukturgens der potentiellen Polyisopren-Dioxygenase aus <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 102 |
| 3.2.4.1. | Überprüfung von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y auf das Vorkommen extrachromosomaler DNA-Strukturen | 102 |
| 3.2.4.2. | Konstruktion einer Cosmid-Genbank von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y in <i>E. coli</i> und Screening auf NR-Abbau | 103 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 3.2.4.3. | Komplementation der NR-Negativmutanten A und B durch eine Genbank in einem broad-host-range-Vektor | 104 |
| 3.2.5. | Proteinbiochemische Untersuchungen an <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y und den NR-Negativmutanten A und B | 107 |
| 3.2.5.1. | Photometrische Messung der NR-abbauenden Aktivität in NR-Kulturüberständen..... | 107 |
| 3.2.5.2. | Induktion des NR-Abbaus in <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 108 |
| 3.2.5.3. | Einfluß der verwendeten Kohlenstoffquelle auf die Bildung extrazellulärer Proteine durch <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 110 |
| 3.2.5.4. | N-terminale Blockierung des 65 kDa-Proteins | 111 |
| 3.2.5.5. | Aufreinigung des 65 kDa-Proteins aus dem Kulturüberstand von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y gewachsen auf NR..... | 112 |
| 3.2.5.6. | Bestätigung der Reinheit des aufgereinigten 65 kDa-Proteins mittels 2D-Elektrophorese | 114 |
| 3.2.5.7. | Chemische und proteolytische Spaltungen des 65 kDa-Proteins von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 116 |
| 3.2.5.8. | Ermittlung interner Aminosäuresequenzen des 65 kDa-Proteins aus <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 120 |
| 3.2.5.9. | Herstellung einer für das Strukturgen des 65 kDa-Proteins spezifischen DNA-Sonde | 121 |
| 4. | DISKUSSION | 123 |
| 4.1. | NR-Abbau durch <i>S. griseus</i> 1D, <i>S. coelicolor</i> 1A und <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 124 |
| 4.1.1. | Charakterisierung des NR-Abbaus durch <i>S. griseus</i> 1D, <i>S. coelicolor</i> 1A und <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 124 |
| 4.1.2. | Beruhet der NR-Abbau durch <i>S. griseus</i> 1D, <i>S. coelicolor</i> 1A und <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y auf einem komplexen Stoffwechselweg ? | 127 |
| 4.1.3. | Abbau von Isoprenderivaten..... | 128 |
| 4.2. | Reklassifizierung von <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y als <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 130 |
| 4.2.1. | Ergebnis morphologischer, physiologischer, biochemischer und genetischer Analysen..... | 130 |
| 4.2.2. | Erste Identifizierung eines Xanthomonadin-Derivates in einem Nicht-Xanthomonaden..... | 133 |
| 4.3. | Klonierung der Strukturgene der NR-abbauenden Enzyme | 137 |
| 4.3.1. | Klonierung der Strukturgene aus <i>S. griseus</i> 1D bzw. <i>S. coelicolor</i> 1A | 137 |
| 4.3.2. | Klonierung der für den NR-Abbau codierenden Strukturgene aus <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 141 |
| 4.3.2.1. | Konstruktion und Screening einer Cosmid-Genbank von <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y in <i>E. coli</i> | 141 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3.2.2. | Komplementation der <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y-Negativmutanten und Konstruktion eines broad-host-range Cosmides | 143 |
| 4.4 | Proteinbiochemische Untersuchung des NR-Abbaus | 144 |
| 4.4.1. | Extrazelluläre Enzymaktivität | 144 |
| 4.4.2. | NR-Abbau durch <i>S. griseus</i> 1D und <i>S. coelicolor</i> 1A und deren Mutanten.... | 145 |
| 4.4.3. | Induktion des NR-Abbaus in <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | 145 |
| 4.4.4. | Aufreinigung und Spaltung des 65 kDa-Proteins aus <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y, sowie Bestimmung interner Aminosäuresequenzen | 146 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 150 |
| | SUMMARY..... | 152 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 154 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-----------|--|
| A | Adenin, Ampere |
| A. | <i>Alcaligenes</i> |
| Abb. | Abbildung |
| AGE | Agarose-Gelelektrophorese |
| Å | Angström |
| Ap | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosin-5`-Triphosphat |
| bidest | bidestilliert |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin) |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CHAPS | 3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonium-1-propansulfonat |
| CIEX | Cation Exchange Chromatography (Kationenaustausch-Chromatographie) |
| cm | Zentimeter |
| Cm | Chloramphenicol |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| d | Durchmesser, Küvettenschichtdicke, Tag |
| Da | Dalton |
| dATP | 2`-Desoxy-Adenosin-5`-Triphosphat |
| dCTP | 2`-Desoxy-Cytidin-5`-Triphosphat |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| dGTP | 2`-Desoxy-Guanosin-5`-Triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 2`-Desoxy-Nukleosid-5`-triphosphat |
| DPNR | Deproteinized Natural Rubber (deproteinisierter Naturkautschuk) |
| DSMZ | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | 2`-Desoxy-Thymidin-5`-Triphosphat |
| E | Extinktion |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| E-Cup | Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| et al. | et alteri (und andere) |
| EtOH | Ethanol |
| F | Farad |
| Fa. | Firma |
| FPLC | Fluid-Phase Liquid Chromatography |

| | |
|------------------------------------|--|
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) |
| G | Guanin |
| GETL | Glucose-EDTA-Tris-Lysozym |
| GSPB | Göttinger Sammlung Phytopathogener Bakterien |
| h | Stunde |
| H ₂ O _{bidest} | bidestilliertes Wasser |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure |
| HIC | Hydrophobe Interaktionchromatographie |
| HPLC | High-Pressure Liquid Chromatography |
| IEF | isoelektrische Fokussierung |
| IEP | isoelektrischer Punkt |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| k | Kilo |
| Km | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare |
| konz. | konzentriert |
| KP | Kaliumphosphat |
| l | Liter |
| Lsg. | Lösung |
| LB | Luria-Bertani |
| LMW | Low Molecular Weight |
| λ | Lambda |
| m | Meter, milli |
| M | Molar (mol/Liter) |
| μ | mikro |
| MM | Mineralmedium |
| min | Minute |
| MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| N | Normal |
| n | nano |
| NB | Nutrient Broth |
| Neo | Neomycin |
| N, N'-DMFA | N, N' - Dimethylformamid |
| NR | Natural Rubber (Naturkautschuk) |
| OD | optische Dichte |
| Ω | Ohm |
| p | pico |
| <i>P.</i> | <i>Pseudomonas</i> |
| Pa | Pascal |
| p.a. | pro analysis (zur Analyse) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline) |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PFE | Pulsed Field Electrophoresis (Wechselfeld-Gelelektrophorese) |

| | |
|----------------|--|
| pH | negativ dekadischer Logarithmus der |
| PHA | Protonenkonzentration |
| PHB | Polyhydroxyalkanoat |
| PIPES | Polyhydroxybuttersäure |
| pKS | Piperazin-N, N`-bis(ethansulfonsäure) |
| PMSF | pBluescript KS ⁻ |
| PVDF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| r | Polyvinylidenfluorid |
| RP-HPLC | resistent |
| RT | Reversed Phase High-Pressure Liquid Chromatography |
| S. | Raumtemperatur |
| s. | <i>Streptomyces</i> |
| SAM | siehe |
| sec | S-Adenosyl-Methionin |
| SDS | Sekunde |
| SL | Natriumdodecylsulfat |
| SM | Spurenelementlösung |
| sp. | Soja-Mannit |
| T | species |
| T _a | Thymin, Temperatur |
| Tab. | Annealing-Temperatur |
| TAE | Tabelle |
| TBE | Tris-Acetat-EDTA |
| Tc | Tris-Borsäure-EDTA |
| TE | Tetracyclin |
| TEMED | Tris-EDTA |
| TES | N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin |
| Th | N-Tris(hydroxymethyl-2-aminoethansulfonsäure) |
| TNE | Thiostrepton |
| Tris | Tris-NaCl-EDTA |
| TSB | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Tryptic soy broth |
| ÜN | Unit [µmol bzw. µg/min] |
| Upm | über Nacht |
| UV | Umdrehungen pro Minute |
| V | Ultraviolett |
| v/v | Volt |
| W | Volumen pro Volumen |
| w/v | Watt |
| w/w | Masse pro Volumen |
| X. | Masse pro Masse |
| X-Gal | <i>Xanthomonas</i> |
| | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β-D-galactosid |

1. EINLEITUNG

Naturkautschuk (NR) ist ein hochpolymeres Isoprenoid, *cis*-1,4-Polyisopren, das aus 3 *trans*- und einigen Hundert bis zu mehreren Zehntausend *cis*-Isopreneinheiten besteht und ein Molekulargewicht von etwa 10^6 Da besitzt.

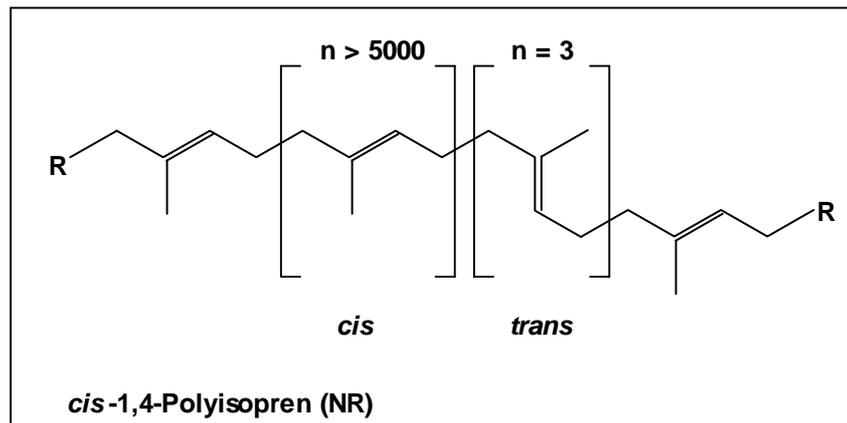


Abb. 1: Struktur von *cis*-1,4-Polyisopren (NR).

cis-1,4-Polyisopren ist heutzutage eines der wichtigsten natürlichen Polymere, das von mehr als 2000 Pflanzen, die vorwiegend zur Familie der *Euphorbiaceae* (Wolfsmilchgewächse) und *Compositae* (Korbblütler) gehören, aber auch von einigen Pilzen produziert wird. Der bekannteste Vertreter, der auch zur Zeit als einzige kommerzielle Quelle genutzt wird, ist der Gummibaum *Hevea brasiliensis*. Seit mehr als hundert Jahren wird dieser ursprünglich vom Amazonas-Becken in Brasilien stammende Baum in großen Plantagen in Südostasien, insbesondere Malaysia, aber auch China, Taiwan, Thailand und Indonesien, sowie den Philippinen und Afrika angebaut. *H. brasiliensis* benötigt zum Wachstum ein feucht-warmes, tropisches Klima mit Durchschnittstemperaturen von ca. 28°C und einem jährlichen Regenfall von 1.800-2.000 mm ohne ausgeprägte Trockenzeiten. Die Bäume bevorzugen einen leicht sauren Lehmboden und können bis zu 40 m hoch und über 100 Jahre alt werden (Duckworth, 1972/73). Einmal im Jahr können sie nach erfolgreicher Befruchtung, große Früchte bilden, die mehrere 3-6 g schwere, hartschalige Samen enthalten. Diese keimen innerhalb von 2-3 Wochen zu Schößlingen heran. Nach 5-6 Jahren erreichen die dann etwa 20-30 m hohen Bäume ihre „Reife“ und können für die Entnahme der Kautschukmilch (Latex) genutzt werden. Latex wird in allen Pflanzenteilen von

H. brasiliensis gefunden. Sie wird in speziellen Zellen, den Laticifers, im Phloem synthetisiert und häuft sich dort in Form kleiner Tröpfchen an, die eine milchig-trübe Flüssigkeit bilden. Die Latextröpfchen besitzen unterschiedliche Größen (50-30.000 Å) (Gomez & Hamzah, 1989) und sind von einer membranartigen Hülle umgeben, die aus zahlreichen Proteinen (u.a. Enzymen, die in die Biosynthese der NR-Partikel involviert sind) und Lipiden besteht. Dieser Proteinanteil, der selbst in gewaschener Latex stets vorhanden ist, ist für die allergischen Reaktionen des Typs I (anaphylaktische Reaktionen) verantwortlich. Latex besteht zu 90 % des Trockengewichtes aus *cis*-1,4-Polyisopren und zu 10 % aus Nicht-Gummi-Bestandteilen wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, Harzen und anorganischen Salzen (Subramaniam, 1995). Die Gewinnung der Latex erfolgt durch regelmäßiges, spiralförmiges Anritzen der Rinde (Tapping) in einem horizontalen Winkel von 25-30°. Durch den Turgor in den Laticifers fließt die Latex heraus und aggregiert an der Luft zu einem elastischen Pfropfen, der den Wundverschluß und somit den Einschluß und das Abtöten von Parasiten bewirkt. Um diese Coagulation beim Tapping zu verhindern, wird die Latex in kleinen Gefäßen aufgefangen, die Ammonium oder andere Antioxidantien enthalten (Duckworth, 1972/73). Je nach Verwendungszweck erfolgt eine unterschiedliche Aufarbeitung der gewonnenen Latexmilch. Auf diese Weise werden jährlich bis zu 2 t pro ha und insgesamt $4,7 \times 10^6$ t Naturkautschuk pro Jahr gewonnen, wobei Malaysia durch erfolgreiche Verpflanzungsprogramme und die Verwendung von Fertilisatoren und Hormonen heute 45 % der gesamten NR-Produktion bewältigt.

Trans-1,4-Polyisopren ist ein härteres Naturpolymer, das von anderen Arten von Gummibäumen produziert wird. Als Guttapercha wurde es eine Zeitlang als Füllstoff in der Zahnmedizin verwendet.

Aufgrund seiner Struktur und seines Molekulargewichtes besitzt *cis*-1,4-Polyisopren überragende Materialeigenschaften (Elastizität, Undurchlässigkeit, Beständigkeit, Abriebsicherheit, etc.), die nicht so einfach durch artifiziell hergestellte Polymere, wie z.B. Polyhydroxyalkanoat-(PHA-)Derivate kopiert werden können. Allerdings unterliegt dieser thermoplastische Naturstoff auch einem Alterungsprozess, hervorgerufen durch Licht- und Wärmeeinwirkung. Eine Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften konnte 1839 durch die Erfindung der Vulkanisation mit Schwefel annähernd zeitgleich durch Goodyear in den USA und Hancock in England erreicht werden. Dabei werden die Polymerketten des

Naturkautschuks durch Schwefelbrücken quervernetzt. Heute wird Naturkautschuk als Rohstoff für mehr als 40.000 Produkte, u.a. Autoreifen, Isolierungen, Dichtungen, Radiergummi und Gummihandschuhe, verwendet. In den Jahren 1905-1939 wurden auch erstmals zahlreiche Beschleuniger und Antioxidantien (Anilin, organische Basen, Zinkoxid) zur Verbesserung von Stabilität und Haltbarkeit eingesetzt. Diese Additive sind für allergische Reaktionen des Typs IV (Kontakt-Dermatitis) verantwortlich.

Als Naturprodukt unterliegt Naturkautschuk in der Biosphäre einem langsamen aber kontinuierlichen biologischen Abbauprozess. Die durch die Aktivität von Mikroorganismen hervorgerufenen Verrottungsprozesse begrenzen die Lebensdauer von Kautschuk-Produkten und sind daher auf der einen Seite für die Anwendung unerwünscht, eröffnen aber auf der anderen Seite die Möglichkeit einer umweltgerechten Entsorgung dieser Produkte. Daher ist es auch erstaunlich, daß die genauen biologischen und chemischen Vorgänge des mikrobiellen Naturkautschukabbaus immer noch weitgehend unbekannt sind.

Erste systematische Untersuchungen des mikrobiellen Abbaus von Naturkautschuk wurden 1914 von Söhnngen & Fol durchgeführt. Mit Hilfe von „solution-cast“-Filmen gelang ihnen die Isolierung von Actinomyceten (*Actinomyces fuscus*, *Actinomyces elastica*), die in der Lage waren, Löcher in Kautschukmaterialien hervorzurufen. Der Nachweis, daß tatsächlich der polymere Kohlenwasserstoff und nicht etwa (Protein-) Verunreinigungen das Substrat der Bakterien darstellte, konnte von ihnen jedoch nicht zweifelsfrei erbracht werden. Spence & van Niel entwickelten etwa 20 Jahre später sowohl eine Methode, mit der Latexsuspensionen ohne Coagulation autoklaviert werden konnten, als auch die sogenannte „clear zone“-Methode, die es ermöglichte, Latex-abbauende Organismen beim Wachstum auf milchig-trüben NR-Agarplatten durch die Bildung einer Aufklarungszone um die Kolonien herum zu identifizieren (Spence & van Niel, 1936). Mit dieser Methode wurden dann in den nachfolgenden Jahren eine Reihe von Mikroorganismen isoliert, die in der Lage sind, NR abzubauen (Borel et al., 1982; Jendrossek et al., 1997; Kaliyenko, 1938; Rook, 1955). Oftmals war eine Unterscheidung zwischen dem tatsächlichen Abbau des Kohlenwasserstoff-Rückgrades und einer oberflächlichen Besiedlung von Kautschuk, die ein Wachstum der Mikroorganismen durch darin enthaltene Verunreinigungen ermöglicht, schwierig (Cundell & Mulcock, 1972). Daher wurde nachfolgend der NR-Abbau für verschiedene Bakterien und Pilze auch anhand von

Kohlendioxid-Produktion (Berekaa et al., 2000; Keursten & Groenevelt, 1996), Abnahme der Viskosität oder einer mittels Gelpermeationschromatographie gemessenen Reduktion des Molekulargewichts von *cis*-1,4-Polyisopren (Borel et al., 1982; Ikram & Zainul, 1995; Tsuchii et al., 1979) nachgewiesen. Bei allen isolierten Bakterien handelte es sich um Gram-positive, myzelbildende Organismen aus der Gruppe der Actinomyceten.

Ende der 70er Jahre wurden die Untersuchungen zum Kautschuk-Abbau von Tsuchii und Mitarbeitern wieder aufgenommen (Tsuchii et al., 1990; Tsuchii et al., 1984; Tsuchii et al., 1979; Tsuchii et al., 1985; Tsuchii & Takeda, 1990; Tsuchii et al., 1996; Tsuchii et al., 1996; Tsuchii & Tokiwa, 1998). Durch Verwendung unterschiedlicher Kautschukmaterialien (NR, synthetischer Kautschuk, vulkanisierter Kautschuk) isolierten sie verschiedene *cis*-1,4-Polyisopren abbauende Bakterienstämme, von denen ein *Nocardia*- und ein *Xanthomonas*-Spezies die stärksten NR-Abbauer waren. *Nocardia* sp. 835A war in der Lage sowohl Naturkautschuk als auch synthetischen und vulkanisierten Kautschuk als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Tsuchii et al., 1990; Tsuchii et al., 1985). Dabei stellten sie fest, daß der Abbau von Weichgummiprodukten (Gummiringe, Latexhandschuhe) und nicht-vulkanisiertem NR deutlich schneller verlief als der Abbau von Hartgummiprodukten (Autoreifen, Isolierungen), dieser jedoch durch Zugabe von Handschuhstreifen stimuliert werden konnte (Tsuchii et al., 1996). Außerdem war das Ausmaß des Abbaus abhängig vom Vernetzungsgrad des Polymers (durch Vulkanisation) und von der Besiedlungsdichte durch Bakterien, die wiederum eine lineare Funktion von Oberfläche zu Gewicht des NR-Streifens war (Tsuchii et al., 1996). *Xanthomonas* sp. 35Y, der bis vor Kurzem der einzig bekannte Gram-negative Kautschuk-Abbauer war, ist in der Lage seine NR-abbauende Aktivität ins Medium auszuschleiden (Tsuchii & Takeda, 1990; Tsuchii & Tokiwa, 1998). Durch Fütterung mit ¹⁸O-markiertem Sauerstoff wurden beim Abbau von NR bzw. synthetischem Kautschuk durch *Xanthomonas* sp. 35Y in der Kulturflüssigkeit zwei niedermolekulare Oligoisoprenoide, 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-dien-1-al und 8-Oxo-4-methyl-4-nonen-1-al, als Zwischenprodukte identifiziert. Die Inkorporation beider Sauerstoffatome in die entstandenen Intermediate deutete auf eine intramolekulare Spaltung von *cis*-1,4-Polyisopren an der Doppelbindung durch eine Dioxygenase hin. Auch für *Nocardia* sp. 835A, der seine NR-abbauende Aktivität nicht ins Medium ausscheidet, wurde ein entsprechender

Spaltungsmechanismus postuliert (Tsuchii et al., 1985; Tsuchii & Tokiwa, 1998).

Aufgrund des unterschiedlichen Abbauverhaltens können alle Kautschuk-abbauenden Bakterien in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die einen besiedeln die Kautschuk-Stücke, d.h. wachsen nur in direktem Kontakt (adhäsiv), und führen so zu einer Zersetzung des Materials, während die anderen die Latex durch extrazelluläre enzymatische Aktivität angreifen (Linos et al., 2000; Tsuchii & Tokiwa, 1998). Die initiale, intramolekulare Spaltung des Polymers durch eine Polyisopren-Dioxygenase scheint jedoch allen NR-abbauenden Bakterien gemeinsam zu sein, unabhängig von ihrem Abbauverhalten. Lediglich Low & Mitarbeiter postulierten für einige Actinomyceten und Pilze einen Abbau des NR-Polymers von den Enden und damit einen exo-Spaltungsmechanismus (Low et al., 1992). Auch in anderen Organismen wurden Dioxygenasen nachgewiesen, die eine intramolekulare Spaltung an einer C-C-Doppelbindung bewirken und zur Bildung von Aldehyden bzw. Ketonen führen. So wurde in *Microcystis* sp. eine Dioxygenase gefunden, die β -Carotin in β -Cyclocitral und Crocetindial spaltet (Jüttner & Höflacher, 1985). In der Rattenleber wird die Spaltung von β -Carotin in zwei Moleküle Retinal ebenfalls durch eine Dioxygenase katalysiert (Olsen & Hayaishi, 1965). Auch die Spaltung von Lignostilben durch *Pseudomonas paucimobilis* TMY 1009 (Kamoda & Saburi, 1993; Kamoda & Saburi, 1993), sowie die Spaltung eines Epoxy-Carotenoids in der Abscisinsäure-Biosynthese in Mais (Schwartz et al., 1997) erfolgen durch Dioxygenasen.

Neuere Untersuchungen beschäftigten sich vorwiegend mit Methoden zur Verbesserung der Bioabbaubarkeit von Kautschukprodukten (Berekaa et al., 2000; Linos & Steinbüchel, 1998) sowie mit dem Abbau von gereinigtem, vulkanisiertem oder synthetischem *cis*-1,4-Polyisopren durch sowohl Gram-positive wie auch Gram-negative Bakterien (Bode et al., 2000; Heisey & Papadatos, 1995; Linos et al., 2000).

Im Rahmen eines Screenings nach NR-Abbauern wurden zahlreiche Gram-positive Bakterien isoliert und identifiziert, die in der Lage sind, mit NR als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (Jendrossek et al., 1997). Zwei *Streptomyces*-Stämme fielen dabei besonders auf: *S. griseus* 1D zeichnete sich durch eine offenbar konstitutive Hofbildung auf NR-Agarplatten in Anwesenheit einer zweiten wasserlöslichen Kohlenstoffquelle aus und *S. coelicolor* 1A bildete einen besonders starke Aufklärung auf diesen Platten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun der NR-Abbau durch diese zwei *Streptomyces*-Stämme sowie dem von Tsuchii & Takeda,

1990 isolierten *Xanthomonas*-Species eingehender untersucht werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Plasmide sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Organismen

| Stamm | relevanter Geno- oder Phänotyp ^a | Referenz/Herkunft |
|--|--|---------------------------|
| <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | NR ⁺ | (Tsuchii & Takeda, 1990) |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | NR ⁻ | GSPB 2217 |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> | NR ⁻ | GSPB 1386 |
| <i>Xanthomonas pelargonii</i> | NR ⁻ | GSPB 1955 |
| <i>Ralstonia eutropha</i> CH34 | pMOL28 (163 kb) | (Mergeay et al., 1985) |
| <i>Ralstonia eutropha</i> AEM813 | pMOL30 (238 kb) | (Siddiqui et al., 1988) |
| <i>Streptomyces lividans</i> 1326 | pULB113 (64 kb) | |
| <i>Streptomyces lividans</i> TK 23 | pMOL28 (163 kb) | (Lomovskaya et al., 1972) |
| <i>Streptomyces griseus</i> 1D | pMOL30 (238 kb) | (Hopwood et al., 1985) |
| <i>Streptomyces griseus</i> 1D-L ⁻ -M1 | NR ⁻ , SLP2, SLP3 | (Jendrossek et al., 1997) |
| <i>Streptomyces griseus</i> 1D-L ⁺ -M1 | NR ⁻ | diese Arbeit |
| <i>Streptomyces griseus</i> DSM 40236 | NR ⁺ | diese Arbeit |
| <i>Streptomyces griseus</i> M881 | NR ⁻ | DSM 40236 |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> 1A | NR ⁻ , <i>str</i> ⁻ | Thamm, unveröffentlicht |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> 1A-L ⁻ -M1 | NR ⁺ | (Jendrossek et al., 1997) |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> 1A-L ⁺ -M1 | NR ⁻ | diese Arbeit |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | NR ⁺ | diese Arbeit |
| | F ⁻ :: ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 / <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁻</i>) <i>supE44 thi-1 λ</i> <i>gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA⁻ argF</i>) U169 | (Hanahan, 1983) |

Fortsetzung Tabelle 1

| | | |
|--|--|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> XL1-blue | F ⁻ :: Tn10 <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^a Δ(<i>lacZ</i>) M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>supE44 relA1 lac</i> | (Bullock et al., 1992) |
| <i>Escherichia coli</i> XL1-blue MR | Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> ^c | (Jerpseth et al., 1992) |
| <i>Escherichia coli</i> JM110 | F ⁻ :: <i>traD36 proAB</i> <i>lacI</i> ^a Δ(<i>lacZ</i>)M15 / GM48str ^f (<i>thr</i> ⁻ <i>leu</i> ⁻ <i>thi</i> ⁻ <i>lacY galK galT ara</i> ⁻ <i>tonA tsx dam dcm</i> ⁻ <i>supE44</i>) Δ(<i>lac-proAB</i>) | (Yanisch-Perron et al., 1985) |
| <i>Escherichia coli</i> SCS110 | F ⁻ :: <i>traD36 proAB</i> <i>lacI</i> ^a Δ(<i>lacZ</i>)M15 / GM48str ^f (<i>thr</i> ⁻ <i>leu</i> ⁻ <i>endA1 thi lacY galK</i> <i>galT ara tonA tsx</i> ⁻ <i>dam dcm supE44</i>) Δ(<i>lac-proAB</i>) | Stratagene (San Diego, USA) |
| <i>Escherichia coli</i> EB304 | F ⁻ λ ⁻ suc ⁺ | Dr. Reh, Laborsammlung |
| <i>Escherichia coli</i> BHB 2688 | <i>recA</i> λ ^f (λ <i>Dam4b2 red3</i> <i>imm434 cIts Sam7</i>) | (Maniatis et al., 1982) |
| <i>Escherichia coli</i> BHB 2690 | <i>recA</i> λ ^f (λ <i>Dam15b2</i> <i>red3 imm434 cIts Sam7</i>) | (Maniatis et al., 1982) |
| <i>Escherichia coli</i> S17-1 | Tp ^R , Sm ^R , <i>thi-1, pro,</i> <i>hsdR, hsdM</i> ⁺ , <i>recA, tra</i> ⁺ | (Simon et al., 1983) |
| ^a Genotypbezeichnungen: Phänotypbezeichnungen: | s. (Bachmann, 1987) NR ⁺ : NR-Abbau NR ⁻ : kein NR-Abbau | |

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

| Vektor | relevanter Geno- oder Phänotyp ^a | Größe [bp] | Referenz/Herkunft |
|--------------------------------|--|------------|-----------------------------|
| pBBR1MCS-2 | Km ^R , <i>mob</i> | 5.144 | (Kovach et al., 1995) |
| pBBR1MCS-2cos | cos, Km ^R , <i>mob</i> | 6.863 | diese Arbeit |
| pBBR1MCS-2cos Amp | cos, Km ^R , Ap ^R , <i>mob</i> | 8.019 | diese Arbeit |
| pBluescript II KS ⁻ | Ap ^R , <i>lacPOZ</i> ['] , ColE1 | 2.961 | Stratagene (San Diego, USA) |
| pHC79 | cos, Ap ^R , Tc ^R | 6.524 | (Hohn & Collins, 1980) |
| pIJ702 | Th ^R , <i>mel</i> | 5.650 | (Katz et al., 1983) |
| pKU206 | cos, Ap ^R , Th ^R | 15.510 | (Kakinuma et al., 1990) |
| pLAFR3 | cos, Tc ^R | 22.000 | (Staskawicz et al., 1987) |

Fortsetzung Tabelle 2

| | | | |
|----------|---|--------|--|
| pPM803 | Th ^R , Neo ^R , oriT | 10.500 | (Mazodier et al., 1989) |
| pScosBC1 | cos, Ap ^R , Tp ^R | 8.772 | (Sokol et al., 1999) |
| pSUP5011 | Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tn5:: <i>mob</i> | | (Simon et al., 1983) |
| pWE15 | Ap ^R , Neo ^R , ColE1, | 8.136 | Stratagene (San Diego, USA) |
| pWHM3BE | SV40 ori, cos Ap ^R , Th ^R | 7.099 | Borovoc und Schrempf, unveröffentlicht |

^a Genotypbezeichnungen: s. (Bachmann, 1987)
mel: Tyrosinasegen
 Phänotypbezeichnungen: Ap^R: Ampicillin-Resistenz
 cos: cos-sites des Phagen λ
 Km^R: Kanamycin-Resistenz
 Neo^R: Neomycin-Resistenz
 Tc^R: Tetracyclin-Resistenz
 Th^R: Thiostrepton-Resistenz

2.2. Nährmedien

Zur Herstellung fester Komplexmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, 15 g Japanagar/l zugegeben, für feste Mineralmedien wurde 15 g/l Bacteriological Agar verwendet.

2.2.1. Komplexmedien

Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth 8 g
 H₂O_{bidest} ad 1000 ml

Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook et al., 1989)

Trypton 10 g
 Hefeextrakt 5 g
 NaCl 10 g
 H₂O_{bidest} ad 1000 ml
 pH 7,5

Soja-Mannit-Medium (SM)

-zur Stammhaltung von Streptomyceten

Sojamehl (fettarm) 20 g
 Mannit 20 g
 H₂O_{bidest} ad 1000 ml

Vollmedium (J. Pigac, pers. Mitteilung)

- zur Anzucht von *S. lividans* in Flüssigkultur

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Saccharose | 103 g |
| Tryptic Soy Broth | 20 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 990 ml |

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml 5 M MgCl₂ steril zugesetzt.

Tryptic Soy Broth (TSB)

- zur Anzucht von *S. griseus* in Flüssigkultur

| | |
|------------------------------------|------------|
| Tryptic Soy Broth | 20 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |

R-S-Medium

- zur Stammhaltung von Streptomyceten

| | |
|--|------------|
| K ₂ SO ₄ | 0,25 g |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 10,12 g |
| Glucose | 10,0 g |
| Casamino acids | 0,1 g |
| Hefeextrakt | 5,0 g |
| Tris | 3,03 g |
| Agar | 14,0 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,6 | |

Nach dem Autoklavieren wurden folgende separat autoklavierte Lösungen steril zugesetzt:

| | | |
|--|-------------|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 % (w/v) | 1,0 ml |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 5 M | 0,4 ml |
| Spurenelementlösung | 10 x | 2,0 ml |

R+S-Medium

- zur Regeneration von *S. lividans*-Protoplasten

R+S-Medium enthielt im Gegensatz zum R-S-Medium noch 103 g Saccharose/l und 5,78 g/l TES statt des in R-S-Medium verwendeten Tris.

SpMR-Medium

- zur Regeneration von *S. griseus*-Protoplasten

| | |
|--|------------|
| Glucose | 5,0 g |
| Hefeextrakt | 1,0 g |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 10,0 g |
| Spurenelementlösung (10 x) | 2,0 ml |
| MOPS | 2,1 g |
| Saccharose | 103,0 g |
| Agar | 22,0 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,2 | |

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 4 ml 5 M CaCl₂ steril zugesetzt.

Spurenelementlösung (10 x)

| | |
|--|-----------|
| ZnCl ₂ | 40 mg |
| FeCl ₃ x 6 H ₂ O | 200 mg |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 10 mg |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 10 mg |
| Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O | 10 mg |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O | 10 mg |
| H ₂ O _{bidest} | ad 100 ml |

SOC-Medium

| | |
|------------------------------------|------------|
| Trypton | 20,0 g |
| Hefeextrakt | 5,0 g |
| NaCl | 0,6 g |
| KCl | 0,2 g |
| MgCl ₂ | 2,3 g |
| MgSO ₄ | 2,6 g |
| Glucose | 3,6 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |

Kings B-Medium

| | |
|--|------------|
| Proteose Pepton | 20,0 g |
| Glycerin (87 %, v/v) | 10,0 ml |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 1,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,5 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |
| pH 7,2-7,4 | |

2.2.2. Mineralmedien**Mineralmedium** (Schlegel et al., 1961)

| | |
|--|------------|
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 9,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 g |
| NH ₄ Cl | 1,0 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,02 g |
| Fe(III)NH ₄ -Citrat | 1,2 mg |
| SL6 (10.000 x) | 0,1 ml |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,0 | |

In der Regel wurden MgSO₄, CaCl₂ und Fe(III)NH₄-Citrat als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen getrennt autoklaviert und später dem Medium steril zugesetzt.

Spurenelementlösung SL6 (Pfennig, 1974) (10.000 x)

| | |
|---|------------|
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 1,0 g |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0,3 g |
| H ₃ BO ₄ | 3,0 g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 2,0 g |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,1 g |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,2 g |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,3 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |

Mineralmedium (Tsuchii & Takeda, 1990)

| | |
|---|------------|
| K ₂ HPO ₄ | 8,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,02 g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,018 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 g |
| MnSO ₄ | 0,5 mg |
| NaCl | 0,1 g |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,5 mg |
| Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O | 0,5 mg |
| Hefeextrakt | 0,2 g |
| Tween 80 | 0,002 % |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,5 | |

In der Regel wurden nur die Pufferkomponenten, Hefeextrakt und Tween 80 zusammen autoklaviert und die restlichen Bestandteile des Mediums nachfolgend als 1000-fach-konzentrierte Stammlösungen steril zugesetzt.

2.2.3. Medien für physiologische Untersuchungen**Dye`s Medium C, modifiziert**

| | |
|---|------------|
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 5,0 g |
| Hefeextrakt | 1,0 g |
| C-Quelle (20 %, w/v) | 25 ml |
| Bromphenolrot [0,1 % (w/v) in 40 % (v/v) EtOH] | 10,5 ml |
| Agar | 12,0 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |

Eine Säurebildung aus der angebotenen C-Quelle resultierte in einer Azidifizierung des Mediums und daher in einem Farbumschlag des pH-Indikators Bromphenolrot von (dunkel-)lila zu (hell-)rot.

Gasbildung aus Nitrat unter anaeroben Bedingungen (Denitrifikation)

| | |
|------------------------------------|------------|
| Trypton | 1,0 g |
| Hefeextrakt | 0,2 g |
| Fleischextrakt | 0,3 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| NaNO ₃ | 1,0 g |
| Agar | 0,5 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,6 | |

Nach Beimpfung und Verfestigung des Agars im Röhrchen wurde dieser mit einem ca. 2 cm dicken Agarpfropfen überschichtet.

Gasbildung aus Nitrat unter anaeroben Bedingungen wurde durch auftretende Gasblasen unterhalb des Agarpfropfens sichtbar.

Gärung mit Glucose/Gasbildung aus Glucose

| | |
|------------------------------------|------------|
| Pepton | 10,0 g |
| Glucose (20 %, w/v) | 50 ml |
| K ₂ HPO ₄ | 2,0 g |
| Eosin Y | 0,4 g |
| Methylenblau | 0,06 g |
| Agar | 15 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 6,8 | |

oder:

| | |
|------------------------------------|------------|
| Tryptose | 10,0 g |
| Fleischextrakt | 3,0 g |
| Hefeextrakt | 2,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 5,0 g |
| Glucose (20 %, w/v) | 25 ml |
| Agar | 5,0 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,2 | |

Nach Beimpfung und Verfestigung des Agars im Röhrchen wurde dieser mit einem ca. 2 cm dicken Agarpfropfen überschichtet.

Gärung mit Glucose/Gasbildung aus Glucose wurde durch auftretende Gasblasen unterhalb des Agarpfropfens sichtbar.

Citratverwertung

| | |
|--|------------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| NaCl | 1,0 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 g |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 1,0 g |
| Na ₃ -Citrat | 2,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Phenolrot (0,04 %, w/v) | 20,0 ml |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,0 | |

Eine Verwertung von Citrat resultierte in einer Alkalisierung des Mediums und daher in einem Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot von rot nach orange.

Nitratreduktion (Nitritnachweis)

| | |
|------------------------------------|------------|
| Nutrient Broth | 8,0 g |
| H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| pH 7,0 | |

Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1 ml 1,5 % (w/v) KNO₃ steril zugesetzt. Der Nitrat- bzw. Nitritnachweis erfolgte mit Hilfe von Merckoquant 10020 Indikatorstäbchen der Merck AG, Darmstadt.

2.2.4. Polymer-Agarplatten

NR/DPNR-Platten

Um auch auf festen Nährböden den NR-Abbau untersuchen zu können, wurden NR-Agarplatten hergestellt. Diese Platten bestanden aus zwei Schichten, von denen die untere Schicht („underlay“) ca. 20 ml Schlegel-Mineralmedium + 0,05 % (w/v) Hefeextrakt mit den betreffenden Zusätzen, die obere Schicht („overlay“; 7-8 ml) zusätzlich zum Medium [+ 0,05 % (w/v) Hefeextrakt] noch 0,2 % (w/v) NR bzw. DPNR enthielt. Ein Abbau von NR/DPNR wurde anhand einer um die Kolonien herum auftretenden Aufklärung des Agars deutlich.

PHB-Platten

Analog zu den NR/DPNR-Platten bestanden auch die PHB-Platten aus 2 Schichten, von denen die obere zusätzlich zum Schlegel-Mineralmedium 0,4 % (w/v) PHB enthielt. Ein Abbau von PHB wurde anhand eines um die Kolonien herum auftretenden Hydrolysehofes sichtbar.

Casein-Platten

10 % (w/v) Skim Milk und 2,5 % (w/v) Wasseragar, pH 7-7,5, wurden getrennt autoklaviert und anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt. Ein Abbau von Casein wurde anhand eines um die Kolonien herum auftretenden Hydrolysehofes sichtbar.

Stärke-Platten

Um einen Stärkeabbau nachweisen zu können, wurden NB-Platten mit 1 % (w/v) löslicher Stärke hergestellt. Der Nachweis des Stärkeabbaus erfolgte durch Überschichten der bewachsenen Platten mit Lugol'scher Lösung (13 g/l J₂, 20 g/l KJ). Während nicht-hydrolysierte Stärke durch die Einlagerung von Jod blau erscheint, wird abgebaute Stärke nicht mehr angefärbt, so daß der Agar hell erscheint.

2.3. Medienzusätze

2.3.1. Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen und Medienzusätze wurden nach (Sambrook et al., 1989) mit den entsprechenden Lösungsmitteln angesetzt, sterilfiltriert und in Aliquots

bei -20°C aufbewahrt. Sie wurden den autoklavierten Nährmedien nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt:

| Medienzusatz | Stammlösung | Endkonzentration |
|----------------------|--|-------------------------|
| Ampicillin (Na-Salz) | 50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} | 50-100 µg/ml |
| Kanamycin | 25-100 mg/ml in H ₂ O _{bidest} | 25-50 µg/ml |
| Tetracyclin | 15 mg/ml in 50 % Ethanol (v/v) | 7,5-15 µg/ml |
| Thiostrepton | 1 mg/ml in N,N`-DMFA | 10-25 µg/ml |
| IPTG | 0,2 M in H ₂ O _{bidest} | 0,2 mM |
| X-Gal | 2 % (w/v) in N,N`-DMFA | 0,003 % (w/v) |

2.3.2. Polymere

NR/DPNR

NR (Natural rubber) oder DPNR (Deproteinized natural rubber) wurden als sterile und teilweise durch Ammonium stabilisierte 6-40 %ige (w/v) Stammlösungen von Dr. A. Ikram vom National Rubber Research Institute of Malaysia in Kuala Lumpur, Malaysia erhalten. Durch Dialyse gegen 50 mM KH₂PO₄-Puffer, pH 6,8 (NaOH) ÜN bei 4°C wurde das Ammonium und andere niedermolekulare Verunreinigungen entfernt (Visking Dialysis Tubing 20/32, Ausschlußvolumen von 6-8 kDa, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), so daß die Latex anschließend erneut für 15 min bei 120°C autoklaviert werden konnte. Alternativ wurde ÜN bei 4°C gegen (steriles) H₂O_{bidest} dialysiert und die Latexsuspension dann 1 h bei 80°C pasteurisiert. Anschließend wurde der NR-Gehalt durch Trockengewichtsbestimmung ermittelt (100 µl NR/DPNR auf Objektträger auftropfen, bis zur Massenkonstanz trocknen und auswiegen).

PHB

Zur Herstellung einer PHB-Stammlösung wurden 3 g fein zermörseres PHB, welches wie in (Jendrossek et al., 1993) beschrieben, isoliert worden war, in 100 ml H₂O_{bidest} gegeben und ÜN gerührt. Um eine möglichst homogene und stabile PHB-Suspension zu erhalten, wurde die Lösung anschließend unter ständiger Kühlung in einem Eis/NaCl-Gemisch mit Ultraschall behandelt (60 %, Amplitude 0,4, 1 min/6 ml, Ultraschallprozessor UP200s, Dr. Hielscher GmbH, Stuttgart). Diese Suspension wurde dann für 10 min autoklaviert und bei 4°C gelagert.

2.4. Anzucht von Streptomyceten und *Xanthomonas* sp 35Y in NR/DPNR-Flüssigkulturen

Die Anzucht von Streptomyceten erfolgte als 100 ml-Kulturen in 1 l-Erlenmeyerkolben. Es wurde Schlegel-Mineralmedium mit 0,05 % (w/v) oder 0,2 % (w/v) NR/DPNR als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Hauptkulturen wurden 5 %ig (v/v) mit den Zellen gut gewachsener TSB-Vorkulturen beimpft. Die Inkubation erfolgte als Standkulturen bei 30°C für 1-4 Wochen. Dabei war darauf zu achten, daß das Volumen/Oberflächen-Verhältnis möglichst gering ausfiel und die Kulturen keiner permanenten Lichteinstrahlung ausgesetzt waren. Außerdem wurde beobachtet, daß ein besseres Wachstum der Kulturen erreicht wurde, wenn diese nur gelegentlich geschüttelt wurden. Die Anzucht von *Xanthomonas* sp. 35Y erfolgte als 100 ml-Kultur in 1 l- oder als 300 ml-Kultur in 5 l-Erlenmeyerkolben, jedoch wurde Mineralmedium nach (Tsuchii & Takeda, 1990) mit 0,002 % (v/v) Tween 80 und den entsprechenden C-Quellen verwendet. Die Hauptkulturen wurden 5 %ig (v/v) mit den Zellen gut gewachsener NB-Vorkulturen beimpft. Um ein Ausfallen des NRs bzw. DPNRs zu vermeiden, wurden alle Kulturen bis zu 8 Tagen bei 30°C als Standkulturen inkubiert, jedoch mehrmals täglich kräftig geschüttelt.

Nach der Ernte der Kulturen wurde der Überstand zur restlosen Entfernung von Zellmaterial und des nicht abgebauten NRs/DPNRs mittels 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und bei 4°C oder -20°C gelagert.

2.5. Stammhaltung und Konservierung

Zur kurzfristigen Lagerung wurden alle Bakterienstämme auf geeigneten Platten im Kühlschrank bei 6-8°C gehalten. Eine dauerhafte Konservierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte bei -70°C als Glycerin-Stammkultur. Dazu wurde aus einer ausgewachsenen LB-Flüssigkultur ein Aliquot von 830 µl entnommen und in einem sterilen Schraubdeckelgläschen (Serolab, Aidenbach) mit 170 µl 87 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Zur Reaktivierung wurde ein Ausstrich auf LB-Agar, gegebenenfalls mit Antibiotika-Zusatz, vorgenommen und ÜN bei 37°C inkubiert. Die *Streptomyces*-Stämme wurden dauerhaft als Sporensuspensionen bei -70°C gelagert. Dazu wurden von einer gut bewachsenen SM-Platte die Sporen mit einer Impföse abgenommen und in steriles, 20 %iges (v/v) Glycerin gegeben. Die Lagerung der

Sporensuspensionen erfolgte bei -70°C . Zur Reaktivierung der Sporen wurde ein Ausstrich auf SM-Medium vorgenommen.

Die langfristige Lagerung der *Xanthomonas*-Stämme erfolgte als Lyophilisat. Dazu wurden sterile Filterplättchen, die auf einer gut bewachsenen NB-Platte durch Aufschwemmung der Kolonien mit einer Lösung aus 10 % (w/v) Skimmlin und 5 % (w/v) myo-Inositol Zellen aufgesogen hatten, bei -20°C eingefroren und mindestens 24 h gefriergetrocknet. Die Lagerung der zellgetränkten Plättchen erfolgte in kleinen Schraubdeckelgläsern über Watte und Blaugel als Trockenmittel bei -70°C . Zur Reaktivierung wurden 1-2 Filterplättchen in 10 ml NB-Medium bei 30°C ÜN inkubiert.

2.6. Physiologische Tests

2.6.1. Aktivitäts-Test

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung extrazellulärer NR-(Di-) Oxygenase-Aktivität wurden Enzym-Aktivitätstests in 96 well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden 60, 120 oder 180 μl zellfreier, eingengter Überstand einer NR/DPNR-gewachsenen *Xanthomonas*-Kultur mit unterschiedlichen Konzentrationen NR/DPNR [0,0017 %, 0,0085 %, 0,017 %, 0,085 % (w/v)] in folgendem Reaktionsansatz für bis zu 24 h bei 22°C inkubiert:

| | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Enzym-Rohextrakt | | 60-180 μl |
| NR | 0,0017-0,085 % (w/v) | x μl |
| Tween 80 | 0,3 % (v/v) | 2 μl |
| KP-Puffer, pH 7,5 | 10 mM | 60 μl |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 300 μl |

Die Messung der Trübungsabnahme erfolgte als Kinetik in Doppelwerten bei 595 nm in 10 min-Intervallen.

2.6.2. Gram-Färbung

Ein Tropfen des zu bestimmenden Bakterienstammes wurde auf einen Objektträger gegeben und verteilt. Zum Vergleich wurden als Gram-positiver Organismus *Bacillus subtilis* und als Gram-negatives Bakterium *Ralstonia eutropha* mitgeführt. Der Objektträger wurde zur Hitzefixierung durch den oberen, nicht-leuchtenden Teil der Bunsenbrennerflamme gezogen. Anschließend wurde der Ausstrich mit Kristallviolett-

Lösung bedeckt und 2 min einwirken gelassen. Nach Abspülen der Lösung mit Wasser (5 sec) wurde Lugol'sche Lösung aufgetropft, 2 min auf dem Objektträger belassen und mit Wasser kurz abgespült. Die Entfärbung wurde durch n-Propanol-Behandlung für 1 min erreicht. Nachdem kurz mit Wasser gespült worden war, wurde 1 min mit 0,5 % (w/v) Safranin-Lösung gegengefärbt. Das mit Wasser gespülte, jedoch noch nasse Präparat wurde mit einem Deckglas bedeckt und das überschüssige Wasser entfernt. Die Mikroskopie erfolgte im Hellfeld. Gram-positive Bakterien erscheinen dunkel-violett, Gram-negative gelb-orange.

| | | |
|-------------------------|---------------------|--------------|
| Kristallviolett-Lösung: | Kristallviolett | 1,0 % (w/v) |
| | Phenol | 2,5 % (w/v) |
| | Ethanol | 10,0 % (w/v) |
| Lugol'sche Lösung: | J ₂ | 1,3 % (w/v) |
| | KJ | 2,0 % (w/v) |
| | Polyvinylpyrrolidon | 10,0 % (w/v) |

2.6.3. Katalase-Test

Auf eine gut bewachsene Agarplatte des zu untersuchenden Stammes wurden einige Tropfen einer 3 %igen (v/v) H₂O₂-Lösung aufgetropft. Bei Katalase-positiven Bakterien sollten sofort und auch noch nach einigen Minuten Gasblasen aufsteigen.

2.6.4. Oxidase-Test

Tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid wird durch Cytochrom-c-Oxidase zu einer purpurroten Verbindung oxidiert.

Auf ein Filterpapier wurden einige Tropfen einer frisch angesetzten, 1 %igen (w/v) Lösung von Tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid gegeben. Dann wurde etwas Zellmaterial des zu untersuchenden Bakterienstammes auf dem Filterpapier zerrieben. Bei einer positiven Reaktion tritt innerhalb weniger Sekunden eine violette bis purpurrote Färbung auf.

2.6.5. Pigmentextraktion aus verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen

Zur phylogenetischen Einordnung des untersuchten *Xanthomonas*-Spezies wurden methanolische Extrakte des gelben Pigmentes hergestellt. Dazu wurden der betreffende *Xanthomonas*-Stamm und als Referenz drei weitere *Xanthomonaden*,

X. campestris pv. *campestris*, *X. pelargonii* und *X. campestris* pv. *malvacearum*, in jeweils 50 ml NB-Medium angezogen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (4.500 Upm, 20 min, 4°C, Sigma 4K15C, Rotor 11140, Sigma Laborzentrifugen, Deisenhofen) wurden die Pellets in Methanol aufgenommen (80 ml Methanol/g Zellnaßgewicht). Zur Extraktion der Pigmente wurden die Ansätze für 5 min in einem siedenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 4.500 Upm für 20 min wurden die Extrakte entweder im Rotationsverdampfer oder aber in einer Lyophylle bis zur Trocknung eingeengt. Die Pigmentextrakte wurden dann in jeweils 1 ml Methanol wieder aufgenommen. Die Messung der Absorptionsspektren im Bereich von 300-550 nm erfolgte in 1 ml-Quarzküvetten in einem Kontron-Spektrophotometer (Bio-Tek, Kontron Instruments, Mailand) gegen reines Methanol.

2.6.6. UV-Mutagenese

Zur Erzeugung von im NR-Abbau defekten Mutanten wurde mit den Stämmen *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Xanthomonas* sp. 35Y eine ungerichtete Mutagenese mittels UV-Licht durchgeführt. Dazu wurden für die *Streptomyces*-Stämme gut bewachsene SM-Platten mit sterilem 20 % (v/v) Glycerin abgeschwemmt und eine dichte Sporensuspension von $2,5-4,0 \times 10^{10}$ Sporen/ml hergestellt. *Xanthomonas* sp. 35Y wurde als 100 ml-NB-Kultur bei 30°C herangezogen und die Zellen nach der Ernte in steriler Saline [0,9 % (w/v) NaCl] aufgenommen, so daß ebenfalls eine Dichte von $2,5-4,0 \times 10^{10}$ Zellen/ml erreicht wurde. Jeweils 10 ml dieser Sporen-/Zellsuspensionen wurden mit dem gleichen Volumen 20 % (v/v) Glycerin bzw. Saline verdünnt und in eine Glaspetrischale mit 8 cm Durchmesser gegeben. Die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 254 nm erfolgte unter ständigem Rühren in einem Abstand von 8 cm für die Streptomyceten und 30 cm für den *Xanthomonas*-Stamm. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 1 ml Zellsuspension entnommen und bis zur Herstellung der Verdünnungsreihen (0,5 ml Probe + 4,5 ml 20 % (v/v) Glycerin bzw. Saline) im Dunkeln aufbewahrt. Je 100 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden auf SM- bzw. NB-Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Anzahl der überlebenden Zellen pro ml Suspension (cfu/ml) bestimmt.

Aus geeigneten Verdünnungsstufen des Zeitpunktes, an dem 99 % der Zellen abgetötet worden waren, wurden Kolonien auf ihren Phänotyp auf NR-Agarplatten hin überprüft.

So konnte man davon ausgehen, daß die überlebenden Zellen Mutationen aufwiesen.

Molekularbiologische Methoden

Alle Zentrifugationen wurden, sofern nicht anders angegeben, im E-Cup-Maßstab bei RT in einer Biofuge Pico und bei 2-4°C in einer Biofuge Fresco der Firma Heraeus, Osterode durchgeführt. Zentrifugationen größerer Volumina (10-100 ml) wurden in einer Sigma 4K15C-Swing-out-Kühlzentrifuge (Rotor 11140) der Firma Sigma Laborzentrifugen, Deisenhofen oder in einer RC5B-Zentrifuge (Sorvall DuPont Instruments, Bad Homburg) mit SS34-Rotor vorgenommen. Volumina > 100 ml wurden in einer RC5B-Zentrifuge (Sorvall DuPont Instruments, Bad Homburg) mit einem GS-A- bzw. GS-3-Rotor durchgeführt.

2.7. Isolierung von Nukleinsäuren

2.7.1. Vorbehandlung von Lösungen und Geräten

Zur Sterilisation und Inaktivierung von DNasen wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen autoklaviert. Nicht hitzebeständige Gefäße wurden mit 70 % (v/v) Ethanol und anschließend mit sterilem H₂O_{bidest} ausgespült. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm-Filter).

2.7.2. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.7.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen erfolgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde festes, mit 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0 equilibriertes und mit Hydroxychinolin stabilisiertes Phenol (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg) bei 60°C im Wasserbad geschmolzen und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

Zur Deproteinisierung von DNA-Lösungen wurden diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und gut durchmischt. Eine Phasentrennung wurde in der Regel durch Zentrifugation der Proben für 4-10 min bei RT und

13.000 Upm erreicht. Nach Überführung der wäßrigen Oberphase in ein neues Gefäß, wurde die DNA durch Zugabe von 96 % (v/v) Ethanol präzipitiert (s. 2.7.2.2.)

Um besonders gut gereinigte DNA zu erhalten, wurde der Phenol/Chloroform-Extraktion eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion [Zugabe von 1,5 Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1, v/v)] angeschlossen, so daß auch restliches Phenol entfernt wurde. Anschließend erfolgte eine Isopropanol-Fällung (s. 2.7.2.2.).

2.7.2.2. Alkohol-Präzipitation

Zur Konzentrierung von DNA-Lösungen wurde eine Fällung mit 96 % (v/v) Ethanol (Endkonzentration 70 %, v/v) oder Isopropanol (Endkonzentration 60 % , v/v) durchgeführt. Dabei muß die Kationenkonzentration von DNA-Lösungen bei der Ethanol-Präzipitation mindestens 50 mM betragen, gegebenenfalls wurde dies durch Zugabe von NaCl oder Natriumacetat erreicht. Die DNA-Lösung wurde dann mit 2,5 Volumen eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol versetzt, gut durchmischt und für 10-30 min auf Eis oder bei -20°C inkubiert. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 Upm für 30 min. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 3-5 min bei RT und 13.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet, in einem angemessenen Volumen eines geeigneten Puffers oder H₂O_{bidest} gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Bei der Isopropanol-Fällung wurde der wäßrigen Phase nach der Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und gut vermischt. Nach der Zentrifugation für 30 min bei RT und 13.000 Upm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet wie bereits beschrieben mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in Puffer/H₂O_{bidest} resuspendiert.

Ligationsansätze wurden zur Aufkonzentrierung der DNA und zur Entfernung von Salzen mit n-Butanol gefällt. Dazu wurde der Ligationsansatz mit H₂O_{bidest} auf 50 µl aufgefüllt, mit 500 µl n-Butanol versetzt, kurz gevortext und 10 min bei RT und 13.000 Upm zentrifugiert. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 4-5 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

2.7.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten

200 ml Vollmedium mit 10 µg Thiostrepton/ml wurden nach dem Animpfen mit Sporen ÜN als Standkultur und weitere 24 h als Schüttelkultur bei 30°C inkubiert. Die Kultur

wurde durch Zentrifugation bei 4.500 Upm und 4°C für 20 min geerntet. Das Myzel wurde zweimal mit 10 ml P-Puffer gewaschen und vor dem 2. Waschen auf 20 E-Cups aufgeteilt. Pro E-Cup wurden 500 µl Lösung I zugegeben und zur Protoplastierung 20-30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung II und Inkubation für 5 min bei RT wurde der Ansatz mit 270 µl Lösung III versetzt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12.000 Upm. Der Überstand wurde in neue E-Cups überführt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (s. 2.7.2.2.) versetzt und gründlich gemischt. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation bei 12.000 Upm für 5 min wurde der Überstand erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Der DNA-haltige Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol vermischt und 10-15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA bei 4°C und 12.000 Upm für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl H₂O_{bidest} gelöst. Durch Zugabe von 100 µl kaltem 10 M LiCl und Inkubation bei -70°C für 30 min wurden Reste von Proteinen mit anheftender chromosomaler DNA gefällt. Der plasmidhaltige Überstand wurde schließlich mit Isopropanol präzipitiert, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (s. 2.7.2.2.) und die DNA in 20-30 µl TE-Puffer gelöst.

| | | |
|-----------------------------------|--|-----------|
| (Protoplastierungs-) P-Puffer: | Saccharose | 103 g |
| | K ₂ SO ₄ | 0,25 g |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 2,02 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 800 ml |

Der P-Puffer wurde in 80 ml-Portionen aliquotiert und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden pro 80 ml folgende separat autoklavierte Lösungen steril zugesetzt:

| | | |
|--|--------------|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 % (w/v) | 1 ml |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 3,68 % (w/v) | 10 ml |
| TES | 5,73 % (w/v) | 10 ml |
| Spurenelementlösung | 10 x | 0,2 ml |

| | | |
|-----------|-----------------------|---------|
| Lösung I: | Tris/HCl, pH 8,0 | 25 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 10 mM |
| | Glucose | 50 mM |
| | Lysozym | 4 mg/ml |
| | RNaseA (10 mg/ml) | 20 µl |

| | | |
|-------------|----------|-------|
| Lösung II: | SDS | 2 % |
| | NaOH | 0,3 M |
| Lösung III: | K-Acetat | 3 M |
| | Eisessig | 5 M |

2.7.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus Gram-negativen Bakterien

2.7.4.1. Schnellpräparation von Plasmid-DNA (boiling-prep)

Zur schnellen qualitativen Analyse von Transformanten oder Klonen wurde der boiling-prep durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml Zellsuspension aus einer ÜN-gewachsenen 5 ml-LB-Kultur mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz in einem E-Cup für 30 sec bei 13.000 Upm abzentrifugiert und das Pellet in 400 µl STET-Puffer mit 25 µl 12 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nachdem die Probe für 40 sec in einem kochenden Wasserbad denaturiert worden war, wurde der Ansatz 30 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das weiße Proteinpellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 50 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 500 µl Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die DNA für 10 min bei 13.000 Upm und 4°C pelletiert. Die DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit 1 µl RNaseA (10 mg/ml) aufgenommen.

| | | |
|--------------|-----------------------|-------------|
| STET-Puffer: | Tris/HCl, pH 8,0 | 10 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 50 mM |
| | Saccharose | 8 % (w/v) |
| | Triton X-100 | 0,5 % (v/v) |

2.7.4.2. Plasmid-Mini-Präparation durch alkalische Lysis (Birnboim & Doly, 1979)

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 10 ml-LB- bzw. NB-Flüssigkulturen mit Antibiotika-Zusatz ÜN bei 37°C. Jeweils 1,5 ml- bzw. 3 ml-Aliquots der Kulturen wurden in E-Cups 2 min bei RT und 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 100 µl GETL-Lösung resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl SDS-Lösung, gutem Durchmischen und 2-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Lyse der Zellen. Zur Proteinausfällung wurden 150 µl kaltes Kaliumacetat zugegeben, kräftig durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm und 4°C wurden die Überstände in neue E-Cups pipettiert und einer Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.7.2.2.) unterzogen.

Anschließend wurde die DNA, wie unter 2.7.2.2. beschrieben, gefällt, gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde dann in 20-100 µl RNase-haltigem TE-Puffer, pH 8,0, gelöst und bei -20°C gelagert. Die so aufgereinigte Plasmid-DNA konnte direkt für Restriktionsverdau, PCR- und Sequenzierungsreaktionen eingesetzt werden.

| | | |
|----------------------|--|--------------|
| GETL-Lösung: | Tris/HCl, pH 8,0 | 25 mM |
| | Glucose | 50 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 10 mM |
| | Die Lösung wurde bei 4°C gelagert; vor Gebrauch wurden ein paar Krümel Lysozym zugesetzt | |
| SDS-Lösung: | NaOH | 200 mM |
| | SDS | 1 % (w/v) |
| Kaliumacetat-Lösung: | Kaliumacetat | 3 M |
| | Eisessig | 11,5 % (v/v) |
| TE-Puffer: | Tris/HCl, pH 8,0 | 10 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 1 mM |
| RNase A-Lösung: | Tris/HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| | NaCl | 15 mM |
| | RNase A | 10 mg/ml |
| | Die Lösung wurde für 15 min bei 85°C erhitzt und dann aliquotiert bei -20°C gelagert. | |

2.7.4.3. Plasmid-Präparation mittels Säulenchromatographie

Die Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* oder *Xanthomonas* sp. 35Y erfolgte mittels eines QIAGEN Plasmid Midi Kits (QIAGEN GmbH, Hilden). Die gewonnene Plasmid-DNA war in der Regel frei von chromosomaler DNA und konnte direkt für Restriktionsanalysen, Sequenzierungen und PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in bis zu 100 ml-LB-Flüssigkulturen mit Antibiotika-Zusatz ÜN bei 37°C. Die Kulturen wurden 5 min bei RT und 4.500 Upm abzentrifugiert. Das weitere Vorgehen entsprach den Anleitungen des Herstellers.

Für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.7.4.4. Isolierung von Megaplasmiden (Kado & Liu, 1981), modifiziert

10 ml NB-Medium wurde mit *Xanthomonas* sp. 35Y beimpft und mindestens 24 h bei 30°C geschüttelt. 1,5 ml Zellsuspension wurden im E-Cup abzentrifugiert und in 150 µl Puffer I resuspendiert. Nach vorsichtigem Einmischen von 350 µl Lysispuffer wurde der Ansatz bis zur Aufklärung des Lysats 45 min bei 58°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 5 M NaCl und 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurden die Phasen durch mehrfaches, gleichmäßiges Schwenken vollständig durchmischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 10.000 Upm und RT für 20 min erreicht. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol erneut extrahiert. Nach einer abschließenden Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol wurde die erhaltene Oberphase bis zur Elektrophorese bei 4°C gelagert.

Zur Kontrolle wurden die Megaplasmide aus *Alcaligenes eutrophus* CH34 und *Alcaligenes eutrophus* AEM813 ebenfalls isoliert. Für alle Präparationen wurden drei Parallelansätze durchgeführt.

| | | |
|--------------|-----------------------|-------------|
| Puffer I: | Tris | 40 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 20 mM |
| | pH 7,9 (Eisessig) | |
| Lysispuffer: | Tris | 50 mM |
| | NaOH | 89 mM |
| | SDS | 2,5 % (w/v) |
| | pH 12,6 | |

2.7.4.5. Isolierung von intakter Gesamt-DNA für analytische Zwecke

Mit dieser Methode wurde intakte Gesamt-DNA aus *Xanthomonas* sp. 35Y zur raschen Darstellung linearer Plasmide isoliert.

10 ml NB-Medium wurden mit *Xanthomonas* sp. 35Y beimpft und mindestens 24 h bei 30°C geschüttelt. 5 ml Zellsuspension wurden im E-Cup abzentrifugiert, in 100 µl 45°C-warmem EET-Puffer aufgenommen und schnell mit 100 µl auf 45°C temperierter LMP-Agarose [2 % (w/v) in H₂O_{bidest}] vermischt. Zur Herstellung der Blöckchen wurde das Gemisch in den dünn ausgezogenen Teil von langen Pasteurpipetten gezogen und zum Gelieren für 10 min auf Eis gelagert. Das erstarrte Agarose-Gemisch wurde aus den Pasteurpipetten in frisch angesetzten Lysispuffer I ausgeblasen und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Austausch des Puffers gegen Lysispuffer II

und eine Inkubation ÜN bei 55°C. Nachdem der Ansatz auf RT abgekühlt war, wurde der Überstand abgenommen und die Agaroseblöckchen mindestens 3 x 30 min mit TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM Na₂-EDTA, pH 7,5) gewaschen. Die Agaroseblöckchen wurden in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

| | | |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| EET-Puffer: | Tris | 10 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 100 mM |
| | EGTA | 10 mM |
| | pH 8,0 (NaOH) | |
| Lysispuffer I: | Lysozym | 0,5 mg/ml EET-Puffer |
| | Na-N-Lauroylsarkosin | 0,6 mg/ml EET-Puffer |
| Lysispuffer II: | Proteinase K | 0,1 mg/ml EET-Puffer |
| | SDS | 10,0 mg/ml EET-Puffer |

2.7.5. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptomyceten

200 ml TSB mit 2 % (w/v) Glycin, 0,3 % (w/v) Glucose und 15 % (w/v) Saccharose wurde mit Sporen beimpft, ÜN als Standkultur und weitere 24-48 h als Schüttelkultur bei 30°C inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (10 min, 4.500 Upm, 4°C) und das Pellet einmal mit P-Puffer (s. 2.7.3.) gewaschen. Anschließend wurde das Myzelnaßgewicht bestimmt und pro Gramm Myzelnaßgewicht 2 ml P-Puffer mit 5 mg Lysozym/ml zugegeben. Die Protoplastierung der Zellen wurde durch Inkubation für ca. 20-30 min bei 37°C erreicht. Nach Zugabe von alkalischem SDS (s. 2.7.3. Lösung II) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % (w/v) und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz mit 20 µg/ml Proteinase K (Endkonzentration) und 40 µg/ml RNaseA (Endkonzentration) versetzt und erneut 30 min bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die SDS-Konzentration auf 1 % (w/v) erhöht und wiederum 10-30 min bei 37°C inkubiert. Es wurden dann 8 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und bis zur vollständigen Phasendurchmischung (ca. 30 min) bei RT gemischt. Die Phasentrennung wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 4.500 Upm und 4°C erzielt. Die obere Phase wurde mit einer umgedrehten Glaspipette vorsichtig abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform erneut extrahiert. Die DNA-haltige Oberphase wurde in ein kleines Becherglas überführt, mit 4 M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M versetzt und vorsichtig vermischt. Nach vorsichtiger Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wurde die chromosomale DNA mit einer gebogenen

Pasteur-Pipette langsam aufgewickelt bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Die DNA wurde kurz getrocknet und in 1 ml TE-Puffer gelöst.

2.7.6. Isolierung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien (Ausubel et al., 1987)

100-250 ml NB-Medium wurde mit *Xanthomonas* sp. 35Y angeimpft und etwa 2 d bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde für 20 min bei 4.500-6.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 9,5 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml 10 % (w/v) SDS und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde zur Lyse der Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,8 ml 5 M NaCl zugegeben und vorsichtig gemischt. Durch Versetzen des Ansatzes mit 1,5 ml 10 % (w/v) CTAB (in 0,7 M NaCl) und eine 20-minütige Inkubation bei 65°C wurde eine Denaturierung von Proteinen erreicht. Durch die nachfolgende zweifache Extraktion mit 14 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sollten die denaturierten Proteine abgetrennt werden. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß der Ansatz solange vorsichtig geschwenkt wurde, bis keine Phasentrennung mehr zu erkennen war. Nach Zentrifugation bei 4.500 Upm für mindestens 30 min wurde die Oberphase abgenommen und mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Die Pelletierung der chromosomalen DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 4.500 Upm und 4°C für mindestens 30 min. Die DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1-2 ml RNaseA-haltigem TE-Puffer (1 µg/ml) aufgenommen (s. 2.7.2.2.).

2.7.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten definierter Größe wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet, DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wurden mittels QIAex Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) isoliert. Das DNA-Fragment-Gemisch wurde dazu in einem 0,8-1,5 %igen (w/v) Agarosegel mit einer durchgehenden Geltasche elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente dabei TBE (50 mM Tris, 50 mM Borsäure, 2,5 mM Na₂-EDTA, pH 8,5) oder TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 2 mM Na₂-EDTA, pH 8,0). Nach dem Anfärben des Geles mit Ethidiumbromid wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht herausgeschnitten und einer Extraktion gemäß den Herstellerangaben unterzogen. Je nach Verwendungszweck wurde die Plasmid-DNA entweder mit dem im

Kit enthaltenen EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) oder aber mit H₂O_{bidest} eluiert.

2.8. Analyse von Nukleinsäuren

2.8.1. Agarose-Gelelektrophorese

2.8.1.1. Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Auftrennung von Nukleinsäuren wurde das Prinzip der Gelelektrophorese angewendet. Die Durchführung erfolgte in horizontalen Flachbettapparaturen. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäurefragmente wurde 0,8-2 %ige (w/v) Agarose (Agarose NA, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg), die in TBE- oder TAE-Puffer gelöst worden war, als Gelmaterial benutzt. Nachdem die Agarose auf 55°C abgekühlt und in die Gelkammer gegossen worden war, wurde zur Ausformung der Geltaschen ein geeigneter Kamm eingesetzt und nach Erstarren der Agarose die Gelkammer mit Laufpuffer überschichtet und der Kamm entfernt.

Zur schnellen Analyse von Nukleinsäuren wurden Minigele (7 x 10 x 0,3 cm, 25 ml) hergestellt, wobei das aufgetragene Probenvolumen 5-20 µl betrug. Vor dem Auftragen wurden DNA-Proben mit 0,2-0,5 Volumen Stop-Mix versetzt. Die Auftrennung erfolgte dann bei einer konstanten Spannung von 60-120 V für 30-120 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Agarosegele in einer wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung (1,5 µg/ml) 5-10 min gefärbt und anschließend in Wasser kurz entfärbt. Die Nukleinsäuren konnten dann auf einem UV-Transilluminator (Geldoc 1000, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden und mit einer an einen Thermodrucker (Mitsubishi P66DE) gekoppelten Video-Kamera (Bio-Rad, München) fotografiert werden. Als Filmmaterial wurde Thermopapier (K75HM, Mitsubishi, Japan) verwendet.

| | | |
|--------------|-----------------------|--------|
| TBE-Puffer : | Tris/HCl, pH 8,5 | 50 mM |
| | Borsäure | 50 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 2,5 mM |
| TAE-Puffer : | Tris/HCl, pH 8,0 | 40 mM |
| | Acetat | 20 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 2 mM |

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|
| Stop-Mix (Sambrook et al., 1989): | Saccharose | 50 % (w/v) |
| | Harnstoff | 5 M |
| | Na ₂ -EDTA | 1 mM |
| | Bromphenolblau | 0,1 % (w/v) |
| | pH 7,0 | |

2.8.1.2. Wechselfeld-Gelelektrophorese (Pulsed field electrophoresis, PFE), (Kalkus, 1992), modifiziert

Die Technik der Wechselfeld-Gelelektrophorese wurde zum Nachweis und zur Auftrennung von linearen DNA-Molekülen verwendet, die in der konventionellen Gelelektrophorese nicht aufgetrennt werden. Das PFE-System bestand aus einem hexagonalen Elektroden-Kit (Pulsaphor-System, Pharmacia LKB GmbH, Freiburg), einer kühlbaren, horizontalen Elektrophoresekammer mit Pufferumwälzung (2015 Pulsaphor Electrophoresis Unit) und einem Steuergerät (Pulsaphor Plus Control Unit). Bei der PFE-Technik mit dem hexagonalen Elektroden-Kit findet ein Wechsel zwischen zwei festgelegten Feldrichtungen statt, die mit einem Winkel von 120° zueinander stehen.

In den 15 x 15 x 0,4 cm großen Gelen betrug die Agarosekonzentration 0,8 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer (25 mM Tris, 25 mM Borsäure, 1,25 mM Na₂-EDTA). Der Elektrophoresepuffer (2,5 l 0,5 x TBE) wurde während der Elektrophorese umgewälzt und auf 13°C gekühlt. Die angelegte Spannung betrug konstant 120 V für eine Phasendauer von 24 h und einer Pulszeit von 20-80 sec.

2.8.2. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Konzentrationsabschätzungen DNA-haltiger Lösungen wurden routinemäßig anhand der Fluoreszenz der DNA-Banden im mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel vorgenommen. Dazu wurden von der DNA-Lösung mit unbekannter Konzentration verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt, im Agarosegel aufgetrennt, angefärbt und fotografiert. Einer gerade noch durch Fluoreszenz sichtbaren Bande wurde dann eine Konzentration von 1-2 ng zugeordnet. Alternativ dazu wurde ein Vergleich mit DNA-Banden kommerziell erhältlicher Standards (MBI Fermentas, St. Leon Rot) vorgenommen.

2.8.3. Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Größe von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Standard-Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.8.1.1.) bestimmt (Southern, 1979). Als Größenstandard für lineare DNA-Fragmente diente dabei kommerziell erhältlicher 1 kb- bzw. 100 bp-DNA-Ladder (MBI Fermentas, St. Leon Rot).

Tabelle 3: Fragmentgrößen des 1 kb- bzw. 100 bp-DNA-Ladders

| 1 kb-DNA-Ladder [bp] | | 100 bp-DNA-Ladder [bp] | |
|----------------------|-------|------------------------|-----|
| 10.000 | 2.500 | 1.031 | 300 |
| 8.000 | 2.000 | 900 | 200 |
| 6.000 | 1.500 | 800 | 100 |
| 5.000 | 1.000 | 700 | 80 |
| 4.000 | 750 | 600 | |
| 3.500 | 500 | 500 | |
| 3.000 | 250 | 400 | |

Die **fett** gedruckten Fragmente liegen in höherer Konzentration vor.

2.9. Modifikation von Nukleinsäuren

2.9.1. Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau von DNA wurde in einem Volumen von 10-500 µl in E-Cups durchgeführt. Dazu wurde zu der in Tris-Puffer oder H₂O_{bidest} gelösten DNA 1/10 des Ansatzvolumens des entsprechenden vom Hersteller mitgelieferten Puffers gegeben. Für einen vollständigen Restriktionsverdau wurden pro µg DNA 2-10 U Enzym zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1,5 h oder ÜN bei der für das Enzym vom Hersteller angegebenen Temperatur.

Für einen partiellen Restriktionsverdau wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Restriktionsenzym pro µg DNA 0,0025-5 U Enzym eingesetzt und für 5 min bis 5 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 0,2 Volumen Stop-Mix, durch Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C oder durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt. Anschließend wurde der Erfolg des Restriktionsverdaus durch Standard-Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.8.1.1.) überprüft.

2.9.2. Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation linearisierter Vektor-DNA zu verhindern (Sambrook et al., 1989), wurde dessen 5'-Phosphatgruppe mit Shrimps Alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) abgespalten. Die Dephosphorylierung wurde direkt im Anschluß an einen

Restriktionsverdau im gleichen Ansatz durchgeführt (Greene & Guarente, 1987). Dazu wurde pro 20 µl Verdau 1-2 U Alkalische Phosphatase zugegeben und 30-45 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation für 15 min bei 65°C. Eine Abtrennung von Puffer und Enzymen wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.7.2.1.) mit anschließender DNA-Fällung (s. 2.7.2.2.) erreicht. Alternativ konnte der Ansatz mittels des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt werden.

2.9.3. Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 20 µl. Der Ansatz enthielt 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach-Ligase-Puffers, 0,1-1 µg Vektor-DNA und eine etwa 4-6-fach höhere Konzentration an Insert-DNA. Für blunt-end-Ligationen wurden außerdem noch 2 µl 50 % (v/v) PEG 4000 zugegeben. Nach Zusatz von 1-3 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Rot) wurde der Ansatz ÜN bei 16°C oder mindestens 2 h bei RT inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 min bei 65°C. Gegebenenfalls wurde noch eine Butanolfällung durchgeführt (s. 2.7.2.2.).

2.9.4. Auffüllen oder Abdauen überhängender Enden (Sambrook et al., 1989)

Sollten DNA-Fragmente miteinander ligiert werden, die keine kompatiblen Enden zueinander aufwiesen, so wurden die überstehenden Enden entweder mit Nukleotiden aufgefüllt oder abgedaut. Das Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I wurde zum Auffüllen von 5`-überhängenden Enden eingesetzt.

| | | |
|------------------------------------|-----------|----------|
| DNA-Fragment | 0,1 µg/ml | 10 µl |
| MgCl ₂ | 100 mM | 1 µl |
| dNTPs | 10 mM | 1 µl |
| Klenow-Fragment | 2 U/µl | 1 µl |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 20 µl |

Der Ansatz wurde gemischt und 10-30 min bei 37°C inkubiert. Das Klenow-Fragment und überschüssige Nukleotide wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben abgetrennt.

Überhängende 3`-Enden wurden durch die 3`-5`-Exonuklease-Aktivität der Mung Bean Nuklease (NEB, Schwalbach) entfernt.

| | | |
|------------------------------------|-----------|----------|
| DNA-Fragment | 0,1 µg/µl | 10 µl |
| Mung Bean Nuklease-Puffer | 10 x | 2 µl |
| Mung Bean Nuklease | 3 U/µl | 1 µl |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 20 µl |

Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Mung Bean Nuklease wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben abgetrennt.

2.9.5. *in vitro*-Methylierung von DNA

2.9.5.1. Herstellung der Extrakte

Um DNA in andere Streptomycceten-Stämme als *S. lividans* einbringen zu können, wurde eine *in vitro*-Methylierung der aus *E. coli* bzw. *S. lividans* isolierten Plasmid-DNA vorgenommen. Dazu wurden Extrakte hergestellt, die endogene Methyltransferasen des zu transformierenden (Streptomycceten-)Stammes enthielten. Der betreffende Stamm wurde in SpM-Medium bei 30°C angezogen und dann zur Schwächung der Zellwand 1:100 in TSB-Medium mit 1 % (w/v) Glycin und 5 mM MgCl₂ überimpft. Nach Erreichen einer OD₅₀₀ von 8-9 (ca. 24 h) wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 Upm und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde 1 x mit PENP-Puffer gewaschen und dann in 1/50 des Kulturvolumens PENP-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte in einer French-Press. Restliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 12.000 Upm und 4°C für 15 min entfernt. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 87 % (v/v) Glycerin und 0,2 Volumen 1 mg/ml BSA versetzt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -20°C.

| | | |
|--------------|-----------------------|--------|
| PENP-Puffer: | KP-Puffer | 10 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 10 mM |
| | NaCl | 50 mM |
| | PMSF | 0,2 mM |
| | pH 7,0 | |

2.9.5.2. *in vitro*-Methylierungsreaktion

Die Methylierungs-Reaktion erfolgte mit Hilfe von *SssI*- und *AluI*-Methylase (NEB, Schwalbach) in folgendem Ansatz:

| | | |
|------------------------------------|---------|-----------|
| 10 x TNE-Puffer | | 10µl |
| SAM | 32 mM | 5 µl |
| BSA | 1 mg/ml | 10 µl |
| Extrakt | | 25 µl |
| <i>SssI</i> -Methylase | 10 U/µl | 2-5 µl |
| <i>AluI</i> -Methylase | 10 U/µl | 2-5 µl |
| Plasmid-DNA | | ≤ 50 µl |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 100 µl |

Der Ansatz wurde 16-24 h bei 30 °C inkubiert. Nach Zusatz von 1 µl 40 µg/ml RNaseA wurde für weitere 30 min bei 55°C inkubiert. Es folgten jeweils eine Extraktion mit Phenol/Chloroform und Chloroform (s. 2.7.2.1.). Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (s. 2.7.2.2.) und im Ausgangsvolumen (≤ 50 µl) TE-Puffer aufgenommen.

| | | |
|-------------|-----------------------|-------|
| TNE-Puffer: | Tris/HCl, pH 7,5 | 0,5 M |
| | NaCl | 0,5 M |
| | Na ₂ -EDTA | 0,1 M |

2.10. Übertragung von DNA

2.10.1. Protoplastierung von Streptomyceten-Zellen

Zur Transformation von Streptomyceten müssen diese vorher protoplastiert werden, da nur dann eine DNA-Aufnahme möglich ist.

| | | |
|-------------------------------|--|-----------|
| (Protoplastierungs-)P-Puffer: | Saccharose | 103,00 g |
| | K ₂ SO ₄ | 0,25 g |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 2,02 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 800 ml |

Der P-Puffer wurde in 80 ml-Portionen aliquotiert und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden pro 80 ml folgende separat autoklavierte Lösungen steril zugesetzt:

| | | |
|--|--------------|---------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 % (w/v) | 1,0 ml |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 3,68 % (w/v) | 10,0 ml |
| TES | 5,73 % (w/v) | 10,0 ml |
| Spurenelementlösung | 10 x | 0,2 ml |

2.10.1.1. Protoplastierung von *S. lividans* (Hopwood et al., 1985), modifiziert
25 ml Vollmedium (ohne CaCl₂) wurde mit Sporen von *S. lividans* beimpft und ÜN als Standkultur und anschließend 24-32 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach einer mikroskopischen Kontaminationskontrolle wurde die Kultur abzentrifugiert (10 min, 4.500 Upm, 4°C) und das Myzelnaßgewicht bestimmt. Das Zellpellet wurde zweimal mit 5 ml P-Puffer gewaschen und anschließend in P-Puffer aufgenommen (3,5 ml/g Myzel). Zur Protoplastierung der Zellen wurde 7 mg Lysozym/g Myzel zugegeben und unter gelegentlichem Schwenken bei 37°C inkubiert (ca. 30-60 min). Währenddessen wurde die Protoplastierung mikroskopisch überprüft. Nach Protoplastierung von etwa 90 % des Myzels wurde der Ansatz für 1 min bei 1.000 Upm zentrifugiert. Der protoplastenhaltige Überstand wurde abgenommen und das Pellet in der 1-1,25-fachen Menge P-Puffer resuspendiert und 5 mal mit einer 5 ml-Pipette auf- und abpipettiert. Dadurch wurden die restlichen Protoplasten von Myzel getrennt. Es wurde erneut 1 min bei 1.000 Upm zentrifugiert. Die beiden Überstände wurde gepoolt, so daß eine Verdünnung des Lysozyms erreicht wurde, und 7 min bei 3.000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden in 0,5-1 ml P-Puffer resuspendiert. 10 µl der Suspension wurde 1:100 mit P-Puffer verdünnt und in der Thoma-Zählkammer ausgezählt. Durch Verdünnen oder erneute Zentrifugation wurde die Protoplastenkonzentration auf etwa 10⁹-10¹⁰ /ml eingestellt. Die Protoplasten wurden zuerst in 50 µl-Aliquots 1 h auf Eis, dann ÜN bei -20°C und schließlich bei -70°C gelagert.

2.10.1.2. Protoplastierung von *S. griseus*

5 ml TSB-Medium mit 1-3 % (w/v) Glycin und 5 % (w/v) PEG 8000 wurde mit Sporen von *S. griseus* 1D beimpft und ÜN bei 30°C geschüttelt. Eine 20-25 ml Hauptkultur (gleiches Medium) wurde 2 %ig (v/v) mit der Vorkultur angeimpft und bis zur späten exponentiellen Phase (ca. 24-32 h) bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde 15-20 min bei 3.500 Upm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Zellpellet wurde bis es hell erschien, d.h. etwa 2-3 mal mit P-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 4 ml P-Puffer mit 1 mg Lysozym/ml aufgenommen und zur Protoplastierung mindestens 30 min bei 30°C inkubiert. Nach dreimaligem Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml-Pipette wurde zur vollständigen Protoplastierung weitere 15 min bei 30°C inkubiert. Währenddessen wurde die Protoplastierung mikroskopisch

überprüft. Zur Verdünnung des Lysozyms wurden 5 ml P-Puffer zugegeben und dreimal mit einer 5 ml-Pipette auf- und abpipettiert. Der Ansatz wurde durch sterile Watte oder miracloth (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) filtriert, so daß restliches Myzel abgetrennt wurde. Durch Zentrifugation bei 4.000 Upm und 4°C für 7 min wurden die Protoplasten pelletiert. Diese wurden dann in 0,5-1 ml P-Puffer aufgenommen und analog zu *S. lividans* (s. 2.9.1.1.) ausgezählt, aliquotiert und aufbewahrt.

2.10.2. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue et al., 1990)

250 ml LB- oder SOB-Medium wurden in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane mit ca. 10 Einzelkolonien des betreffenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6, jedoch mindestens 24 h, bei RT und 200 Upm geschüttelt. Dann wurden die Zellen steril abzentrifugiert (6.000 Upm, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 80 ml TB-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml TB-Puffer resuspendiert und langsam unter leichtem Schwenken mit DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte bei -70°C.

| | | |
|------------|--------------------------------------|--------|
| TB-Puffer: | PIPES | 0,76 g |
| | oder | |
| | HEPES | 0,60 g |
| | CaCl ₂ x H ₂ O | 0,55 g |
| | KCl | 4,66 g |
| | pH 7,6 (KOH) | |
| | MnCl ₂ x H ₂ O | 2,71 g |

Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.10.3. Herstellung elektrokompeter Zellen

2.10.3.1. Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen

200 ml LB-Medium wurde mit 1/100 Volumen einer frisch gewachsenen ÜN-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C unter kräftigem Schütteln bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert. Die Zellen wurden steril abzentrifugiert (6.000 Upm, 15 min, 4°C) und das Zellpellet wurde nacheinander mit jeweils 200 ml, 100 ml und 50 ml eiskaltem, 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen.

Schließlich wurden die Zellen in 0,6-0,8 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 75 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der elektrokompenten *E. coli*-Zellen erfolgte bei -70°C.

2.10.3.2. Herstellung elektrokompenter *Xanthomonas*-Zellen (Johann, 1998), modifiziert

250 ml NB-Medium wurde mit 1/100 Volumen einer frisch gewachsenen ÜN-Kultur des entsprechenden *Xanthomonas*-Stammes angeimpft und bei 30°C unter kräftigem Schütteln bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden steril abzentrifugiert (6.000 Upm, 10 min, 4°C) und das Zellpellet wurde zweimal mit 200 ml eiskaltem HEPES-Puffer, pH 7,0 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung restlicher Salze einmal mit 200 ml kaltem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in der zurückbleibenden Flüssigkeit (ca. 1 ml) resuspendiert und in 75 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der elektrokompenten *Xanthomonas*-Zellen erfolgte bei -70°C.

2.10.4. Herstellung von Phagenlysaten

2.10.4.1. Test der lysogenen Stämme *E. coli* BHB2688 und *E. coli* BHB2690

Die *E. coli*-Stämme BHB2688 und BHB2690 wurden auf LB-Platten ausgestrichen und ÜN bei 30°C inkubiert. Von Einzelkolonien beider Stämme wurden jeweils zwei Parallelausstriche auf LB-Platten angefertigt, von denen eine Platte nachfolgend bei 30°C, die andere bei 42°C inkubiert wurde. Zeigte sich auf der bei 42°C inkubierten Platte aufgrund der Induktion der Prophagen kein Wachstum, so wurden die Stämme zur Herstellung der Verpackungssysteme herangezogen.

2.10.4.2. Herstellung des "Freeze-Thaw"-Lysates aus *E. coli* BHB2688

5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des auf Lysogenie getesteten *E. coli*-Stammes BHB2688 beimpft und ÜN bei 30°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur von 500 ml LB-Medium (in einem 2 l-Schikanekolben) so beimpft, daß eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 nicht überschritten wurde. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,25-0,3 bei 30°C stark geschüttelt. Nach einer Induktion für 15 min bei 45°C erfolgte eine weitere Inkubation für 2-2,5 h bei 37°C beides ebenfalls unter starkem Schütteln.

Um den Erfolg der Induktion des lytischen Vermehrungszyklus der Phagen zu überprüfen, wurde ein Aliquot aus der Kultur entnommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und gemischt. War die Zellsuspension innerhalb weniger Minuten aufgeklärt, wurde die Kultur auf Eis gestellt und für 10 min bei 6.000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,8 ml Saccharose-Lösung resuspendiert und auf zwei vorgekühlte E-Cups verteilt. Nach Zugabe von je 30 µl frisch angesetzter Lysozym-Lösung wurden die Zellen 30 sec in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lyse der Zellen erfolgte während der anschließenden Auftauphase auf Eis, wodurch der Ansatz eine viskose Konsistenz annahm. Nach Zusatz von je 100 µl frisch hergestelltem M1-Puffer wurden die Ansätze gemischt und nicht-lysierte Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 1 h bei 13.000 Upm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

| | | |
|--------------------|-------------------|-------------|
| M1-Puffer: | Tris/HCl, pH 7,4 | 6 mM |
| | ATP | 15 mM |
| | Spermidin | 30 mM |
| | Putrescin | 30 mM |
| | MgCl ₂ | 18 mM |
| | Mercaptoethanol | 0,2 % (v/v) |
| Saccharose-Lösung: | Tris/HCl, pH 7,4 | 50 mM |
| | Saccharose | 10 % (v/v) |
| Lysozym-Lösung: | Tris/HCl, pH 7,4 | 250 mM |
| | Lysozym | 10 mg/ml |

2.10.4.3. Herstellung des Ultraschall-Lysates aus *E. coli* BHB2690

5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des auf Lysogenie getesteten *E. coli*-Stammes BHB2690 beimpft und ÜN bei 30°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur von 500 ml LB-Medium (in einem 2 l-Schikanekolben) so beimpft, daß eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 nicht überschritten wurde. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2-0,25 bei 30°C stark geschüttelt. Nach einer Induktion für 15 min bei 45°C erfolgte eine weitere Inkubation für 1,5-2 h bei 37°C beides ebenfalls unter starkem Schütteln. Anschließend wurde der Chloroformtest (s. 2.10.4.2.) durchgeführt. War die Probe innerhalb weniger Minuten aufgeklärt wurde wie unter 2.10.4.2. beschrieben inkubiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml

Ultraschall-Puffer resuspendiert und auf zwei 2 ml-E-Cups verteilt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einem NaCl-Eisbad mittels Ultraschall (Ultraschallprozessor UP200s, Dr. Hielscher GmbH, Stuttgart) für 2-5 min bei 60 % und einer Amplitude von 0,4. Zur Abtrennung der Zelltrümmer folgte eine Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C für 10 min. Der erhaltene Überstand wurde mit 0,6 ml frisch angesetztem und eiskaltem M1-Puffer versetzt und die Lysate schließlich aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

| | | |
|---------------------|-----------------------|-------|
| Ultraschall-Puffer: | Tris/HCl, pH 8,0 | 20 mM |
| | MgCl ₂ | 3 mM |
| | Mercaptoethanol | 10 mM |
| | Na ₂ -EDTA | 1 mM |

2.10.5. Transformation von Streptomycceten-Protoplasten (Hopwood et al., 1985), modifiziert

50 µl der bei -70°C gelagerten Streptomycceten-Protoplasten wurden schnell (in der Hand) aufgetaut, mit 2-5 µl Plasmid-DNA versetzt und nach etwa 20 sec mit 200 µl T-Puffer vermischt. Anschließend wurden 800 µl P-Puffer (s. 2.9.1.1.) zugegeben, gemischt und auf geeigneten Platten (R+S oder SpMR), die bereits unter der Sterilbank ca. 1-2 h vorgetrocknet worden waren, ausplattiert. Gegebenenfalls wurden auch Verdünnungstufen des Transformationsansatzes (in P-Puffer) hergestellt und ausplattiert. Nach der Regeneration der Protoplasten (ca. 16-24h) wurden die Platten dann mit 2 ml H₂O_{bidest} + Thiostrepton oder mit 2-5 ml 0,4 % (w/v) Agarose in P-Puffer (45°C) + Thiostrepton überschichtet. Die Thiostrepton-Endkonzentration auf der gesamten Platte sollte dabei 15-25 µg/ml betragen.

| | | | |
|---------------------------------|------------------------------------|------|-----------|
| (Transformations-) T-Puffer: | Saccharose | | 10,3 g |
| | K ₂ SO ₄ | | 0,025 g |
| | Spurenelementlösung | 10 x | 0,2 ml |
| | CaCl ₂ | 5 M | 2 ml |
| | Tris/Maleinsäure, pH 8,0 | 1 M | 5 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | | ad 100 ml |

Vor Gebrauch wurden 3 Volumenanteilen dieser Lösung 1 Teil steriles PEG 1000 zugesetzt.

2.10.6. Transformation kompetenter Zellen von *E. coli*

Zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen von *E. coli* wurden 20 µl ligierte DNA gegeben und 30 min auf Eis inkubiert, so daß die DNA an die Zelloberfläche adsorbieren konnte. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 90-120 sec bei 42°C, wodurch die Aufnahme der DNA in die Zelle erreicht wurde. Der Ansatz wurde dann mit 600 µl LB-Medium versetzt und zur Ausbildung der plasmidcodierten Antibiotikaresistenz für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Von diesen Ansätzen wurden dann jeweils 100 µl bzw. 200 µl auf LB-Antibiotika-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.10.7. Transformation elektrokompenter Zellen

75 µl elektrokompente Zellen (*E. coli* oder *Xanthomonas* sp. 35Y) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in 0,2 cm-Elektroporationsküvetten (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in einem Gene-Pulser (Gene Pulser II mit Pulse Controller II, Bio-Rad, München) bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 25 µF und einer Spannung von 2,5 kV. Die Zeitkonstante betrug idealerweise 4-5 msec. Nach dem Anlegen des elektrischen Impulses wurde der Transformationsansatz mit 600 µl LB- oder NB-Medium versetzt und bis zu 3 h bei 30°C sanft geschüttelt. Schließlich wurden jeweils 100 µl und 200 µl des Ansatzes auf LB- oder NB-Platten mit geeigneten Antibiotikazusätzen ausplattiert.

2.10.8. Verpackung und Transduktion von DNA in *E. coli*

Um die Effizienz der hergestellten *in vitro*-Verpackungssysteme zu überprüfen, wurde in einer Testreaktion λ cI857 Sam7-DNA oder pRD1 verpackt und in *E. coli* EB304 bzw. *E. coli* XL1-blue MR transduziert. Die im Bakterienrasen entstehenden Plaques bzw. die gebildeten Kolonien wurden ausgezählt, wodurch sich die Effizienz des Systems pro µg eingesetzter DNA berechnen ließ.

Um Fremd-DNA nach *E. coli* transduzieren zu können, benötigt man Vektoren, die über die für die Verpackung essentielle „cos“-Sequenz verfügen (Cosmide), wodurch sie in rekombinanter, konkatemerer Form ein Substrat der Verpackungsreaktion darstellen (z.B. pWE15).

Zur *in vitro*-Verpackung von Ligationsansätzen wurden die bei -70°C gelagerten Lysate

auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz wie folgt gemischt:

| | |
|-------------------|-------------|
| Ultraschall-Lysat | 4 μ l |
| Ligationsansatz | 2-5 μ l |
| Freeze-Thaw-Lysat | 14 μ l |

Es folgte eine Inkubation für 2-4 h bei RT. Durch Zugabe von 200 μ l TM-Puffer wurde die Reaktion abgestoppt und die Transduktion durchgeführt.

| | | |
|------------|-------------------|-------|
| TM-Puffer: | Tris/HCl, pH 7,5 | 50 mM |
| | MgSO ₄ | 10 mM |

Für die Infektion mit den *in vitro*-verpackten Ligationsansätzen wurden *E. coli* EB304 oder *E. coli* XL1-blue MR, welche zur Ausbildung des für die Transduktion notwendigen λ -Rezeptors befähigt sind, in LB mit 0,2 % (w/v) Maltose für 6-12 h bei 30°C oder 37°C angezogen. 10 ml einer solchen Kultur wurden abzentrifugiert (4.500 Upm, 10 min, 4°C), das Pellet in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 2,0 eingestellt. Diese Suspension wurde bei 4°C aufbewahrt und innerhalb einer Woche zur Infektion eingesetzt. Dazu wurden 100 μ l des Verpackungsansatzes mit 200 μ l der Empfängerzellen vermischt, für mindestens 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikazusatz ausplattiert.

2.10.9. DNA-Übertragung durch Konjugation

Es wurden Konjugationen zwischen *E. coli* S17-1, der zuvor das zu übertragende Plasmid durch Transformation erhalten hatte, und Streptomyceten sowie *Xanthomonas* sp. 35Y (und dessen Negativmutanten A und B) als Rezipient durchgeführt.

Der Donor-Stamm wurde ÜN bei 37°C in 10 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikazusatz herangezogen. Die Kultur wurde bei 4.500 Upm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet zur Entfernung des Antibiotikums zweimal mit frischem LB-Medium gewaschen. Die Zellen wurden dann mit LB-Medium auf 10⁹-10¹⁰ Zellen/ml eingestellt.

Im Falle der Streptomyceten als Rezipient mußten die Sporen vor der Konjugation durch Hitzeschock zum Auskeimen induziert werden (Hopwood et al., 1985). Dazu wurden die Sporen von einer gut bewachsenen SM-Platten mit 20 % (v/v) Glycerin

abgeschwemmt, so daß eine dichte Sporensuspension entstand. 1 ml dieser Sporensuspension wurde durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 min pelletiert, in 5 ml 0,05 M TES-Puffer, pH 8,0 aufgenommen und 10 min bei 50°C hitzegeschockt. Nach langsamem Abkühlen unter fließendem Wasser wurde das gleiche Volumen doppelt konzentriertes Pre-Germinationsmedium zugegeben und 3 h bei 30°C im Erlenmeyerkolben geschüttelt. Auskeimende Sporen wurde durch Zentrifugation (4.500 Upm, 10 min, 4°C) pelletiert und mit LB-Medium auf eine Zelldichte von ca. 10^8 Zellen /ml eingestellt.

Für die Konjugation wurden 100 µl Donor und 100 µl Rezipient in unterschiedlichen Verhältnissen (1:1, 1:2, 2:1, 1:5, 5:1) gemischt, auf einer LB-Platte verteilt und ÜN bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit LB abgewaschen und der *E. coli*-Stamm durch vorsichtiges Kratzen mit einer Pipette entfernt. Die Platte mit dem bereits Substratmyzel-bildenden *Streptomyces*-Stamm wurde getrocknet, mit 0,4 % (w/v) Agarose + geeigneter Antibiotika (z.B. Neomycin zur Plasmidselektion und Nalidixinsäure zur Selektion gegen *E. coli*) überschichtet und bis zu 6 Tage bei 30°C inkubiert.

Für die Konjugation zwischen *E. coli* S17-1 und *Xanthomonas* sp. 35Y wurden beide Stämme in 10 ml NB-Medium angezogen (*E. coli* S17-1 unter Antibiotikazusatz) und ÜN bei 37°C bzw. 2 d bei 30°C inkubiert. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (4.500 Upm, 10 min, 4°C), mit NB-Medium gewaschen und mit NB auf eine Zelldichte von etwa 10^9 /ml eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (z.B. 1:1, 1:2, 1:5, 2:1, 5:1) gemischt und jeweils 200 µl/NB-Platte aufgetropft (spot-mating). Nach 2 d Inkubation bei 30°C wurden die Zellen mit steriler Saline abgeschwemmt und in Verdünnungsstufen auf geeigneten Selektionsplatten (MM-Malonat oder MM-Citrat + Antibiotikum) ausplattiert.

| | | |
|-------------------------|-----------------------------------|------------|
| Pre-Germinationsmedium: | Hefeextrakt | 10 g |
| | Casaminoacids | 10 g |
| | H ₂ O _{bidst} | ad 1000 ml |

Nach dem Autoklavieren wurden 2 ml 5 M CaCl₂ steril zugesetzt.

2.11. PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR (Polymerase-Chain-Reaction)-Technik wurde zur Synthese spezifischer DNA-Fragmente angewandt. Die Reaktion wurde in einem Primus 25- oder Primus 96 Plus-Thermoblock (MWG-Biotech, München) durchgeführt. Als Matrize diente chromosomale DNA oder Plasmid-DNA. Die verwendeten Primer waren 20-35 bp lang und hatten idealerweise ungefähr den gleichen G+C-Gehalt. In der Regel wurde die *Taq*-DNA-Polymerase zur Amplifikation benutzt.

Eine Standardreaktion wurde in einem Volumen von 100 µl durchgeführt und enthielt die folgenden Komponenten:

| | | |
|------------------------------------|------------|-----------|
| Template-DNA | 1-10 ng | x µl |
| Reaktionspuffer | 10 x | 10 µl |
| Primer 1 | 40 µM | 1,25 µl |
| Primer 2 | 40 µM | 1,25 µl |
| dNTP-Mix | 10 mM | 2 µl |
| Glycerin | 50 % (v/v) | 10 µl |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | 1-3 U | 1-3 µl |
| H ₂ O _{bidest} | | ad 100 µl |

Da im Rahmen dieser Arbeit z.T. DNA mit sehr hohem (G+C)-Gehalt amplifiziert wurde, war die Anwesenheit von 5 % (v/v) Glycerin im Reaktionsansatz essentiell.

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte in 25-35 Zyklen, wobei nach einer anfänglichen Denaturierung von 2-5 min in der Regel folgendes Standardprogramm durchlaufen wurde:

| | | |
|---------------|------|-----------|
| Denaturierung | 95°C | 1 min |
| Annealing | x°C | 0,5-1 min |
| Elongation | 72°C | y min |

Nach dem letzten Zyklus wurde abschließend weitere 5-15 min bei 72°C inkubiert. Für die Berechnung der Hybridisierungstemperatur T_a („annealing“-Temperatur) der beiden Primer an die Template-DNA wurde folgende Formel zugrundegelegt (Chester & Marshak, 1993):

$$T_{\max} = 69,3 + 0,41 (G + C \%) - \frac{650}{\text{bp des Primers}} \text{ [}^\circ\text{C]}$$

G + C % : prozentualer GC-Gehalt des Primers

Unter Berücksichtigung des Richtwertes von (Innis & Gelfand, 1990) wurde die Hybridisierungstemperatur, T_a , 2-3°C unterhalb des berechneten T_{max} -Wertes angesetzt. Die Elongationszeit wurde nach der Faustformel 1000 bp/min berechnet, wobei stets etwas variiert wurde. Zusätzlich auftretende unspezifische Banden konnten durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur oder durch Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration eliminiert werden. Alternativ dazu konnte auch durch Zugabe von DMSO bis zu einer Endkonzentration von 5 % (v/v) die Ausbeute und die Spezifität der Reaktion erhöht werden (Chevet et al., 1995).

Sollten die amplifizierten DNA-Fragmente für Klonierungen verwendet werden, wurden sie über den QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.12. Sequenzierung von DNA

Doppelsträngige DNA wurde nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Dazu wurde zunächst eine PCR-Reaktion mit Hilfe des aus dem AmpliTaq FS 1/4 BigDyeTermination Kit entnommenen Premixes durchgeführt, in welchem die vier verschiedenen Nukleotide Fluoreszenz-markiert vorliegen.

| | | |
|-------------------------|------------|---------------|
| Premix | | 2 μ l |
| DNA-Template (dsDNA) | 250 ng | x μ l |
| Primer | 40 μ M | 2 μ l |
| milliQ-H ₂ O | | ad 10 μ l |

Es wurde folgendes PCR-Programm für 25 Zyklen durchlaufen:

| | | |
|---------------|---------|--------|
| Denaturierung | 95°C | 20 sec |
| Annealing | 45-60°C | 15 sec |
| Elongation | 60°C | 4 min |

Nach der PCR wurde der Ansatz mit milliQ-H₂O auf 100 μ l aufgefüllt, mit 10 μ l Na-Acetat, pH 4,8 (in milliQ-H₂O) und 250 μ l 96 % (v/v) Ethanol versetzt und 15 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 250 μ l 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und im Speed-vac getrocknet (Speed Vac Plus 110A mit angeschlossener Kühlfalle RVT400, Savant Instruments Inc., New York). Die DNA konnte bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert werden. Vor der Sequenzierung wurde

die DNA in 25 µl TSR-Puffer gelöst und 2 min bei 95°C denaturiert. Nachdem der E-Cup-Deckel abgeschnitten und durch einen Gummistopfen ersetzt worden war, war die Probe bereit für die Sequenzierung in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt). Die Fluoreszenzsignale wurden durch das Programm Sequencing Analysis 3.4.1. automatisch in Sequenzdaten umgewandelt. Außerdem konnten die Sequenzdaten manuell mit Hilfe des Programms ABI Edit View 1.0.1. aus den Kurvenverläufen abgeleitet werden.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen DNA-Strider, Version 1.2 und DNA-Star auf einem Macintosh PowerPC.

Proteinbiochemische Methoden

2.13. Konzentrierung von Kulturüberständen und Proteinlösungen

2.13.1. Ammoniumsulfatfällung

Zur Aufkonzentrierung vieler verschiedener Proben wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Dazu wurde dem auf Eis gerührten Kulturüberstand kontinuierlich gemahlenes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 90 % (w/v) zugesetzt. Nach mindestens 30-minütigem Rühren wurden dann die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bei 25.000-30.000 x g und 4°C für 30 min pelletiert. Die gefällten Proteine wurden in 5-10 % des Ausgangsvolumens 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert und zur Entfernung restlichen Ammoniumsulfates unter mehrfachem Pufferwechsel ÜN gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert.

2.13.2. Tangentialfiltration

Zur Aufkonzentrierung großer Volumina (1,0-7,5 l) wurde eine Pro Vario 3-Pumpe der Firma PALL Filtron, Dreieich mit entsprechender Minisette Cassette (Membrantyp Omega, Ausschlußgrenze 10 kDa) verwendet. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, daß der Flüssigkeitsstrom entlang der Membran verläuft, so daß die Poren nicht durch das aufkonzentrierte Protein verstopft werden können. Die Probe wurde auf ein Mindestvolumen von 60-90 ml eingengt.

2.13.3. Ultrafiltration

Proteinhaltige Lösungen von bis zu 15 ml wurden in Amicon Centriplus Konzentratoren Röhren, die eine Ausschlußgrenze von 10 kDa besaßen, bei maximal 3.000 x g und 4°C in Festwinkel- oder Swing-out-Rotoren aufkonzentriert.

Größere Volumina (≤ 250 ml) wurden in einer Amicon Diaflo-Kammer (Millipore GmbH, Eschborn) mit Flachmembranen (Typ YM10) auf ein Mindestvolumen von 7 ml eingengt. Kleinste Volumina wurden durch Microsep Konzentratoren (Pall Filtron, Karlstein) mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa in einer E-Cup-Zentrifuge (Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) bei maximal 12.000 Upm aufkonzentriert.

2.13.4. Einengung im Speed-vac

War eine Konzentrierung vieler Proben mit geringen Volumina notwendig, so wurden diese in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac plus SC110A mit angeschlossener Kühlfalle RVT400, Savant Instruments Inc., New York) aufkonzentriert, wobei zu beachten war, daß gleichzeitig eine Konzentrierung des Mediums/Puffers auftrat.

2.14. Anreicherung und Aufreinigung von Proteinen

Für die säulenchromatographische Aufreinigung von Proteinen wurde eine FPLC des Typs ÄKTA explorer bestehend aus Box 900, pH/C-900, UV-Detektionseinheit UV-900, Pumpe P-900 und Fraktionssammler Frac. 900 (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) verwendet. Vor dem luftblasenfreien Anschließen der Puffer an die FPLC wurden diese mittels 0,2 µm-Filter filtriert und anschließend entgast. Es wurden bereits fertig gepackte Säulen der Firma Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg verwendet, die drop-to-drop an das System angeschlossen und vor jedem Lauf mit einem geeigneten Puffer äquilibriert wurden.

2.14.1. Anionenaustausch-Chromatographie

2.14.1.1. Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephacel

Es wurde eine HiPrep 16/10 DEAE-Sephacel-Säule mit einem Säulenvolumen von 20 ml und einem Ausschlußvolumen von 18 ml verwendet. Die Äquilibration erfolgte mit 3 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Puffer A) bei einer Flußrate von 2 ml/min und einem Maximaldruck von 0,5 MPa. Vor der Elution wurden nicht-

gebundene Proteine durch Waschen mit 4 Säulenvolumen Puffer A ausgespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem Stufen-Gradienten von 0-15 % (w/v) und 15-100 % (w/v) Puffer B (10 mM Tris/HCl, pH 7,5 + 1 M NaCl) in 3-5 bzw. 3 Säulenvolumen.

2.14.1.2. Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ

Es wurde eine MonoQ HR 5/5-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml und einem Ausschlußvolumen von 0,8 ml verwendet. Die Äquilibration erfolgte mit 3 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Puffer A) bei einer Flußrate von 2 ml/min und einem Maximaldruck von 0,5 MPa. Vor der Elution wurden nicht-gebundene Proteine durch Waschen mit 4 Säulenvolumen Puffer A ausgespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-50 % (w/v) Puffer B (10 mM Tris/HCl, pH 7,5 + 1 M NaCl) in 95 Säulenvolumen.

2.14.2. Kationenaustausch-Chromatographie an MonoS

Für die Kationenaustausch-Chromatographie wurde eine MonoS HR 5/5-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml und einem Ausschlußvolumen von 0,8 ml verwendet. Als Puffer dienten Stammlösungen von 0,03 M Na-Phosphat, 0,03 M Formiat, 0,06 M Acetat und 0,1 M HCl sowie H₂O_{bidest}, die entsprechend dem gewünschten Anfangs-pH-Wert gemischt wurden (BufferPrep pH 3,0-7,5 CIEX = Puffer A). Die Äquilibration erfolgte mit 5 Säulenvolumen Puffer A bei einer Flußrate von 0,5 ml/min und einem Maximaldruck von 5 MPa. Vor der Elution wurden nicht-gebundene Proteine durch Waschen mit 2 Säulenvolumen Puffer A ausgespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-100 % (w/v) Puffer B (BufferPrep + 2 M NaCl) in 20 Säulenvolumen.

2.14.3. Gelfiltration an Superdex G200 und G75

Für die Gelfiltration wurden eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (optimale Auftrennung im Bereich von 10-600 kDa) bzw. HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (optimale Auftrennung im Bereich von 3-70 kDa) mit Säulenvolumina von 120 ml und Ausschlußvolumina von 40 ml verwendet. Die Äquilibration erfolgte mit 2 Säulenvolumen 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 + 150 mM NaCl bei einer Flußrate von 0,5 ml/min und einem Maximaldruck von 0,5 MPa. Das aufgetragene Probenvolumen

betrug maximal 4 ml. Die Elution der Proteine erfolgte in einem isokratischen Gradienten bei einer Flußrate von 0,1-0,2 ml/min in 2 Säulenvolumen.

2.14.4. Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) an Octyl-, Butyl- und Phenyl-Sepharose

Für die HIC wurde ein HiTrap Test Kit verwendet, der u.a. eine Butyl-Sepharose 4 FF-, eine Octyl-Sepharose 4 FF- und eine Phenyl-Sepharose HP-Säule mit Säulenvolumina von 1 ml und Ausschlußvolumina von 0,86 ml enthielt. Bei allen 3 Säulenmaterialien erfolgte die Äquilibration mit 5 Säulenvolumen Puffer A (50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0 + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) bei einer Flußrate von 0,75 ml/min und einem Maximaldruck von 0,5 MPa. Vor der Elution wurden nicht-gebundene Proteine durch Waschen mit 5 Säulenvolumen Puffer A ausgespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem linearen Gradienten von 100-0 % (w/v) Puffer B (50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0) in 10 Säulenvolumen.

2.14.5. Chromatofokussierung an MonoP

Die Chromatofokussierung erfolgte mittels einer MonoP HR5/5-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml und einem Ausschlußvolumen von 0,8 ml. Als Äquilibrationpuffer diente 25 mM Imidazol, pH 7,3. Die Äquilibration erfolgte bis zum Erreichen eines konstanten Anfangs-pH-Wertes von 7,3 (ca. 12 Säulenvolumen) bei einer Flußrate von 1 ml/min und einem Maximaldruck von 5 MPa. Vor der Elution wurden nicht-gebundene Proteine durch Waschen mit 5-8 Säulenvolumen Äquilibrationpuffer ausgespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem linearen pH-Gradienten von 7,3-4,0 mit Polybuffer 74, pH 4,0 1:8- bzw. 1:16-verdünnt (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) in 19 Säulenvolumen.

Die Entfernung des Polybuffers aus den Fraktionen erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung der Proteine (s. 2.13.1.).

2.14.6. Dialyse

Zur Umpufferung von Proteinlösungen wurden diese ÜN bei 4°C gegen das mindestens 40-fache ihres Volumens Puffer dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche der Firma Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Visking Dialysis Tubing 20/32) mit einem Ausschlußvolumen von 6-8 kDa verwendet.

2.14.7. Elektroelution

Im SDS-PAGE aufgetrennte und mittels Coomassie angefärbte Proteine wurden mit einem Nachbau des Centrilon Mikro-Elektroelutors der Firma Millipore GmbH, Eschborn, und den entsprechenden Centricon-10 Centrifugal Filter Devices (Millipore GmbH, Eschborn) aus einem SDS-Gelstück eluiert. Dabei wurde das im Gel enthaltene Protein durch Anlegen eines elektrischen Feldes direkt auf die Membran des Centricons eluiert, womit es dann nachfolgend durch Zentrifugation bei maximal 7.500 x g auf ein beliebiges Volumen eingeeengt werden konnte.

2.15. Analyse von Proteinen

2.15.1. Proteinbestimmung

2.15.1.1. Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

10-30 µl Probe wurde in 0,3-1 ml filtriertes Bradford-Reagenz gegeben und vermischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm in 1 ml-Plastikküvetten gemessen. Eine Eichkurve mit 0-1 mg BSA/ml wurde ebenfalls aufgenommen.

| | | |
|-------------------|---|------------|
| Bradford-Reagenz: | Serva Brilliant Blue G 250 | 0,1 g |
| | Ethanol (96 % , v/v) | 50 ml |
| | H ₃ PO ₄ (85 % , v/v) | 100 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| | - filtriert bei 4°C lagern- | |

2.15.1.2. Proteinbestimmung ganzer Zellen (Lowry et al., 1951), modifiziert

Zur Verfolgung des Zellwachstums von NR/DPNR-enthaltenden Kulturen wurden zu verschiedenen Zeiten während des Wachstums 10 ml-Aliquots entnommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml KP-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und auf 2 Reagenzgläser à 0,5 ml verteilt. Nach dem Versetzen mit jeweils 0,5 ml 2 N NaOH wurden die Proben für 10 min im siedenden Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen auf RT wurden jeweils 10 ml frisch hergestelltes Lowry-Reagenz zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml 1:3-verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz hinzugegeben, gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte in 1 ml-Plastikküvetten bei 578 nm gegen einen Leerwert. Eine Eichkurve mit BSA im Bereich von 0-1 mg/ml wurde mitgeführt.

| | | | |
|----------------|--|-----------|--------|
| Lowry-Reagenz: | Na ₂ CO ₃ | 2 % (w/v) | 100 ml |
| | K-Na-Tartrat | 2 % (w/v) | 1 ml |
| | CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 1 % (w/v) | 1 ml |

2.15.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die PAGE wurde eine Twin-Minigel-Elektrophorese-Apparatur (Biometra, Göttingen) mit 10,5 x 9,8 x 0,1 cm-Platten oder eine Doppелеlektrophorese-Kammer mit 17,0 x 18,0 cm-Platten verwendet.

2.15.2.1. SDS-PAGE

Es wurden diskontinuierliche Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Für die Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen (Lagerung bei 4°C) und Puffer verwendet:

| | | |
|---|-----------------------|-------------|
| Acrylamid-Lösung: (Rotiphorese 30, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) | Acrylamid | 30 % (w/v) |
| | Bisacrylamid | 0,8 % (w/v) |
| 4 x Trenngel-Puffer: | Tris/HCl, pH 8,8 | 1,5 M |
| | SDS | 0,4 % (w/v) |
| 2 x Sammelgel-Puffer: | Tris/Eisessig, pH 6,8 | 250 mM |
| | SDS | 0,2 % (w/v) |
| (Ammoniumpersulfat) APS-Lösung: | APS | 10 % (w/v) |
| 10 x Elektrophorese-Puffer: | Tris | 250 mM |
| | Glycin | 2,5 M |
| | SDS | 1 % (w/v) |
| 3 x Denaturierungspuffer: | Tris/HCl, pH 6,8 | 250 mM |
| | SDS | 7 % (w/v) |
| | Glycerin | 30 % (v/v) |
| | Bromphenolblau | 0,3 % (w/v) |
| | Mercaptoethanol | 15 % (v/v) |

Die Gele bestanden aus einem Sammelgel [4 % (w/v)] und einem Trenngel [10-15 % (w/v)] und wurden nach folgendem Schema gemischt:

| Lösung [ml] | Trenngel | | | Sammelgel 4 % |
|------------------------------------|----------|---------|---------|------------------|
| | 10 % | 12 % | 15 % | |
| Acrylamid-Lösung | 1,66 ml | 2,0 ml | 2,5 ml | 0,4 ml |
| Trenngel-Puffer | 1,25 ml | 1,25 ml | 1,25 ml | - |
| Sammelgel-Puffer | - | - | - | 1,5 ml |
| H ₂ O _{bidest} | 2,1 ml | 1,75 ml | 1,25 ml | 2,2 ml |
| TEMED | 7,5 µl | 7,5 µl | 7,5 µl | 10 µl |
| APS-Lösung | 12,5 µl | 12,5 µl | 12,5 µl | 20 µl |

Nach Zugabe der APS-Lösung wurde das Gelmaterial zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und das Trenngel mit 70 % (v/v) Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels (ca. 20 min) wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel gegossen, in das zur Ausformung der Taschen ein Kamm eingesetzt wurde. Das Gel wurde nach ca. 20 min Polymerisationszeit in die Elektrophoresekammer gestellt und mit SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 0,5 Volumen 3 x Denaturierungspuffer versetzt, 3 min bei 95°C hitzedenaturiert und in die Taschen des Gels gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA/Gel bis die Bromphenolblau-Bande das untere Gelende nahezu erreicht hatte.

Als Marker wurde ein Gemisch aus 6 Proteinen (LMW Calibration Kit, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) mit molekularen Massen nach Angaben des Herstellers verwendet:

| | |
|--------------------------|-----------|
| Phosphorylase B | 94.000 Da |
| Rinderserumalbumin (BSA) | 67.000 Da |
| Ovalbumin | 43.000 Da |
| Carbo-Anhydrase | 30.000 Da |
| Trypsin-Inhibitor | 20.100 Da |
| α-Lactalbumin | 14.400 Da |

2.15.2.2. Native PAGE

Zur weiteren Analyse partiell aufgereinigter Proteine wurde eine Nativ-PAGE durchgeführt. Dazu wurden außer den nachfolgend aufgeführten Puffern und Lösungen die gleichen Acrylamid- und APS-Lösungen wie unter 2.15.2.1. beschrieben, verwendet.

| | | |
|----------------------|------------------|--------|
| 4 x Trenngel-Puffer: | Tris/HCl, pH 8,9 | 1,5 M |
| | TEMED | 230 µl |

| | | |
|-------------------------|---|----------------------------|
| 4 x Sammelgel-Puffer: | Tris/H ₃ PO ₄ , pH 6,9 TEMED | 260 mM 263 µl |
| Elektrophorese-Puffer: | Tris Glycin | 100 mM 100 mM |
| 10 x Beschwererlösung:: | Saccharose Bromphenolblau | 40 % (w/v) 0,05 % (w/v) |

Es wurden entweder Gele bestehend aus 10 % (w/v) Trenngel und 4 % (w/v) Sammelgel oder Gradientengele von 4-15 % (w/v) Acrylamid gegossen, wobei dann auf ein Sammelgel verzichtet wurde. Die Gele wurden nach folgenden Schema gemischt, wobei für Gradientengele ein Gradientenmischer mit angeschlossener Pumpe benutzt wurde.

| Lösung [ml] | Trenngel | | | Sammelgel 4 % |
|------------------------------------|----------|--------|---------|------------------|
| | 4 % | 10 % | 15 % | |
| Acrylamid-Lösung | 0,8 ml | 2 ml | 3 ml | 0,4 ml |
| Trenngel-Puffer | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | - |
| Sammelgel-Puffer | - | - | - | 0,75 ml |
| H ₂ O _{bidest} | 3,66 ml | 2,5 ml | 1,46 ml | 1,85 ml |
| APS-Lösung | 36 µl | 42 µl | 36 µl | 18 µl |

Die Gele wurden analog zu 2.15.2.1. hergestellt. Proben für native Gele wurden mit 0,1 Volumen Beschwerer-Lösung versetzt und unter Nativ-Elektrophorese-Bedingungen bei 100-150 V und 4°C aufgetrennt bis die Bromphenol-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.15.2.3. 2-Dimensionale PAGE

Die Methode der 2 D-Elektrophorese trennt Proteine gemäß zwei verschiedener Eigenschaften in zwei unterschiedlichen Schritten: in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes (IEP) aufgetrennt; in der zweiten Dimension, der SDS-PAGE, werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes (MW) aufgetrennt.

Die zu analysierende Probe wurde, zur Entfernung möglicher Störfaktoren, mit 3 Volumen eiskaltem Aceton (reinst) versetzt und mindestens 2 h oder ÜN bei -20°C präzipitiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 1 h bei 13.000 Upm und 4°C

(Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) pelletiert, das Pellet getrocknet und in einem angemessenen Volumen frischen Proben-Puffer aufgenommen

| | | |
|----------------|---------------------------------|-----------|
| Proben-Puffer: | Tris | 35 mM |
| | Harnstoff | 8 M |
| | CHAPS | 2 % (w/v) |
| | DTT | 1 % (w/v) |
| | milliQ-H ₂ O | ad 10 ml |
| | - aliquotiert bei -20°C lagern- | |

Direkt vor Gebrauch wurden 5 µl Pharmalyt (IPG buffer 3-10)/ml zugegeben.

| | | |
|----------------------|---------------------------------|---------------|
| Rehydrierungslösung: | Harnstoff | 8 M |
| | CHAPS | 2 % (w/v) |
| | Pharmalyt (IPG buffer 3-10) | 125 µl |
| | Bromphenolblau | wenige Körner |
| | milliQ-H ₂ O | ad 25 ml |
| | - aliquotiert bei -20°C lagern- | |

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 2,8 mg DTT/ml zugegeben.

170 µl Protein-Lösung (in Proben-Puffer) wurde mit dem gleichen Volumen Rehydrierungslösung versetzt und in die Mitte der Vertiefung des vorbereiteten Keramik-IPG-Strip-Holders pipettiert. Anschließend wurde der Immobiline Dry Strip (pH 3-10, 18 cm, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) nach Entfernung der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei in die Flüssigkeit gelegt, so daß an den Enden des Strips das Gel die jeweilige Elektrode berührt. Um Verdunstung und Harnstoffkristallisation zu vermeiden, wurde der Strip mit IPG Cover Fluid (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) überschichtet. Dann wurde der Strip-Holder mit dem Deckel luftblasenfrei bedeckt und folgendes Programm gestartet:

| | | |
|---------------|-----------|---------|
| Rehydrierung: | 12 h | 20 V |
| [optional] | [2 h | 150 V] |
| Fokussierung: | 1 h | 200 V |
| | 1 h | 500 V |
| | 1.000 Vh | 1.000 V |
| | 32.000 Vh | 8.000 V |

Nach dem Ende der Fokussierung wurde der Strip aus dem Strip-Holder entfernt und sofort weiterverwendet oder in Plastikfolie eingeschweißt bei -70°C gelagert. Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde der Strip für 15 min in 10 ml

Äquilibrationslösung inkubiert und gerade auf die Oberfläche des Trenngels eines großen 10 %igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgels (s. 2.15.2.1.) gelegt. Die Auftrennung erfolgte für 15 min bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA/Gel und für 5-6 h bei 20 mA/Gel.

| | | |
|-----------------------|---------------------------------|---------------|
| Equilibrationspuffer: | Tris/HCl, pH 8,8 | 50 mM |
| | Harnstoff | 6 M |
| | Glycerin | 30 % (v/v) |
| | SDS | 2 % (w/v) |
| | Bromphenolblau | wenige Körner |
| | milliQ-H ₂ O | ad 200 ml |
| | - aliquotiert bei -20°C lagern- | |

Direkt vor Gebrauch wurden 10 mg DTT/ml zugegeben.

2.15.3. Unspezifische Proteinfärbungen

2.15.3.1. Silberfärbung (Blum et al., 1987), modifiziert

Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte in der Regel durch Silberfärbung. Dabei wurde eine modifizierte Silberfärbung nach (Blum et al., 1987) durchgeführt. Vorteile dieser Methode sind die 10-fach höhere Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung und eine Herabsetzung der Hintergrundfärbung durch Einsatz von Thiosulfat, welches mit dem ungebundenen Silbernitrat einen löslichen Komplex bildet.

Nach der Elektrophorese wurden das Gel in eine Plastikschiene gegeben und unter ständigem Schwenken für mindestens 20 min in Fixierer inkubiert. Anschließend wurde es 2 x 10 min in 50 % (v/v) Ethanol und 1 min in Thiosulfat-Lösung geschwenkt. Nach 3 x 20 sec Waschen mit deionisiertem Wasser wurde das Gel mit Imprägnierer überschichtet und 15 min inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 20 sec) wurde Entwickler zugegeben und so lange inkubiert bis die Banden deutlich vor dem Hintergrund sichtbar waren (ca. 5-15 min). Der Entwickler wurde durch 3 x 20 sec Waschen mit deionisiertem Wasser entfernt und durch Stopplösung ersetzt, die für 10 min auf dem Gel belassen wurde. Nach einem letzten Waschen (3 x 20 sec mit deionisiertem Wasser) wurde das Gel dokumentiert, in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

| | | |
|---------------------|--|------------|
| Fixierer: | Methanol | 50 ml |
| | Eisessig | 120 ml |
| | Formaldehyd (37 % , v/v) | 0,5 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| Thiosulfat-Lösung: | Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O | 0,4 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| | - frisch ansetzen - | |
| Imprägnierer: | AgNO ₃ | 1 g |
| | Formaldehyd (37 % , v/v) | 0,75 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| | - frisch ansetzen - | |
| Entwickler: | Na ₂ CO ₃ | 60 g |
| | Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O | 20 ml |
| | (0,04 % , w/v) | |
| | Formaldehyd (37 % , v/v) | 0,5 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |
| - frisch ansetzen - | | |
| Stop-Lösung: | Na ₂ -EDTA | 18,6 g |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |

2.15.3.2. Coomassiefärbung (Thompson & Larson, 1992)

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen, die für weitere Analysen verwendet wurden, erfolgte durch unspezifische Färbung mit Coomassie. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30-60 min in Färbelösung geschwenkt. Diese enthielt anstatt des normalerweise verwendeten Methanols Isopropanol, da Isopropanol nicht, wie Methanol, Proteine in der Gelmatrix fixiert. So konnten die Proteine auch nach der Färbung noch elektroeluiert oder auf PVDF-Membran geblottet werden. Die Entfärbung des Gels erfolgte mit 10 % (v/v) Essigsäure unter mehrfachem Wechsel der Lösung bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

| | | |
|--------------------|------------------------------------|------------|
| Coomassie-Reagenz: | Serva Blau R-250 | 2,5 g |
| | Isopropanol | 250 ml |
| | Eisessig | 100 ml |
| | H ₂ O _{bidest} | ad 1000 ml |

PVDF-Membranen wurden in der gleichen Lösung ca. 5 min gefärbt und unter ständiger Bewegung mit einer Lösung aus 90 % (v/v) Methanol und 2 % (v/v) Essigsäure

entfärbt. Nach dem Entfärben wurden die Membranen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewässert, auf Whatman-3-MM-Chromatographie-Papier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in Plastikfolie eingeschweißt.

2.15.4. Spaltung von Proteinen

2.15.4.1. Chemische Spaltung durch Bromcyan (Tarr, 1986)

Bromcyan (BrCN) spaltet Peptide spezifisch an der Carbonylgruppe von Methioninresten. Dabei wird Methionin bei niedrigem pH-Wert über die Zwischenstufe des Homoserinlactons in Homoserin umgewandelt. Da interne Methioninreste in Proteinen relativ selten sind, erhält man auf diese Weise Peptidfragmente einer Größe, die direkt zur Sequenzanalyse verwendet werden können, und die zudem nicht, wie bei proteolytischen Spaltungen, durch Fremdproteinfragmente oder Proteasen verunreinigt sind.

Für die Bromcyan-Spaltung wurde das zu untersuchende Protein aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eluiert und auf ein geringes Volumen eingengt (s. 2.14.7.). 60 μl eluiertes Protein wurden mit 140 μl konzentrierter Ameisensäure und 1-2 Kristallen Bromcyan versetzt, mit N_2 begast und 16-24 h unter Lichtabschluß bei RT inkubiert. Der Spaltungsansatz wurde dann mit mindestens 5 Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt und im Speed Vac (Speed Vac Plus SC110A, Savant Instruments Inc., New York) bis zur Trocknung eingengt. Die Spaltprodukte wurden dann in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 oder direkt in Denaturierungspuffer resuspendiert und in der SDS-PAGE (s. 2.15.2.1.) aufgetrennt.

2.15.4.2. Proteolytische Spaltung

Wie bereits für die Bromcyan-Spaltung wurde das zu untersuchende Protein aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eluiert und auf ein geringes Volumen eingengt (s. 2.14.7.). Dabei war es wichtig, daß die SDS-Konzentration im Spaltungsansatz 0,05 % (w/v) nicht überschritt. Gegebenenfalls wurde das Protein ÜN bei -20°C mit dem 3-fachen Volumen Aceton gefällt, bei 13.000 Upm und 4°C (Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) für 1 h pelletiert und in 5 mM NH_4HCO_3 aufgenommen. Das Protein wurde einer kontrollierten proteolytischen Spaltung mit der Endoproteinase Glu-C aus *Staphylococcus aureus* V8 (Boehringer, Mannheim) sowie mit Trypsin (Sigma, Deisenhofen) unterzogen. Dazu wurden Protein und Protease in einem

Konzentrationsverhältnis von etwa 50:1 gemischt und für mindestens 2 h oder ÜN bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Proteolyse wurden durch SDS-PAGE (s. 2.15.2.1.) überprüft.

Alternativ dazu wurde das Protein (im SDS-Polyacrylamidgel) zusammen mit Proteasepuffer und der Endoproteinase Glu-C in die Tasche eines zweiten SDS-Polyacrylamidgels gegeben, bis kurz vor Erreichen des Trenngels einlaufen gelassen und dann für 30-60 min ohne Strom inkubiert (Cleveland et al., 1977). Anschließend erfolgte eine Auftrennung wie gewohnt.

| | | |
|------------------|------------------|----------------|
| Protease-Puffer: | Tris/HCl, pH 6,8 | 125 mM |
| | Glycerin | 10 % (v/v) |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |
| | Bromphenolblau | 0,0001 % (w/v) |

2.15.5. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Ein gelelektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Protein-bindende Membranen nach Towbin et al., 1979 wurde zur späteren N-terminalen Aminosäuresequenzierung partiell gereinigter Proteine oder Proteinfragmente durchgeführt.

Nach der Auftrennung der Proteine in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Proteine unter Verwendung einer Semy-Dry-Fast-Blot-Apparatur (B32/33, Biometra, Göttingen) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore GmbH, Eschborn) übertragen.

Dazu wurden auf der Anodenseite des Gerätes in folgender Reihenfolge drei Blätter Whatman-3-MM-Chromatographiepapier, eine PVDF-Membran, das Gel und wiederum drei Blätter Whatman-3-MM-Chromatographie-Papier luftblasenfrei aufgelegt. Das Chromatographie-Papier und die Membran wurden zuvor auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 30-60 min in Transfer-Puffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde wegen ihrer starken Hydrophobizität vor Verwendung einige Sekunden in Methanol (reinst) geschwenkt und erst dann in Transfer-Puffer getränkt. Die Proteine wurden für 30-60 min bei 4-5 mA/cm² Gel geblottet. Um eine Erwärmung während des Transfers zu vermeiden, wurde die Kathodenplatte durch Auflegen einer Schale mit Eiswasser gekühlt.

| | | |
|------------------|----------|------------|
| Transfer-Puffer: | Tris | 25 mM |
| | Glycin | 192 mM |
| | Methanol | 20 % (v/v) |

Wurden bereits Coomassie-gefärbte Gele geblottet, so wurden diese nach der Färbung (und vor Inkubation in Transfer-Puffer) für 1 h in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 1 % (w/v) SDS inkubiert, wodurch eine Wiederaufladung des Protein-Farbstoff-Komplexes erreicht wurde.

2.15.6. RP-HPLC-Auftrennung und N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse

Für die N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse wurde das partiell gereinigte Protein einer SDS-PAGE (s. 2.15.2.1.) mit anschließender Coomassie-Färbung (s. 2.15.3.2.) unterzogen. Nach dem Ausschneiden der gewünschten Proteinbande wurde das Protein einem tryptischen Verdau im Gel nach einer modifiziertem Methode von Shevchenko et al., 1996 mit anschließender RP-HPLC-Aufreinigung unterzogen. Die Auftrennung erfolgte an einer C18-Säule der Firma TosoHaas (Protoptyp; Super ODS, 2 µm Partikel, 110A, 2 mm I.D x 100 mm) an einem Smart-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg mit µPeak-Monitor, 10 ml Spritzenpumpen und angeschlossenen Fraktionssammler. Als Laufmittel A diente 0,1 % (v/v) TFA in in Quarzglas doppelt destilliertem Wasser und 0,085 % (v/v) TFA in Acetonitril (gradient grade) als Laufmittel B. Bei einer Flußrate von 0,1 ml/min wurde für 20 min ein isokratischer Gradient bei 7 % (v/v) Laufmittel B angelegt, der dann linear in 100 min auf 50 % (v/v) Laufmittel B anstieg. Die Detektion der Peptidfragmente erfolgte simultan bei 215, 256 und 280 nm. Die N-terminalen Aminosäuren ausgewählter Proteinfragmente wurden durch automatischen Edman-Abbau in einem Sequenator der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt (Model 473A und 476A) bestimmt. Beide Geräte waren mit Mikrocartridges ausgerüstet und wurden in sogenannten „fast cycles“ nach Vorschrift, mit Verbrauchsmaterialien und Chemikalien des Herstellers betrieben. Die entsprechenden Analysen wurden von Dr. Weber am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart durchgeführt.

2.15.7. Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die Massen ausgewählter Peptide wurden mit einem LD-TOF System der Firma Hewlett Packard (Modell G2025A) mit „time lag focussing“ und LeCroy 9350 CM 500 MHz Speicheroscilloscop bestimmt. Die Probenpräparation erfolgte nach der „thinlayer“-Technik. Als Matrix diente Alpha-cyano-4-hydroxy-zimtsäure mit Nitrocellulose in Aceton/Isopropanol 1:1.

2.16. Elektronenmikroskopische Methoden

2.16.1. Negativkontrastierung (Valentine et al., 1968), modifiziert

Auf Parafilm wurden nebeneinander Tropfen aus einer Zellsuspension, H_2O_{tridest} und das Kontrastierungsmittel pipettiert. Auf der konvexen Oberfläche des Tropfens mit der Objektlösung wurde nun die Kohlefolie eines ca. 2 x 2 mm großen Glimmerstückes partiell abflottiert. Je nach Konzentration der Zellsuspension wurde die Kohlefolie 10-30 sec auf der Probe belassen (Mayer & Spiess, 1976). Zum Abwaschen nicht-adsorbierter Zellen wurde die Kohlefolie auf tridestilliertem Wasser partiell abflottiert. Im anschließenden Kontrastierungsschritt auf 3 % (w/v) Phosphorwolframsäure, pH 7,0 bzw. 4 % (w/v) Uranylacetat, pH 4,8 wurde die Kohlefolie vollständig abflottiert. Der Glimmer wurde dabei auf den Grund des Tropfens abgesenkt. Die auf dem Tropfen flottierende Folie wurde mit einem G 300-Kupfergrid (Typ 300 mesh, 3,05 mm Durchmesser; Science Services, München) aufgenommen, und überschüssiges Kontrastierungsmittel wurde mit einem Filterpapier abgesogen.

2.16.2. Einbettung in Kunstharz

2.16.2.1. Fixierung der Zellen

Die Zellen von unter verschiedenen Bedingungen angezogenen *Xanthomonas* sp. 35 Y-Kulturen wurden direkt in ihren Kulturgefäßen fixiert. Dazu wurde den Kulturen 25 % (v/v) Glutaraldehyd (grade I) bis zu einer Endkonzentration von 3 % (v/v) zugesetzt und für bis zu 1,5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei 4°C und 4.500 Upm abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 100 µl PBS resuspendiert.

| | | |
|------|---------------------------------|--------|
| PBS: | K ₂ HPO ₄ | 50 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 50 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| | pH 7,0 | |

2.16.2.2. Einbettung der Zellen (Spurr, 1969)

50-150 µl-Aliquots der Proben wurden in E-Cups überführt und mit dem gleichen Volumen 1,5 %igem (w/v) Bacto-Agar (in PBS, s. 2.16.2.1.) vermischt, der bei 45°C flüssig gehalten wurde. Nach dem Erstarren des Agars wurde die Proben aus dem Gefäß herausgelöst und in kleine Blöckchen von ca. 1 mm Kantenlänge zerteilt. Die Agarblöckchen wurden mehrmals nacheinander in großen Volumina PBS (s. 2.16.2.1.) gewaschen und nachfolgend für 30 min in 1 %iger (w/v) Osmiumtetroxidlösung in 100 mM Cacodylatpuffer, pH 7,0 nachfixiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Agarblöckchen mehrmals mit großen Volumina H₂O_{bidest} gewaschen. Zur Entwässerung der Proben wurden diese nacheinander mit 10 %, 30 % und 50 % (v/v) Acetonlösung versetzt und für jeweils 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für mindestens 2 h oder ÜN mit einer Lösung aus 2 % (w/v) Uranylacetat in 70 % (v/v) Aceton kontrastiert. Dann wurden die Proben für jeweils weitere 10 min in 70 %, 90 % und 100 % (v/v) Aceton entwässert. Das 100 %ige Aceton wurde nochmals ausgetauscht und im Verhältnis 1:2 mit Kunstharzmischung versetzt. Nach 30 min wurden die Proben mit Kunstharz:Aceton 1:4 für weitere 90 min überdeckt. Diese Mischung wurde entfernt und durch reines Kunstharz ersetzt, welches nach 16 h nochmals ausgewechselt wurde. Nach weiteren 3 h wurden die Agarblöckchen einzeln in die Spitze von Gelatinekapseln überführt und mit frischem Kunstharz überschichtet. Zur Entfernung von Gasblasen wurden die Kapseln für 10 min evakuiert und anschließend für 8 h bei 70°C polymerisiert.

| | | |
|------------------|-------------------------------------|--------|
| Spurr-Kunstharz: | Vinylcyclohexendioxid | 15,0 g |
| | D. E. R. 736 | 9,0 g |
| | Nonenylbernsteinsäureanhydrid (NSA) | 39,0 g |
| | α-Dimethylaminoethanol | 0,6 g |

2.16.2.3. Ultramikrotomie

Die polymerisierten Proben wurden mit einer Diamantfräse (TM 60, Reichert, Wien, Österreich) so angespitzt, daß ein Pyramidenstumpf mit einer quadratischen Anschnittfläche von ca. 0,5 mm² entstand, die möglichst vollkommen von der

eingebetteten Probe eingenommen wurde. Die Dünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (UltratomeII, LKB, Bromma, Schweden) unter Verwendung von Glasmessern angefertigt. Die Glasmesser wurden aus 25 mm breiten und 6,5 mm dicken Glasstreifen (LKB, Bromma, Schweden) mit einem Messerbrecher (Knifemaker LKB 7800, LKB, Bromma, Schweden) gebrochen. Sie hatten bei einem Gegenstück von 0,5 mm Dicke einen realen Winkel von 55° an der Messerkante. Zur Aufnahme der Schnitte wurden die Messer mit einem Kunststoffrog (Plano, Marburg) versehen, der mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gefüllt wurde, so daß die Schnitte auf der Oberfläche abflottieren konnten. Die Dicke der Schnitte konnte anhand der Interferenzfarbe bestimmt werden und betrug bei silbener Farbe 60-90 nm. Nach der Spreitung der Schnitte durch Chloroformdampf wurden sie mit formvarbeschichteten Kupfergrids aufgenommen.

2.16.2.4. Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat

Zur Kontrastierung wurden Grids mit Ultradünnschnitten für 3 min auf einen Tropfen 4 % (w/v) Uranylacetatlösung, pH 4,8 gelegt, die zuvor durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm partikelfrei gemacht wurde. Überschüssiges Uranylacetat wurde mit einem Filterpapier abgesaugt und die Grids wurden an der Luft getrocknet. Für den zweiten Kontrastierungsschritt wurde 10 %iges (w/v) Bleicitrat in 0,1 N NaOH, pH 12,0 verwendet. Die Kontrastierung erfolgte durch Flottieren der Uranylacetat-kontrastierten Grids auf einem Tropfen dieser Lösung für 3-4 min unter CO_2 -Ausschluß in einer feuchten NaOH enthaltenden Glaspetrischale. Die CO_2 -Absorption an NaOH sollte Bleicarbonat-Ausfällungen auf den Schnitten verhindern. Nach diesem Kontrastierungsschritt wurden die Schnitte gründlich in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, welches zur Entfernung des CO_2 abgekocht und unter Luftausschluß abgekühlt wurde, gespült. Die Grids wurden auf Filterpapier getrocknet und aufbewahrt.

2.16.3. Elektronenmikroskopische Abbildung

Elektronenmikroskopische Präparate wurden im Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV elektronenoptisch auf einem Leuchtschirm abgebildet (EM 301, Philips, Eindhoven, Niederlande). Für die Mikrographien wurden Planfilme (Scientia 23D-56, Agfa Gevaert, Leverkusen; Abmessungen 6,5 x 9 cm) als Negativmaterial verwendet.

2.16.3.1. Hellfeldabbildung

Bei der Abbildung negativkontrastierter oder eingebetteter Präparate im Transmissionselektronenmikroskop wird Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure als Kontrastierungsmittel eingesetzt. Durch die Ausblendung der unter großen Winkeln an den Atomkernen der schweren Elemente (Uran, Wolfram) elastisch gestreuten Elektronen erscheint das Kontrastierungsmittel im Bild dunkel. An Proteinstrukturen, die nicht von Kontrastierungsmittel bedeckt sind, werden die Elektronen wegen der geringeren Anzahl an Atomkernen vergleichsweise wenig durch elastische Stöße gestreut. Die Elektronen, die die Proteine ungestreut passieren, bedingen maßgeblich die Helligkeit der Abbildung.

2.17. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe) mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ verwendet. Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), New England Biolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (St. Leon Rot) bezogen. Darüber hinaus wurden Biochemikalien und Enzyme sowie spezielle Produkte von folgenden Firmen benutzt:

AgarAids, Stansted, Essex, UK:

Komponenten des Spurr-Einbettungsharzes

Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg:

Agarose NA, Cover Fluid, DTT, Immobiline Dry Strips pH 3-10, IPG-Buffer 3-10, LMW Calibration Kit

Biomol Feinchemikalien GmbH, Ilvesheim:

basisches Phenol, IPTG, X-Gal

Boehringer Mannheim GmbH, Darmstadt:

Ammoniumpersulfat, Ampicillin, RNase A, Shrimps Alkalische Phosphatase

Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach:

Miraclon, Thiostrepton

Carl Roth GmbH, Karlsruhe:

30 % (w/v) Acrylamid + 0,8 % (w/v) Bisacrylamid, Ethidiumbromid, Glycin, Tris

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Agar, Hefeextrakt, Nutrient Broth, Trypton

Fluka Feinchemikalien, Buchs, Schweiz:

Glycerin, Natriumazid

Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein:

Oligonukleotide

MBI Fermentas, St. Leon Rot:

dNTPs, *Taq*-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase, 100 bp-Ladder, 1 kb-Ladder

Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel:

GN2 MicroPlates für Gram-negative Bakterien

Millipore GmbH, Eschborn:

Amicon Centriplus-10 Concentrators, Amicon Centricon-10 Centrifugal Filter Devices, Immobilon-P PVDF-Membran, Steritop-GP 500 ml Express (PES)-Membran

MWG-Biotech, München:

Oligonukleotide

NEB, Schwalbach:

Mung Bean Nuklease, *AluI*-Methylase, *SssI*-Methylase

Oxoid, Wesel:

Oxoid-Agar Nr. 5

Pall Filtron, Dreieich:

Minisette Cassette 10 kDa Membrantyp: Omega

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen:

2 mm-Elektroporationsküvetten

QIAGEN GmbH, Hilden:

QIAquick Gel Extraction Kit, QIAex Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit

Riedel-de-Haen AG, Seelze:

Aceton, Chloroform, Essigsäure, Ethanol, HCl, Isopropanol, NaOH

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg:

Bromphenolblau, BSA, Formvar (Polyvinylformaldehyd), Harnstoff, HEPES, Lysozym, Kanamycin, Na₂-EDTA, Osmiumtetroxid, Phosphorwolframsäure, PIPES, SDS, TEMED, Visking Dialysis Tubing 20/32

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen:

Chloramphenicol, DTT, Formaldehyd, Endoproteinase Glu-C aus *Staphylococcus aureus* V8, Tetracyclin

3. EXPERIMENTE & ERGEBNISSE

Aufgrund der weiten Verbreitung von isoprenoiden Verbindungen, die insbesondere von den *Euphorbiaceae* (Wolfsmilchgewächsen) produziert werden, wurde ein systematisches Screening über die Verbreitung von Naturkautschuk (NR) verwertenden Bakterien durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Boden- und Abwasserproben europäischer und asiatischer Standorte auf das Vorkommen NR-abbauender Bakterien untersucht. 50 Naturkautschuk (NR)-abbauende Bakterien konnten isoliert und aufgereinigt werden, die alle in der Lage waren, auf Agarplatten mit NR als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen und eine Aufklärung um die Kolonien zu bilden. 33 der 50 Bakterienstämme wurden als *Streptomyces*-, 8 als *Micromonospora*- und 1 als *Microtetraspora*-Species identifiziert, die übrigen konnten keiner bekannten Gattung zugeordnet werden, gehörten jedoch auch zur Gruppe der Actinomyceten. Die Untersuchung von 1220 Stämmen aus verschiedenen Stammsammlungen auf NR-Verwertung erbrachte nochmals 46 NR-Abbauer (Jendrossek et al., 1997). Auffällig war, daß alle NR-abbauenden Organismen aus der Gruppe der Actinomyceten stammten und trotz intensiver Suche kein Gram-negativer Kautschukabbauer gefunden werden konnte. Somit blieb bis vor Kurzem der von Tsuchii & Takeda, 1990 beschriebene *Xanthomonas* sp. 35Y der einzig bekannte Gram-negative NR-Abbauer. Dieser Stamm wurde jedoch in keiner allgemein zugänglichen Stammsammlung hinterlegt. Inzwischen allerdings konnte ein *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm isoliert und identifiziert werden, der ebenfalls zum NR-Abbau fähig ist, jedoch auf NR-Agarplatten keine Hofbildung zeigt (Linos et al., 2000).

Die Untersuchung der isolierten Bakterien auf ihre morphologischen und physiologischen Charakteristika ließ zwei besonders hervortreten: ein als *Streptomyces griseus* 1D bezeichneter Stamm, der sich durch seine offenbar konstitutive Hofbildung auf NR-Agarplatten mit einer zweiten, wasserlöslichen Kohlenstoffquelle auszeichnete, und ein als *Streptomyces coelicolor* 1A bezeichneter Stamm, der eine besonders starke Aufklärung des NR-Agars um die Kolonien herum zeigte. Diese Organismen wurden daher für die weiteren molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen ausgewählt. Wie bereits aufgrund von Fütterungsexperimenten an *Xanthomonas* sp. 35Y mit ¹⁸O-markiertem Sauerstoff postuliert wurde, sollte es sich bei dem initialen, für den NR-Abbau verantwortlichen

Enzym um eine Polyisoprenoid-Dioxygenase handeln, da beide der markierten Sauerstoff-Atome in den gebildeten Intermediaten nachzuweisen waren (Tsuchii & Takeda, 1990) (Abb. 2). Der NR-Abbau ist somit strikt Sauerstoff-abhängig.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen sollte nun eine Identifizierung und Klonierung der/des für den NR-Abbau verantwortlichen Enzym(e)/Enzymkomplexes bzw. dessen/deren Strukturgene sein.

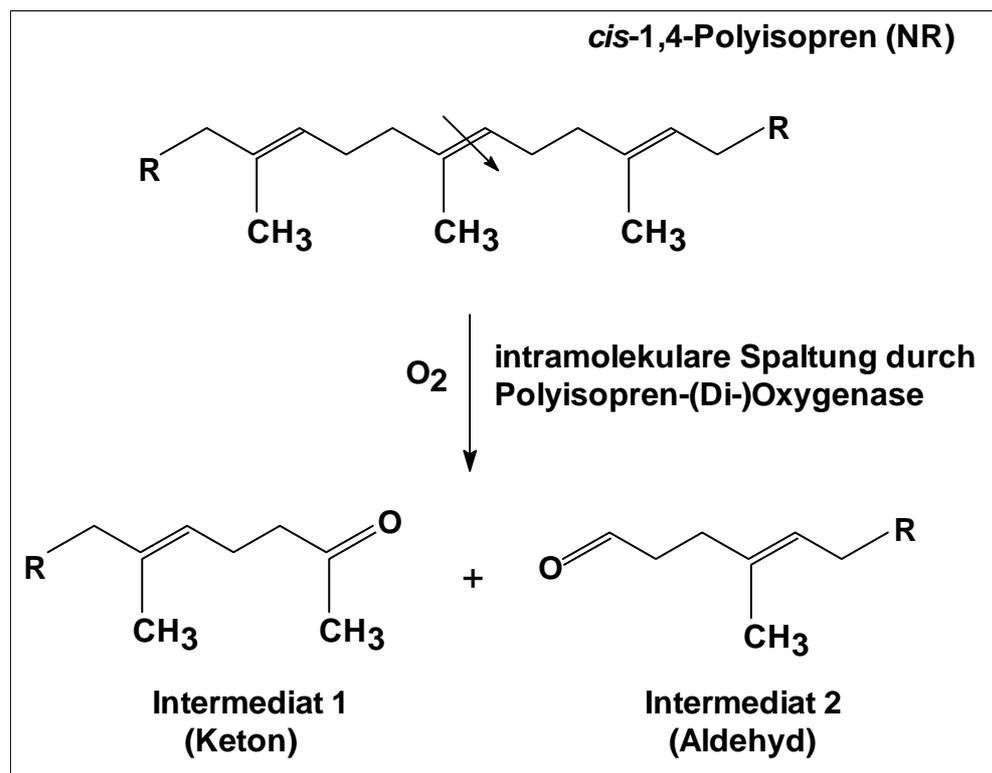


Abb. 2: Hypothetischer Mechanismus der initialen Spaltung von *cis*-1,4-Polyisopren (NR) durch *Xanthomonas* sp. 35Y nach Tsuchii & Takeda, 1990, modifiziert.

3.1. Abbau von NR durch *Streptomyces griseus* 1D und *Streptomyces coelicolor* 1A

3.1.1. Charakterisierung von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A beim Wachstum auf NR

Beim Wachstum von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A auf NR-Agarplatten tritt nach 3-4 Tagen ein NR-Abbau auf, was durch eine Hofbildung um die Kolonien herum deutlich wird. Wie beim Wachstum dieser Organismen auf Mineralmedium mit anderen, wasserlöslichen Kohlenstoffquellen auch, ist das gebildete Luftmyzel deutlich

feiner und weniger stark ausgeprägt als beim Wachstum auf Komplexmedien, wie z.B. SM-Medium. Während die Kolonien auf SM-Medium durch ein dichtes Luftmyzel bedeckt sind, ist auf Mineralmedium eine in konzentrischen Kreisen verlaufende Sporenbildung zu beobachten (siehe auch Abb. 5, NR oder zum Vergleich (Spence & van Niel, 1936)). Auch in Flüssigkultur wird bei *S. coelicolor* 1A der Abbau von NR durch Zugabe einer anderen verwertbaren Kohlenstoffquelle (z.B. Glucose) gehemmt, während bei *S. griseus* 1D die NR-abbauende Aktivität offenbar konstitutiv exprimiert wird.

In Mineralmedium-Flüssigkulturen mit NR als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wird bei beiden Organismen nach längerer Kultivierungsdauer mit abnehmender Trübung des Mediums eine Ausflockung der Zellen sichtbar. Außerdem wird auf der Oberfläche der Kulturen eine Sporendecke gebildet.

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativkontrastierten Präparates von *S. griseus* 1D, gewachsen in NR-Flüssigkultur, verdeutlicht, daß beim NR-Abbau ein direkter Kontakt zwischen Myzel und Latexpartikeln vorhanden ist. Daher wurde davon ausgegangen, daß es sich beim dem für den NR-Abbau verantwortlichen Enzym/Enzymkomplex, nicht unbedingt um einen löslichen Enzymkomplex handeln müßte, sondern es sich auch um ein zell- bzw. membrangebundenen Proteinkomplex handeln könnte.

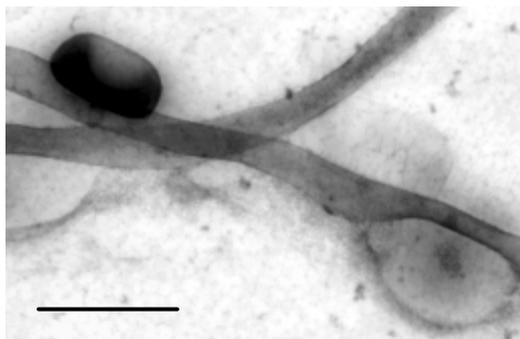


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Phosphorwolframsäure negativkontrastierten Präparates von *S. griseus* 1D, das den direkten Kontakt zwischen Myzel und Latexpartikel zeigt. Die Zellen wurden für 8 Tage in Mineralmedium mit 0,05 % (w/v) NR angezogen. Der Balken entspricht 1 μm .

3.1.2. Genetische Fixierung der NR-abbauenden Eigenschaften in *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A

Um sicherzustellen, daß es sich beim NR-Abbau durch *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A um eine genetisch zugängliche Eigenschaft handelt, die auf einen (komplexen) Abbauweg schließen läßt, und nicht um eine nicht-spezifische oder nicht-enzymatische Reaktion, verursacht durch gebildete Intermediate, wurde eine ungerichtete Mutagenese mittels UV-Licht durchgeführt. Sollte es sich bei der Fähigkeit NR abzubauen um eine spezifische Eigenschaft handeln, würde man Mutanten erwarten, die nach UV-Bestrahlung ein verändertes Abbauverhalten (verbesserter Abbau, verminderter Abbau, kein Abbau) zeigen, jedoch ansonsten ein normales, d.h. gegenüber dem Wildtyp unverändertes Wachstumsverhalten aufweisen.

3.1.2.1. Herstellung von Mutanten durch ungerichtete UV-Mutagenese

S. griseus 1D und *S. coelicolor* 1A wurden auf SM-Platten ausgestrichen und bis zur Sporulation bei 30°C inkubiert. Die UV-Mutagenese der konzentrierten Sporensuspensionen wurde wie unter 2.6.6. beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden von 0-20 min in Zeitintervallen von 2 min jeweils 2 x 0,5 ml Sporensuspension entnommen, zur Vermeidung lichtabhängiger Reparaturmechanismen dunkelgestellt und mit 20 % (v/v) Glycerin bis 10^{-8} verdünnt. Jeweils 3 x 100 µl drei verschiedener Verdünnungsstufen wurden auf SM-Platten ausplattiert und bis zur Sporulation der Zellen bei 30°C inkubiert. Die angewachsenen Kolonien wurden ausgezählt, in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer eine Absterbekurve aufgenommen (Abb. 4) und die Absterberaten bestimmt.

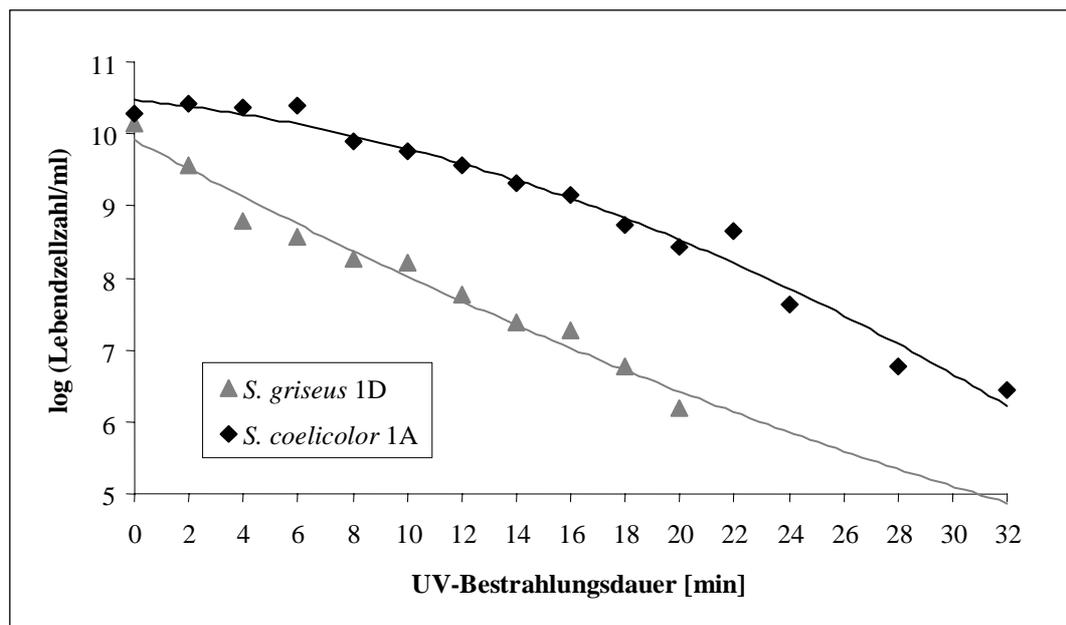


Abb. 4: Dosis-abhängige Absterbekurve von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A nach Bestrahlung mit UV-Licht.

Aus den Daten der Absterbekurve wurden folgende Absterberaten ermittelt:

S. griseus 1D: - 0,41/min

S. coelicolor 1A: - 0,19/min

Anhand der mehr als doppelt so hohen Absterberate von *S. griseus* 1D wird deutlich, daß dieser Stamm anscheinend wesentlich empfindlicher auf UV-Strahlung reagiert als *S. coelicolor* 1A.

3.1.2.2. Phänotyp der durch UV-Mutagenese erzeugten Mutanten von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A

Aus entsprechenden Verdünnungsstufen der Zeitpunkte, an denen 99,9 % aller Sporen abgetötet worden waren, d.h. für *S. griseus* 1D nach 16 min und für *S. coelicolor* 1A nach 24 min, wurden mehrmals je 100 µl auf NR-Agarplatten ausplattiert und auf einen veränderten Phänotyp im NR-Abbau untersucht. Von etwa 27.000 Kolonien von *S. griseus* 1D waren 78 Mutanten nicht mehr in der Lage auf NR einen Hof zu bilden und somit als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. 2 Mutanten dagegen zeigten eine verstärkte Hofbildung bzw. eine deutlichere Aufklärung. Für *S. coelicolor* 1A wurden ca. 10.700 Kolonien untersucht, von denen 132 Mutanten nicht zum NR-Abbau

befähigt waren. Andererseits bildeten nur 4 Mutanten einen größeren Aufklärungshof bzw. eine deutlichere Aufklärung.

Um weitestgehend ausschließen zu können, daß ein nicht unmittelbar am NR-Abbau beteiligter Faktor, beispielsweise im allgemeinen Protein-Sekretionsapparat der Zelle, für den aufgetretenen negativen Phänotyp im NR-Abbau verantwortlich ist, wurden alle Mutanten zusätzlich auf ihren Phänotyp beim Wachstum auf Casein, Stärke und PHB getestet. Alle diese Polymere werden von beiden Spezies ebenfalls durch extrazelluläre Enzyme (Protease, α -Amylase, Depolymerase) angegriffen, so daß man davon ausgehen kann, daß, wenn die Mutanten noch in der Lage sind, diese Polymere abzubauen, der allgemeine Sekretionsapparat für extrazelluläre Enzyme nicht betroffen sein dürfte. 4 der 78 *S. griseus* 1D-Negativmutanten (*S. griseus* 1D-L⁻-M1-4) und 1 der 132 *S. coelicolor* 1A-Negativmutanten (*S. coelicolor* 1A-L⁻-M1) konnten jedoch nur noch Casein, Stärke und PHB in zum Wildtyp vergleichbarer Weise nutzen. Das bedeutet, daß für *S. griseus* 1D mit einer Frequenz von 0,015 % und für *S. coelicolor* 1A mit einer Frequenz von 0,01 % Mutanten auftraten, die offenbar einen spezifischen Defekt im NR-Abbau aufwiesen. Beide *S. griseus* 1D-Gewinnmutanten (*S. griseus* 1D-L⁺-M4 und -M6) konnten Casein und Stärke in zum Wildtyp vergleichbarer Weise nutzen, während 1 Mutante (*S. griseus* 1D-L⁺-M6) PHB hingegen nur noch sehr schwach abbauen konnte. Auch die Gewinnmutanten von *S. coelicolor* 1A konnten alle Casein vergleichbar gut wie der Wildtyp hydrolysieren, während jedoch 1 Mutante (*S. coelicolor* 1A-L⁺-M3) einen signifikant verringerten Abbau von Stärke und 3 Mutanten (*S. coelicolor* 1A-L⁺-M1, -M2 und -M4) einen signifikant verringerten Abbau von PHB aufwiesen. Alle Mutanten mit beeinträchtigtem PHB-Abbau (*S. griseus* 1D-L⁺-M2, *S. coelicolor* 1A-L⁺-M2-4) zeigten außerdem auf diesem Medium ein sehr diffuses Wachstum. Nur für *S. griseus* 1D konnte also eine Mutante erzeugt werden, die eine stärkere Hofbildung auf NR-Agarplatten bewirkte, ansonsten jedoch ein mit dem Wildtyp vergleichbares Abbauverhalten aufwies.

Tabelle 4: Phänotyp der Mutanten von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A beim Wachstum auf NR-, Stärke-, Casein- und PHB-Agarplatten.

| Mutanten | NR | Stärke | Casein | PHB |
|--|----|--------|--------|-----|
| <i>S. griseus</i> 1D-L ⁻ -M1-M4 | - | + | + | + |
| <i>S. griseus</i> 1D-L ⁺ -M4 | ++ | + | + | + |
| <i>S. griseus</i> 1D-L ⁺ -M6 | ++ | + | + | +/- |
| <i>S. coelicolor</i> 1A-L ⁻ -M1 | - | + | + | + |
| <i>S. coelicolor</i> 1A-L ⁺ -M3 | ++ | +/- | + | + |
| <i>S. coelicolor</i> 1A-L ⁺ -M1, -M2, -M6 | ++ | + | + | +/- |

+ , Hydrolyse/Abbau vergleichbar mit dem Wildtyp; ++ , gegenüber Wildtyp verbesserte/r Hydrolyse/Abbau; +/- , gegenüber Wildtyp signifikant reduzierte/r Abbau/Hydrolyse; - , kein/e Abbau/Hydrolyse; Veränderungen von Abbau/Hydrolyse wurden anhand der durchschnittlichen Hofgröße bestimmt.

Im Folgenden wurden jedoch von jedem Stamm nur jeweils eine Verlust- (1D-L⁻-M1 bzw. 1A-L⁻-M1) und eine Gewinnmutante (1D-L⁺-M1 bzw. 1A-L⁺-M1) für weitere Experimente verwendet, die in Abb. 5 für *S. griseus* 1D und dessen Mutanten exemplarisch dargestellt sind. *S. coelicolor* 1A und dessen Mutanten zeigten beim Wachstum auf NR-, Stärke-, Casein- und PHB-Agarplatten einen vergleichbaren Phänotyp.

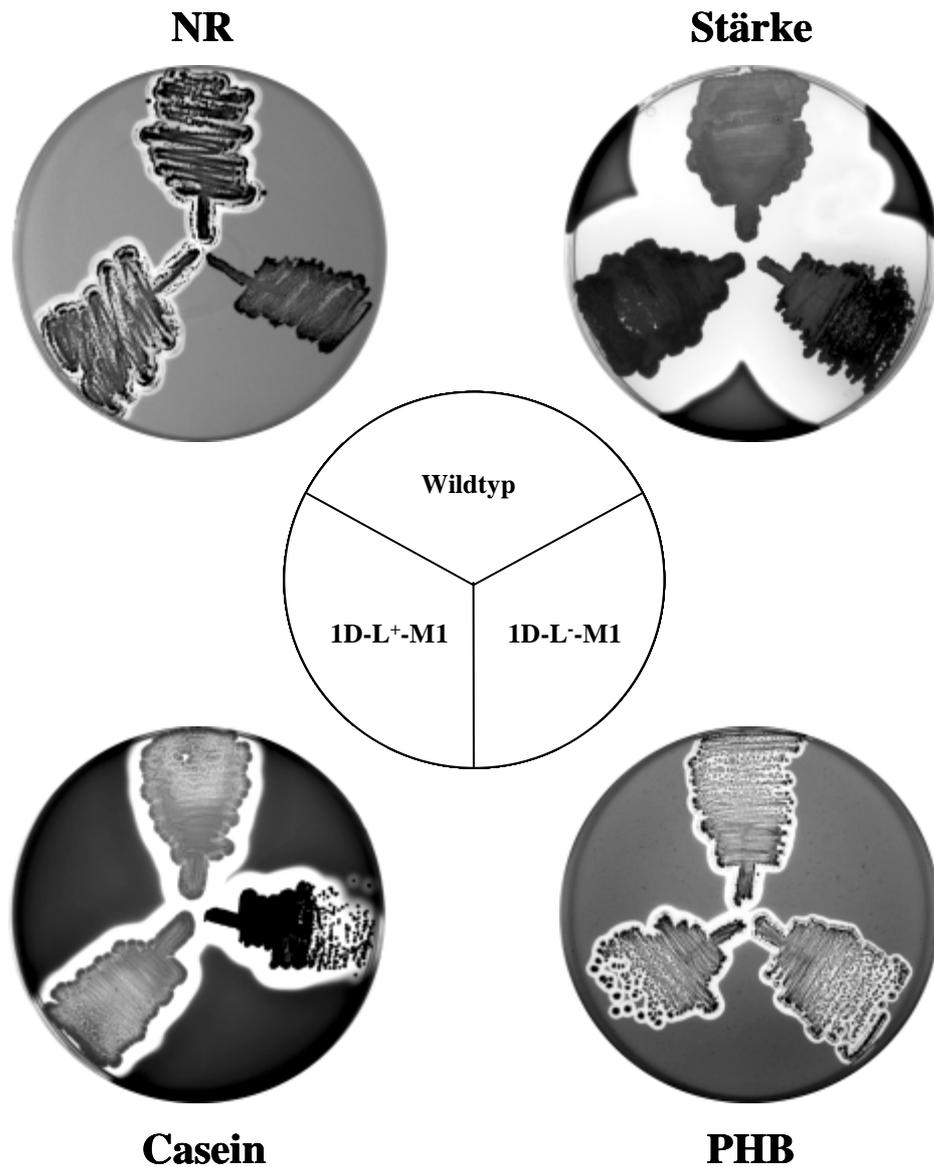


Abb. 5: Phänotyp von *S. griseus* 1D (Wildtyp), *S. griseus* 1D-L⁻-M1 (Negativmutante M1) und *S. griseus* 1D-L⁺-M1 (Gewinnmutante G1) beim Wachstum auf NR-, Stärke-, Casein- und PHB-Agarplatten nach 4-5 Tagen Inkubation bei 30°C. Während beim Wachstum auf NR deutliche Unterschiede in der Hofgröße zwischen Wildtyp und den Mutanten auftraten, sind beide Mutanten in der Lage Stärke, Casein und PHB vergleichbar gut zu verwerten wie der Wildtyp.

3.1.3. Strategien zur Klonierung der Strukturgene der potentiellen Polyisopren-Dioxygenase aus *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A

Für die Klonierung der potentiellen Polyisopren-Dioxygenase standen zunächst zwei Möglichkeiten zur Auswahl, die Klonierung in *E. coli* oder in einem anderen Streptomyceten, z.B. *S. lividans*. Zwar bot die Klonierung in *E. coli* den Vorteil relativ schnell und einfach vonstatten gehen zu können, jedoch war zur Feststellung der erfolgreichen Klonierung eine heterologe Expression des betreffenden Gens, die zu einer phänotypisch sichtbaren Hofbildung führt, notwendig. Eine Expression der typischerweise sehr (G+C)-reichen *Streptomyces*-DNA in *E. coli* ist allerdings nicht unbedingt gewährleistet. Die meisten Streptomyceten-Promotoren werden in *E. coli* nicht transkribiert (Bibb & Cohen, 1982; Jaurin & Cohen, 1984). Außerdem bestand das Problem der unterschiedlichen Zellwand-Struktur, so daß selbst bei erfolgreicher Expression nicht zwingend auch eine Sekretion des gebildeten Proteins stattfinden mußte. Daher wurde der Weg der Klonierung in *S. lividans* 1326 gewählt. Der Organismus wächst relativ schnell, sporuliert gut und zeigt normalerweise keine Restriktion von DNA anderer *Streptomyces*-Spezies. Auch kann aus *E. coli* isolierte Plasmid-DNA direkt in *S. lividans* übertragen werden. Als Klonierungsvektor diente das 5,7 kb-*Streptomyces*-Plasmid pIJ702 (Katz et al., 1983), ein Derivat des Multicopyplasmides pIJ101, das einen weiten Wirtsbereich aufweist. pIJ702 verfügt neben einer Thiostrepton-Resistenz (*tsr*) über ein Tyrosinasegen (*mel*), das dem Wirt beim Wachstum auf Tyrosin-haltigen Medien durch die Melaninbildung eine dunkle Koloniefarbe verleiht. Die Klonierung von Fremd-DNA in die singulären Schnittstellen innerhalb des Tyrosinasegens (*Bgl*III, *Sph*I und *Sst*I) führt dann zu phänotypisch leicht erkennbaren weißen Kolonien.

Da bekannt war, daß bestimmte DNA-Fragmente in einem Vektor stabil sind, in einem anderen hingegen nicht (Hopwood et al., 1985), wurde ein zweiter Klonierungsvektor eingesetzt. Obwohl eine gewisse Instabilität von Shuttle-Vektoren in Streptomyceten beobachtet worden war (Hopwood et al., 1985), wurde der *E. coli*-*Streptomyces*-Shuttle-Vektor pWHM3BE (Borovoc und Schrempf, unveröffentlicht) verwendet, denn dieser Vektor bot den Vorteil der Errichtung einer Genbank in *E. coli* mit anschließender Transformation in *S. lividans*. Es handelt sich dabei um ein 7,1 kb-Plasmid, welches ein Derivat von pWHM3 (Vara et al., 1989) darstellt, in dem die *Bss*HIII- und *Esp*I-Schnittstellen deletiert wurden. Der Vektor verfügt neben dem Thiostrepton-

Resistenzgen über eine Ampicillin-Resistenz und das *lacZ*-Fragment zur chromogenen Selektion in *E. coli* (Vieira & Messing, 1982).

3.1.3.1. Konstruktion einer Genbank von *S. griseus* 1D in *S. lividans*

Entsprechend der Klonierungsstrategie (s. 3.1.3.) wurde chromosomale DNA aus *S. griseus* 1D wie unter 2.7.5.2. beschrieben, isoliert, mit dem Restriktionsenzym *MboI* bzw. *Sau3AI* partiell verdaut (s. 2.9.1) und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Nach Ausschneiden der Größenfragmente von 4-10 kb unter UV-Licht wurden diese mit Hilfe des QIAex Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert und aufgereinigt (s. 2.7.6.).

Die Vektoren pIJ702 bzw. pWHM3BE wurden ebenfalls einem Restriktionsverdau unterzogen (s. 2.9.1.), wobei zur Linearisierung von pIJ702 *BglIII* und von pWHM3BE *BamHI* verwendet wurde. Im Anschluß daran wurden die Plasmide mit Shrimps Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (s. 2.9.2) und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Um ausschließlich linearisierte Plasmid-DNA zu erhalten, wurde die Bande des linearisierten Vektors unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert und aufgereinigt (s. 2.7.6.).

Nach der Ligation (s. 2.9.3) zwischen Vektor- und Insert-DNA (chromosomale DNA-Fragmente) wurde der Ansatz zur Reduzierung des Volumens einer Butanolfällung unterzogen und in Protoplasten von *S. lividans* 1326 transformiert (s. 2.10.5). Nach der Sporulation der Zellen (2-3 d) wurden die Transformanten zur Selektion potentieller Positivklone auf Mineralmedium mit 0,05 % Hefeextrakt und 0,2 % NR gepickt bzw. gestempelt und bis zu 2 Wochen bei 30°C inkubiert.

Überraschenderweise wurden trotz zahlreicher Transformationsversuche niemals mehr als 50 Transformanten/Platte erhalten, so daß insgesamt für pIJ702 nur etwa 8.200 Klone und für pWHM3BE ca. 2.400 Klone getestet werden konnten. Auch war die phänotypische Unterscheidung von Insert-tragenden Klone von reinen Vektor-Transformanten ein Problem, da *S. lividans* 1326 auch über ein chromosomal codiertes Tyrosinasegen verfügt und somit selbst rekombinante Transformanten eine braune Koloniefarbe aufwiesen. Eine Überprüfung einzelner Transformanten durch Plasmidpräparation ergab, daß nur etwa 1/5 aller Klone ein rekombinantes Plasmid enthielten.

Auch ein Wechsel des Klonierungswirtes, d.h. die Verwendung von *S. lividans* TK23, der im Gegensatz zu *S. lividans* 1326 nicht die natürlichen Plasmide SLP2 und SLP3 besitzt und auch etwas einfacher zu protoplastieren war, brachte keine verbesserten Transformationsraten.

3.1.3.2. Komplementation der NR-Negativmutanten von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A bzw. Transposonmutagenese der Wildtyp-Stämme

Als Alternative zur Errichtung einer Genbank von *S. griseus* 1D in *S. lividans* sollte durch Komplementation der mittels UV-Mutagenese erhaltenen Negativmutanten eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps erreicht werden. Außerdem sollte eine Transposonmutagenese der Wildtyp-Stämme durchgeführt werden. Da jedoch für die Transformation von Streptomyceten eine Protoplastierung dieser Voraussetzung ist, damit sie DNA aufnehmen können, mußte zuerst eine Protoplastierung von *S. griseus* 1D bzw. 1D-L⁻-M1 und *S. coelicolor* 1A bzw. 1A-L⁻-M1 durchgeführt werden.

Für *S. coelicolor* 1A und dessen Negativmutante *S. coelicolor* 1A-L⁻-M1 konnte trotz Variation der Anzuchtbedingungen (Medienzusammensetzung und Anzuchtdauer), Verwendung anderer Zellwand-angreifender Enzyme (Novozym, Mutanolysin), Verlängerung der Protoplastierungsdauer oder Veränderung der Protoplastierungstemperatur keine erfolgreiche Protoplastierung bewirkt werden. Somit war es auch nicht möglich zu testen, ob *S. coelicolor* 1A und 1A-L⁻-M1 in der Lage sind, Plasmid-DNA aufzunehmen. Zur Protoplastierung von *S. griseus* 1D und 1D-L⁻-M1 wurden diese in TSB-Medium unter Zusatz von MgCl₂, Glycin und PEG 8000 wie unter 2.10.1.2. beschrieben, angezogen. Durch Zugabe von 1 mg Lysozym/ml P-Puffer konnte innerhalb von 30-60 min bei 30°C eine Protoplastierung der Zellen erreicht werden. Zwar war die Ausbeute an Protoplasten mit 10³-10⁴/ml nur relativ gering im Vergleich zu *S. lividans* (10⁹-10¹⁰/ml), jedoch standen zumindest Protoplasten für Transformationsexperimente zur Verfügung.

Um zunächst die Transformationseffizienz einschätzen zu können, wurde versucht, pIJ702 bzw. pWHM3BE in die *S. griseus* 1D- und 1D-L⁻-M1-Protoplasten zu übertragen. Dazu wurde wie unter 2.10.5. beschrieben, vorgegangen. Allerdings konnte trotz zahlreicher Versuche keine Aufnahme der Plasmide erzielt werden.

Aus Experimenten mit dem Stamm *S. griseus* DSM 40236 in der Arbeitsgruppe von

Prof. Dr. W. Piepersberg an der Universität GH Wuppertal war jedoch bekannt, daß aus unbekanntem Gründen oftmals eine DNA-Aufnahme durch *S. griseus* nur stattfand, wenn die zu übertragende DNA aus einer A-Faktor- und Streptomycin-negativen Mutante (M881) von *S. griseus* DSM 40236 stammte (Thamm, persönliche Mitteilung). Daher wurde die Vektoren pIJ702 und pWHM3BE zuvor in die Mutante M881 transformiert, aus dieser durch Plasmidpräparation isoliert und in *S. griseus* 1D und 1D-L-M1 transformiert. Doch auch dieser Versuch der Transformation war nicht erfolgreich.

Ein weiteres Problem bei der Transformation von DNA in Streptomyceten konnte darin bestehen, daß die eingebrachte Plasmid-DNA aufgrund ihres Methylierungsmusters als Fremd-DNA angesehen und daher durch zelleigene Restriktionsendonukleasen verdaut wurde (Cox & Baltz, 1984; Kakinuma et al., 1990; Lomovskaya et al., 1980; Roberts, 1983). Aus diesem Grund wurde mit den Vektoren pIJ702 und pWHM3BE, sowie pJOE2448 und pJOE2577 eine *in vitro*-Methylierung mit zelleigenen Methyltransferasen und kommerziell erhältlichen Methylasen durchgeführt (s. 2.9.5.). Allerdings konnten auch mit dieser Methode keine Transformanten erhalten werden. Eine Alternative zur *in vitro*-Methylierung der eingebrachten Plasmid-DNA war die Isolierung dieser aus methylierungsdefekten Stämmen. Jedoch stand kein methylierungsdefekter *Streptomyces*-Stamm, sondern nur die methylierungsdefekten *E. coli*-Stämme JM110 und SCS110 zur Verfügung, so daß nur das Plasmid pWHM3BE bzw. die Transposonvektoren pJOE2448 und pJOE2577, isoliert aus diesen *E. coli*-Defektmutanten, für die Transformation von *S. griseus* 1D und 1D-L-M1 eingesetzt werden konnten. Erwartungsgemäß wurde auch diese unmethylierte DNA nicht aufgenommen. Eine Hitzebehandlung der Protoplasten, die eine Attenuation des Restriktions-/Modifikationssystems bewirkt (Baily & Winstanley, 1986; Engel, 1987; Kakinuma et al., 1990; Kakinuma et al., 1991), war ebenfalls ohne Erfolg.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Protoplastierungs- und Transformationsversuche von *S. griseus* 1D, 1D-L⁻M1, *S. coelicolor* 1A und 1A-L⁻M1.

| Stamm | Protoplastierung | Transformation | |
|---|------------------|-------------------|---------------------|
| | | Aufnahme | |
| | | methylierter pDNA | unmethylierter pDNA |
| <i>S. lividans</i> (Kontrolle) | + | + | + |
| <i>S. griseus</i> 1D | + | - | - |
| <i>S. griseus</i> 1D-L ⁻ M1 | + | - | - |
| <i>S. coelicolor</i> 1A | - | ? | ? |
| <i>S. coelicolor</i> 1A-L ⁻ M1 | - | ? | ? |

+ , Protoplastierung/Transformation erfolgreich; - , Protoplastierung/Transformation nicht erfolgreich; ? , unbekannt, ob Transformation möglich, da keine Protoplastierung erreicht

Eine weitere Möglichkeit Plasmid-DNA in Streptomyceten zu übertragen, ist die Konjugation. Dazu wurde der Vektor pPM803 verwendet (Mazodier et al., 1989). pPM803 ist ein 10,5 kb-großes Plasmid, das neben dem origin of transfer (*oriT*) des IncP-Plasmids RK2, der für eine konjugative Übertragung unerlässlich ist, über eine Neomycin-Resistenz, die eine Selektion sowohl in Gram-negativen wie auch in Gram-positiven Bakterien erlaubt, sowie über eine Thiostrepton-Resistenz verfügt. Außerdem besitzt der Vektor den Replikationsursprung (*oriR*) des Streptomyceten-Plasmids pIJ101. Um einen konjugativen Transfer beider Vektoren zu erreichen, mußten die *tra*-Gene des RP4-Plasmids in *trans* zur Verfügung stehen. Dazu wurde der Vektor in *E. coli* S17-1 transformiert, der eine chromosomale Integration dieses Plasmides besitzt und somit die *tra*-Funktionen bereitstellt.

Die Konjugation zwischen *E. coli* S17-1, der das entsprechende Plasmid enthielt, und dem Rezipienten wurde als spot-mating wie unter 2.10.9. beschrieben, durchgeführt. Nachdem der Donor durch sanftes Waschen mit LB-Medium entfernt worden war, wurden die Platten getrocknet und mit 1 ml LB-Medium mit 100 µg Neomycin und 200 µg Nalidixinsäure überschichtet. Nalidixinsäure unterbindet die DNA-Synthese in *E. coli*, die für einen konjugativen Transfer essentiell ist, so daß aufgrund einer natürlichen Resistenz der Streptomyceten eine Selektion gegen den sensitiven Donor möglich ist.

Während ein konjugativer Transfer von Plasmid-DNA von *E. coli* nach *S. lividans* erzielt werden konnte, wurden für *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A keine transkonjuganten Kolonien gebildet, so daß die Vermutung nahe liegt, daß

S. griseus 1D-L-M1 und *S. coelicolor* 1A-L-M1 zumindest unter den getesteten Bedingungen nicht zur Konjugation befähigt sind.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Klonierung der für den NR-Abbau codierenden Strukturgene, wurden zur Identifizierung der NR-abbauenden Aktivität in *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A weitere Untersuchungen auf proteinbiochemischer Ebene durchgeführt.

3.1.4. Proteinbiochemische Untersuchungen zum Wachstum von *S. griseus* 1D, dessen Mutanten und *S. coelicolor* 1A und dessen Mutanten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Um auf proteinbiochemischer Ebene Aussagen über das für den NR-Abbau verantwortliche Enzym oder Enzymsystem machen zu können, wurden sowohl die Wildtyp-Stämme als auch die durch UV-Mutagenese erzeugten Negativ- und Gewinnmutanten in Flüssigkultur auf NR angezogen. Dazu wurden die Stämme in Schlegel-Mineralmedium (s. 2.2.2.) mit 0,2 % (w/v) NR wie unter 2.5. beschrieben, angezogen. Nachdem die anfänglich durch den NR verursachte Trübung der Kultur abgenommen und die Streptomyceten gut angewachsen waren, wurden die Kulturen geerntet, der Überstand sterilfiltriert, gegebenenfalls durch Ammoniumsulfatfällung [90 % (w/v)] oder Ultrafiltration auf 1/100 des Ausgangsvolumens eingengt und bei 4°C gelagert. Der Kulturüberstand wurde zunächst einem Aktivitätstest (Tropftest) auf NR-Agarplatten unterzogen, welcher jedoch stets, auch nach verlängerter Inkubationszeit (bis zu 1 Woche) bei 30°C, negativ ausfiel. Auch der Zusatz von verschiedenen Metallionen (Mn, Fe, Cu, Zn, etc.), die typischerweise für die Aktivität von Oxygenasen notwendig sind (Harayama et al., 1992; Maeng et al., 1996), hatte keinerlei Effekt. Allerdings konnte oftmals auch für Dioxygenasen aus anderen Organismen, bedingt durch die Instabilität dieser Enzyme, keine Aktivität gemessen werden (Bloch & Hayaishi, 1966; Hayaishi, 1962; Schwartz et al., 1997).

Daher wurden Aliquots der eingengten Kulturüberstände auf ein 10 %iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Referenz wurden Proben der Überstände von Kulturen, die auf 0,5 % (w/v) Glucose bzw. auf 0,5 % (w/v) Glucose + 0,2 % (w/v) NR gewachsen waren, mitgeführt. Durch Vergleich des Proteinbandenmusters zwischen Glucose- und/oder NR-gewachsenen Kulturen sowie zwischen Wildtyp und Mutanten sollte ein potentielles Protein identifiziert werden, daß spezifisch beim Wachstum auf

NR gebildet wird und somit am NR-Abbau beteiligt sein dürfte. Wie in Abb. 6 dargestellt, zeigte sich jedoch, daß das extrazelluläre Proteinmuster aller drei Stämme (Gewinnmutante 1D-L⁺-M1, Wildtyp 1D und Negativmutante 1D-L⁻-M1) im Wesentlichen übereinstimmte. Es konnte trotz zahlreicher Experimente kein Protein entdeckt werden, daß beim Wachstum auf Glucose nicht vorhanden, hingegen beim Wachstum auf NR bzw. Glucose + NR exprimiert wurde. Die Negativmutante *S. griseus* 1D-L⁻-M1 konnte auf NR als einziger Kohlenstoffquelle kaum wachsen, so daß dementsprechend wenig extrazelluläres Protein gebildet wurde, was die Aussage zusätzlich erschwerte. Zu beobachten war jedoch, daß das Bandenmuster im SDS-PAGE, obwohl die Kulturen immer gleich behandelt wurden, variierte. Dieses legte die Vermutung nahe, daß das gesuchte Enzym unter den Versuchsbedingungen nicht stabil war, so daß es spontan zerfiel und somit auch keine Aktivität meßbar war.

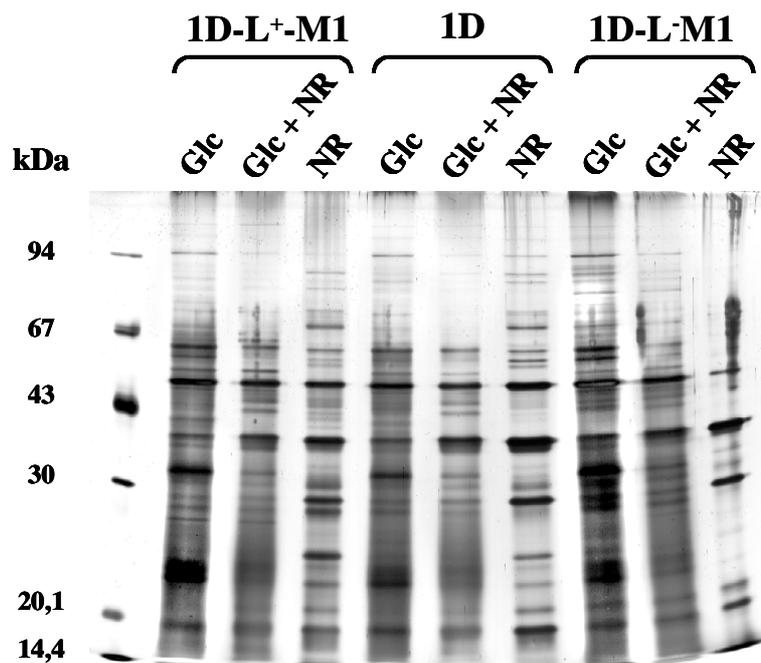


Abb. 6: 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel von durch Ultrafiltration aufkonzentrierten Kulturüberständen von *S. griseus* 1D-L⁺-M1, *S. griseus* 1D und *S. griseus* 1D-L⁻-M1, die in Schlegel-Mineralmedium mit 0,5 % (w/v) Glucose, 0,5 % (w/v) Glucose + 0,2 % (w/v) NR oder 0,2 % (w/v) NR als Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Pro Spur wurden etwa 2,3 µg Protein aufgetragen, die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Durch Vergleich des Proteinbandenmusters zwischen Wildtyp und Mutanten sowie zwischen Glucose und/oder NR-gewachsenen Kulturen, konnte kein spezifisch beim Wachstum auf NR exprimiertes Protein identifiziert werden.

Da im Elektronenmikroskop ein direkter Kontakt zwischen Myzel und Latex gezeigt werden konnte, wurde die Möglichkeit eines zell- bzw. membrangebundenen Proteins nicht ausgeschlossen. Daher wurde das Zellpellet verschiedenen Extraktionen unterzogen (mit Ethanol, Propanol, Butanol oder Detergenzien) oder auch zur Ablösung der Proteine mit Ultraschall behandelt. Der zellfreie Überstand wurde anschließend eingedampft und der Rückstand in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert. Dieses Extrakt wurde ebenfalls einem Aktivitätstest (Tropftest) auf NR-Agarplatten unterzogen. Doch dieser Test war, wie schon für den zellfreien Überstand, in allen Fällen negativ und auch der Zusatz von verschiedenen Metallionen (Mn, Fe, Cu, Zn, etc.) hatte keinen positiven Einfluß. So wurden die Zellextrakte auf ein 10 %iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und untereinander verglichen (Abb. 7). Aufgrund der z.T. recht zahlreichen Proteinbanden konnte auch in den Zellextrakten kein am NR-Abbau beteiligtes Enzym identifiziert werden.

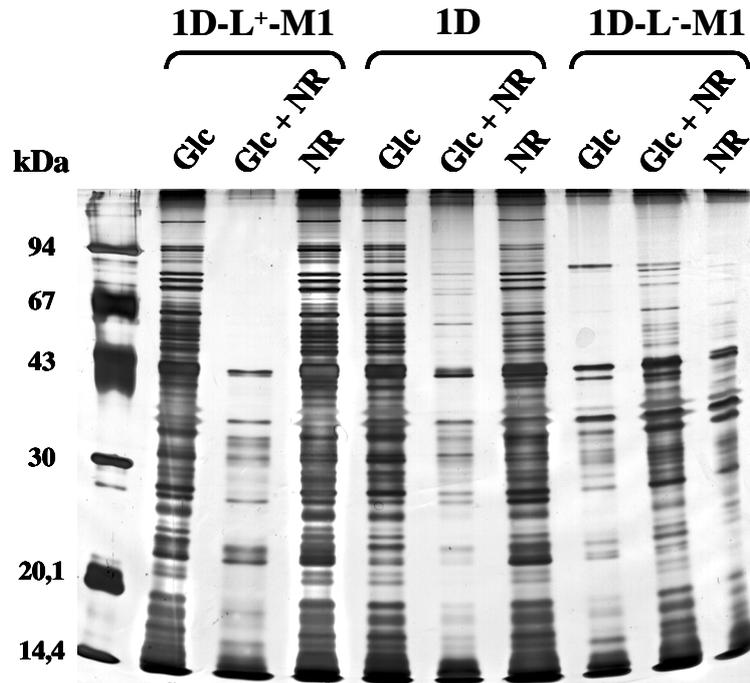


Abb. 7: 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel von mit Detergenz behandelten Zellextrakten von *S. griseus* 1D-L⁺-M1, *S. griseus* 1D und *S. griseus* 1D-L⁻-M1, die in Schlegel-Mineralmedium mit 0,5 % (w/v) Glucose, 0,5 % (w/v) Glucose + 0,2 % (w/v) NR oder 0,2 % (w/v) NR als Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Pro Spur wurden etwa 2,1 µg Protein aufgetragen, die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Durch Vergleich des Proteinbandenmusters zwischen Wildtyp und Mutanten sowie zwischen Glucose und/oder NR-gewachsenen Kulturen, konnte kein spezifisch beim Wachstum auf NR exprimiertes Protein identifiziert werden.

Die bislang erläuterten Experimente wurden analog auch für *S. coelicolor* 1A und deren Mutanten *S. coelicolor* 1A-L⁺-M1 und *S. coelicolor* 1A-L⁻-M1 durchgeführt und erbrachten vergleichbare Ergebnisse, so daß im Detail nicht weiter darauf eingegangen wird.

3.2. NR-Abbau durch *Xanthomonas* sp. 35Y

3.2.1. Taxonomische Einordnung des als *Xanthomonas* sp. 35Y beschriebenen Stammes

Die taxonomische Klassifizierung des bis dahin einzig bekannten Gram-negativen NR-abbauenden Bakteriums *Xanthomonas* sp. 35Y durch Tsuchii & Takeda, 1990 erfolgte aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale. So wurde es als ein Gram-negatives, 0,6 x 3-5 µm großes, strikt aerobes Stäbchen mit 1-2 polaren Geißeln, das ein wasserunlösliches gelbes Pigment bildet, beschrieben. Im Vergleich für die in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology für Xanthomonaden charakteristische Zellgröße von 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm war das Bakterium doch recht groß. Daher wurde zunächst eine genauere taxonomische Beschreibung des Organismus anhand morphologischer, wie auch physiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen durchgeführt.

3.2.1.1. Taxonomische Einordnung des Stammes aufgrund morphologischer, physiologischer und biochemischer Merkmale

Mittels physiologischer Tests, sowie makroskopischer, mikroskopischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde zunächst eine Charakterisierung des Organismus und ein Vergleich zu den in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology für Xanthomonaden charakteristischen Merkmalen vorgenommen (s. auch Tabelle 6). Zell- und Koloniegröße sowie Pigmentbildung von *Xanthomonas* sp. 35Y waren stark mediumabhängig. Während die Zellen beim Wachstum auf NB-Medium 0,4-0,6 x 1,9-2,8 µm groß waren, betrug die Zellgröße bei Wachstum auf Mineralmedium mit einer verwertbaren Kohlenstoffquelle 0,2-0,47 x 1,7-3,0 µm. Auf NB-Agar (oder Kings B-Medium) bildete *Xanthomonas* sp. 35Y gelbe, leicht glänzende Kolonien, die etwas erhaben waren, aber keinen ausgefransten Rand besaßen und im Gegensatz zu *Xanthomonas*-Kolonien nicht weich und schleimig waren. Auf Mineralmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen war die Koloniemorphologie vergleichbar, jedoch waren die Kolonien etwa 1/3 kleiner. Auch die Pigmentierung von *Xanthomonas* sp. 35Y war auf NB- oder Kings B-Medium wesentlich stärker ausgeprägt als auf Mineralmedium mit einer geeigneten Kohlenstoffquelle. Eine Gram-Färbung, sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten den bereits von (Tsuchii & Takeda, 1990) bestimmten Gram-negativen Zellwandtyp (Abb. 8). Genau wie *Xanthomonas*-Stämme waren die Stäbchen-förmigen Zellen durch 1-2 polare

Geißeln beweglich, verfügten jedoch im Gegensatz zu Xanthomonaden zusätzlich noch über einen polaren Fimbrien-/Pilischopf (Abb. 9b). Sporen, Kapseln, Zellverzweigungen oder PHB-Einschlüsse (Abb. 8 und 9) konnten nicht nachgewiesen werden.

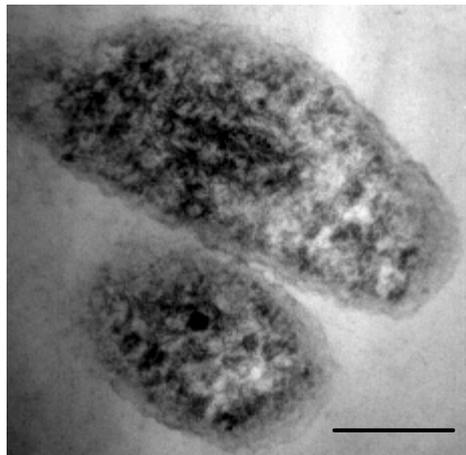
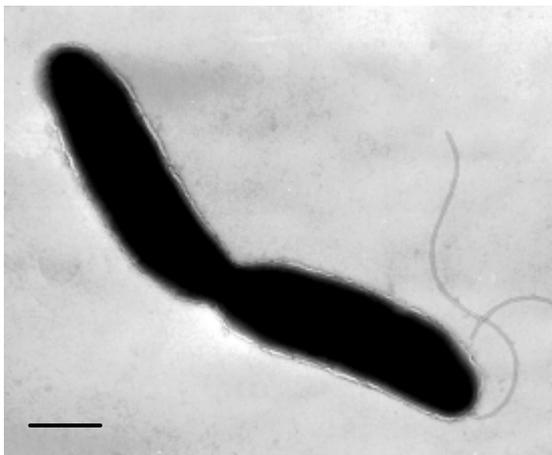


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes von *Xanthomonas* sp. 35Y, die den Gram-negativen Zellwandtyp, sowie das Fehlen von Einschlusskörpern verdeutlicht. Der Balken entspricht 0,25 μm .

a.



b.

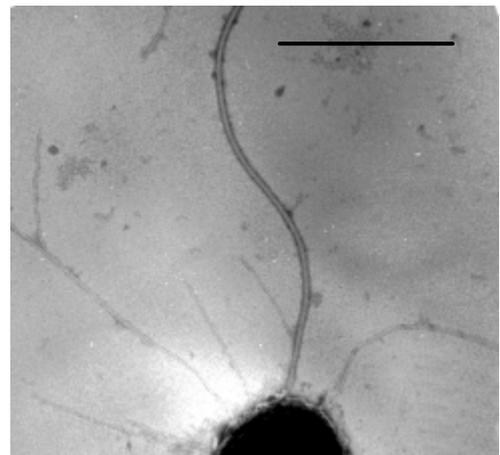


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit Phosphorwolframsäure negativkontrastierten Präparaten von *Xanthomonas* sp. 35Y, die die Zellform und -größe, sowie die polare Begeißelung und den Fimbrien- bzw. Pilischopf zeigen. Die Balken entsprechen jeweils 0,5 μm .

Zu den weiteren Gemeinsamkeiten von *Xanthomonas* sp. 35Y und der Gattung *Xanthomonas* zählen die aerobe und strikt respiratorische Energiegewinnung, sowie das Ausbleiben von Denitrifikation oder Nitratreduktion. Außerdem wurde wie in Xanthomonaden keine Indolbildung aus Tryptophan, Glucose-Fermentation oder Gasbildung aus Glucose beobachtet. Auch das Wachstum von *Xanthomonas* sp. 35Y konnte durch Zugabe von 0,1 % (w/v) 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid gehemmt werden, wie es bei Xanthomonaden der Fall ist. Eine Fettsäureanalytik, durchgeführt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, ergab, daß *Xanthomonas* sp. 35Y das typische iso/anteiso-Fettsäuremuster kombiniert mit 2- und 3-Hydroxy-Fettsäuren aufwies, wie es für Spezies der Gattung *Xanthomonas* diagnostisch ist. Jedoch konnte der Organismus keiner *Xanthomonas*-Spezies zugeordnet werden, da zu den Datenbankeinträgen der Xanthomonaden signifikante quantitative Unterschiede bestanden. Weiterhin zeigte *Xanthomonas* sp. 35Y im Gegensatz zur Gattung *Xanthomonas* eine negative Katalase- und positive Oxidase-Reaktion. Im Vergleich zu Xanthomonaden, die bei Temperaturen von 25-39°C wachsen, war *Xanthomonas* sp. 35Y in der Lage auch noch bei 41°C zu wachsen, jedoch nicht mehr bei 4°C und 45°C. Ein ebenfalls deutlicher Unterschied konnte beim G+C-Gehalt von *Xanthomonas* sp. 35Y festgestellt werden. Während der G+C-Gehalt von Xanthomonaden zwischen 63 und 71 mol% liegt, besitzt *Xanthomonas* sp. 35Y nur $60,94 \pm 0,4$ mol% G+C.

Tabelle 6: Vergleich der phänotypischen und physiologischen Charakteristika von *Xanthomonas* sp. 35Y und der Gattung *Xanthomonas* nach (Holt et al., 1994).

| Charakteristika | <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | <i>Xanthomonas</i> |
|--|----------------------------|----------------------|
| Zellgröße | 0,2-0,6 x 1,7-3,0 µm | 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm |
| Gram-Färbung | - | - |
| Katalase | - | + |
| Oxidase | + | - oder (+) |
| Sporenbildung | - | - |
| Kapselbildung | - | - |
| Verzweigung | - | - |
| PHB-Einschlüsse | - | - |
| Beweglichkeit | + | + |
| Geißelung | 1 polare Geißel | 1-2 polare Geißeln |
| Fimbrien/Pili | + | - |
| Pigmentbildung auf Kings B-Medium | + | + |
| Schleimiges Wachstum auf zuckerhaltigen Medien | - | + |
| Wachstum bei: | | |
| 4°C | - | - |
| 25°C | + | + |
| 30°C | + | + |
| 37°C | + | + |
| 41°C | + | - |
| 45°C | - | - |
| Wachstum auf: | | |
| 0,8 % NaCl | + | + |
| 3 % NaCl | + | + |
| 5 % NaCl | - | - |
| 7 % NaCl | - | - |
| Respiration | strikt aerob | strikt aerob |
| Indolbildung | - | - |
| Glucose-Fermentation | - | - |
| Gasbildung aus Glucose | - | - |
| Nitratreduktion | - | - |
| Denitrifikation | - | - |
| Inhibition durch 0,1 % (w/v) 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid | + | + |
| G + C-Gehalt (mol%) | 60,94 ± 0,4 | 63-71 |

+ , positiv ; (+) , schwach positiv; - , negativ

Nachdem nun gravierende morphologische und physiologische Unterschiede von *Xanthomonas* sp. 35Y zu anderen *Xanthomonas*-Spezies festgestellt worden waren, sollte anhand des Substratspektrums eine Klassifizierung vorgenommen werden. Dazu

wurden sowohl GN2 MicroPlates zur Identifizierung Gram-negativer Bakterien der Firma Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel verwendet, als auch, wie unter 2.2. beschrieben, hergestellte Medien. *Xanthomonas* sp. 35Y und zum Vergleich der Typ-Spezies der Gattung *Xanthomonas*, *X. campestris* pv. *campestris*, wurden auf NB-Medium angezogen, die Zellen abzentrifugiert und mit steriler Saline auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Jeweils 150 µl dieser Zellsuspensionen wurden in eine Vertiefung der GN2 MicroPlate gegeben. Alternativ wurde von dieser Zellsuspension auf die hergestellten Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation sowohl der MicroPlates als auch der Agarplatten erfolgte bei 30°C. Eine Verwertung der angebotenen Kohlenstoffquelle wurde in den MicroPlates durch eine Farbreaktion angezeigt, wobei anhand der Intensität der Verfärbung zwischen positiver und schwach positiver Reaktion unterschieden wurde.

Parallel dazu wurden beide Stämme auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse bzw. zum Abbau verschiedener Polymere (s. 2.2.4.) und zur Säurebildung beim Wachstum auf verschiedenen Zuckern (s. 2.2.3.) getestet. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieser Substrattests dargestellt.

Tabelle 7: Vergleich der biochemischen Eigenschaften von *Xanthomonas* sp. 35Y und *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

| Test | <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> |
|-------------------------------|----------------------------|--|
| Verstoffwechslung von: | | |
| α -Cyclodextrin | + | - |
| Dextrin | + | + |
| Glycogen | - | + |
| Tween 40 | + | - |
| Tween 80 | + | (+) |
| N-Acetyl-D-galactosamin | + | - |
| N-Acetyl-D-glucosamin | + | (+) |
| Adonitol | - | - |
| L-Arabinose | + | - |
| D-Arabitol | - | - |
| Cellobiose | + | + |
| i-Erythritol | - | (+) |
| D-Fructose | + | + |
| L-Fucose | - | + |
| D-Galactose | + | - |
| Gentiobiose | + | + |
| α -D-Glucose | + | + |
| Gluconat | (+) | - |
| m-Inositol | - | - |
| α -D-Lactose | + | - |
| Lactulose | - | + |
| Maltose | + | + |
| D-Mannitol | - | - |
| D-Mannose | - | (+) |
| D-Melibiose | - | + |
| Melizitose | (+) | (+) |
| β -Methyl-D-glucosid | (+) | + |
| D-Psicose | - | + |
| D-Raffinose | - | + |
| D-Ribose | - | + |
| L-Rhamnose | + | (+) |
| D-Sorbitol | - | (+) |
| Sucrose | + | + |
| D-Trehalose | + | + |
| Turanose | + | (+) |
| D-Xylose | + | + |
| Xylitol | - | - |
| Methylpyruvat | + | + |
| Monomethylsuccinat | + | + |
| Essigsäure | - | (+) |
| <i>cis</i> -Aconitat | + | + |
| Citronensäure | + | (+) |
| Ameisensäure | + | - |

Fortsetzung Tabelle 7

| | | |
|------------------------------|-----|-----|
| D-Galactonsäurelacton | (+) | - |
| D-Galacturonsäure | + | - |
| D-Gluconsäure | + | - |
| D-Glucosaminsäure | - | - |
| D-Glucuronsäure | + | - |
| α -Hydroxybuttersäure | (+) | + |
| β -Hydroxybuttersäure | + | (+) |
| γ -Hydroxybuttersäure | - | - |
| p-Hydroxyphenyllessigsäure | (+) | (+) |
| Itaconsäure | - | (+) |
| α -Ketobuttersäure | + | + |
| α -Ketoglutarsäure | + | + |
| α -Ketovaleriansäure | - | + |
| D,L-Milchsäure | + | + |
| Malonsäure | + | + |
| Propionsäure | + | + |
| Chinasäure | + | - |
| D-Saccharinsäure | + | + |
| Sebacinsäure | + | + |
| Bernsteinsäure | + | + |
| Brombernsteinsäure | + | + |
| Bernsteinsäuremonoamid | + | + |
| Glucuronamid | + | - |
| Alaninamid | + | + |
| D-Alanin | + | + |
| L-Alanin | + | + |
| L-Alanylglycin | + | + |
| L-Asparagin | + | - |
| L-Asparaginsäure | + | + |
| L-Glutaminsäure | + | + |
| Glycyl-L-asparaginsäure | + | - |
| Glycyl-L-glutaminsäure | + | + |
| L-Histidin | + | - |
| Hydroxy-L-Prolin | + | + |
| L-Leucin | (+) | + |
| L-Ornithin | + | (+) |
| L-Phenylalanin | + | - |
| L-Prolin | + | + |
| L-Pyroglutaminsäure | + | (+) |
| D-Serin | - | - |
| L-Serin | + | + |
| L-Threonin | + | + |
| D,L-Carnithin | - | - |
| γ -Aminobuttersäure | + | - |
| Urocanat | + | - |
| Inosin | - | + |
| Uridin | - | + |

Fortsetzung Tabelle 7

| | | |
|---------------------------------|-----|-----|
| Thymidin | - | - |
| Phenylethylamin | - | - |
| Putrescin | - | - |
| 2-Aminoethanol | - | - |
| 2,3-Butandiol | - | - |
| Glycerin | + | - |
| D,L- α -Glycerinphosphat | - | - |
| Glucose-1-phosphat | - | + |
| Glucose-6-phosphat | - | (+) |
| Hexadecan* | + | - |
| Hexan/Octan* | + | - |
| Citronellol* | - | - |
| Farnesol* | - | - |
| Geraniol* | - | - |
| Isopren* | - | - |
| Squalen* | - | - |
| Hydrolyse/Abbau von: | | |
| Casein | (+) | + |
| Cellulose | - | - |
| Chitin | (+) | - |
| DPNR | + | - |
| Gelatine | - | - |
| NR | + | - |
| PHB | - | - |
| Stärke | (+) | + |
| Säurebildung aus: | | |
| L-Arabinose | - | + |
| D-Cellobiose | - | - |
| D-Galactose | - | - |
| D-Glucose | - | - |
| Lactose | - | - |
| Maltose | - | - |
| D-Mannose | - | - |
| meso-Inosit | - | - |
| Sucrose | - | - |
| D-Trehalose | - | - |

+, gute Verstoffwechslung, Hydrolyse/Abbau bzw. Säurebildung; (+), geringe Verstoffwechslung, Hydrolyse/Abbau bzw. Säurebildung; -, keine Verstoffwechslung, Hydrolyse/Abbau bzw. Säurebildung
 *, unterschiedliche Mengen (5 μ l, 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l) wurden auf ein steriles Filterpapier aufgetropft und in den Deckel einer Petrischale mit Schlegel-Mineralagar gelegt

Xanthomonas sp. 35Y war in der Lage 69 der 106 angebotenen Substrate zu verstoffwechseln und 5 der 8 verwendeten Polymere abzubauen. Dabei bestanden im Vergleich zum Typ-Species *X. campestris* pv. *campestris* die wesentlichen Unterschiede in der Fähigkeit zur Verstoffwechslung von α -Cyclodextrin, Tween 40, N-Acetyl-D-galactosamin, L-Arabinose, D-Galactose, D-Galactonsäurelacton, D-Galacturonsäure, D-Gluconsäure, D-Glucuronsäure, Chinasäure, Glucuronamid, L-Asparagin, Glycyl-L-asparaginsäure, L-Histidin, L-Phenylalanin, γ -Aminobuttersäure, Urocanat, Glycerin, Hexadecan und Hexan/Octan (1:1). Auch ein Abbau von Chitin, NR und DPNR fand nur durch *Xanthomonas* sp. 35Y statt.

Eine Auswertung der mittels GN2 MicroPlate erhaltenen Daten erfolgte durch das Computerprogramm MicroLog 1 System, das eine taxonomische Einordnung des untersuchten Organismus aufgrund von Gemeinsamkeiten im Substratspektrum zu anderen in der Datenbank vorhandenen Bakterien vornimmt. Die höchsten Gemeinsamkeiten ergaben sich zu *Sphingomonas paucimobilis* A, die jedoch mit 16 % weit unter der Signifikanzgrenze von 50 % lagen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß charakteristische Unterschiede zwischen *Xanthomonas* sp. 35Y und der Gattung *Xanthomonas* darin bestehen, daß *Xanthomonas* sp. 35Y wesentlich größer ist, über Fimbrien/Pili verfügt, Oxidase-positiv und Katalase-negativ ist, auf zuckerhaltigen Medien nicht schleimig wächst, Asparagin als einzige C- und N-Quelle verwerten kann und einen G+C-Gehalt von nur 61 mol% besitzt.

Somit konnte auch aufgrund des Substratspektrums keine Zuordnung von *Xanthomonas* sp. 35Y zur einer bestimmten Gattung Gram-negativer Organismen vorgenommen werden. Es bestanden jedoch erhebliche Zweifel daran, daß der als *Xanthomonas* sp. 35Y beschriebene Organismus der Gattung *Xanthomonas* angehört. Daher wurde das 16S-rRNA-Gen von *Xanthomonas* sp. 35Y amplifiziert und sequenziert, um dann auf 16S-rRNA-Ebene eine phylogenetische Einordnung treffen zu können.

3.2.1.2. Taxonomische Einordnung des Stammes aufgrund von 16S-rRNA-Sequenzdaten

Zur Amplifikation des 16S-rRNA-Gens aus chromosomaler DNA von *Xanthomonas* sp. 35Y mittels PCR wurden die Primer 16F27 und 16R1525 mit

folgender Sequenz verwendet:

| Primer | Sequenz | komplementär zu Position (<i>E. coli</i> 16S-rRNA-Gen- Sequenzbezeichnung) |
|---------|----------------------------------|---|
| 16F27 | 5`-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3` | 8-27 |
| 16R1525 | 5`-AAG GAG GTG WTC CAG CC-3` | 1525-1541 |

M = A, C ; W = A, T

Der PCR-Ansatz war, wie unter 2.11. beschrieben, zusammengesetzt. Die Amplifikation erfolgte mittels *Taq*-DNA-Polymerase in 30 Zyklen, wobei eine Annealingtemperatur von 47°C und eine Elongationszeit von 2 min gewählt wurden. Zur Vermeidung von Sequenzfehlern, die durch falschen Baseneinbau bei der Amplifikation mittels *Taq*-Polymerase entstehen können, wurden mehrere unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt. Das gebildete Amplifikat hatte eine Länge von etwa 1,7 kb. Zur Abtrennung der eingesetzten Template-DNA (chromosomale DNA) wurden die gepoolten PCR-Ansätze auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, das PCR-Produkt unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) aufgereinigt. Das gereinigte Fragment, das aufgrund der Amplifikation mittels *Taq*-DNA-Polymerase am 3`-Ende über einen Poly-A-Schwanz verfügte, wurde in den *EcoRV*-geschnittenen Vektor pBluescript KSII ligiert, der zuvor mit dTTP und *Taq*-DNA-Polymerase behandelt worden war, um ihn für eine TA-Klonierung vorzubereiten. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* XL1-blue transformiert. Aus den zahlreichen Transformanten wurden 12 willkürlich ausgewählt und mittels Plasmidpräparation und anschließendem *Xba*I- bzw. *Eco*RI/*Hind*III-Restriktionsverdau untersucht. Aus diesen 12 Klonen wurden 4 Klone, die in beiden Restriktionsverdaus Inserts aufwiesen, für die Präparation von Plasmid-DNA mittels QIASpin Mini Prep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) ausgewählt. Unter Verwendung der Primer T3 und T7 bzw. weiterer interner Primer (T3-1 bzw. T7-1) wurde das Insert der rekombinanten Plasmide, wie unter 2.12. beschrieben, doppelsträngig sequenziert. Die 16S-rRNA-Sequenz wurde aus den Sequenzdaten der 4 Klone gemittelt und ist in Abb. 10 in einem Alignment mit anderen 16S-rRNA-Gen-Sequenzen Gram-negativer Bakterien, die laut NCBI-Datenbankabgleich die nächsten Verwandten von *Xanthomonas* sp. 35Y sind, dargestellt. Außerdem wurde in das Alignment die 16S-rRNA-Gen-Sequenz des anderen, Gram-negativen NR-Abbauers *Pseudomonas aeruginosa* AL98 mit aufgenommen.

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  NNAACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTNAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCA
Pseudomonas sp.  -----AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCNTAACACATGCA
Xanthomonas sp.  -----AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCNTAACACATGCA
P.aeruginosa AL98 -----GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
Consensus          NNAACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCA
Homologie          ***** **

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  AGTCGAACCGGTAACAG-----GCCTTCGGGCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGT
Pseudomonas sp.  AGTCGAACCGGAAACGATGGAAGCTTGCTTCCAGGCGT---CGAGTGGCGGACGGGTGAGT
Xanthomonas sp.  AGTCGAGCGGTAGCAG-----GTGTAGCAATACATGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT
P.aeruginosa AL98 AGTCGAGCGGATGAAG--GGAGCTTGCTCCTGGATTCT----AGCGGCGGACGGGTGAGT
Consensus          AGTCGA2CGG2A2CAGTGG2AGCTTGC2TC2G2G2GCTGACGAG2GGCGGACGGGTGAGT
Homologie          ***** **

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  AACCGGTAGGAATCTGCC'NNGTAGTGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATACCGC
Pseudomonas sp.  AATACTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGGACAACCTCGAGGAAACTCGAGCTAATACCGC
Xanthomonas sp.  AACGCTTGGGAATCTGC-TGTTAGTGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATACCGC
P.aeruginosa AL98 AATGCCTAGGAATCTGCC'TGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGC
Consensus          AA2GCTTAGGAATCTGCC'TGTTAGTGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATACCGC
Homologie          ** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  ATACGCCCAA--GGGGGAAAGCGGGGCTCTTC--GGACCTCGCGCTATCAGATGAGCCTG
Pseudomonas sp.  ATACGCCCTACGGGGGAAAGCGGAGGATCTTTCGGGACTTCGCGCTATTGGATGAGCCTA
Xanthomonas sp.  ATACGCACTACGGTGGAAAGCCGGGGACCGCA--AGGCTGGCGCTAACAGATGAGCCCA
P.aeruginosa AL98 ATACGCTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC--GGACCTACGCTATCAGATGAGCCTA
Consensus          ATACGCCCTACGGGGGAAAGCGGGGATCTTTCGGGACTTCGCGCTATCAGATGAGCCTA
Homologie          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  CGTCCGATTAGCTNGTTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATCCGNAGCTNGTCT
Pseudomonas sp.  AGTCGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCT
Xanthomonas sp.  AGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCT
P.aeruginosa AL98 GGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCT
Consensus          AGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA2GGCC2ACCAAGGCGACGATCCGTA2CTGGTCT
Homologie          *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCNGNCTNNTACGGGAGGCAGCA
Pseudomonas sp.  GAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
Xanthomonas sp.  GAGAGGACGACAGTCACACCGGAACTGAGACACGGTCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCA
P.aeruginosa AL98 GAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
Consensus          GAGAGGA2GATCAG2CACACTGG2ACTGAGACACGG2CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
Homologie          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          370     380     390     400     410     420
          |      |      |      |      |      |
E. shaposhnikovi  GTGGGGAATATTGGAC-AATGGGCGCAAGCC-TNATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGA
Pseudomonas sp.  GTGGGGAATATTGGAC-AATGGGCGCAAGCC-TGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGA
Xanthomonas sp.  GTGGGGAATATTGGACCAATGGGGGAAAACCTGATCCAGCGACGCCGCGTGGGTGAAGA
P.aeruginosa AL98 GTGGGGAATATTGGAC-AATGGGCGAAAGCC-TGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGA
Consensus          GTGGGGAATATTGGACCAATGGGCG2AAGCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGA
Homologie          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

| | | | | | | |
|--------------------------|---|--------------------------------|---------------------------|----------|-------|-------------|
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | AGGCCTGCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTGGGAGGAAAAGCGGGCGCCTAATACGTGCT | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | AGGCCTGCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTAGAGAAGAAAAGCCTACGGTTAATACCCGTG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AGGCCTGCGGGTTGTAAAGCCCTTTTCGGTTGGGAAGAAAAGTTGCGACCTAACACGTCCG | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | AGGTCTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGC | | | | | |
| Consensus | AGGCCTGCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTTGGGA2GAAAAGC4G4C222TAATAC2TGCC | | | | | |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | TGACTTGACGTTACCCACAGAAGAAGCACC | GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCNCGGTAAT | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GGTCTTGACGTAACCTACAGAAGAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GACCTTGACGTAACCAACTAAAGAAGCACC | GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAAT | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | TGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACC | GGCTAACTTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT | | | | |
| Consensus | 2GTCTTGACGT2ACCAACAGAAGAAGCACC | GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT | | | | |
| Homologie | ***** ** * | ** * | * ** | ***** | ***** | ***** |
| | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | ACGGAGNGTGCNAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGTGGTTATGT | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | ACGGAGGGAGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGCTTTGT | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | ACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGCTTTGC | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | ACGAAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGCTTTGC | | | | | |
| Consensus | ACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGG2GG2TTTG2 | | | | | |
| Homologie | ** * * * | ***** | ***** | ***** | ***** | ** * * |
| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | CAGTCAGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGA | ACTGCATCTNATACTGCATGGCTAG | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | AAGTCGGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTGGA | ATTGCATTCGATACTGCATGGCTAG | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AAGCCGGATGTGAAATCCC | CGGCTTAACCTGGGA | ACTGCATTCGATACTGCATGGCTAG | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | AAGTTGGATGTGAAATCCC | CGGCTCAACCTGGGA | ACTGCATTCGATACTGCATGGCTAG | | | |
| Consensus | AAGTCGGATGTGAAA2CCC | CGGCTCAACCTGGGA | ACTGCATTCGATACTGCATGGCTAG | | | |
| Homologie | ** ***** | ** ***** | ***** | ***** | ***** | *** * ***** |
| | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | AGTTTGGTAGAGGAGAGTGGAAATTTCCGGTGTAGCGGTNAAATGCGTAGATATCGGAAGG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | ACTATGGTAGAAGGAAGTGGAAATTTCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGAAGG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AGTATGGGAGAGGGAAGTGGAAATTTCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGAAGG | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | AGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGAAGG | | | | | |
| Consensus | AGTATGGTAGAGGGAAGTGGAAATTTCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGAAGG | | | | | |
| Homologie | * * * * * | * | ***** | ***** | ***** | ***** |
| | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTNAAACTGACACTGAGGTGCNNAAGCGTGG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | AACACCAATGGCGAAGGCGACTTCTCTGGGCAATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AACATCAGTGGCGAAGGCGACTTCTCTGGACCAATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGG | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | AACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGG | | | | | |
| Consensus | AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTCTGGAC2AATACTGAC2CTGAGGTGCGAAAGCGTGG | | | | | |
| Homologie | **** * * | ***** | ***** | * | ***** | ** * ***** |
| | 790 | 809 | 810 | 820 | 830 | 840 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGA | ACTAGCCGTT | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACCATGAGA | ACTATATGTT | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCATAACCGATGAGA | ACTGATGTC | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGA | ACTAGCCGTT | | | | |
| Consensus | GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGA | ACTAG2GTT | | | | |
| Homologie | ***** | ***** | ***** | ** ***** | *** | ** * * |

| | | | | | | |
|--------------------------|---|------|------|------|------|------|
| | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | GGGAGGGTTTAACTCTTAGTGGCGCAGCAAACGCGTTAAGTTCTCNGCCTGGGGAGTAC | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GGGGGGTT--GCCCTCGGTGTCGCGAGCTAACGCGTTAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTAC | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GGGAGGGTCT-GCCTCTCGGTGTCGTAGCTAACGCGTTAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTAC | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | GGGATCCTT-GAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCCTGGGGAGTAC | | | | | |
| Consensus | GGGAGGGTTT22CCTCT22GTG2CGCAGCTAACGCGTTAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTAC | | | | | |
| Homologie | *** * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** | | | | | |
| | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | GGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCNGCACAAGCGGTGGAGCATGTG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GCCGGCAACGGTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG | | | | | |
| Consensus | GGCCGCAAGGTT2AAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG2CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG | | | | | |
| Homologie | * | | | | | |
| | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | GTTTAATTCGATGNAACGCGAAGAACCTTACCTGCCCTTGACATCCTCGGAATCCTGCAG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGCCCTTGACATGACAGAACTCCTGTAG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCTTGCATGCTAGGAATCCTGCAG | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | GTTTAATTCGAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTCCAG | | | | | |
| Consensus | GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG2CCTTGACATCCTC2GAATCCTGCAG | | | | | |
| Homologie | ***** * ***** ***** ***** * ***** ***** * * * * * | | | | | |
| | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | AGATGCGGGNGTGCCTTCGGGAACCGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | AGATACGGGAGTGC-TTCGGC--CTGGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AGATGTGGGAGTGCCTTCGGGAACCTGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | AGATGGATTGTCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT | | | | | |
| Consensus | AGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAAC2G2GAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT | | | | | |
| Homologie | **** | | | | | |
| | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAACA | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCA | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCA | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCA | | | | | |
| Consensus | GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCA | | | | | |
| Homologie | ***** ***** ***** ***** * ***** ***** * * * * * * * * * * | | | | | |
| | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | CTTTG-GGTGGGAACCTTAGGGNGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGA | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | CGTAATGGTGGGAACCTTAGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGACGA | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | TTCAG--TTGGGAACCTTAAGGGGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGA | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | CCTCG-GGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGA | | | | | |
| Consensus | CTTAGTGTTGGGAACCTTA2GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGA | | | | | |
| Homologie | **** | | | | | |
| | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 |
| <i>E. shaposhnikovii</i> | CGTCAAGTCATCATNNNCCTTATGGGCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCAGTACAG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | CGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGGGCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGAATACAG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | CGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCAGTACAA | | | | | |
| <i>P.aeruginosa</i> AL98 | CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAA | | | | | |
| Consensus | CGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGG2CAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCAGTACA2 | | | | | |
| Homologie | ***** ***** | | | | | |

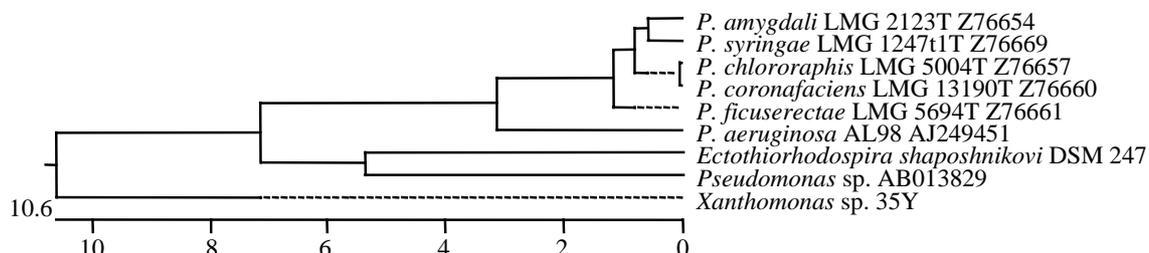
| | | | | | | |
|---------------------------|---|-------|---------|-------|-------|--------|
| | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | TGGGTTGCCAAGCNGCGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCTNGTCGTAGTCCGGATTGGA | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | AGGGCTGCCAACCAGCGATGGTGAGCTAATCCCTTAAAACCTCGTCGTAGTCCGGATCGGA | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AGGGTTGCCAACC CGCGAGGGGAGCCAATCCATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATCGCA | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> AL98 | AGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTCGTAGTCCGGATCGCA | | | | | |
| Consensus | AGGGTTGCCAA2CCGCGAGG2GGAGCTAATCCATAAAA2CTGGTCGTAGTCCGGATCG2A | | | | | |
| Homologie | *** ** | * ** | *** ** | *** * | ***** | ** |
| | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTTGCTGCG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAAT-GTCGCG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GTCTGCAACTCGGCTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGCGATGTCACG | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> AL98 | GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAT-GTCACG | | | | | |
| Consensus | GTCTGCAACTCGACT2CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG2GAATCAG2ATTGTC2CG | | | | | |
| Homologie | ***** | ** * | ***** | ***** | ***** | ** |
| | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | GTGAATACGTTCCCGGGCNTTGTACACACCCGCGTACACCATGGGAGTTGGCTGCACC | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGAAGTAGATTGCACC | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGATTGCACC | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> AL98 | GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTGCTCC | | | | | |
| Consensus | GTGAATACGTTCCCGGG2CTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTG2TTGCACC | | | | | |
| Homologie | ***** | ***** | ***** | ***** | *** * | *** ** |
| | 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | AGAAGTAGATAGTCTAACCTTCGGG-AGGACGTTTACCACGGT-GTGGTCAATGACTGGG | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | AGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACGGTAGTGGTTTATGACTGGG | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | AGAAGTAGGTAGCTTAACCGCAAGG-AGGGCGCTTACCACGGT-GTGGTCAATGACTGGG | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> AL98 | AGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGG-GGGACGTTTACCACGGA-GTGATTTCATGACTGGG | | | | | |
| Consensus | AGAAGTAGGTAG2CTAACCG22GGGAGG2CGCTTACCACGGTAGTGGT2AATGACTGGG | | | | | |
| Homologie | ***** ** | ***** | ** ** * | ***** | *** * | ***** |
| | 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 | |
| <i>E. shaposhnikovi</i> | G----- | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | GTGAAGTCCTAACAAGGTAACC----- | | | | | |
| <i>Xanthomonas</i> sp. | GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACGGGAACGTGCGGCTGGATCACCTCCTT--- | | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> AL98 | GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT | | | | | |
| Consensus | GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA2GGGAAC2TGC | | | | | |
| Homologie | * | | | | | |

Abb. 10: Alignment der 16S-rRNA-Gen-Sequenzen von *Xanthomonas* sp. 35Y, *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa* AL98 und *Ectothiorhodospira shaposhnikovi* erstellt mit dem Programm Network Protein Sequence @nalysis nach der Clustal W-Methode (Thompson et al., 1994). Die Angabe „2“ in der Consensus-Sequenz bedeutet, daß zwei der vier Basen an der betreffenden Stelle identisch sind; eine Homologie in allen vier Sequenzen wird durch einen „*“ symbolisiert.

Die Darstellung des phylogenetischen Stammbaums (Abb. 11a) sowie einer vergleichenden Tabelle über Ähnlichkeit bzw. Distanz der verschiedenen Stämme untereinander (Abb. 11b) machen deutlich, daß keiner der erwähnten Organismen ein naher Verwandter von *Xanthomonas* sp. 35Y ist. Die Identitäten in der 16S-rRNA-Sequenz betragen maximal 83,6 % zwischen *Xanthomonas* sp. 35Y und *P. amydali*. Auch 16S-rRNA-Gen-Sequenzabgleiche in nicht öffentlich zugänglichen Datenbanken (Prof. Dr. Amann, München) ergaben keine Ähnlichkeiten mit bislang bekannten und

identifizierten Organismen. Es konnte allerdings eine Zuordnung des Organismus zu der Untergruppe der γ -Proteobakterien vorgenommen werden.

a.



b.

| | | % Identität | | | | | | | | | | |
|-----------|---|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| Divergenz | 1 | ■ | 92.0 | 93.3 | 93.3 | 90.8 | 93.1 | 82.7 | 81.3 | 82.4 | 1 | <i>P. aeruginosa</i> AL98 AJ249451 |
| | 2 | 6.5 | ■ | 97.9 | 97.9 | 95.8 | 98.7 | 81.7 | 81.3 | 83.6 | 2 | <i>P. amygdali</i> LMG 2123T Z76654 |
| | 3 | 5.4 | 1.5 | ■ | 99.9 | 96.5 | 98.9 | 81.5 | 80.6 | 83.0 | 3 | <i>P. chlororaphis</i> LMG 5004T Z76657 |
| | 4 | 5.5 | 1.5 | 0.0 | ■ | 96.4 | 98.9 | 81.5 | 80.6 | 83.0 | 4 | <i>P. coronafaciens</i> LMG 13190T Z76660 |
| | 5 | 5.7 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | ■ | 96.8 | 80.0 | 79.2 | 81.5 | 5 | <i>P. ficuserectae</i> LMG 5694T Z76661 |
| | 6 | 5.4 | 1.1 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | ■ | 81.7 | 80.8 | 83.5 | 6 | <i>P. syringae</i> LMG 1247t1T Z76669 |
| | 7 | 13.2 | 12.3 | 12.1 | 12.1 | 12.1 | 12.2 | ■ | 81.9 | 82.2 | 7 | <i>Ectothiorhodospira shaposhnikovi</i> DSM 247 |
| | 8 | 15.6 | 14.6 | 15.0 | 15.0 | 15.4 | 15.2 | 10.7 | ■ | 81.6 | 8 | <i>Pseudomonas</i> sp. AB013829 |
| | 9 | 15.0 | 14.4 | 14.2 | 14.3 | 14.3 | 14.2 | 12.8 | 13.9 | ■ | 9 | <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |

Abb. 11: a. Phylogenetischer Stammbaum von *Xanthomonas* sp. 35Y und seinen gemäß Datenbankabgleich nächsten Verwandten, basierend auf den 16S-rDNA-Sequenzen. Die Länge der Verzweigungen repräsentiert die Divergenz zwischen zwei Sequenzen, die Zahlen bezeichnen die Anzahl der Substitutionsereignisse.

b. Ähnlichkeits- bzw. Distanztabelle von *Xanthomonas* sp. 35Y und seinen gemäß Datenbankabgleich nächsten Verwandten, basierend auf 16S-rDNA-Sequenzen. Mit 83,6 % besteht die höchste Identität von *Xanthomonas* sp. 35Y zu *P. amygdali*.

Da Bakterienstämme mit Identitäten in der 16S-rRNA-Gen-Sequenz von unter 97 % eine neue Bakteriengattung definieren (Stackebrandt & Goebel, 1994; Wayne et al., 1987), ist somit davon auszugehen, daß es sich bei *Xanthomonas* sp. 35Y nicht nur nicht um einen *Xanthomonas*-Spezies handelt, sondern daß der Organismus ein Vertreter einer bislang unbekanntes Gattung ist.

3.2.1.3. Identifizierung des Pigmentes von *Xanthomonas* sp. 35Y als ein Xanthomonadin-Derivat

Das auffälligste phänotypische Merkmal der Xanthomonaden ist die Bildung eines gelben Pigmentes, was auch Tsuchii & Takeda, 1990 dazu brachte, den Gram-negativen NR-Abbauer als *Xanthomonas*-Spezies zu klassifizieren. Bei den Pigmenten der Xanthomonaden handelt es sich um bromierte Aryl-Polyene, die auch als Xanthomonadine bezeichnet werden und ein Charakteristikum dieser Gattung sind (Andrewes et al., 1973; Andrewes et al., 1976; Chou et al., 1997; Starr et al., 1977; Starr & Stephens, 1964). Tatsächlich ist bislang kein Organismus bekannt, der nicht zur Gattung *Xanthomonas* gehört, jedoch Xanthomonadin produziert. Andere gelbe Aryl-Polyene, die jedoch kein Brom enthalten, sogenannte Carotenoide, sind unter den Mikroorganismen allerdings weit verbreitet (Jensen, 1965).

Zur genaueren Charakterisierung wurde daher das Pigment des Organismus näher untersucht. Das Pigment wird vorwiegend beim Wachstum auf Komplexmedien (NB, LB, Kings B) gebildet, während beim Wachstum von *Xanthomonas* sp. 35Y auf Mineralmedium mit einer verwertbaren Kohlenstoffquelle nur eine schwache Gelbfärbung der Kolonien auftritt. Daher wurden in NB-Medium gewachsene Zellen von *Xanthomonas* sp. 35Y einer Methanolextraktion unterzogen (s. 2.6.5.) und das Absorptionsspektrum des aus der Membran herausgelösten Pigmentes bestimmt. Als Referenzen wurden Kulturen von *X. campestris* pv. *campestris* und *X. campestris* pv. *malvacearum* analog angezogen und behandelt. Die Absorptionsspektren im Bereich von 300-550 nm der drei Stämme sind in Abb. 12 dargestellt. Überraschenderweise hatten die methanolischen Extrakte des Pigmentes aus *Xanthomonas* sp. 35Y sowie Xanthomonadine aus *X. campestris* pv. *campestris* und *X. campestris* pv. *malvacearum* übereinstimmende Absorptionsmaxima bei 440/441 nm. Das Pigment aus *Xanthomonas* sp. 35Y wies zudem noch Schultern bei 420 und 467 nm auf.

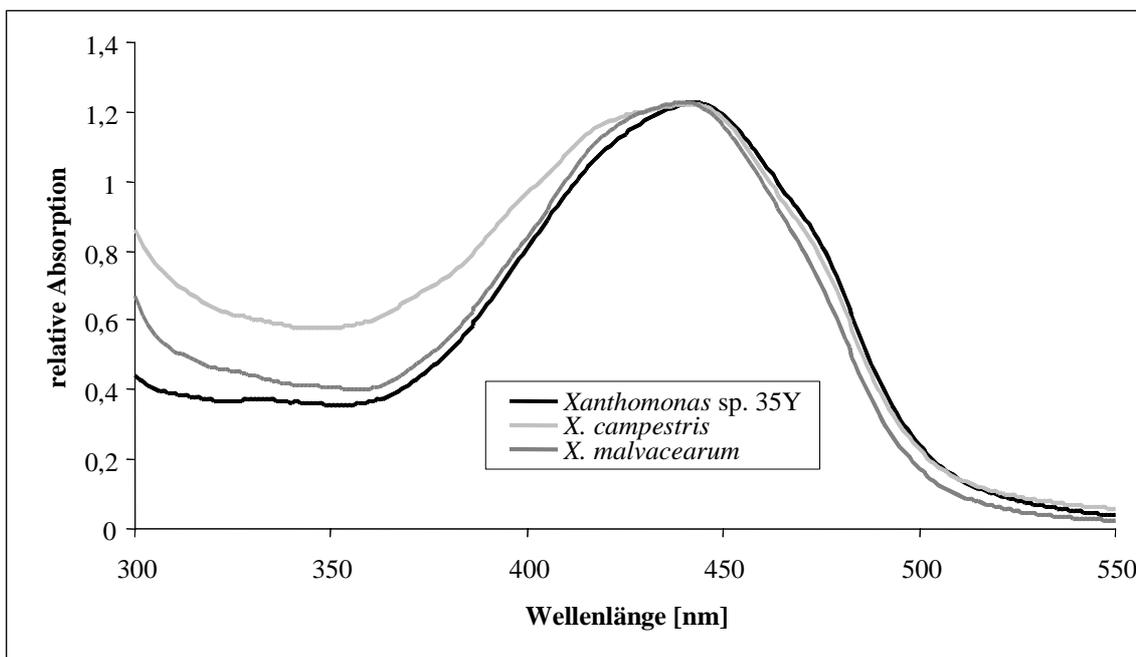


Abb. 12: Absorptionsspektren methanolischer Extrakte von *Xanthomonas* sp. 35Y, *X. campestris* pv. *campestris* und *X. campestris* pv. *malvacearum* im Bereich von 300-550 nm. Alle drei Stämme weisen ein absolutes Absorptionsmaximum bei 440/441 nm auf, was charakteristisch für Xanthomonadin-Derivate ist.

Nach dem Absorptionsverhalten der verschiedenen methanolischen Pigmentextrakte zu urteilen, handelt es sich somit bei dem gelben, von *Xanthomonas* sp. 35Y gebildeten Pigment zumindest um eine Xanthomonadin-ähnliche Substanz.

Um dieses zu bestätigen, wurde eine massenspektroskopische Analyse des nach Starr et al., 1977 aufgereinigten und derivatisierten Pigmentes von *Xanthomonas* sp. 35Y im Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Zeeck durchgeführt. Dazu wurden die Zellen von 10 x 1 l-NB-Kulturen von *Xanthomonas* sp. 35Y mit Aceton und Aceton/Methanol extrahiert, so daß die Lipid-Pigment-Komplexe herausgelöst wurden. Anschließend erfolgte eine Derivatisierung der Pigmente zum Isobutylester und eine Auftrennung der Extrakte auf einer Silica Kieselgel-Säule mit anschließender Massenspektrometrie.

Es ergab sich eine Summenformel von $C_{27}H_{28}Br_2O_3$ und ein Molekülpeak bei 560. Damit ist die Substanz um eine CH_2 -Gruppe ärmer und somit um 14 Masseneinheiten kleiner als Xanthomonadin I aus *X. juglandis* XJ103 ($C_{28}H_{30}Br_2O_3$) (Andrewes et al., 1976) (Abb. 13).

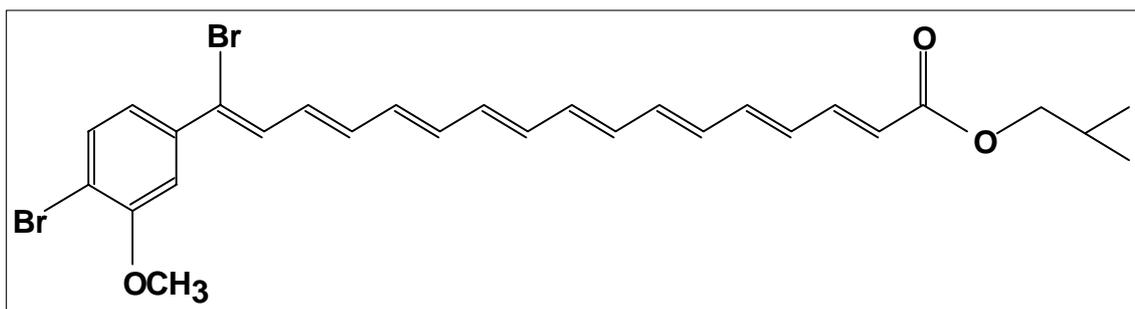


Abb. 13: Strukturformel des Isobutylesters von Xanthomonadin I aus *X. juglandis* XJ103 (Andrewes et al., 1976).

In Anlehnung an die Strukturformel von Xanthomonadin I könnte der Unterschied in der Substitution am Aromaten bestehen, d.h. das Pigment aus *Xanthomonas* sp. 35Y könnte statt der Methoxy- eine Hydroxylgruppe besitzen. Eine Bromierung der Substanz konnte aber aufgrund des Massenspektrums und der daraus abgeleiteten Summenformel zweifelsfrei nachgewiesen werden. Da Bromierungen in der Natur ziemlich selten sind und bislang außer den Vertretern der Gattung *Xanthomonas* ausschließlich marine Organismen isoliert wurden, die zur Brom-Fixierung und -Inkorporation befähigt sind (Andrewes et al., 1976), stellt der Brom-Nachweis im Pigment von *Xanthomonas* sp. 35Y doch eine Besonderheit dar.

Es wird somit davon ausgegangen, daß es sich bei dem gelben Pigment aus *Xanthomonas* sp. 35Y um ein Xanthomonadin-Derivat handelt.

3.2.1.4. Taxonomische Reklassifizierung von *Xanthomonas* sp. 35Y als *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Da anhand morphologischer, physiologischer wie auch genetischer Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß es sich bei *Xanthomonas* sp. 35Y nicht um einen Spezies der Gattung *Xanthomonas* handelt, jedoch ein gelbes, zumindest Xanthomonadin-ähnliches Pigment nachgewiesen werden konnte, wird der Organismus als der erste Vertreter einer neuen Gattung angesehen. Für diese Gattung wird aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung eines Xanthomonadin-ähnlichen Pigmentes die Bezeichnung *Pseudoxanthomonas* vorgeschlagen.

3.2.2. Charakterisierung von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y beim Wachstum auf NR

Beim Wachstum von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y auf NR-Agarplatten setzt nach etwa 2-3 Tagen Inkubationszeit bei 30°C eine Hofbildung um die Kolonien herum ein. Wie beim Wachstum des Organismus auf Mineralmedium mit einer verwertbaren Kohlenstoffquelle allgemein, ist nur eine schwache Gelbfärbung der Kolonien zu beobachten. In Mineralmedium-Flüssigkultur mit NR als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle setzt ebenfalls nach 2-3 Tagen eine deutliche Aufklärung des Mediums mit leichter Gelbfärbung, bedingt durch das Wachstum von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y, ein. Der Abbau von NR wird sowohl auf NR-Agarplatten als auch in Flüssigkultur durch gleichzeitige Zugabe einer anderen, wasserlöslichen Kohlenstoffquelle gehemmt.

3.2.3. Genetische Fixierung der NR-abbauenden Eigenschaften in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Um sicherzustellen, daß es sich auch beim NR-Abbau durch *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y um eine genetisch zugängliche Eigenschaft handelt, die auf einen (komplexen) Abbauweg schließen läßt, und nicht um eine unspezifische oder nicht-enzymatische Reaktion, verursacht durch gebildete Intermediate, wurde eine ungerichtete Mutagenese mittels UV-Licht durchgeführt. Sollte es sich bei der Fähigkeit NR abzubauen um eine spezifische Eigenschaft handeln, würde man Mutanten erwarten, die nach UV-Bestrahlung ein verändertes Abbauverhalten (verbesserter Abbau, verminderter Abbau, kein Abbau) zeigen, jedoch ansonsten ein normales, d.h. gegenüber dem Wildtyp unverändertes Wachstumsverhalten aufweisen.

3.2.3.1. Herstellung von Mutanten durch ungerichtete Mutagenese mittels UV-Licht

Für die UV-Mutagenese wurde *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in NB-Medium bei 30°C angezogen. Die UV-Mutagenese wurde wie unter 2.6.6. beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden nach 30 sec, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 min jeweils 2 x 0,5 ml Zellsuspension entnommen, zur Vermeidung lichtabhängiger Reparaturmechanismen dunkelgestellt und mit 0,9 % (w/v) NaCl bis 10^{-8} verdünnt. Jeweils 3 x 100 µl zwei verschiedener Verdünnungsstufen wurden auf NB-Platten ausplattiert und bis zur Kolonieentwicklung

bei 30°C inkubiert. Die angewachsenen Kolonien wurden ausgezählt, in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer eine Absterbekurve aufgenommen (Abb. 14) und die Absterberaten bestimmt.

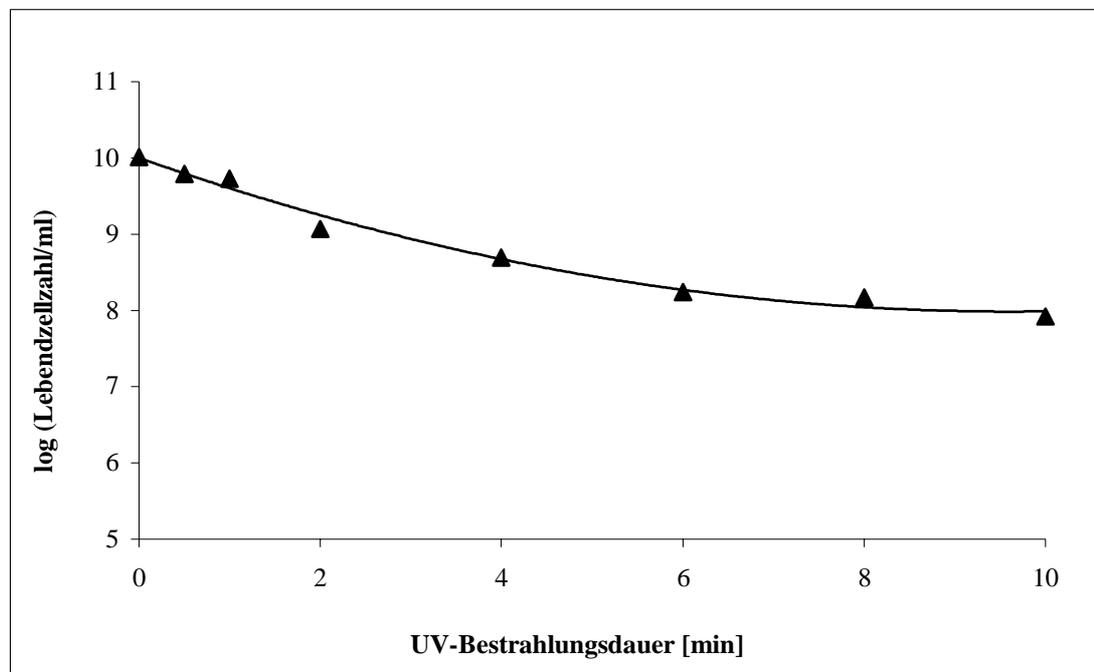


Abb. 14: Dosis-abhängige Absterbekurve von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y nach Bestrahlung mit UV-Licht

Im Vergleich zu den *Streptomyces*-Stämmen wurde tatsächlich schon nach etwa der Hälfte der Bestrahlungszeit (10 min) eine 99 %ige Absterberate erreicht. Zudem fand die UV-Bestrahlung und somit die Inaktivierung aus einem fast viermal größeren Abstand statt. Die Absterberate betrug $-0,70/\text{min}$ und lag somit, ungeachtet des größeren Bestrahlungsabstandes, 1,7- bzw. 3,7-fach höher als bei *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A.

3.2.3.2. Phänotyp der durch UV-Mutagenese erzeugten Mutanten von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Aus entsprechenden Verdünnungsstufen der Zeitpunkte, an denen 99 % aller Zellen abgetötet worden waren, d.h. nach 10 min, wurden mehrmals je 100 μl auf NR-Agarplatten ausplattiert und auf Mutanten gescreent, die ein verändertes Verhalten im NR-Abbau zeigten. So wurden 115 Kolonien getestet, von denen 2 Kolonien unfähig waren NR abzubauen; jedoch wurden keine Mutanten erhalten, die ein verbessertes

Abbauverhalten zeigten. Aufgrund der schlechten Haltbarkeit von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in Saline oder auch jedem anderen Puffer wurde nach Detektion der beiden Verlustmutanten auf keine weiteren Mutanten mehr gescreent. Die beiden erhaltenen Mutanten (A und B) wurden auf ihren Phänotyp auf anderen Polymeren wie Casein, Stärke und PHB getestet, um weitestgehend sicherstellen zu können, daß die Mutation spezifisch für den NR-Abbau ist. Da jedoch schon der Wildtyp von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y nicht in der Lage ist, Casein und PHB zu hydrolysieren, war es nicht verwunderlich, daß die Negativmutanten dies auch nicht konnten (Platten nicht abgebildet). So bildeten der Wildtyp und die zwei Mutanten lediglich beim Wachstum auf Stärke einen schwachen Hof (Abb. 15). Nach langer Inkubationszeit der Mutanten A und B auf NR (> 1 Monat) zeigte die Mutante A eine sehr schwache Hofbildung bzw. NR-Abbau in NR-Flüssigkultur. Die Mutante B hingegen war auch nach dieser langen Zeit nicht zur Hofbildung bzw. zum Wachstum und NR-Abbau in Flüssigkultur befähigt.

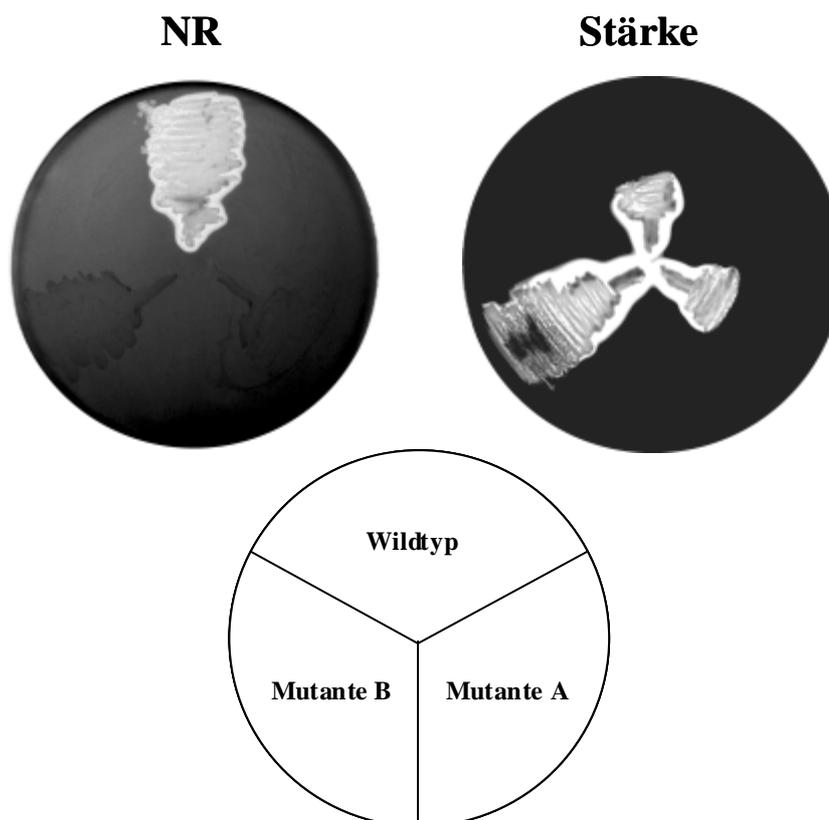


Abb. 15: Phänotyp von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y und dessen Mutanten A und B beim Wachstum auf NR- und Stärke-Agarplatten nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30°C. Beide Mutanten waren nicht mehr in der Lage NR abzubauen, konnten jedoch Stärke vergleichbar gut wie der Wildtyp verwerten.

3.2.4. Klonierung des Strukturgens der potentiellen Polyisopren-Dioxygenase aus *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

3.2.4.1. Überprüfung von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y auf das Vorkommen extrachromosomaler DNA-Strukturen

Komplexe Stoffwechselwege bzw. für den Organismus nicht-lebensnotwendige genetische Informationen werden häufig auf extrachromosomalen DNA-Strukturen wie Plasmiden codiert (Lengeler et al., 1999). Da auch *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y nicht auf den Abbau von NR angewiesen ist, sondern auch andere Kohlenstoffquellen verwerten kann, und zudem eine gewisse Instabilität der NR-abbauenden Fähigkeit nach wiederholter Kultivierung auf nicht-NR-haltigen Medien beobachtet wurde, wurde der Organismus auf das Vorkommen extrachromosomaler DNA-Strukturen hin untersucht. So wurde eine Plasmidpräparation durch alkalische Lysis (s. 2.7.4.2.), eine

Megaplasmidpräparation (s. 2.7.4.4.) und eine Isolierung intakter Gesamt-DNA (s. 2.7.4.5.), die eine Isolierung linearer Plasmide beinhaltet, durchgeführt. Bei allen Präparationen wurden Organismen, die bekanntermaßen entsprechende Plasmide enthielten (s. Tabelle 1), mitgeführt. Außerdem wurden für alle Isolierungen drei parallele Ansätze gefahren. In keinem Fall konnten aus *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y extrachromosomale DNA-Strukturen, d.h. Plasmide isoliert werden, während hingegen die mitgeführten Positivkontrollen stets auch positiv ausfielen. Somit wurde trotz der beobachteten Instabilität des NR-Abbaus, die durch den Verlust einer extrachromosomalen DNA-Struktur zu erklären gewesen wäre, davon ausgegangen, daß die Gene, die für den NR-Abbau verantwortlichen Enzyme codieren, bei *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y auf dem Chromosom lokalisiert sind.

3.2.4.2. Konstruktion einer Cosmid-Genbank von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in *E. coli* und Screening auf NR-Abbau

Für die Klonierung des Strukturgens der postulierten Polyisopren-Dioxygenase aus *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y wurde *E. coli* als heterologer Wirt ausgewählt, da die Klonierung in *E. coli* etabliert ist und ausreichend unterschiedliche Vektoren zur Verfügung stehen. Außerdem handelt es sich bei beiden Organismen um Gram-negative Bakterien, so daß auch die heterologe Expression und Sekretion des gebildeten Proteins möglich sein sollte. Da jedoch davon auszugehen war, daß es sich bei dem NR-Abbau um einen komplexen Abbauweg handelt, dessen Strukturgene möglicherweise geclustert vorliegen, wurde der Cosmidvektor pWE15 verwendet, der eine Klonierung großer Inserts ermöglicht. Es handelt sich dabei um ein 8,1 kb großes Cosmid, das neben einer Ampicillin- und einer Neomycinresistenz über die für Cosmidvektoren charakteristischen konkatemeren Sequenzen des Phagen λ (cos-sites) verfügt. Diese Sequenzabschnitte ermöglichen die Verpackung der zwischen 38 und 51 kb großen rekombinanten Cosmide durch *in vitro*-Phagen-Verpackungssysteme.

Hochmolekulare, genomische DNA von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y wurde mit *Bam*HI partiell verdaut, so daß Fragmente von etwa 30-45 kb entstanden. Diese wurden mit dem *Bam*HI-verdautem und dephosphorylierten Cosmid-Vektor pWE15 ligiert und nach *in vitro*-Verpackung in *E. coli* EB304 transduziert. Es wurden ca. 14.000 rekombinante Klone erhalten, die nach Clarke & Carbon, 1976 mit mehr als 99,99 %iger Wahrscheinlichkeit das Genom von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

repräsentierten. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die Genomgröße von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y etwa 2-5 Mb beträgt. Alle 14.000 Klone wurden auf ihre Fähigkeit zur Hofbildung auf NR-Agarplatten untersucht, jedoch konnte kein positiver Klon identifiziert werden. Dieses konnte vielfältige Ursachen haben, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird.

3.2.4.3. Komplementation der NR-Negativmutanten A und B durch eine Genbank in einem broad-host-range-Vektor

Für die Klonierung von Genen komplexer Stoffwechselwege ist die Verwendung von Negativ-Mutanten als Klonierungswirte sehr effizient, da Klone, die das gesuchte Gen enthalten und exprimieren, zum Wildphänotyp komplementieren und durch Selektion detektiert werden können (Clarke & Carbon, 1976). Außerdem ist sichergestellt, daß aufgrund des identischen genetischen Backgrounds die klonierten Gene exprimiert und, wie im Fall von Exoproteinen auch sekretiert werden können.

Nachdem nun mit den NR-Negativmutanten A und B von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y homologe Klonierungswirte zur Verfügung standen, die somit auch den gleichen genetischen Hintergrund aufwiesen, wurde versucht, die NR-Negativmutanten durch verschiedene DNA-Übertragungsmechanismen zu komplementieren. Dazu wurden verschiedene Vektoren ausgesucht (s. Tabelle 8), die sich sowohl in *E. coli* als auch in den *Pseudoxanthomonas*-Negativmutanten replizierten und stabil erhalten blieben. Außerdem sollte die stabile Replikation eines Cosmid-Vektors in den Mutanten erreicht werden, da dann die Anzahl an Klonen, die das gesamte Genom von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y repräsentieren, aufgrund der Insertgröße auf einige Hundert beschränkt wäre. Zunächst mußte jedoch erst eine geeignete Methode zur Übertragung der Plasmid-DNA in sowohl den Wildtyp als auch die Negativmutanten gefunden werden. Dieses sollte mittels Konjugation und/oder Elektroporation erreicht werden.

Konjugationen mit den mobilisierbaren broad-host-range-Plasmiden pBBR1MCS-2 und pBBR1MCS-3, die sich im wesentlichen nur in ihrer Antibiotika-Resistenz unterschieden (Km^R bzw. Tc^R), sowie mit dem mobilisierbaren broad-host-range-Cosmid pLAFR3, das für eine Tetracyclin-Resistenz codiert, wurden wie unter 2.10.9. beschrieben, durchgeführt. Alle Vektoren wurden bereits erfolgreich für die Konjugation unterschiedlicher Gram-negativer Bakterien eingesetzt (Kovach et al.,

1995; Staskawicz et al., 1987). Trotz einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden für pBBR1MCS-3 und pLAFR3 keine Transkonjuganten erhalten. Alle Konjugationen mit pBBR1MCS-2 bildeten sehr viele pin-point-Kolonien, die auch nach verlängerter Inkubationsdauer nicht weiter anwuchsen. Nach wiederholtem Ausstreichen dieser Kolonien auf NB-Platten mit Kanamycin wuchsen die potentiellen Transkonjuganten nicht wieder an. Auch mittels Plasmidpräparation konnten keine Plasmide nachgewiesen werden. Somit wurde davon ausgegangen, daß eine konjugative Übertragung von Plasmid-DNA in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y bzw. dessen NR-Negativmutanten unter den gewählten Bedingungen nicht möglich ist.

Für eine DNA-Übertragung mittels Elektroporation wurden die Zellen der *Pseudoxanthomonas*-Mutanten A und B nach einem modifizierten Protokoll von Johann, 1998 für die Elektroporation vorbereitet. Um eine Funkenbildung und eine damit häufig verbundene Lyse der Zellen bei der Elektroporation zu vermeiden, wurden die in NB angezogenen Zellen zur Entfernung von Salzen in Puffer und anschließend in 10 % (w/v) Glycerin wie unter 2.10.3.2. beschrieben, gewaschen. Die elektrokompenten Zellen wurden nach dem Auftauen auf Eis mit maximal 5 µl Plasmid-DNA versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV elektroporiert. Nach dem Versetzen mit 600 µl NB-Medium und Inkubation für mindestens 2 h schüttelnd bei 30°C wurden die Ansätze auf NB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

Zunächst wurde versucht, den Cosmid-Vektor pWE15 mittels Elektroporation in die Negativmutanten von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y zu übertragen. Wäre eine stabile Replikation dieses Vektors in den Mutanten A und/oder B möglich, so könnte die bereits in *E. coli* EB304 errichtete Cosmid-Genbank in die Mutanten transformiert werden und so eine Komplementation herbeiführen. Leider war jedoch keine Replikation von pWE15 in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y zu erzielen. Daher wurden im weiteren Elektroporationen mit den Plasmid-Vektoren pBBR1MCS-2 und pBBR1MCS-3 und den broad-host-range Cosmiden pLAFR3 und pHc79 durchgeführt. Die Ergebnisse der Transformationsversuche sind in Tabelle 8 zusammengefasst. pBBR1MCS-3 konnte sich nicht in *Pseudoxanthomonas* replizieren, während alle drei anderen Vektoren mit unterschiedlichen Raten erfolgreich transformiert wurden. Jedoch wiesen die Cosmide pLAFR3 und pHc79, die für eine Tetracyclin-Resistenz codieren, deutlich geringe Transformationsraten auf als pBBR1MCS-2, der ein Kanamycin-

Resistenzgen trägt. Außerdem war eine Instabilität der Cosmid-Vektoren über mehrere Generationen zu beobachten, d.h. ohne Selektionsdruck gingen die Vektoren nach einigen Generationen verloren.

Tabelle 8: Möglichkeiten der Übertragung verschiedener Vektoren in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y und dessen Negativmutanten

| Vektor | Konjugation | Elektroporation | |
|------------------|---------------|-----------------|---------------------------------|
| | | | |
| pWE15 | nicht möglich | - | - |
| pBBR1MCS-2 | - | + | 10^5 - $10^6/\mu\text{g DNA}$ |
| pBBR1MCS-2cosAmp | - | + | $10^5/\mu\text{g DNA}$ |
| pBBR1MCS-3 | - | + | $7 \times 10^3/\mu\text{g DNA}$ |
| pLAFR3 | - | + | $3 \times 10^4/\mu\text{g DNA}$ |
| pHC79 | nicht möglich | + | $2 \times 10^4/\mu\text{g DNA}$ |

+, Übertragung erfolgreich, -, Übertragung nicht erfolgreich; nicht möglich bedeutet, daß das Plasmid nicht über die für die Konjugation benötigte *mob*-site verfügt

Um die Anzahl an rekombinanten Klonen, die das gesamte Genom von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y repräsentieren, möglichst gering zu halten, sollte ein Cosmid-Vektor mit einer Kanamycin-Resistenz eingesetzt werden. Da von pBBR1MCS-2 bekannt war, daß er sich gut in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y replizierte und zudem über eine Kanamycin-Resistenz verfügte, wurde aus diesem Plasmid ein Cosmid konstruiert. Dazu wurden die *cos*-sites aus pHC79 als 1.719 bp *Bgl*III-Fragment ausgeschnitten und in die singuläre *Bgl*III-Schnittstelle von pBBR1MCS-2 kloniert. Um eine schnellere Selektion von Transformanten in *E. coli* zu ermöglichen, wurde zudem die Ampicillin-Resistenz als 1.156 bp-Fragment aus pBluescript KSII mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden Primer verwendet, die zusätzlich über eine *Stu*I-Schnittstelle verfügten, so daß eine blunt-end-Ligation in die singuläre *Xca*I-Schnittstelle von pBBR1MCS-2 durchgeführt werden konnte. Der resultierende Cosmid-Vektor pBBR1MCS-2cosAmp ist in Abb. 16 dargestellt. Der Vektor zeigte eine gegenüber pBBR1MCS-2 10-100-fach verringerte Elektroporationsrate in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y, konnte sich jedoch auch über mehrere Generationen stabil replizieren.

Die Errichtung einer Cosmid-Genbank von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in *E. coli* mit anschließender Elektroporation in die NR-Negativmutanten zur Komplementation des Phänotyps kann jetzt in weiteren Experimenten durchgeführt werden.

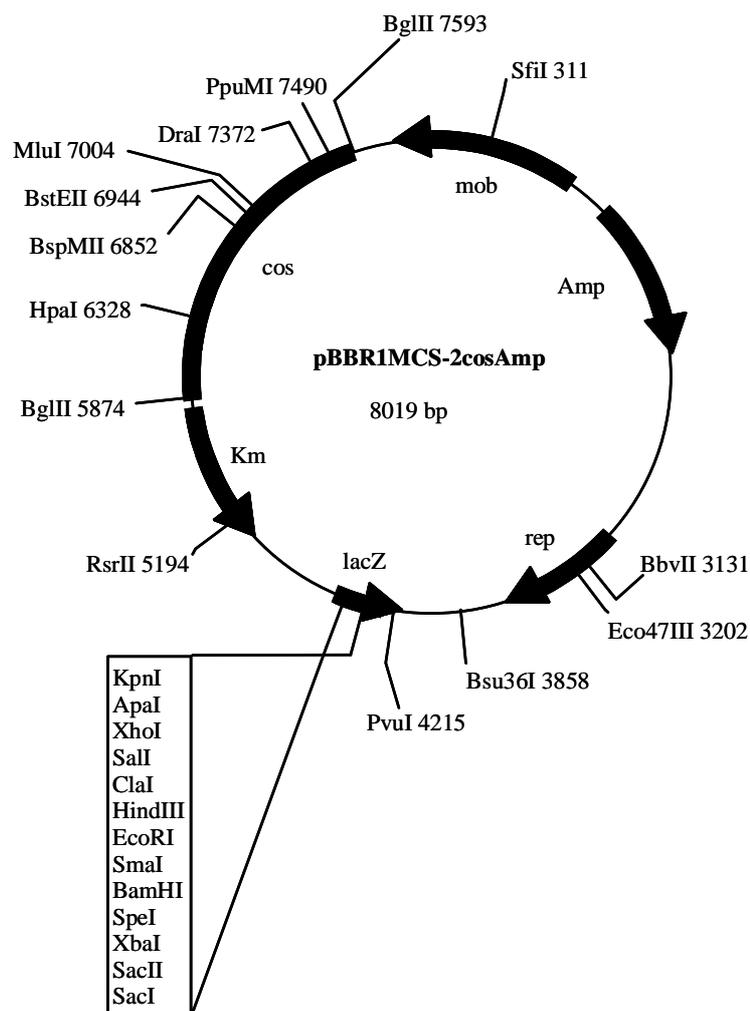


Abb. 16: *E. coli-Pseudoxanthomonas-Shuttle-Cosmid pBBR1MCS-2cosAmp.*

3.2.5. Proteinbiochemische Untersuchungen an *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y und den NR-Negativmutanten A und B

3.2.5.1. Photometrische Messung der NR-abbauenden Aktivität in NR-Kulturüberständen

Da Tsuchii & Takeda, 1990 im extrazellulären Kulturfiltrat von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y beim Wachstum mit NR als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mittels GPC-Analysen NR-abbauende Aktivität nachweisen konnten, wurden photometrische Enzym-Aktivitätstests mit dem eingengten Kulturüberstand vorgenommen. Dazu wurde *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y für bis zu 8 Tage in Tsuchii-Mineralmedium mit 0,05 % (w/v) NR bzw. DPNR angezogen (s. 2.4.). Als Kontrollen dienten unbeimpfte Kulturen mit 0,05 % (w/v) NR bzw. DPNR. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert, wodurch auch

nicht abgebauter NR weitestgehend entfernt wurde, und auf 5 % des Ausgangsvolumens eingeeengt (s. 2.13.3.). Die Enzym-Aktivität wurde durch Trübungsabnahme des Reaktionsansatzes in Mikrotiterplatten wie unter 2.6.1. beschrieben, gemessen. Im Vergleich zum Reaktionsansatz, der statt Enzym-Rohextrakt nur Kulturüberstand der unbeimpften NR-Kultur enthielt, war keine Trübungsabnahme zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Alle Kinetiken wiesen die gleiche, leicht abfallende Tendenz auf, was auf Verdunstung bzw. ein Absetzen der NR-Partikel zurückzuführen sein könnte. Mittels eines optisch-enzymatischen Tests konnte also keine NR-abbauende Aktivität nachgewiesen werden.

3.2.5.2. Induktion des NR-Abbaus in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Nachdem im zellfreien Kulturüberstand NR-gewachsener Zellen von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y mittels photometrischer Messungen keine NR-abbauende Aktivität nachgewiesen werden konnte und somit eine Lokalisierung bzw. Zuordnung der Enzymaktivität zu einem bestimmten Protein nicht möglich war, wurden Wachstumsversuche in NR-Flüssigkulturen durchgeführt. Es sollte eine Korrelation zwischen maximaler Wachstumsrate und dem verstärkten Auftreten eines Proteins im extrazellulären Kulturfiltrat festgestellt werden. So wurde *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y wie unter 2.4. beschrieben, mit 0,2 % (w/v) NR bzw. DPNR als Kohlenstoff- und Energiequelle, sowie zur Kontrolle mit 0,5 % (w/v) Glucose angezogen. Jeden Tag wurden jeweils 10 ml Kultur steril entnommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert, auf 2-10 % des Ausgangsvolumens eingeeengt (s. 2.13.3.) und bis zur weiteren Analyse bei 4°C auf Eis gelagert. Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren. Da aufgrund der Trübung der Kulturen, verursacht durch den NR/DPNR, keine optische Messung des Wachstums möglich war, wurde eine Wachstumskurve anhand der Zunahme der Zellproteinmenge aufgenommen. Dazu wurden die Zellpellets einer Proteinbestimmung ganzer Zellen nach Lowry et al., 1951 unterzogen (s. 2.15.1.2.). Aus der Auftragung der Proteinmenge gegen die Zeit wird deutlich (Abb. 17), daß zwar keine logarithmische Zunahme der Proteinmenge und somit der Zellzahl beim Wachstum auf NR bzw. DPNR zu beobachten ist, jedoch eindeutig ein Wachstum über einen Zeitraum von mehreren Tagen stattfindet. Die exponentielle Wachstumsphase, die bei der Glucose-Kultur sofort beginnt, ist beim Wachstum auf NR bzw. DPNR nicht so stark ausgeprägt, doch wurde eine Zunahme der Proteinmenge

nach 7-8 Tagen um das 6- bis 7-fache festgestellt. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Tsuchii & Takeda, 1990 in ihren Versuchen über den zeitlichen Verlauf des NR-Abbaus durch den Stamm 35Y. Sie nutzten die Gesamt-Proteinmenge im Kulturmedium zur Dokumentation des Zellwachstums und konnten an den Tagen 5-7 der Inkubationszeit die maximale Proteinmenge (bis zu 220 µg/ml) detektieren. Die Enzymaktivität (gemessen durch Gaschromatographie der gebildeten Produkte) erreichte am 5. Inkubationstag ihr Maximum und der Trockengewichtsverlust an NR betrug am 7. Tag 60 %.

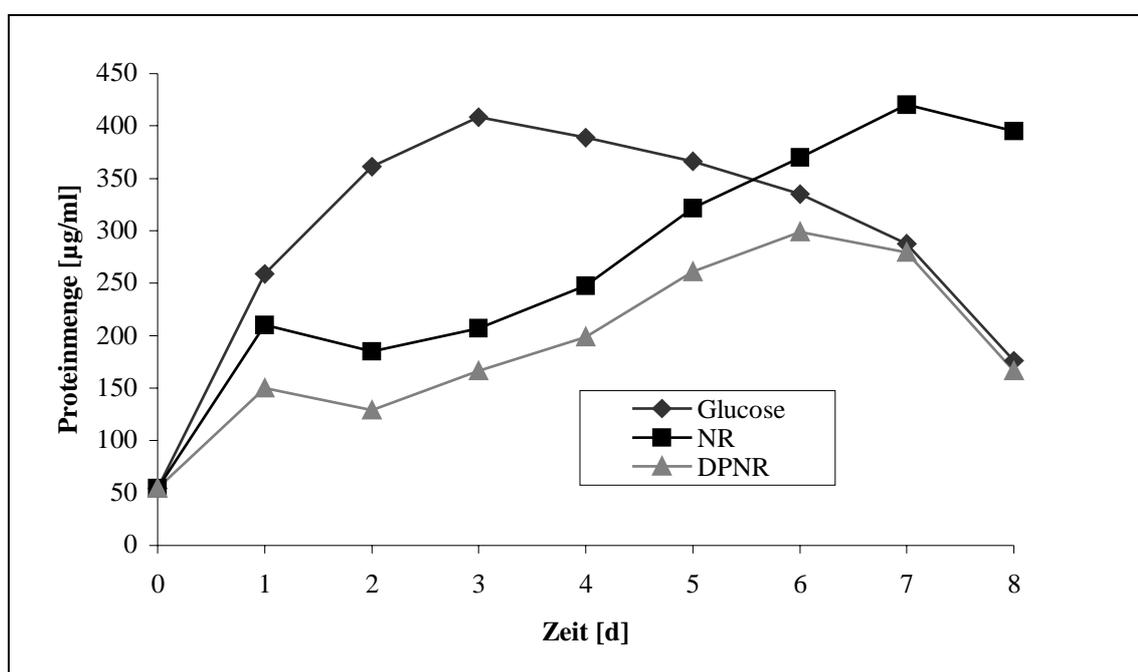


Abb. 17: Wachstumsverlauf von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y-Kulturen mit 0,2 % (w/v) NR bzw. DPNR und 0,5 % (w/v) Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Das Wachstum wurde an der gebildeten Zellproteinmenge gemessen.

Die mittels Centriplus-Röhrchen (Millipore GmbH, Eschborn) aufkonzentrierten Kulturüberstände wurden einer Proteinbestimmung nach Bradford, 1976 unterzogen, so daß nachfolgend für die SDS-PAGE von allen Proben etwa gleiche Protein-Konzentrationen aufgetragen werden konnten. Auf dem in Abb. 18 dargestellten 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel wird deutlich, daß die Konzentration eines Proteins von ca. 65 kDa im Verlaufe des Wachstums von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y auf NR immer stärker zunimmt und am 8. Inkubationstag ihr Maximum erreicht. Dieses Protein könnte also am NR-Abbau beteiligt sein.

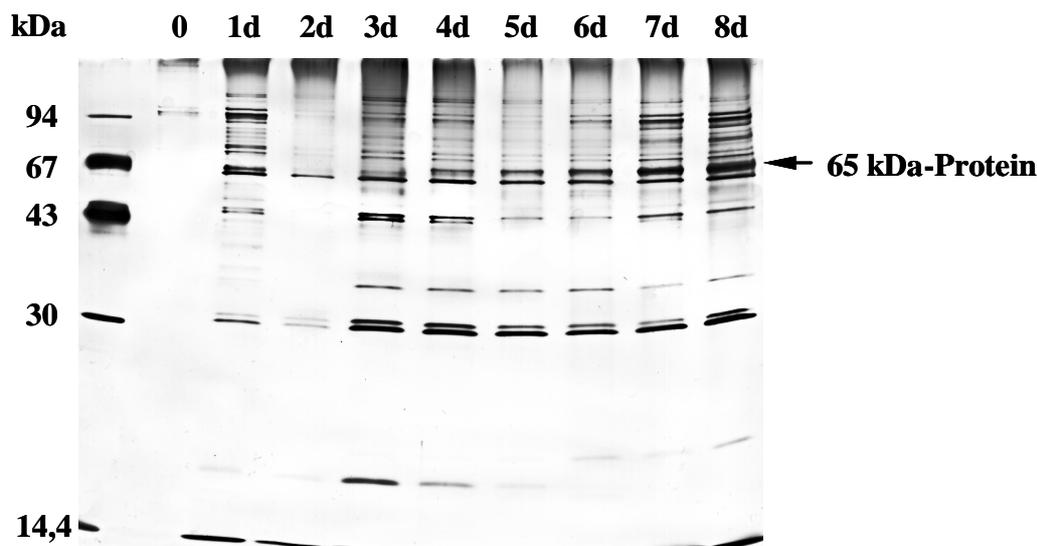


Abb. 18: 10 % (w/v) SDS-PAGE des eingengten Kulturüberstandes von *Pseudoxanthomonas sp. 35Y* gewachsen in Tsuchii-Mineralmedium mit 0,2 % (w/v) NR als Kohlenstoff- und Energiequelle. Pro Spur wurden etwa 1,32 μg Protein aufgetragen, die Proteine wurden mit Silber angefärbt. Im Verlauf des 8-tägigen Wachstums nimmt die Konzentration einer Proteinbande der Größe von 65 kDa kontinuierlich zu.

3.2.5.3. Einfluß der verwendeten Kohlenstoffquelle auf die Bildung extrazellulärer Proteine durch *Pseudoxanthomonas sp. 35Y*

Um den Einfluß der verwendeten Kohlenstoffquelle auf die Expression des 65 kDa-Proteins zu untersuchen bzw. um nachweisen zu können, daß das etwa 65 kDa große Protein, dessen Konzentration am extrazellulären Gesamtprotein beim Wachstum auf NR immer stärker zunimmt, spezifisch für den NR-Abbau ist, wurden Wachstumsversuche mit *Pseudoxanthomonas sp. 35Y* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen durchgeführt. Dazu wurden Kulturen von Tsuchii-Mineralmedium mit 0,2% (w/v) NR bzw. DPNR, 0,5 % (w/v) Glucose, 0,5 % (w/v) Gluconat oder 0,5 % (w/v) Rhamnose als Kohlenstoffquelle mit *Pseudoxanthomonas sp. 35Y* angeimpft und wiederum 8 Tage als Standkulturen bei 30°C inkubiert (s. 2.4.). Jeden Tag wurden, wie unter 3.2.5.2. erläutert, Proben steril entnommen, abzentrifugiert, die Überstände sterilfiltriert und eingengt. Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford, 1976 wurden wieder gleiche Konzentrationen auf ein 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (nicht dargestellt). Für jede Kohlenstoffquelle wurde dann eine repräsentative Probe erneut auf ein 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel

aufgetragen und die Proteinmuster miteinander verglichen (Abb. 19). Es zeigte sich, daß die Bande bei 65 kDa wirklich nur spezifisch beim Wachstum auf NR bzw. DPNR auftrat. Beim Wachstum auf anderen Kohlenstoffquellen wie z.B. Glucose, Gluconat oder Rhamnose wurde dieses Protein nicht gebildet. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, daß die 65 kDa-Bande durch ein im NR enthaltenes Protein verursacht wurde, da die Proteinbande zum Einen erst im Laufe des Wachstums auftrat und nicht von Beginn an vorhanden war und das Protein zum Anderen auch in Kulturen mit DPNR (Deproteinisierter NR) auftrat. Dieses suggerierte eine Beteiligung des 65 kDa-Proteins am NR-Abbau. Daher sollte im weiteren die N-terminale Aminosäuresequenz dieses Proteins bestimmt werden.

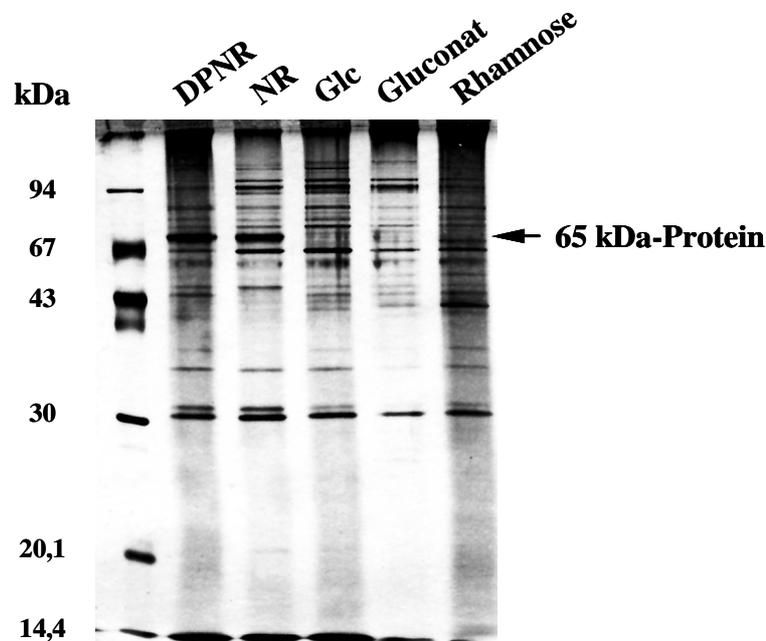


Abb. 19: 10 % (w/v) SDS-PAGE der eingengten Kulturüberstände von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y gewachsen auf NR bzw. DPNR, Glucose, Gluconat oder Rhamnose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Pro Spur wurden etwa 1 µg Protein aufgetragen, die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Das 65 kDa-Protein wird nur spezifisch beim Wachstum auf NR oder DPNR gebildet, und konnte somit im Kulturfiltrat mit anderen Kohlenstoffquellen gewachsener Zellen nicht nachgewiesen werden.

3.2.5.4. N-terminale Blockierung des 65 kDa-Proteins

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz dieses beim Wachstum von *Pseudoxanthomonas* sp. 5Y auf NR gebildeten 65 kDa-Proteins wurde eingengter

Kulturüberstand auf ein großes 10 %iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.15.2.1.) aufgetragen, so daß eine bessere Auftrennung der Proteinbanden erreicht wurde. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (s. 2.15.3.2.) und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.15.5.). Anschließend erfolgte die N-terminale Aminosäuresequenzierung des 65 kDa-Proteins durch automatisierten Edman-Abbau in der Arbeitsgruppe von Dr. Kratzin am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen. Leider konnte keine N-terminale Sequenz bestimmt werden, da das Protein N-terminal blockiert war. Dieses tritt nach PAGE und anschließendem Blotting, besonders bei extrazellulären Proteinen, häufiger auf (Kratzin, pers. Mitteilung).

3.2.5.5. Aufreinigung des 65 kDa-Proteins aus dem Kulturüberstand von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y gewachsen auf NR

Um genügend Ausgangsmaterial für eine Proteinaufreinigung zu haben, wurden Anzuchten im 3,5 l-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y wie unter 2.5. beschrieben, angezogen. Nach der Ernte der Zellen wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert, mit einem Tangentialfilter auf 60-90 ml eingengt und bei 4°C gelagert.

Der erste Schritt in der Aufreinigung war eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (s. 2.14.1.1.). Als Equilibrierungspuffer wurde 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 verwendet. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem Stufengradienten von 0-150 mM NaCl. Unter diesen Bedingungen konnte ein Großteil der Proteine an die Matrix binden, während das 65 kDa-Protein vorwiegend im Durchfluß, column wash und den ersten Niedrigsalzfraktionen vorkam. Mit Hilfe des stärkeren Anionenaustauschers MonoQ konnte keine verbesserte Abtrennung von Fremdproteinen erreicht werden, da das gewünschte 65 kDa-Protein nicht wieder von der Säule eluiert werden konnte.

Somit schien Anionenaustauschchromatographie an einem schwachen Ionentauscher wie DEAE-Sephacel das geeignete Mittel zu sein, um einen ersten Aufreinigungsschritt durchzuführen.

Eine Kationenaustauschchromatographie an MonoS, einem starken Ionentauscher, erbrachte bei pH-Werten von 5,5, 6,5 und 7,5 keinen weiteren Aufreinigungserfolg. Daher wurde versucht, eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes zu erreichen. Dazu wurde eine Gelfiltration an Superdex G200

durchgeführt. Dieses Säulenmaterial erlaubt eine Trennung von Proteinen im Bereich von 10-600 kDa. Die Elution der Proteine erfolgte in einem isokratischen Gradienten von 150 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. Entsprechend dem durch SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht eluierte das 65 kDa-Protein bei einem Elutionsvolumen von 80-90 ml, so daß es sich vermutlich um ein monomeres Protein handelt. In der SDS-PAGE zeigte sich, daß noch zwei weitere Proteine (46 kDa und 24 kDa) als Verunreinigung in der Fraktion enthalten waren (s. Abb. 20).

Um die anderen Proteine abzutrennen, wurde im Folgenden eine Gelfiltration an Superdex G75 vorgenommen. Lediglich das Protein von ca. 24 kDa konnte dabei teilweise abgetrennt werden. Mit dieser Methode wurde somit keine vollständige Aufreinigung erzielt. Eine zusätzlich durchgeführte Nativ-PAGE bestätigte allerdings, daß es sich bei den beiden kleineren Proteinen nicht um Abbauprodukte des 65 kDa-Proteins handeln konnte, sondern um eigenständige Proteine/Proteinkomplexe.

Weitere Versuche die drei Proteine durch hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-, Butyl- oder Phenyl-Sepharose zu trennen, zeigten ebenfalls keinen Erfolg.

Eine mögliche Auftrennung der Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes (IEP) sollte die Chromatofokussierung an MonoP erbringen. Dabei wird auf der Säule ein pH-Gradient erzeugt, der eine Anordnung und Elution der Proteine an ihrem IEP bewirkt. Um die Fraktionen auf die darin enthaltenen Proteine im SDS-PAGE untersuchen zu können, ist jedoch eine Abtrennung des für die Elution verwendeten Polybuffers notwendig. Dieses wurde durch 100 % (w/v) Ammoniumsulfatfällung der Fraktionen erreicht. Nachfolgend konnte in den gefällten Fraktionen allerdings kein Protein mehr nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Mittel konnte also eine nahezu vollständige Aufreinigung des 65 kDa-Proteins aus dem NR-Kulturüberstand erzielt werden (Abb. 20).

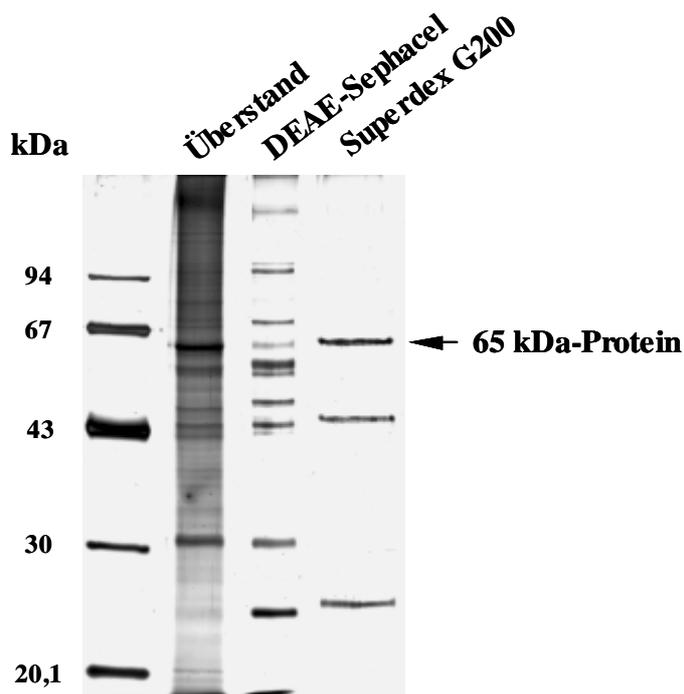


Abb. 20: Partielle Aufreinigung des 65 kDa-Proteins mittels Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel mit anschließender Gelfiltration an Superdex G200. Die Proteine wurden in einem 10 % (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silber angefärbt.

3.2.5.6. Bestätigung der Reinheit des aufgereinigten 65 kDa-Proteins mittels 2D-Elektrophorese

Um nachweisen zu können, daß es sich bei dem 65 kDa-Protein wirklich nur um ein Protein handelt und nicht zwei gleich große Proteine, die einander in der SDS-PAGE überlagern, wurde eine 2D-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden ca. 15 µg des nach der Gelfiltration an Superdex G200 erhaltenen, partiell aufgereinigten Proteins mit 3 Volumen eiskaltem Aceton ÜN bei -20°C gefällt. Nach der Pelletierung der Proteine wurden diese wie unter 2.15.2.3. beschrieben, in Puffer aufgenommen und einer Auftrennung in der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung unterworfen. Die zweite Dimension wurde in einer großen Vertikal-Elektrophorese-Kammer durchgeführt. Als Referenz für das zu untersuchende 65 kDa-Protein wurde eine mittels SDS-PAGE aufgetrennte und Coomassie-gefärbte Bande desselben Proteins an die Anodenseite des fokussierten Dry-Strips gelegt und erneut im 10 % (w/v) SDS-PAGE aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt. Es wird deutlich, daß es sich bei

dem 65 kDa-Proteins tatsächlich nur um ein Protein handelt und nicht zwei oder mehr Proteine einander überlagern. Die zwei um wenige Millimeter nach links versetzten Spots rühren wahrscheinlich vom gleichen Protein, jedoch einer modifizierten (glykosylierten oder phosphorylierten) Form her (Berkelmann & Stenstedt, 1998). Außerdem ist eine geringfügige Verschiebung des Referenzproteins, bedingt durch die unterschiedlichen Materialien, in denen die Proteine immobilisiert waren (Dry-Strip, Polyacrylamidgel) und eine damit verbundene veränderte Wanderungsgeschwindigkeit im Gel, zu beobachten (vergleiche auch Lauffront). Aufgrund seiner Intensität kann der markierte Spot jedoch eindeutig dem 65 kDa-Protein zugeordnet werden. Desweiteren konnte festgestellt werden, daß der IEP des 65 kDa-Proteins im sauren pH-Bereich liegt.

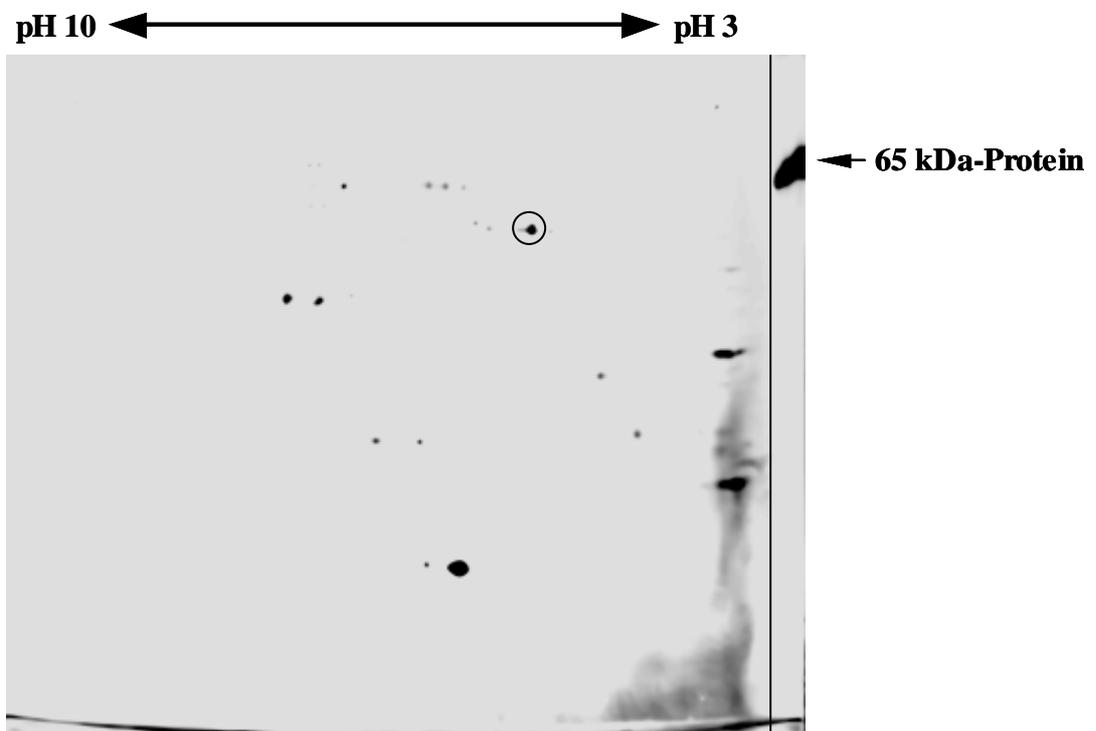


Abb. 21: 10 % (w/v) SDS-PAGE (2. Dimension) von 15 µg partiell aufgereinigtem Protein nach isoelektrischer Fokussierung. Als Referenz wurde ein Gelstück mit darin enthaltenem 65 kDa-Protein mit auf das Gel der zweiten Dimension gelegt (rechts der Trennlinie). Die Proteine wurden mit Silber gefärbt. Der durch einen Kreis markierte Spot entspricht dem 65 kDa-Protein.

3.2.5.7. Chemische und proteolytische Spaltungen des 65 kDa-Proteins von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Da eine N-terminale Blockierung des 65 kDa-Proteins vorlag, sollte das Protein zur Ermittlung interner Aminosäuresequenzdaten einer Spaltung unterzogen werden. Dazu wurden verschiedene Proteasen, sowie eine chemische Spaltung durch Bromcyan getestet. Zunächst mußte das 65 kDa-Protein von den übrigen zwei Proteinen, die in dem nach Gelfiltration an Superdex G200 erhaltenen Proteingemisch vorhanden waren, abgetrennt werden. Dazu wurde das Proteingemisch auf ein 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Bande des 65 kDa-Proteins nach Anfärben des Gels mit Coomassie-Farbstoff ausgeschnitten. Die Gewinnung des Proteins aus dem Gelmaterial erfolgte durch Elektroelution mit anschließender Einengung wie unter 2.14.7. beschrieben. Das eluierte Protein wurde dann zunächst einer Spaltung durch Bromcyan unterzogen (s. 2.14.4.1.). So sollte eine durch Proteasen verursachte Verunreinigung der Probe vermieden werden. Bromcyan spaltet die Aminosäurekette spezifisch an der Carboxylgruppe von Methioninresten, so daß bei niedrigem pH-Wert über die Zwischenstufe des Homoserinlactons ein Homoserin entsteht (Abb. 22).

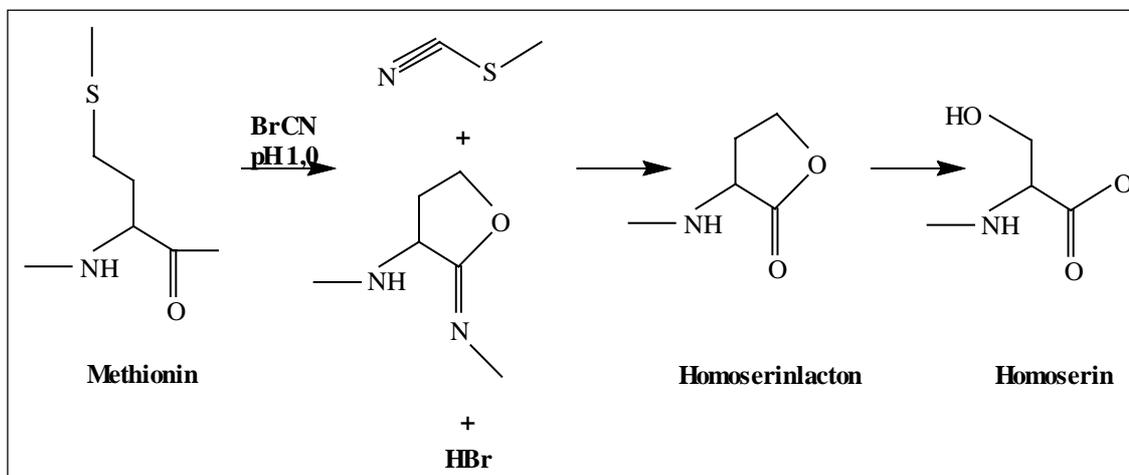


Abb. 22: Schematische Darstellung der chemischen Spaltung von Peptiden an Methioninresten durch Bromcyan. Über die Zwischenstufe des Homoserinlactons wird unter sauren Bedingungen ein Homoserin-Derivat gebildet.

Zur Einschätzung der Effizienz einer solchen Proteinspaltung wurde BSA unter gleichen Bedingungen einer Spaltung unterzogen. Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte durch SDS-PAGE in einem 15 %igen (w/v) Polyacrylamidgel. BSA besitzt neben einem typischen Methioninrest am N-Terminus vier interne Methionine, so daß es bei vollständiger Bromcyanspaltung in fünf Peptide von 2,6 kDa, 11,4 kDa, 11,7 kDa, 12,6 kDa und 29,7 kDa fragmentiert wird (Barry, 1991; Castellino & Barker, 1968). Erwartungsgemäß wurden bei der Spaltung von BSA fünf Banden erhalten (nicht gezeigt). Die Spaltung des 65 kDa-Proteins hingegen erbrachte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Der Großteil des gespaltenen bzw. zur Spaltung eingesetzten Proteins war nach Entfernung der Ameisensäure durch Abdampfen im Speed Vac, oder auch einfach im Vakuum, nicht mehr nachzuweisen. Eine Immobilisierung der Spaltprodukte durch Aufbringen dieser auf PVDF-Membran konnte ebenfalls keine verbesserte Ausbeute bewirken.

Eine weitere Möglichkeit der Spaltung von Proteinen besteht in einer Hitze-Denaturierung. Dazu wurde das 65 kDa-Protein bis zu einer Stunde bei 95°C inkubiert und nachfolgend auf einem 15 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Obwohl es sich um einen mesophilen Organismus handelt, war keine Spaltung des Proteins durch Hitzeeinwirkung möglich (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde dazu übergegangen, proteolytische Spaltungen durchzuführen, die zwar eine Verunreinigung durch Proteasen bewirken, jedoch nachfolgend keine Entfernung des Reaktionspuffers bzw. Lösungsmittels notwendig machen. Somit sollte das gesamte zur Spaltung eingesetzte Material (Protein) auch in den Spaltprodukten erhalten bleiben. Zunächst wurden verschiedene Proteasen ausprobiert, da alle unterschiedliche Angriffsstellen besitzen. Die Endoproteinase Glu-C aus *Staphylococcus aureus* V8 spaltet je nach Reaktionsbedingungen spezifisch am Carboxylende von Aspartat und/oder Glutamat. Trypsin aus dem Rinderpankreas greift die Aminosäurekette spezifisch an der Carboxylseite von Arginin und Lysin an. Thrombin spaltet Arginin-Glycin-Bindungen in bestimmten Peptidsequenzen.

Eine Spaltung des Proteins mit Thrombin erbrachte keinen entsprechenden Spaltungserfolg, d.h. das Protein lag größtenteils ungespalten vor. Auch die Spaltung mit der Endoproteinase Glu-C aus *Staphylococcus aureus* V8 war nur bedingt erfolgreich. Bei Einsatz geringer Mengen an Protein wurden verschiedene Spaltfragmente erhalten (Abb. 23b), wurden jedoch größere Mengen Protein (und auch

entsprechend mehr Protease) zur Spaltung verwendet, konnte keine vollständige Spaltung erreicht werden. Ebenso führte eine Spaltung im Sammelgel eines 15 %igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgels (Cleveland et al., 1977) nur in kleinen Reaktionsansätzen zur Spaltung. Dies mag damit zusammenhängen, daß kein ausreichender Kontakt zwischen Protein und Protease zustandekam. Die tryptische Spaltung führte in Abhängigkeit von der zugegebenen Trypsinmenge (0,2-1 µg) und der Inkubationsdauer zu verwertbaren Spaltfragmenten verschiedener Größe (Abb. 23c). Somit schien Trypsin geeignet eine Spaltung des 65 kDa-Proteins herbeizuführen.

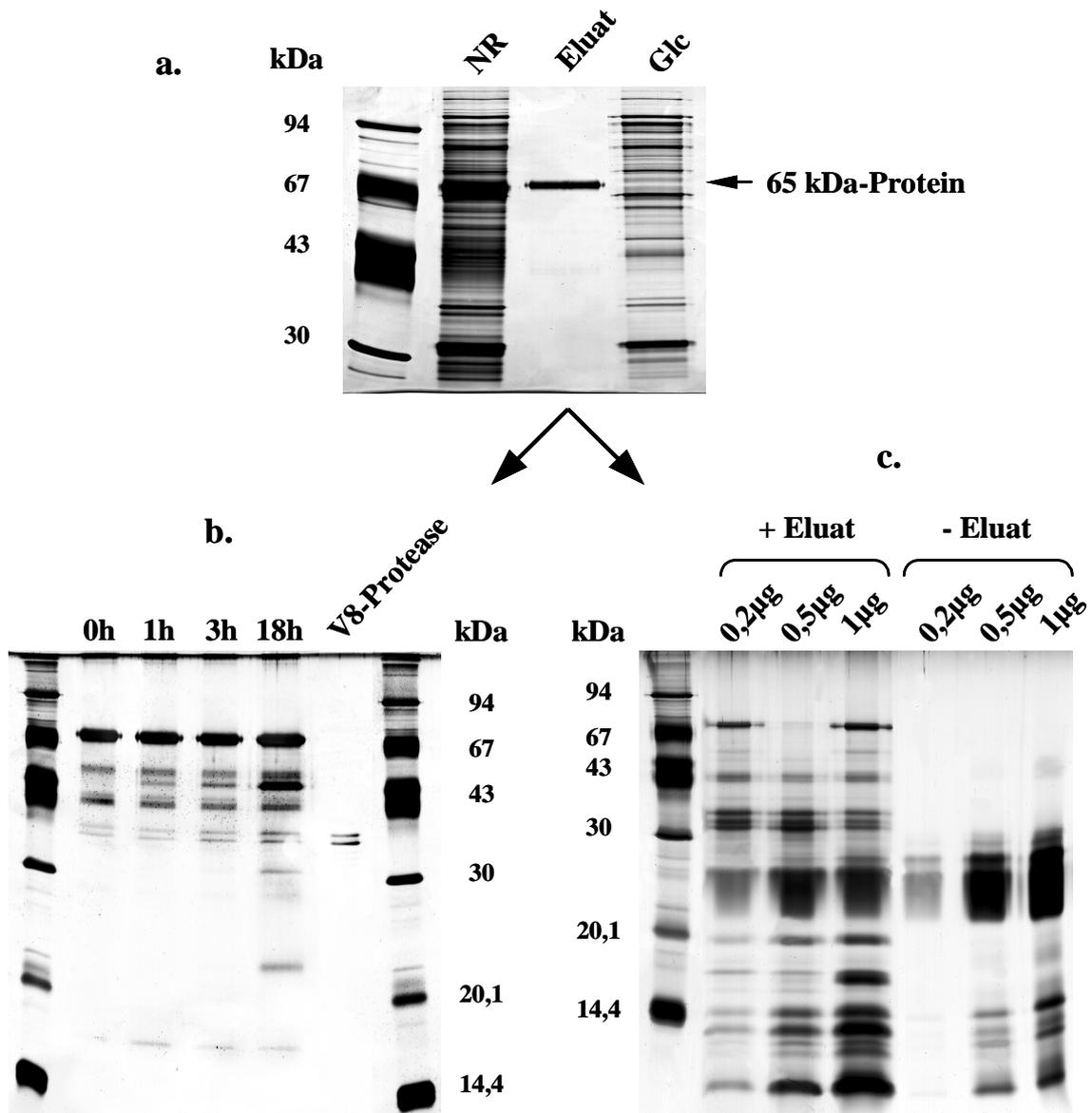


Abb. 23: Verschiedene proteolytische Spaltungen (b., c.) des elektroeluierten 65 kDa-Proteins (a). Zum Vergleich wurden in a. je 10 µl konzentrierter NR- und Glucose-Kulturüberstand mit aufgetragen. b. Spaltung mit Endoproteinase Glu-C. Jeweils 10 µl elektroeluiertes Protein wurden mit 0,2 µg Protease für die angegebene Zeitdauer bei 37°C gespalten. c. Tryptische Spaltung, d.h. jeweils 10 µl elektroeluiertes Protein wurden mit den angegebenen Proteasemengen 4 h bei 37°C gespalten. Das elektroeluierte Protein wurde in einem 10 % (w/v), die Spaltungen in einem 15 % (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silber angefärbt.

3.2.5.8. Ermittlung interner Aminosäuresequenzen des 65 kDa-Proteins aus *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Da gezeigt werden konnte, daß eine Trypsin-Spaltung des 65 kDa-Proteins zu Spaltfragmenten verschiedener Größe führt, sollten diese Peptidfragmente dann auch einer N-terminalen Aminosäuresequenzierung zugänglich sein. Daher wurden 480 µl (enthält ca. 48 µg 65 kDa-Protein) des nach der Gelfiltration an Superdex G200 erhaltenen Gemisches aus 3 Proteinen in einem 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 2.15.2.1) und mit Coomassie angefärbt (s. 2.15.3.2.). Die Bande des 65 kDa-Proteins wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zusammen mit einem etwa gleichgroßen Stück gefärbtem Gel ohne darin enthaltenem Protein (Leerwert) wie unter 2.15.4.2. beschrieben, entwässert und reduziert. Die nachfolgenden Schritte, Trypsin-Verdau, Extraktion, RP-HPLC-Auftrennung der Peptide mit anschließender Aminosäuresequenzierung, sowie Massenbestimmung durch MALDI-TOF-MS, erfolgten in der Arbeitsgruppe von Dr. Weber am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart.

Ausgewählte Peaks, d.h. solche, die symmetrisch und im Leerwert (Trypsin-Spaltung ohne Protein) nicht enthalten waren, sowie eine Masse über 500 Da besaßen, wurden einer N-terminalen Aminosäuresequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau unterzogen. Die Peptide 23/25, 36/38, 38/40 und 44 erbrachten die in Tabelle 9 dargestellten Teilsequenzen.

Tabelle 9: Aminosäureteilsequenzen der durch tryptischen Verdau des 65 kDa-Proteins erhaltenen internen Peptide und die für die DNA-Sonden-Herstellung (s. 3.2.5.9) daraus abgeleiteten degenerierten Oligonukleotidsequenzen.

| Peptid | M _r [Da] | Aminosäuresequenz mit abgeleiteter degenerierter Oligonukleotidsequenz (Sinnstrang) |
|--------|------------------------|---|
| 23/25 | 2997,9 | G N D N G G H D F 5`-GGN AAY GAY AAY GGN GGN CAY GAY TT-3` (TV-5) 3`-CCN TTR CTR TTR CCN CCN GTR CTR AA-5` (TV-6) |
| 36/38 | n.b. | P F A Y L Q F 5`-CCN TTY GCN TAY YTN CAR TTY-3` (TV-3) 3`-GGN AAR CGN ATR RAN GTY AAR-5` (TV-4) 5`-CCI TTY GCI TAY CTI CAR TTY-3` (TV-11) 3`-GGI AAR CGI ATR GAI GTY AAR-5` (TV-12) |
| 38/40 | 2034,8 | W G L P N S A N D A G 5`-TGG GGN YTN CCN AAY WSN GCN AAY GAY GCN GG-3` (TV-9) 3`-ACC CCN RAN GGN TTR WSN CGN TTR CTR CGN CCN-5` (TV-10) 5`-TGG GGI CTI CCI AAY TCI GCI AAY GAY GCI GG-3` (TV-1) 3`-ACC CCI GAI GGI TTR AGI CGI TTR CTR CGI CC-5` (TV-2) |
| 44 | n.b. | P I T A L G 5`-CCN ATH ACN GCN YTN GGN-3` (TV-7) 3`-GGN TAD TGN CGN RAN CCN-5` (TV-8) |

N = G, A, T, C; H = A, T, C; D = G, A, T; S = G, C; W = A, T; Y = C, T; R = A, G; I = Inosin;
n. b., nicht bestimmt

Sequenzabgleiche mit den in öffentlichen Datenbanken zugänglichen Strukturen wurden mittels der Programme Fasta 3 und Fasta 33, sowie Blast 2.0 durchgeführt und ergaben keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Proteinen.

3.2.5.9. Herstellung einer für das Strukturgen des 65 kDa-Proteins spezifischen DNA-Sonde

Um mittels PCR-Amplifikation mit chromosomaler DNA von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y als Template eine für das Strukturgen des 65 kDa-Proteins spezifische DNA-Sonde herzustellen, wurden aus den erhaltenen Aminosäuresequenzdaten degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, deren Sequenzen in Tabelle 9 dargestellt sind. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Eppendorf Gradientencycler durchgeführt, so daß ein breiter Temperaturbereich (35-65°C) zur Anlagerung der Primer abgedeckt werden konnte. Im Wesentlichen erfolgte die PCR-Amplifikation wie unter 2.11. beschrieben. Bei der Amplifikation mittels *Taq*-DNA-Polymerase wurde eine Elongationszeit von 1,5 min gewählt, da für die Kodierung eines 65 kDa-Proteins ein ca. 1,8 kb-großes Strukturgen erwartet werden kann und die *Taq*-DNA-Polymerase im Mittel mindestens 1 kb/min amplifizieren kann. Da bei degenerierten Oligonukleotiden ein Gemisch von Primern vorliegt und die spezifischen

Sequenzen somit nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten sind, wurden Primerendkonzentrationen von 2,5 μM bzw. 25 μM eingesetzt. Um auszuschließen, daß ein Amplifikat aufgrund der Anlagerung nur eines Oligonukleotids an verschiedenen Stellen der chromosomalen DNA entsteht, wurden auch PCR-Reaktionen mit nur einem darin enthaltenen Primer durchgeführt. Desweiteren wurden alle (sinnvollen) Primerkombinationen getestet. Es konnten zahlreiche DNA-Fragmente amplifiziert werden, jedoch waren diese Amplifikate stets auch in PCR-Reaktionen mit nur einem Primer nachweisbar, so daß sie auf die Mehrfachanlagerung des degenerierten Oligonukleotids an die chromosomale DNA zurückzuführen waren. In PCR-Reaktionen, die ein degeneriertes Primerpaar enthielten, wurden somit unter den gewählten Bedingungen keine spezifischen Amplifikate gebildet.

4. Diskussion

Aufgrund ihres Molekulargewichtes erfolgt der initiale Abbau vieler Naturstoffe wie z.B. Cellulose, Lignocellulose, Xylan, Stärke, Chitin, Lignin, Pectin, Polyhydroxyalkanoaten und Kohlenwasserstoffen durch extrazelluläre Enzyme (Crawford, 1978; Eggert et al., 1996; Jendrossek et al., 1996; Kirk et al., 1986; Liao et al., 1992; Mondou et al., 1986; Schlochtermeyer et al., 1992; Specka et al., 1991; Tien & Kirk, 1984). Sowohl Bakterien als auch viele Eukaryonten, vor allem niedere Pilze, sind in der Lage, unter bestimmten Bedingungen entsprechende Enzyme auszuschleiden und somit diese Naturstoffe als Kohlenstoff- und Energiequellen zu nutzen. Während der Abbau von Lignin unter aeroben Bedingungen, oftmals durch eine Oxygenierung als einleitende Spaltungsreaktion, stattfindet, greifen Xylanasen, Amylasen, Pectinasen, Chitinasen und aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoff-abbauende Enzyme die Polymere sowohl unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen an. In der Regel erfolgt der Abbau polymerer Naturstoffe nur in Abwesenheit einer anderen, gut verwertbaren Kohlenstoffquelle (Eggert et al., 1996; Jendrossek et al., 1996; Priest, 1992), d.h. die Expression dieser Enzyme unterliegt komplizierten Regulationsmechanismen. Auch Umwelteinflüsse wie Temperatur oder pH-Wert können einen Einfluß auf die Expression der Gene haben (Delafield et al., 1965). In anderen Bakterien wird die Enzymsynthese temporal reguliert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wird die Synthese unterdrückt bzw. bleiben die Enzyme zellgebunden und in der stationären Phase findet eine Expression bzw. Ausscheidung statt. So werden beispielsweise die Proteasen und Amylasen aus verschiedenen *Bacillus*-Arten (Priest, 1992) und die Glucoamylase aus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* auf diese Weise reguliert (Specka et al., 1991). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Abbau von Naturkautschuk (NR) durch verschiedene Bakterien untersucht werden. Obwohl schon seit langem NR-abbauende Bakterien und Pilze isoliert und charakterisiert wurden, ist der molekulare Mechanismus der Spaltung sowie entsprechende Enzyme und deren Strukturgene noch immer unbekannt. Aufgrund von Untersuchungen der entstehenden Abbauprodukte beim Wachstum von *Nocardia* sp. und *Xanthomonas* sp. 35Y auf NR wurden von Tsuchii und Mitarbeitern als einleitende Reaktion eine intramolekulare Spaltung des *cis*-1,4-Polyisoprens (NR) durch eine Polyisopren-Dioxygenase postuliert (Tsuchii et al., 1985; Tsuchii & Takeda, 1990).

4.1. NR-Abbau durch *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

4.1.1. Charakterisierung des NR-Abbaus durch *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

S. griseus 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y sind in der Lage auf Agarplatten mit NR als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen und einen Hof um die Kolonien herum zu bilden. Auch in NR-Flüssigkultur findet ein Abbau statt, wobei bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der *Streptomyces*-Stämme ein direkter Kontakt zwischen Latex und Myzel nachweisbar ist. *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y hingegen scheidet die NR-abbauende Aktivität offenbar ins Medium aus. Aufgrund ihres Abbauverhaltens beim Wachstum auf NR wurden alle bislang identifizierten Organismen in zwei Gruppen eingeteilt (Tabelle 10). Die Einen, vorwiegend Actinomyceten (Linos et al., 2000; Linos et al., 2000; Linos & Steinbüchel, 1998; Linos et al., 1999; Rook, 1955; Tsuchii et al., 1996; Tsuchii et al., 1996), aber auch ein *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm (Linos et al., 2000) wachsen nur in direktem Kontakt zum Substrat und führen zu einer beträchtlichen Zersetzung des Naturkautschuks während der Kultivierung. Im Gegensatz zu diesen adhäsiven Organismen stehen bislang nur zwei bekannte NR-verwertende Bakterien (*Micromonospora aurantiaca* W2b, *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y), die nicht-adhäsiv wachsen und auf NR-Agarplatten zu einer Hofbildung um die Kolonien herum führen (Linos et al., 2000; Tsuchii & Takeda, 1990). Während bei der ersten Gruppe die NR-abbauende Aktivität offenbar zellgebunden vorliegt, scheiden Vertreter der zweiten Gruppe die entsprechenden Enzyme aus der Zelle aus. *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A scheinen nun eine Intermediärstellung einzunehmen (s. Tabelle 10), denn auf der einen Seite wachsen sie in direktem Kontakt zum Substrat, sind aber andererseits in der Lage auf NR-Agarplatten eine Aufklärung um die Kolonien herum zu bewirken. Dieses verleitet zu der Annahme, daß je nach Wachstumsphase die NR-angreifenden Enzyme zellgebunden bzw. extrazellulär vorliegen. Ähnliches konnte auch für die Glucoamylase aus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* beobachtet werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase liegt das Enzym zellassoziiert vor, während es in der stationären Phase extrazellulär im Kulturüberstand zu finden ist (Specka, 1991; Specka et al., 1991). Weitere Untersuchungen dieser Glucoamylase haben gezeigt, daß es sich vermutlich um ein Lipoprotein handelt (Ducki, 1995). Das

Vorhandensein des lipophilen Proteinanteils bedeutet bei Gram-positiven Bakterien nicht zwangsläufig eine Bindung an die Zelloberfläche, wurden doch viele Lipoproteine Gram-positiver Bakterien aus dem Kulturüberstand aufgereinigt (Rothe et al., 1989; Sutcliffe et al., 1993). Die Freisetzung von der Zelloberfläche kann in acylierter Form, abhängig von der Wachstumsphase oder nach proteolytischer Spaltung erfolgen. So ließe sich auch das indifferente Verhalten von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A beim Wachstum auf NR erklären. Trotz ihres unterschiedlichen Abbauverhaltens ist allen Organismen jedoch vermutlich der initiale Schritt der oxidativen Spaltung des Substrates NR durch eine potentielle Polyisopren-Dioxygenase gemeinsam. Ob dieses eine Enzym jedoch schon für den auf NR-Agarplatten sichtbaren Phänotyp der Hofbildung ausreicht, wie es bei den PHA-Depolymerasen verschiedener Pseudomonaden der Fall ist, ist nicht bekannt.

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen Wachstum und Lokalisation der NR-abbauenden Aktivität. *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A nehmen aufgrund ihrer Fähigkeit zum adhäsiven Wachstum einerseits und der Hofbildung auf NR-Agarplatten andererseits eine Intermediärstellung zwischen den rein adhäsiven NR-Abbauern und den ausschließlich extrazellulär abbauenden Bakterien ein.

| Organismus | Wachstum auf NR | Hofbildung auf NR-Platten | NR-abbauende Aktivität |
|---|-----------------|---------------------------|--------------------------------|
| <i>Nocardia</i> sp. 835A ^a | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Gordonia</i> sp. VH2 ^b | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Gordonia</i> sp. Kb2 ^b | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Gordonia</i> sp. Kd2 ^c | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> ^d | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> NF49 ^b | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Actinomyces</i> sp. ^e | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AL98 ^f | adhäsiv | - | zellgebunden |
| <i>Micromonospora aurantiaca</i> W2b ^b | nicht-adhäsiv | + | extrazellulär |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y ^g | nicht-adhäsiv | + | extrazellulär |
| <i>Actinomyceten</i> ^h u.a. | | | |
| <i>Streptomyces griseus</i> 1D | adhäsiv | + | extrazellulär/ zellgebunden |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> 1A | adhäsiv | + | extrazellulär/ zellgebunden |

^a, (Tsuchii et al., 1996; Tsuchii et al., 1996), ^b, (Linos et al., 2000), ^c, (Linos & Steinbüchel, 1998), ^d, (Linos et al., 1999), ^e, (Rook, 1955), ^f, (Linos et al., 2000), ^g, (Tsuchii & Takeda, 1990), ^h, (Jendrossek et al., 1997); +, Hofbildung; -, keine Hofbildung

In Anwesenheit anderer, wasserlöslicher Kohlenstoffquellen wird der NR-Abbau durch *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y reprimiert, während *S. griseus* 1D eine offenbar konstitutive Expression der entsprechenden Enzyme, d.h. konstitutive Hofbildung auf NR-Agarplatten zeigt. Im Hinblick auf die Komplexität des Substrates scheint eine Repression durch andere, einfacher aufgebaute Kohlenstoffquellen ökonomisch für die Zelle zu sein. Auch andere Polymer-abbauende Organismen besitzen eine ähnliche Regulation (Priest, 1992). Beim Wachstum auf Succinat und pH-Werten $\geq 6,8$ werden die PHB-Depolymerasen aus *Pseudomonas lemoignei* exprimiert und sekretiert, während die Anwesenheit von 3-Hydroxybutyrat diese Schritte unterdrückt (Delafield et al., 1965; Terpe, 1999). Auch die Laccase-Produktion des Weißfäulepilzes *Pycnosporus cinnabarinus* wird in Anwesenheit von Glucose reprimiert (Eggert et al., 1996).

Für *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y konnte außer der Repression des NR-Abbaus zudem noch eine gewisse Instabilität der NR-verwertenden Eigenschaft nach wiederholter Kultivierung auf nicht NR-haltigen Medien beobachtet werden. Ähnliches wurde auch für *Pseudomonas aeruginosa* AL98 festgestellt (Linos et al., 2000). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß die für den NR-Abbau codierenden Strukturgene auf extrachromosomalen DNA-Elementen (Plasmiden) lokalisiert sind, da diese entweder verloren gehen können oder aber durch Konjugation übertragbar sind. Jedoch konnten für *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y durch verschiedene Plasmidpräparationen weder katabolische Plasmide, noch Mega- oder lineare Plasmide nachgewiesen werden. Somit ist der verzögerte NR-Abbau nach wiederholter Kultivierung auf beispielsweise Komplexmedien wahrscheinlich auf eine langsame Induktion der NR-abbauenden Enzyme zurückzuführen. Viele extrazelluläre Enzyme weisen eine geringe konstitutive Enzymexpression auf, so daß es beim Auftreten von polymeren Substraten außerhalb der Zelle zur Hydrolyse und Bildung von Spaltprodukten kommt, die dann ihrerseits nach Aufnahme in die Zelle eine verstärkte Enzymsynthese auslösen (Priest, 1977). Dies ist aufgrund der Komplexität der Substrate und der damit verbundenen Unfähigkeit der Zelle diese aufzunehmen, notwendig, führt jedoch zwangsläufig auch zu einem zeitlich verzögerten Abbau des Polymers. Es ist also davon auszugehen, daß die Induktion des NR-Abbaus einem recht langsamen Regulationsmechanismus unterliegt bzw. daß erst ein im Katabolismus relativ spät gebildetes Intermediat/Abbauprodukt die Induktion oder Derepression der Enzymexpression bewirkt.

4.1.2. Beruht der NR-Abbau durch *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y auf einem komplexen Stoffwechselweg ?

Mutagenesen mittels UV-Licht oder chemischen Agenzien sind zumindest bei Streptomyceten das Mittel der Wahl, um ungerichtete Mutationen zu erzeugen und somit Stoffwechselwege und deren Regulation zu untersuchen (Hopwood et al., 1985; Kendrick & Wheelis, 1982). Mittels UV-Mutagenese konnten Mutanten von *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y erhalten werden, die ein verändertes NR-Abbauverhalten besaßen, jedoch ansonsten einen gegenüber dem Wildtyp unveränderten Phänotyp aufwiesen. Somit wurde gezeigt, daß die Fähigkeit zum NR-Abbau durch *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y spezifisch ist und es sich nicht um eine nicht-enzymatische Reaktion, verursacht durch entstehende Intermediate, oder eine Nebenreaktion handelt. Wie bei den meisten Naturstoffen ist vermutlich ein komplizierter Stoffwechselweg notwendig, um NR für die Zelle als Kohlenstoff- und Energiequelle verfügbar zu machen. Um weitestgehend ausschließen zu können, daß ein anderer Defekt, z.B. im allgemeinen Protein-Sekretionsapparat der Zelle, für die aufgetretenen Phänotypen verantwortlich war, wurden sowohl die durch UV-Mutagenese erhaltenen Verlust- als auch Gewinnmutanten auf ihren Phänotyp beim Wachstum auf anderen Polymeren wie Stärke, Casein und PHB getestet. Nur bei Mutanten, die einen dem Wildtyp entsprechenden Phänotyp auf diesen Medien zeigten, wurde davon ausgegangen, daß die Mutation spezifisch für den NR-Abbau ist. Für *S. griseus* 1D wurden mit einer Frequenz von 0,015 % Mutanten erhalten, die nicht mehr in der Lage sind, auf NR-Agarplatten einen Aufklärungshof um die Kolonien herum zu bilden. Für *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y traten solche Mutanten mit einer Frequenz von 0,01 % bzw. 1,7 % auf. Obwohl bei der UV-Mutagenese nicht ausgeschlossen werden kann, daß in einer Zelle gleich mehrere Punktmutationen entstehen, könnte die relative Häufigkeit, mit der Verlustmutanten auftraten, darauf hindeuten, daß zahlreiche Enzyme am NR-Abbau beteiligt sind und es sich somit um einen recht komplexen Stoffwechselweg handelt. Auch zahlreiche Mutanten mit einer verstärkten Hofbildung bzw. einer deutlicheren Aufklarungszone wurden beobachtet, jedoch waren diese bei den beiden *Streptomyces*-Stämmen oftmals in ihrer Sporulationsfähigkeit beeinträchtigt, was auf einen genetischen Defekt in der A-Faktor-Biosynthese hindeutet. Aufgründdessen, daß der A-Faktor nicht nur in die Sporulation,

sondern auch in die Streptomycin-Biosynthese und wahrscheinlich noch mehrere andere Prozesse involviert ist, wurden derartige Mutanten nicht berücksichtigt. Außerdem war, bedingt durch die ausbleibende Sporulation der Stämme, eine Handhabung dieser äußerst schwierig. Mutanten mit verbesserten NR-Abbau wurden für *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A mit einer Frequenz von 0,0074 % bzw. 0,037 % erhalten. *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y-Mutanten mit verbesserten Abbau-Eigenschaften wurden nicht beobachtet. Dieses ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß nur 115 Kolonien gescreent wurden und Gewinnmutanten (zumindest bei *S. griseus* 1D) mit einer wesentlich geringeren Frequenz auftrat als Verlustmutanten. Außerdem ist eine Punktmutation, die zu einem Verlust der Enzymaktivität führt, in der Regel einfacher zu erzielen und daher häufiger als eine Punktmutation, die eine Verbesserung der Enzymaktivität bzw. dessen Umsatzrate zur Folge hat.

4.1.3. Abbau von Isoprenderivaten

Während Untersuchungen zur Aufklärung des mikrobiellen Abbaus von niedermolekularen, acyclischen Isoprenoiden schon seit den späten 50er Jahren durchgeführt worden sind, ist der molekulare Mechanismus des Abbaus von hochmolekularen Isoprenoiden wie Naturkautschuk immer noch weitgehend unbekannt. Zwar wurden die Untersuchungen des bakteriellen Abbaus von Isoprenderivaten wie Citronellol, Geraniol, Nerol und Farnesol durch den toxischen Effekt, den diese Alkohole beim Wachstum in Flüssigkultur auf die meisten Bakterien ausüben, erschwert, jedoch konnte der Abbauweg durch zahlreiche Arbeiten fast vollständig aufgeklärt werden (Cantwell et al., 1978; Seubert, 1960; Seubert & Fass, 1964; Seubert & Fass, 1964; Seubert et al., 1963). So wurde festgestellt, daß *Pseudomonas citronellolis* bei Verwendung von Citronellat oder in Anwesenheit von Succinat (und Citronellol) eine reduzierte Sensitivität besaß, so daß dieser Organismus für die Aufklärung des Abbauweges geeignet erschien. Die Oxidation der Alkohole (Citronellol, Geraniol und Farnesol) zu den entsprechenden Carbonsäuren sowie eine nachfolgende Aktivierung durch Coenzym A stellen die einleitenden Reaktionen dar. Der Mechanismus der Isomerisierung der in *trans* vorliegenden Thioester zu *cis*-Geranyl-CoA ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Da β -Alkylgruppen eine Umsetzung durch die Reaktionen der β -Oxidation verhindern (Cantwell et al., 1978; Pirnik, 1977), findet zunächst eine Carboxylierung der Thioester durch die Geranyl-CoA-Carboxylase

zu den entsprechenden Carbonsäurethioestern statt. Nach Hydratisierung durch die β -Isohexenylglutaconyl-CoA-Isomerase und einer Lyase-Reaktion durch die β -Hydroxy- β -isohexenylglutaryl-CoA-Lyase entsteht Acetat und ein β -Ketothioester, der dann über die Schritte der β -Oxidation verstoffwechselt werden kann.

Für den Abbau von Naturkautschuk (*cis*-1,4-Polyisopren) sind prinzipiell zwei grundlegende Mechanismen denkbar: Ein Abbau des Polymers vom Kettenende (exo-Spaltung), sowie eine interne Spaltung (endo-Spaltung). Bislang wurde jedoch außer von Low et al., 1992, die eine Exo-Spaltung durch verschiedene Actinomyceten und Pilze postulierten, nur Hinweise auf einen endo-Spaltungsmechanismus des Moleküls gefunden. Aufgrund der ersten Untersuchungen von Tsuchii und Mitarbeitern wurde eine initiale Spaltung von *cis*-1,4-Polyisopren an der C-C-Doppelbindung durch eine Dioxygenase gefordert, was die Entstehung eines Aldehyds und eines Ketons als Intermediate erklären würde (Tsuchii et al., 1985; Tsuchii & Takeda, 1990). Auch andere Arbeitsgruppen konnten solche primären Abbauprodukte nachweisen (Bode et al., submitted; Bode et al., 2000; Linos et al., 2000). So wurden anhand von NR-Langzeitkulturen, die zur Bildung stabiler Intermediate führten, weitere niedermolekulare Oligomere detektiert, so daß ein weiterführender Abbauweg postuliert wurde (Bode et al., submitted; Bode et al., 2000). Die als Primärprodukte entstandenen Aldehyde und Ketone werden durch Oxidation der endständigen Carbonylgruppe zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert, die dann durch Coenzym A zum Thioester aktiviert wird und eine β -Oxidation durchläuft. Aufgrund der α -Methylgruppe des Thioesters dürfte ein weiterer kompletter β -Oxidationszyklus schwierig sein. Daher wird zum Einen eine Reduktion und Hydrolyse des Intermediates zu Coenzym A und der entsprechenden Carbonsäure postuliert und zum Anderen eine Oxidation zum β -Ketothioester, der spontan decarboxyliert, wodurch ein Dion entsteht. Das Dion sowie die Carbonsäure konnten als stabile Intermediate im Kulturfiltrat von *S. coelicolor* 1A nachgewiesen werden. Ob sie jedoch Endprodukte darstellen oder über subterminale Oxidation oder ω -Oxidation weiter abgebaut werden, ist weiterhin unbekannt.

4.2. Reklassifizierung von *Xanthomonas* sp. 35Y als *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

4.2.1. Ergebnis morphologischer, physiologischer, biochemischer und genetischer Analysen

Morphologische, physiologische und biochemische Untersuchungen des als *Xanthomonas* sp. 35Y benannten Organismus (Tsuchii & Takeda, 1990), haben ergeben, daß das Bakterium gravierende Unterschiede zu bekannten Vertretern der Gattung *Xanthomonas* aufweist. Während Xanthomonaden stets 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm groß, Katalase-positiv und Oxidase-negativ (oder schwach positiv) sind, schleimiges Wachstum auf Zucker-haltigen Medien zeigen, sowie nicht auf Asparagin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können (Holt et al., 1994), ist *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y 0,2-0,6 x 1,7-3,0 µm groß, Katalase-negativ, Oxidase-positiv, wächst nicht-schleimig auf Zucker-haltigen Medien und ist in der Lage mit Asparagin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Außerdem ist bislang keine *Xanthomonas*-Spezies bekannt, die außer 1-2 polar inserierten Geißeln noch über Fimbrien oder Pili verfügt (Bradbury, 1984; Holt et al., 1994), wie sie für *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y nachgewiesen werden konnten. Lediglich *Xanthomonas maltophilia* ist multitrich begeißelt (Palleroni, 1984; Swings et al., 1983), jedoch bestehen erhebliche Zweifel daran, daß der Organismus korrekterweise in die Gattung *Xanthomonas* eingeordnet wurde (Palleroni, 1984). So unterscheidet sich *X. maltophilia* von den generellen Charakteristika der Xanthomonaden (Bradbury, 1984; Holt et al., 1994) durch die multitriche Begeißelung, die Fähigkeit zur Nitratreduktion, durch begrenzte Schleimbildung auf Glucose-haltigen Medien und durch die Fähigkeit zum Wachstum auf 0,1 % TTC (Swings et al., 1983; Van den Mooter & Swings, 1990). Außerdem ist der Organismus opportunistisch human-pathogen. *X. maltophilia* ist zwar in der Lage ein blaß-gelbes Pigment zu produzieren, das allerdings keine strukturellen Ähnlichkeiten zu den Xanthomonaden aufweist (Starr et al., 1977). van Zyl & Steyn regten daher 1992 an, *X. maltophilia* einer neuen Bakteriengattung zuzuordnen, welche allerdings ebenfalls in die Gruppe der γ -Proteobakterien gehört.

Taxonomische und phylogenetische Einordnungen von Eubakterien werden vorwiegend aufgrund von 16S-rRNA-Sequenz-Analysen und Nukleinsäure-Paarungsstudien ganzer Genome oder ausgewählter Gene (DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybridisierungen)

vorgenommen. Während die Auflösungskraft von 16S-rRNA-Analysen von der Ebene der Domänen (ab ca. 55 % Homologie) bis hin zu einigermaßen verwandten Spezies, d.h. bis etwa 97,5 % Ähnlichkeit, reicht, sind DNA-Hybridisierungen nur zur Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen nah verwandten Taxa, d.h. Stämme oder Spezies, geeignet (Stackebrandt & Goebel, 1994). Gemäß heutiger Erkenntnisse wird DNA von Organismen, die zueinander weniger als 97,5 % 16S-rRNA-Sequenzhomologie besitzen, nicht mehr als zu 60 % reassoziieren, unabhängig davon welche Hybridisierungsmethode angewandt wird (Stackebrandt & Goebel, 1994). Organismen mit weniger als 70 % DNA-Reassoziierung und damit DNA-Ähnlichkeit definieren unabhängige Gattungen und sind somit nicht auf Spezies-Ebene verwandt (Wayne et al., 1987).

So wurde zunächst eine Bestimmung der 16S-rRNA-Sequenz mittels Amplifikation und Sequenzierung der 16S-rDNA von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y durchgeführt. Anschließend Sequenzabgleiche mit anderen bekannten 16S-rRNA-Genen in verschiedenen Datenbanken erlaubten keine Zuordnung des Organismus zu einer bekannten Bakteriengattung. Höchste Identitäten ergaben sich zu einer *Ectothiorhodospira*- und einer *Pseudomonas*-Spezies, jedoch betragen diese maximal 83,6 %. Gemäß Stackebrandt & Goebel, 1994; und Wayne et al., 1987 kann man somit daraus schließen, daß es sich bei diesem Organismus um einen Vertreter einer bislang unbekanntem Bakteriengattung handelt.

Aufgrund bestimmter konservierter Bereiche innerhalb der 16S-rRNA, die durch T₁-Ribonuklease-Oligonukleotid-Katalogisierung der 16S-rRNA (Fox et al., 1977) zahlreicher Vertreter der verschiedenen Gruppen von Bakterien ermittelt wurden, konnte eine Einteilung der Eubakterien vorgenommen werden (s. Abb. 24). Die Gruppe der „Purpurbakterien und Verwandte“ beinhaltet die meisten, wenn auch nicht alle, der klassischerweise als Gram-negativ bezeichneten Bakterien (Fox et al., 1980; Gibson et al., 1979). Sie unterscheiden sich von allen anderen Gruppen von Eubakterien durch ihre rDNA-Oligonukleotid-Sequenzen in den Positionen 120, 375, 390, 555 und 610. Desweiteren können alle „Purpurbakterien und Verwandte“ (= α - δ -Proteobakterien) durch folgende Oligonukleotid-Sequenzen in der 16S-rDNA charakterisiert werden: CTAATACCG (Position 170), YACACAYYG (Position 315, Y = C, T), AATTTTS (Position 365; S = C, G) und TCACACCATG (Position 1410) (Stackebrandt et al., 1988).

| Organismus/Gruppe | Region 120 | Region 375 | Region 390 | Region 555 | Region 610 |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Gram-positive Eubakterien | TAACACG | ACAATG | ATCCAG | | AAATYCC[AY]G |
| Purpurbakterien und Verwandte | TAACACG | ACAATG | ATCCAG | TTAATCG | AAATYCC[AY]G |
| Spirochaeten und Verwandte | TAACACG | | | | |
| S-abhängige Eubakterien und Verwandte | TAACACG | | | TTAATCG | |
| Bacteriode, Flavobakterien, Cytophaga | TAACACG | ACAATG | ATCCAG | | |
| Cyanobakterien | TAACACG | | | | |
| Grüne Schwefelbakterien | | ACAATG | | | |
| Grüne Nicht-Schwefelbakterien und Verwandte | | ACAATG | | | |
| Radioresistente Micrococcen | TAACACG | | | | |
| Planctomyceten und Verwandte | TAACACG | | | | |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | | | ATCCAG | TTAATCG | AAATCCC |

Y = C,T; Übereinstimmungen in den Oligonukleotid-Sequenzen zwischen *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y und den verschiedenen Gruppen der Eubakterien wurden grau hinterlegt

Abb. 24: Vergleich der konservierten Regionen der 16S-rDNA-Sequenzen von den „Purpurbakterien und Verwandte“, *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y mit denen der anderen Gruppen der Eubakterien nach Woese et al., 1985. Übereinstimmungen in den Oligonukleotid-Sequenzen erlaubten eine Zuordnung von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in die Gruppe der „Purpurbakterien und Verwandte“.

Aufgrund der Übereinstimmungen in den 16S-rDNA-Oligonukleotidsequenzen zwischen der Gruppe der „Purpurbakterien und Verwandte“ und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y wurde der Organismus dieser Gruppe zugeordnet. Ferner erfolgte eine genauere Einordnung in die Untergruppe der γ -Proteobakterien anhand der in Abb. 25 dargestellten, grau-unterlegten Sequenzübereinstimmungen.

| Organismus/Gruppe | Region | Region | Region |
|----------------------------------|-------------|---|----------------------------------|
| | 50 | 365 | 510 |
| α -Proteobakterien | CYTAAYACATG | AATCTTC (4) AATCTTR (34) AATATTG (53) | CTAACTYYG (91) CYAACTACG (9) |
| β -Proteobakterien | CYTTAYACATG | AATCTTR (4) AATATTG (96) | CYAACTACG |
| γ -Proteobakterien | CYTAAYACATG | AATATTG (90) | CTAACTYYG (83) CYAACTACG (12) |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | CCTAACACATG | AATATTG | CTAACTCTG |

| Organismus/Gruppe | Region | Region | Region |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------|----------------------------------|
| | 535 | 555 | 815 |
| α -Proteobakterien | TAATACG | | ...TAAACG (91) CCCTAAACG (4) |
| β -Proteobakterien | TAATACG | TTAATCG | CCCTAAACG |
| γ -Proteobakterien | TAATACG (87) TAATACAG (13) | TTAATCG (90) | ...TAAACG (89) CCCTAAACG (11) |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | TAATACAG | TTAATCG | ...TAAACG |

| Organismus/Gruppe | Region | Region | Region |
|----------------------------------|------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | 980 | 1240 | 1470 |
| α -Proteobakterien | ...AACCTTA | ..CTACAATG | |
| β -Proteobakterien | AAAAACCTTA | TCATACAATG (78) TAATACAATG (22) | CTYACCACG... (46) |
| γ -Proteobakterien | ...AACCTTA | ..CTACAATG (94) TACTACAATG (6) | CTYACCACG... (8) CTYACCACTTTG (19) |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | ...AACCTTA | ..CTACAATG | CTTACCACG... |

Y = C,T; R = A, G; die Werte in Klammern geben die Häufigkeit (in %) an, mit der diese Oligonukleotide in den 16S-rDNA-Sequenzen der verschiedenen Untergruppen der „Purpurbakterien und Verwandte“ vorkommen; Übereinstimmungen in den Oligonukleotid-Sequenzen zwischen *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y und den verschiedenen Untergruppen wurden grau hinterlegt

Abb. 25: Vergleich der konservierten Regionen der 16S-rDNA-Sequenzen von α -, β - und γ -Proteobakterien nach Woese et al., 1985 mit den entsprechenden Bereichen in der 16S-rDNA-Sequenz von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y. Aufgrund der charakteristischen Übereinstimmungen in den Oligonukleotid-Sequenzen wurde *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y der Untergruppe der γ -Proteobakterien zugeordnet.

4.2.2. Erste Identifizierung eines Xanthomonadin-Derivates in einem Nicht-Xanthomonaden

Nahezu alle Xanthomonaden bilden, besonders beim Wachstum auf Komplexmedien, ein gelbes Pigment, das als Xanthomonadin bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um mono- oder dibromierte Aryl-Polyene, die bislang in keinem Organismus außerhalb der Gattung *Xanthomonas* nachgewiesen werden konnten, und daher ein Charakteristikum dieser Gattung darstellen (Starr & Stephens, 1964). In der Regel liegen mehrere

verschiedene Xanthomonadine als Gemisch vor. Obwohl bislang außer der Struktur von Xanthomonadin I aus *X. juglandis* XJ103 keine weitere veröffentlicht wurde, ist bekannt, daß die Xanthomonadine sich voneinander in ihrem Substitutionsmuster am Aromaten, den Substituenten am Aromaten, dem Grad und Ort der Bromierung (mono- oder dibromiert, am Aromaten oder an der Polyen-Kette), nicht-aromatischen Endgruppen und/oder anderen strukturellen Veränderungen unterscheiden (Starr et al., 1977). Über die physiologische Funktion von Xanthomonadinen ist noch nicht allzuviel bekannt. Carotenoide phototropher und nicht-phototropher Bakterien schützen die Zelle gegen photolytische und photodynamische Schäden. Für diese schützende Funktion wurde der Polyen-Anteil der Carotenoide verantwortlich gemacht. Aufgrund der ähnlichen Struktur der Xanthomonadine wurden daher unpigmentierte Mutanten von *Xanthomonas*-Stämmen erzeugt und auf ihre Überlebensfähigkeit in sichtbarem Licht untersucht. Es zeigte sich tatsächlich, daß diese Mutanten eine wesentlich höhere Anfälligkeit in sichtbarem Licht aufwiesen, so daß die Funktion von Xanthomonadin als Antioxidans bzw. Schutz gegen Photooxidation diskutiert wird (Jenkins & Starr, 1982; Rajagopal et al., 1997). Schutzmechanismus oder involvierte Ziele sind jedoch weiterhin unbekannt. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Xanthomonadin I aus *X. juglandis* XJ103, ebenso wie Carotenoide anderer Organismen, in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und durch Extraktion mit Methanol unbeschadet herausgelöst werden kann (Stephens & Starr, 1963). Daher wurden methanolische Zellextrakte von *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum* und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y hergestellt und die Absorptionsspektren im Bereich von 300-550 nm gemessen. Es konnte eine deutliche Übereinstimmung der Absorptionsmaxima beobachtet werden. Für alle drei Organismen wurde ein absolutes Maximum bei 440/441 nm bestimmt, wie es charakteristisch für Xanthomonadine ist.

Auch ein Vergleich der Absorptionsmaxima methanolischer Extrakte von Xanthomonadin- und Carotenoid-Pigmenten verschiedener *Xanthomonas*- und Nicht-*Xanthomonas*-Spezies (Tabelle 11) zeigt, daß alle Werte für die Absorptionsmaxima sehr nahe beieinander liegen. Ein Großteil der *Xanthomonas*-Spezies, darunter auch *X. campestris* pv. *campestris* und *X. campestris* pv. *malvacearum*, sowie *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y haben in Methanol Absorptionsmaxima bei 420, 441 und 467/468 nm (Starr & Stephens, 1964). Auch die Absorptionsmaxima von Extrakten in Petrolether (418, 437, 463 nm) und Benzen (435, 554 und 481 nm) sind unter den

Xanthomonaden recht einheitlich. Lediglich *X. carotae* und *X. pelargonii* bilden in allen drei Lösungsmitteln Ausnahmen, denn ihre Maxima (425/426 bzw. 444 nm) weichen stark ab (Starr & Stephens, 1964) und stimmen eher mit denen der Carotenoid-Pigmente der Nicht-Xanthomonaden überein. Diese weisen in Methanol Absorptionsmaxima bei 425/426 nm, 444-447 nm und 470-473 nm auf. Im Vergleich zu den Xanthomonaden sind die Absorptionspeaks der Carotenoide von Nicht-Xanthomonaden in Methanol jedoch wesentlich schärfer (Starr & Stephens, 1964).

Tabelle 11: Vergleich der Absorptionsmaxima von Xanthomonaden und Carotenoiden verschiedener Organismen (Starr & Stephens, 1964).

| Organismus ^a | Stamm- Bezeichnung ^b | Absorptionsmaxima | | |
|--|------------------------------------|-------------------|-----|------|
| | | [µm] | | |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. 35Y | | 420 | 441 | 467 |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | GSPB 2217 | n.b. | 441 | n.b. |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> | GSPB 1386 | n.b. | 440 | n.b. |
| <i>Xanthomonas pelargonii</i> | ICPB-XP8 | 426 | 445 | - |
| <i>Xanthomonas carotae</i> | ICPB-XC139 | 425 | 445 | - |
| <i>Erwinia ananas</i> | ICPB-EA133 | 425 | 445 | 473 |
| <i>Erwinia lathyri</i> | ICPB-EL102 | 425 | 444 | 473 |
| “ <i>Xanthomonas</i> ” <i>sterwartii</i> | ICPB-SS12 | 425 | 445 | 470 |
| (<i>Pantoea sterwartii</i>) | (ATCC 8199) | | | |
| “ <i>Xanthomonas</i> ” <i>trifolii</i> | ICPB-XT109 | 425 | 444 | 473 |
| (<i>Pantoea agglomerans</i>) | (ATCC 12287) | | | |
| “ <i>Xanthomonas</i> ” <i>uredovorus</i> | ICPB-XU103 | 425 | 447 | 475 |
| (<i>Pantoea ananatis</i>) | (ATCC 13531) | | | |
| andere Xanthomonaden | | 420 | 441 | 468 |

n.b. , nicht bestimmt; - , kein weiteres Absorptionsmaximum vorhanden

^a Die Anführungsstriche weisen daraufhin, daß die Autoren Starr & Stephens, 1964 glauben, daß die Stämme fälschlicherweise der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet wurden. Die in Klammern geschriebenen Bakterienamen wurden den Organismen nach Hinterlegung in der ATCC zugeordnet.

^bGSPB: Göttinger Sammlung Phytopathogener Bakterien; ICPB: International Collection of Phytopathogenic Bacteria; ATCC: American Type Culture Collection

Aufgrund des Absorptionsverhaltens des methanolischen Extraktes von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y-Zellen kann der Organismus also weder eindeutig der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet noch von dieser abgegrenzt werden. Zwar stimmten die Absorptionsmaxima methanolischer Extrakte von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y mit den Xanthomonaden der meisten Xanthomonaden überein, jedoch gab es auch innerhalb dieser Gattung einige Ausnahmen, die andere Maxima aufwiesen. Es deutet somit alles darauf hin, daß es sich bei dem von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y gebildeten Pigment wirklich um ein Xanthomonadin-Derivat handelte.

Um Informationen über die Zusammensetzung der Substanz zu bekommen, wurde eine massenspektroskopische Analyse durchgeführt. Es wurde eine Summenformel von $C_{27}H_{28}Br_2O_3$ und eine Molekülmasse von 560 ermittelt. Damit ist die Verbindung um 14 Masseneinheiten kleiner und vermutlich um eine CH_2 -Gruppe ärmer als Xanthomonadin I aus *X. juglandis* XJ103 ($C_{28}H_{30}Br_2O_3 = 17$ -(4-bromo-3-methoxyphenyl)-17-bromo-heptadeca-2,4,6,8,10,12,14,16-octaensäure) (Andrewes et al., 1976). Auch für Xanthomonadine, die aus anderen *Xanthomonas*-Spezies isoliert wurden, konnte ein Molekülpeak bei 560 oder 481 bestimmt werden. Dabei handelt es sich bei Xanthomonadinen mit Molekülmassen von 560 bzw. 574 um dibromierte Substanzen, die sich voneinander durch das Vorhandensein einer CH_2 -Gruppe unterscheiden (Starr et al., 1977). Xanthomonadine mit einer Molekülmasse von 481 hingegen enthalten nur ein Bromatom. Die meisten der charakterisierten Xanthomonadine gehören zwei verschiedenen Gruppen an: die eine enthält dibromierte Pigmente mit einer Molekülmasse von 560 und einem Absorptionsmaximum (in Aceton) bei 443-445 nm, die andere monobromierte Xanthomonadine mit einer Molekülmasse von 481 und einem Absorptionsmaximum (in Aceton) von 440-441 nm (Starr et al., 1977). Eine Strukturaufklärung dieser Xanthomonadine wurde bislang jedoch noch nicht durchgeführt bzw. veröffentlicht. Natürlich läßt die ermittelte Summenformel $C_{27}H_{28}Br_2O_3$ im Vergleich zu Xanthomonadin I aus *X. juglandis* XJ103 auch eine Modifikation im Polyen-Schwanz des Moleküls oder gar eine grundsätzlich andere Struktur zu, jedoch spricht auch das Absorptionsverhalten der methanolischen Extrakte von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y eher für eine verwandte Struktur. Außerdem sind natürlich auftretende Brom-Verbindungen sehr selten, da nur marine Organismen zur Brom-Fixierung und Inkorporation befähigt sind (Andrewes et al., 1973; Andrewes et al., 1976). So konnten Brom-substituierte Aromaten nur in einigen marinen Mikroorganismen nachgewiesen werden, jedoch ohne eine lange Polyen-Kette wie sie in Xanthomonadin I vorkommt. Die einzigen anderen Pigmente mit einer generell ähnlichen Struktur, die bislang gefunden wurden, sind Flexirubin in der äußeren Membran von *Flexibacter elegans* (Achenbach et al., 1974; Reichenbach et al., 1974), Cortisalin aus dem Pilz *Corticium salicinum* (*Cytidia salicina*) (Gripenberg, 1952) und Corticrocin aus *Corticium croceum* (Erdtman, 1948). Flexirubin ist ein nicht-bromiertes Aryloctanoat, Cortisalin ein nicht-bromiertes Phenol mit einer *para*-substituierten Polyen-Carbonsäure und Corticrocin eine unverzweigte Polyen-Dicarbonsäure.

Ein weiterer Nachweis für das Vorhandensein bzw. die Bildung von Xanthomonadin durch *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y könnte in einer Amplifikation von Genen, die für an der Biosynthese von Xanthomonadin beteiligten Enzymen codieren, bestehen. So wurde beispielsweise für das *pigB*-Gen aus *X. campestris* pv. *campestris* nachgewiesen, daß es nicht nur essentiell für die Produktion extrazellulärer Polysaccharide und Signalmoleküle ist, sondern auch für die Xanthomonadin-Bildung (Poplawsky & Chun, 1997; Poplawsky & Chun, 1998).

Zusammenfassend bleibt also festzustellen, daß *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y zwar eine Xanthomonadin-ähnliches Pigment enthält, jedoch die meisten der anderen untersuchten Eigenschaften gegen eine Zuordnung des Organismus zur Gattung *Xanthomonas* sprechen (s. Tabelle 12). Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, den vormals als *Xanthomonas* sp. 35Y bezeichneten Organismus in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y umzubenennen. Es würde sich somit um den ersten Vertreter einer neuen, bislang unbekanntes Gattung handeln, der aber entgegen aller bisherigen Erkenntnisse ein Pigment bildet, das der Gruppe der bromierten Aryl-Polyene zugeordnet werden muß. Es handelt sich also um den ersten Nicht-Xanthomonaden, der eine zumindest Xanthomonadin-ähnliche Substanz produziert.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Eigenschaften, die für (pro) bzw. gegen (contra) eine Zuordnung von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y zur Gattung *Xanthomonas* sprechen.

| pro | contra |
|--|---|
| aerobes, Gram-negatives Stäbchen | Zellgröße |
| 1-2- polare Geißeln | polar inserierte Fimbrien/Pili |
| Pigment: gelbes, bromiertes Aryl-Polyen | kein schleimiges Wachstum auf Zuckerkhaltigen Medien |
| Inhibition durch 0,1 % (w/v) 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid | physiologische Eigenschaften unterschiedlich (Oxidase, Katalase) |
| | Substratspektrum unterschiedlich (u.a. Wachstum auf Asparagin als einziger C- und N-Quelle möglich) |
| | G + C-Gehalt < 63 mol % |
| | 16S-rRNA-Sequenz-Homologie < 83,6 % |

4.3. Klonierung der Strukturgene der NR-abbauenden Enzyme

4.3.1. Klonierung der Strukturgene aus *S. griseus* 1D bzw. *S. coelicolor* 1A

Die Errichtung einer kompletten, chromosomalen Genbank von *S. griseus* 1D in

S. lividans 1326 bzw. TK23 mittels der Vektoren pIJ702 und pWHM3BE war nicht erfolgreich, da keine für die shot-gun-Klonierung ausreichenden Transformationsraten erreicht wurden. Obwohl schon eine ganze Reihe von Streptomycceten-Genen mit Hilfe von pIJ702 in *S. lividans* kloniert und überexprimiert worden sind (Blaak et al., 1993; Gusek & Kinsella, 1992; Mondou et al., 1986; Murooka et al., 1986), konnte im Rahmen dieser Arbeit keine repräsentative Genbank erstellt bzw. die Strukturgene der für den NR-Abbau verantwortlichen Enzyme nicht kloniert werden. Ursachen für diese Probleme waren das recht störungsanfällige System der PEG-vermittelten Transformation von *Streptomyces*-Protoplasten wie auch die nachfolgende Detektion potentieller Positivklone. Durchgeführte Kontrolltransformationen der Ligationsansätze (mit pWHM3BE) in *E. coli* XL1-blue ergaben stets ausreichend rekombinante Klone, so daß die Qualität der für die Ligationen eingesetzten DNA sowie der Ligationsbedingungen an sich nicht als Ursachen für die Probleme in Betracht kommen. Da jedoch bekannt ist, daß *Streptomyces*-Promotoren in *E. coli* in der Regel nicht transkribiert werden (Bibb & Cohen, 1982), wurde eine Klonierung in *E. coli* von vornherein als wenig aussichtsreich angesehen. Theoretisch sollten rekombinante Klone durch die Inaktivierung des Tyrosinasegens und das damit verbundene Ausbleiben der Melaninbildung phänotypisch erkennbar sein, jedoch war eine Unterscheidung schwierig, da *S. lividans* zusätzlich noch über ein chromosomal codiertes Tyrosinasegen verfügt. Umstände, in denen eine Klonierung mit pIJ702 problematisch sein kann, z.T. verursacht durch eine spontane Deletion im Tyrosinasegen, werden auch bereits früher beschrieben (Gusek & Kinsella, 1992). Transformationen von pIJ702 in *S. griseus* PSR-2 führten sogar zu einem gänzlichen Ausbleiben der Melaninproduktion (Ikeda et al., 1998). Klonierungen mit *E. coli*-*Streptomyces*-Shuttle-Plasmiden wie pWHM3BE hingegen bringen zwar den Vorteil der Bifunktionalität mit sich, jedoch zeigten diese Vektoren oftmals auch eine Instabilität in *Streptomyces* (Hopwood et al., 1985). Zu den Schwierigkeiten mit der chromogenen Selektion rekombinanter Klone kamen Unregelmäßigkeiten in der Regeneration und Sporulation der *S. lividans*-Protoplasten (Hopwood et al., 1977). Außerdem produzieren sich früh entwickelnde Kolonien häufig auto-inhibitorische Substanzen, die eine Regeneration der umgebenen Protoplasten unterbinden (Baltz, 1978; Hopwood et al., 1977). Dadurch war ein gleichmäßiges Stempeln aller Kolonien nicht gesichert, so daß versucht wurde, potentielle Positivklone in Anlehnung an Blaak et al., 1993 durch Überschichten der Regenerationsplatten mit

NR-overlay zu detektieren. Jedoch war diese Methode leider nicht geeignet, da selbst der Wildtyp *S. griseus* 1D unter diesen Bedingungen keine Hofbildung zeigte.

Alternativ zur Erstellung einer Genbank in *S. lividans* wurden Versuche zur Transposonmutagenese der Wildtyp-Stämme *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A sowie zur Komplementation der entsprechenden NR-Defektmutanten durchgeführt. Zunächst mußte dafür jedoch eine Protoplastierung der Stämme vorgenommen werden. Da zahlreiche Untersuchungen über Faktoren, die eine Protoplastierung und die nachfolgende Regeneration von Streptomyceten beeinflussen, vorliegen (Baltz & Matsushima, 1981; Hopwood et al., 1985; Okanishi et al., 1983; Shirahama et al., 1981; Thompson et al., 1982), konnte *S. griseus* 1D nach einigen Variationen und Optimierungen erfolgreich durch ein modifiziertes Protokoll der Methoden von Babcock & Kendrick, 1988 und Hopwood et al., 1977 protoplastiert werden. Die Ausbeute an *S. griseus* 1D-Protoplasten war jedoch mit 10^3 - 10^4 /ml relativ gering im Vergleich zu *S. lividans* (10^9 - 10^{10} /ml). Im Hinblick darauf, daß in Abhängigkeit vom verwendeten Organismus unter geeigneten Bedingungen auch nur maximal 40-50 % (Okanishi et al., 1974) und durchschnittlich etwa 1-10 % aller zur Transformation eingesetzten Protoplasten regenerieren (Hopwood, 1981; Hopwood et al., 1977), war dies die minimale Menge der für shot-gun-Klonierungen benötigten Protoplasten. Für *S. coelicolor* 1A hingegen konnte trotz Variation der Anzuchtbedingungen, Verwendung anderer Zellwand-angreifender Enzyme sowie Veränderung der Protoplastierungsdauer und -temperatur keine erfolgreiche Protoplastierung herbeigeführt werden.

S. griseus 1D konnte, wie bereits erwähnt, erfolgreich protoplastiert werden, jedoch fand keine Aufnahme von Plasmid-DNA statt. Auch Ohnuki et al., 1983 konnten für *S. griseus* ATCC10137 nur geringe Transformationsraten (42 Kolonien/ μ g DNA) erreichen, wenn die eingebrachte Plasmid-DNA aus einem anderen Streptomyceten stammte. Nach Reisolierung der Plasmid-DNA und erneuter Transformation von *S. griseus* ATCC10137 stiegen die Transformationsraten dann um das 10^6 -fache. Restriktions-/Modifikationssysteme, die einen Interspezies-DNA-Transfer einschränken, sind unter den Streptomyceten weit verbreitet (Lomovskaya et al., 1980). Wie schon für andere *Streptomyces*-Spezies beobachtet (Engel, 1987; Kakinuma et al., 1991; Kakinuma et al., 1990), konnte auch eine Transformation von *S. griseus* ATCC12475 mit verschiedenen Plasmiden nur erreicht werden, wenn die

Protoplasten vor der DNA-Zugabe einer Hitzeattenuation des Restriktionssystems unterzogen wurden (Lindley et al., 1995). Ein solcher Inkubationsschritt, sowie die Einführung *in vitro*-methylierter bzw. aus methylierungsdefekten *E. coli*-Stämmen isolierter Plasmid-DNA, wie es für *S. coelicolor* A3(2) beschrieben wurde (Kieser & Hopwood, 1991), erbrachte allerdings für *S. griseus* 1D ebenfalls keine Transformanten. Eine DNA-Übertragung von *E. coli* S17-1 in die Streptomyceten-Stämme mittels Konjugation nach Mazodier et al., 1989 war auch nicht erfolgreich, was in Anbetracht der für Streptomyceten bekannten starken Restriktionsbarrieren jedoch nicht weiter verwunderte. Außerdem bestand ein großes Problem bei dieser Art der Konjugation darin, daß *E. coli* als Donor wesentlich schneller und auch besser auf LB-Agar wuchs als der Rezipient, so daß die Transkonjuganten möglicherweise noch kein Substratmyzel gebildet hatten und so mit dem Donor von der Platte gewaschen wurden. Jedoch war es nicht möglich, geeignete Medien bzw. Bedingungen zu finden, die sowohl *E. coli* als auch den *Streptomyces*-Stämmen ein annähernd gleich schnelles Wachstum ermöglichten.

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Übertragung und eine Alternative zur PEG-vermittelten Transformation von Protoplasten ist die Elektroporation. Da jedoch die Transformationsraten in der Regel um den Faktor 10^3 niedriger sind als bei der PEG-vermittelten Transformation (MacNeil, 1987; Pigac & Schrempf, 1995) und zudem auch die aufwendige Protoplastierung vorgenommen werden muß, findet Elektroporation bei den meisten transformierbaren Streptomyceten kaum Anwendung. Es könnte jedoch eine geeignete Methode darstellen, um eine erste Aufnahme von Plasmid-DNA durch Stämme zu erreichen, die einer PEG-vermittelten Transformation nicht zugänglich sind, wie z.B. *S. griseus* 1D. Nach Reisolierung der Plasmid-DNA ist dann nachfolgend möglicherweise auch eine PEG-vermittelte Transformation möglich. Im Vergleich zur gewöhnlichen *E. coli*-Elektroporation sind zur Elektroporation von Streptomyceten-Protoplasten allerdings Feldstärken von 10 kV/cm bei 400 Ω Widerstand notwendig (Pigac & Schrempf, 1995). Interessanterweise wurden bei *S. lividans* die höchsten Elektroporationsraten beobachtet, wenn eine signifikante Lysis der Zellen einsetzte (MacNeil, 1987). Die Elektroporation von intakten Streptomyceten-Zellen konnte von Mazy-Servais et al., 1997 erreicht werden. Sie waren in der Lage, *S. parvulus* und *S. vinaceus* ohne vorherige Lysozym-Behandlung mit einer 10-100-fach höheren Effizienz als bei der klassischen PEG-vermittelten Transformation

zu elektroporieren. Allerdings blieb die Transformation von *S. lividans* und *S. coelicolor* erfolglos, so daß diese Methode also nicht unbedingt auf alle *Streptomyces*-Stämme anwendbar ist bzw. in Abhängigkeit des verwendeten Stammes einer Optimierung der Elektroporationsbedingungen (Anzuchtbedingungen, Pufferzusammensetzung, Elektroporationskonstanten, DNA-Konzentration, etc.) bedarf.

4.3.2. Klonierung der für den NR-Abbau codierenden Strukturgene aus *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

4.3.2.1. Konstruktion und Screening einer Cosmid-Genbank von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in *E. coli*

Viele Gene extrazellulärer Enzyme aus Gram-negativen wie auch Gram-positiven Bakterien wurden mit Hilfe von „Multi-copy“-Vektoren in *E. coli* als heterologem Wirt kloniert. Häufig waren die klonierten Gene in *E. coli* stabil und wurden ausreichend exprimiert, so daß positive Klone phänotypisch detektiert werden konnten (Haeckel & Bahl, 1989; Klingbeil et al., 1996; Müller, 1992). Cosmid-Vektoren, die in der Lage sind 30-45 kb-Fragmente aufzunehmen, anschließend *in vitro* in λ -Phagenpartikel verpackt und in einen geeigneten Wirtstamm transduziert werden können, bieten für die Klonierung komplexer Stoffwechselwege bzw. ganzer Gencluster unbestreitbare Vorteile. Daher wurde in *E. coli* EB304 eine Genbank mit dem Cosmid-Vektor pWE15 erstellt und auf NR-abbauende Aktivität auf NR-Agarplatten gescreent. Die Genbank umfaßte etwa 14.000 rekombinante Klone, die das Genom von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y nach Clarke & Carbon, 1976 mit über 99,99 %iger Wahrscheinlichkeit abdeckten und daher auch das Strukturgen der Polyisopren-Dioxygenase mit statistischer Wahrscheinlichkeit enthalten sollten. Jedoch zeigte keiner der getesteten Klone eine sichtbare Aktivität auf NR-Agarplatten. Das Ausbleiben einer meßbaren NR-abbauenden Aktivität in *E. coli* konnte eine Folge einer Reihe verschiedener Faktoren sein. Zum Einen kann es darauf hindeuten, daß das Strukturgen der postulierten Polyisopren-Dioxygenase in *E. coli* nicht oder nur schwach transkribiert bzw. exprimiert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Collmer et al., 1990; Franklin et al., 1981; Ribbons et al., 1979). Sie entdeckten, daß Gene von entfernt verwandten Organismen, wie z.B. *Pseudomonas*, in *E. coli* nur schwach exprimiert werden. Auch Liao et al., 1996 konnten nach Klonierung des *pel*-Gens aus *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in den Cosmid-Vektor

pLAFR3 keine pectinolytische Aktivität für *E. coli* beobachten. Ein rekombinanter *Pseudomonas viridiflava*-Stamm hingegen exprimiert und sekretiert bis zu 5 U/ml Protein ins Medium. Dies spiegelt auch die biologische und physiologische Vielseitigkeit vieler Bodenbakterien wider, über die *E. coli* nicht verfügt. Die geringe Expression von in Cosmid-Vektoren klonierten Genen in *E. coli* kann aber auch durch die Insertgröße und die geringe Kopienzahl der Vektoren bedingt sein. Auch eine Instabilität bestimmter DNA-Fragmente in Cosmid-Vektoren wurde beobachtet (Ducki, 1995; Grupe, 1987). Weiterhin ist es möglich, daß der Promotor des Gens von der RNA-Polymerase in *E. coli* nicht erkannt wird und/oder die auf dem Vektor codierten Promotoren zu weit vom Transkriptionsstartpunkt des gewünschten Gens entfernt liegen. Ähnliches wurde auch schon für zahlreiche Gram-positive *Streptomyces*-Spezies beobachtet. Aufgrund ihres hohen G+C-Gehaltes werden die Promotoren dieser Organismen in *E. coli* häufig nicht erkannt (Bibb & Cohen, 1982). Möglicherweise wurde auch nur ein Teil des gesamten Gens/Genclusters kloniert, so daß die phänotypische Hofbildung auf NR-Agarplatten aufgrund unvollständiger Informationen nicht auftreten kann. Desweiteren ist natürlich auch denkbar, daß zwar eine Expression des Proteins stattfindet, dieses aber entweder nicht aus der Zelle ausgeschleust wird oder aber für seine Aktivität bestimmte Cofaktoren benötigt, die in *E. coli* nicht oder nicht ausreichend zur Verfügung stehen (Binnie et al., 1989). Vor einigen Jahren wurden auch für eine Reihe von Genen, vorwiegend Gram-positiver Organismen, Schwierigkeiten bei der Klonierung und Expression in *E. coli*-Wirtsstämmen beschrieben. Die problematischen Genregionen beinhalteten dabei keine offensichtlich toxischen Informationen für den Gram-negativen Wirt. So konnten z.B. die *mal*-Gene, die an der Umsetzung von Maltosacchariden in *Streptococcus pneumoniae* beteiligt sind, nicht mittels „multi-copy“-Vektoren in *E. coli* kloniert werden (Stassi & Lacks, 1982). Auch heterolog in *E. coli* exprimierte α -Amylasen aus verschiedenen *Bacillus*-Spezies übten eine toxische Wirkung auf den Wirt aus (Nishizawa et al., 1987; Willemot & Cornelis, 1983; Yang et al., 1983). Durch einen Wechsel des Wirtsstammes oder die Verwendung von „low-copy“-Vektoren konnten diese Probleme umgangen werden, wobei die eigentlichen Gründe für die Toxizität unklar blieben.

Eine charakteristische Gemeinsamkeit vieler nicht in *E. coli* klonierbarer (exprimierbarer) Gene wurde in den letzten Jahren entdeckt. Handelt es sich um Gene, die für Lipoproteine codieren, so verfügen diese über eine typische Konsensussequenz

im Signalpeptid des unreifen Proteins, die sowohl in Gram-positiven wie auch Gram-negativen Organismen stark konserviert ist (Bairoch, 1993; Braun & Wu, 1994; von Heinje, 1989). Diese Bereiche werden vom Wirt erkannt, so daß es zu einer Spaltung und Acylierung des Proteins kommt. Die in *E. coli* für die Proteinsekretion verantwortliche „Maschinerie“ beginnt mit dem Export dieser in hoher Konzentration vorhandenen, nicht-zelleigenen Lipoproteine. Dadurch wird der Export wirtseigener Proteine beeinträchtigt und die Kopplung von Transportprozessen an den elektrochemischen Gradienten über die Membran beeinflusst. Dieses führt nachfolgend zu einer Verringerung und letztendlich zum vollständigen Verlust des Membranpotentials, was den Zelltod zur Folge hat (Martin et al., 1989; Sutcliffe & Russell, 1995).

4.3.2.2. Komplementation der *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y-Negativmutanten und Konstruktion eines broad-host-range Cosmides

Nachdem keine NR-abbauende Aktivität in rekombinanten *E. coli*-Klonen meßbar gewesen war, sollte durch Komplementation der NR-Negativmutanten von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y durch eine Genbank eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps erreicht werden. Dazu wurden anhand verschiedener Plasmide zunächst unterschiedliche DNA-Übertragungsmethoden getestet. Es zeigte sich, daß *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y unter den getesteten Bedingungen nicht zur konjugativen Aufnahme von DNA befähigt war. Da eine DNA-Aufnahme durch Elektroporation für verschiedene Gattungen Gram-negativer Bakterien bereits erfolgreich gezeigt werden konnte (Wirth et al., 1989), wurde eine Elektroporation nach einem modifizierten Protokoll für *Pseudomonas*-Elektroporationen durchgeführt (Johann, 1998). In Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid konnten Transformationsraten von 10^3 - $10^6/\mu\text{g}$ DNA erzielt werden, die aufgrund der definierten Bedingungen beim Elektroporationsvorgang auch gut reproduzierbar waren. Nur Plasmide, die eine Kanamycin- oder Tetracyclin-Resistenz besaßen, konnten in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y selektiert werden. Ampicillin, Chloramphenicol oder Trimethoprim eigneten sich aufgrund der natürlichen Resistenz des Organismus nicht zur Selektion von Transformanten. Auffällig war auch, daß die Transformationsraten bei Vektoren, die für eine Kanamycin-Resistenz codierten um den Faktor 10-100 höher waren als bei Vektoren mit einer Tetracyclin-Resistenz. Aufgrund des

Resistenzmechanismus, der bei Kanamycin in einer Phosphorylierung durch die Aminoglycosidphosphotransferase und bei Tetracyclin in einem aktiven Transport des Antibiotikums aus der Zelle heraus besteht, kann diese erhöhte Transformationsrate die für die Zelle ökonomischere Resistenzvariante widerspiegeln. Außerdem gehören die verwendeten Vektoren verschiedenen Inkompatibilitätsgruppen an, so daß der Organismus scheinbar Vektoren der IncP-Gruppe bzw. mit ColE1-*origin* bevorzugt. Da nun kein Cosmid-Vektor mit einer Kanamycin-Resistenz, der sich in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y stabil replizieren konnte, zur Verfügung stand, es aber aufgrund der Schwierigkeiten bei der Ligation der Insert-DNA wünschenswert erschien, die Anzahl an Transformanten möglichst gering zu halten, wurde aus dem broad-host-range Plasmid pBBR1MCS-2 (Kovach et al., 1995) ein Cosmid konstruiert. Nach Einfügen der *cos*-sites aus pHC79 wurde noch, um die Selektion in *E. coli* zu beschleunigen, zusätzlich die Ampicillin-Resistenzcassette aus pBluescript KSII eingefügt. Der erhaltene broad-host-range Cosmid-Vektor pBBR1MCS2cosAmp konnte sich ohne Selektionsdruck über mehrere Generationen stabil in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y replizieren und dürfte daher auch für eine Komplementation der NR-Negativmutanten geeignet sein. Außerdem erlaubt der Vektor aufgrund seiner geringen Größe von 8 kb die Klonierung von DNA-Fragmenten im Bereich von 30-43 kb, so daß auch ein komplexer Abbauweg, wenn er geclustert vorliegt, von einem einzigen Klon repräsentiert sein könnte.

4.4. Proteinbiochemische Untersuchung des NR-Abbaus

4.4.1. Extrazelluläre Enzymaktivität

Obwohl *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y beim Wachstum auf NR-Agarplatten zur Bildung eines Aufklärungshofes um die Kolonien herum befähigt sind und man somit (zumindest temporär) eine extrazelluläre Enzymaktivität erwarten muß, konnte durch Tropftest auf NR-Agarplatten im zellfreien Kulturüberstand dieser Stämme keine NR-abbauende Aktivität festgestellt werden. Auch durch Zugabe unterschiedlicher Metallionen, die für die Aktivität verschiedener anderer Oxygenasen notwendig sind und den spin-verbotenen Elektronenübergang von Sauerstoff auf Kohlenstoff überbrücken (Harayama et al., 1992; Maeng et al., 1996), konnte kein positiver Effekt erzielt werden. Mittels GLC- und GPC-Analysen waren Tsuchii & Takeda, 1990 jedoch in der Lage gewesen, in einem Reaktionsansatz mit NR,

Detergenz, Puffer und eingeengtem NR-Kulturfiltrat von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y als Enzym-Rohextrakt Carbonylverbindungen als Intermediate zu detektieren und somit NR-abbauende Aktivität nachzuweisen. In Anlehnung an die Messungen extrazellulärer PHB-Depolymerase-Aktivität von *Pseudomonas lemoignei* als lineare Trübungsabnahme der Polymersuspension sollte im Rahmen dieser Arbeit NR-abbauende Aktivität ebenfalls durch einen optisch-enzymatischen Test nachgewiesen werden. Allerdings war die Empfindlichkeit dieser Methode scheinbar nicht hoch genug, um auch geringe Aktivitäten noch erfassen zu können, denn es konnte keine NR-abbauende Aktivität festgestellt werden.

4.4.2. NR-Abbau durch *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A und deren Mutanten

Da eine Identifizierung des NR-abbauenden Enzyms über eine Messung der Aktivität nicht möglich gewesen war, wurden Wachstumsversuche mit *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A und deren Verlust- bzw. Gewinnmutanten auf Glucose und/oder NR als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Durch Vergleich des Proteinbandenmusters zwischen den Kulturen sollte dann ein potentielles Protein identifiziert werden, daß spezifisch beim Wachstum der Wildtypen und Gewinnmutanten auf NR gebildet wurde. Sowohl im extrazellulären Kulturfiltrat als auch im Zellextrakt von *S. griseus* 1D und *S. coelicolor* 1A konnte im SDS-PAGE kein Protein identifiziert werden, daß ausschließlich beim Wachstum auf NR exprimiert wurde und in Kulturen der Verlustmutanten nicht vorhanden war. Aufgrund des variierenden Bandenmusters wurde davon ausgegangen, daß das Protein unter den gewählten Versuchsbedingungen möglicherweise nicht stabil war, was ebenso die nicht-meßbare Aktivität erklären würde. Auch die Isolierung und Aufreinigung von Dioxygenasen aus anderen Organismen wurde oftmals durch die Instabilität dieser Enzyme erschwert (Bloch & Hayaishi, 1966; Hayaishi, 1962; Schwartz et al., 1997).

4.4.3. Induktion des NR-Abbaus in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y

Wachstumsversuche mit NR oder DPNR als Kohlenstoff- und Energiequelle ergaben eine Korrelation zwischen maximaler Wachstumsrate und verstärkter Expression eines extrazellulären Proteins von 65 kDa. Dieses Protein wurde in der späten exponentiellen und frühen stationären Phase am stärksten exprimiert und beim Wachstum von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y auf anderen Kohlenstoffquellen wie Glucose, Gluconat

oder Rhamnose nicht gebildet. Daher wurde davon ausgegangen, daß eine Beteiligung dieses 65 kDa-Proteins am NR-Abbau gegeben ist. Ob es sich bei dem Protein jedoch um die postulierte Dioxygenase, die vermutlich die initiale Spaltung des *cis*-1,4-Polyisoprens durchführt, handelt, konnte nicht festgestellt werden. Der Versuch der N-terminalen Aminosäuresequenz-Analyse ergab, daß eine N-terminale Blockierung dieses Proteins vorliegt, wie sie auch schon für andere Exoenzyme beobachtet wurde (Ohnishi et al., 1992; Specka, 1991). Auch bei diesen Proteinen handelt es sich um Lipoproteine, die über die typische Erkennungsstelle der Signalpeptidase, ein Leucinrest in einem Abstand von 3-5 Aminosäuren gefolgt von einem Cystein, verfügen. Solche Lipoprotein-N-Termini sind durch Edman-Abbau nur schwer zugänglich.

4.4.4. Aufreinigung und Spaltung des 65 kDa-Proteins aus *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y, sowie Bestimmung interner Aminosäuresequenzen

Mittels Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel und Gelfiltration an Superdex G200 wurde das 65 kDa-Protein aus dem zellfreien Kulturüberstand NR-gewachsener Zellen von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y angereichert und nahezu vollständig aufgereinigt. Das 65 kDa-Protein eluierte in der Gelfiltration bei einem Elutionsvolumen von 80-90 ml, was gemäß einer mit verschiedenen Proteinen ermittelten Eichkurve für die verwendete Superdex G200-Säule einem Molekulargewicht von 55-65 kDa entspricht. Dieses korrelierte somit mit dem durch SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht von 65 kDa, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß es sich um ein monomeres Enzym handelte. Die beiden als Verunreinigung in der SDS-PAGE aufgetretenen Proteine von 24 kDa und 46 kDa konnten keine Abbauprodukte des 65 kDa-Proteins darstellen, da das 24 kDa-Protein durch Gelfiltration an Superdex G75 teilweise abgetrennt werden konnte. Somit lagen die drei Proteine nicht mehr im gleichen stöchiometrischen Verhältnis vor, wie es im Fall von Abbauprodukten der Fall sein müßte. Dieses Ergebnis konnte auch mittels Nativ-PAGE bestätigt werden. Weitere Versuche, das 65 kDa-Protein durch andere chromatographische Verfahren gänzlich aufzureinigen, waren hingegen nicht erfolgreich. Dieses mag daran liegen, daß die drei Proteine ähnliche Eigenschaften (Ladung, Molekulargewicht, etc.) besaßen, die eine Auftrennung mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht ermöglichte. Die Analyse des partiell aufgereinigten Proteins

mittels 2 D-Elektrophorese erbrachte den Beweis, daß es sich nur um ein Protein von 65 kDa handelt und nicht zwei gleich große Proteine, die einander in der SDS-PAGE überlagern. Außerdem konnte festgestellt werden, daß das 65 kDa-Protein, wie die meisten bakteriellen Proteine, einen IEP im sauren Bereich besitzt. Desweiteren konnten im SDS-PAGE der 2. Dimension zwei kleinere, schwächere Spots beobachtet werden, die sich auf der basischen Seite des Hauptspots befanden. Im Hinblick darauf, daß das 65 kDa-Protein auch in vorausgegangen SDS-PAGEs gelegentlich ein unterschiedliches Laufverhalten zeigte und mal schneller, mal langsamer als das Referenzprotein BSA lief, bestand der Verdacht, daß das Protein, zumindest teilweise, in einer modifizierten Form vorliegt. Posttranslationale Modifizierungen in Form von Glykosylierung (oder Phosphorylierung) beeinflussen das Laufverhalten im SDS-PAGE im Vergleich zu Proteinen ohne Kohlenhydratanteil bzw. Phosphatresten mit gleicher Molekularmasse (Leach et al., 1980; Segrest & Jackson, 1972). Glykosylierte Proteine laufen in der Regel langsamer, da nur der Proteinanteil von SDS-Molekülen besetzt wird und somit die resultierende Nettoladung im Vergleich zur Molekülgröße geringer ausfällt. Natürlich kann auch eine ungewöhnliche Konformation des Proteins das langsamere Laufverhalten erklären. Eine posttranslationale Modifikation des extrazellulären Polypeptids durch proteolytische Aktivität, die zur Entstehung von Isoenzymen führt, ist ebenfalls denkbar. Ähnliches wurde auch für die extrazelluläre PHB-Depolymerase aus *Pseudomonas lemoignei* sowie die PHO-Depolymerase aus *Pseudomonas fluorescens* GK13 vermutet (Briese, 1997; Schirmer, 1994). Desweiteren ist für *E. coli* bekannt, daß Zellen unter Mangel- bzw. Hungerbedingungen nicht mehr alle tRNAs mit Aminosäuren beladen und somit für die Proteinbiosynthese bereitstellen können (Lewin, 1994). Anstelle eines Abbruchs der Proteinbiosynthese kommt es dann zum Einbau alternativer Aminosäuren, die natürlich eine Veränderung des IEPs bewirken können. Auch die NR-Kulturen von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y wurden für die Proteinaufreinigung in der stationären Phase geerntet, so daß also das Eintreten von Mangelbedingungen nicht auszuschließen ist. Der Nachweis einer Glykosylierung des 65 kDa-Proteins ist mit einer Reihe verschiedener Methoden möglich (Periodsäureoxidation, chemische oder enzymatische Deglykosylierung, Lektin-Immudiffusion, MALDI-MS) und könnte mittels Protein-Blot durchgeführt werden ohne eine vollständige Aufreinigung des Proteins notwendig zu machen.

Um die N-terminale Aminosäuresequenz des 65 kDa-Proteins zu bestimmen, wurden

nachfolgend verschiedene chemische und proteolytische Spaltungen des elektroeluierten Enzyms durchgeführt. Die bevorzugte Methode war die chemische Spaltung durch BrCN, da Verunreinigungen durch Fremdproteine vermieden werden. Nach der Spaltung waren jedoch sowohl das eingesetzte Protein als auch die entstandenen Peptidfragmente nicht mehr nachweisbar, während Kontrollspaltungen mit BSA stets erfolgreich waren. Daher wurde angenommen, daß die Peptidfragmente beim Abdampfen der verdünnten Ameisensäure im Speed-vac bzw. im Vakuum mitgerissen wurden. Proteolytische Spaltungen die eine Entfernung des Lösungsmittels unnötig machten, waren zunächst nur bei Einsatz geringer Mengen Protein erfolgreich. Tryptische Spaltungen führten dann zur Bildung verschiedener Peptidfragmente, die einer N-terminalen Aminosäuresequenzierung zugänglich sein sollten.

Die tryptische Spaltung des 65 kDa-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender HPLC-Auftrennung der Peptide führte zu 4 Fragmenten, die eine Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren durch automatisierten Edman-Abbau ermöglichten. Aus den erhaltenen Aminosäuresequenzen wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, mittels derer ein Fragment des für das 65 kDa-Protein codierenden Strukturgens aus chromosomaler DNA von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y amplifiziert werden sollte. Trotz Variation der Hybridisierungstemperatur, sowie der verwendeten Primerzusammensetzungen, -kombinationen und -konzentrationen konnte keine Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes erreicht werden. Dieses war vermutlich auf die starke Degenerierung der verwendeten Primer zurückzuführen. Vergleiche der erhaltenen Aminosäuresequenzen mit in Datenbanken vorhandenen Primärsequenzen erbrachten keine Homolgien zu bekannten Proteinen, so daß davon ausgegangen wurde, daß es sich um ein bislang unbekanntes Protein handelt. Allerdings sind bisher auch nur wenige extrazelluläre Dioxygenasen bekannt. Lediglich das VP14-Protein, das eine oxidative Spaltung eines Epoxy-Carotenoids in der Abscisinsäure-Biosynthese in Mais katalysiert (Schwartz et al., 1997), sowie die Lignostilben- α,β -Dioxygenase aus *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009 (Kamoda & Saburi, 1993; Kamoda & Saburi, 1993) sind untersucht. Sie bilden eine neue Klasse von Dioxygenasen, die die Spaltung einer Doppelbindung in aliphatischen Verbindungen bewirken und zur Bildung von Aldehyden bzw. Ketonen führen. Die konservierten Sequenzen dieser Enzyme wurden weiterhin in zwei ORFs der *Synechocystis*-Genom-Sequenz und in einem Protein, das in Regenbogenhaut von Säugern exprimiert wird

(RPE65), gefunden (Hamel et al., 1993; Kaneko et al., 1996). Allerdings konnte die Funktion dieser Proteine bislang nicht bestimmt werden. Auch ein gezielter Vergleich der durch Edman-Abbau erhaltenen Peptidsequenzen des 65 kDa-Proteins mit den Sequenzen der erwähnten Proteine ergab keine signifikanten Homologien. Da jedoch keine Aktivität des 65 kDa-Proteins meßbar gewesen war, war somit nicht bekannt, ob es sich bei dem untersuchten Protein überhaupt um die für den NR-Abbau postulierte, initiale Dioxygenase handelte. Eine Beteiligung des 65 kDa-Proteins am NR-Abbau sollte aber aufgrund der spezifischen Expression dieses Proteins beim Wachstum auf NR und DPNR gegeben sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch morphologische, physiologische und molekularbiologische Analysen wurden erhebliche Unterschiede zwischen den für die Gattung *Xanthomonas* diagnostischen Eigenschaften und den Charakteristika des in der Literatur als *Xanthomonas* sp. 35Y beschriebenen Organismus festgestellt.
 - 1.1. Die Amplifikation, Sequenzierung und Analyse der 16S-rDNA aus *Xanthomonas* sp. 35Y ergab eine eindeutige Zugehörigkeit zur Untergruppe der γ -Proteobakterien.
 - 1.2. Spektroskopische Untersuchungen erlaubten eine Identifizierung des gelben Pigmentes von *Xanthomonas* sp. 35Y ($C_{27}H_{28}Br_2O_3$, M^+ 560, λ_{\max} (Methanol) 441 nm) als Xanthomonadin-Derivat.
 - 1.3. Aufgrund der Bewertung aller taxonomisch relevanten Eigenschaften wird die Schaffung der neuen Gattung *Pseudoxanthomonas* und die Umbenennung von *Xanthomonas* sp. 35Y in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y vorgeschlagen.
2. Mittels ungerichteter UV-Mutagenese konnten Mutanten von *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A und *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y erzeugt werden, die entweder keine oder aber verstärkte Aufklarungszonen um die Kolonien beim Wachstum auf milchig-trüben NR-Agarplatten bildeten. Auf anderen Polymeren hingegen zeigten sie ein im Vergleich zum Wildtyp unverändertes Abbauverhalten, was auf Mutationen spezifisch für den NR-Abbau hindeutete.
3. Das Screening einer vollständigen Cosmid-Genbank von *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in *E. coli* ergab keine NR-abbauenden Klone, was eine ungenügende Expression der entsprechenden Gene oder eine unzureichende Aktivität der Genprodukte vermuten läßt. Deshalb wurde das broad-host-range-Cosmid pBBR1MCS-2cosAmp konstruiert, das sich in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y stabil repliziert. Mit diesem sollte dann eine Komplementation der durch UV-Mutagenese erzeugten Negativmutanten möglich sein.

4. Ein 65 kDa-Protein, das *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y spezifisch beim Wachstum auf NR- oder DPNR-Latex in hoher Konzentration bildet, wurde weitgehend aufgereinigt.
5. Vier HPLC-getrennte Peptidfragmente des durch Trypsin-verdauten 65 kDa-Proteins wurden einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen ergaben keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Proteinsequenzen. Somit wird davon ausgegangen, daß es sich um ein bislang unbekanntes Protein handelt.

SUMMARY

1. Morphological, physiological and molecular biological analyses revealed significant differences between the characteristics diagnostic for the genus *Xanthomonas* and those of the organism described in the literature as *Xanthomonas* sp. 35Y.
 - 1.1. Amplification, sequencing and analysis of the 16S rRNA sequence resulted in a classification of *Xanthomonas* sp. 35Y into the γ -subgroup of proteobacteria.
 - 1.2. By spectroscopical analyses the yellow pigment of *Xanthomonas* sp. 35Y was identified as a xanthomonadin derivative ($C_{27}H_{28}Br_2O_3$, M^+ 560, λ_{max} (methanol) 441 nm).
 - 1.3. Considering all taxonomically relevant properties the establishment of the new genus *Pseudoxanthomonas* and the reclassification of *Xanthomonas* sp. 35Y as *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y is proposed.
2. By random UV-mutagenesis mutants of *S. griseus* 1D, *S. coelicolor* 1A and *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y were obtained, which formed no or improved clearing zones around the colonies during growth on opaque NR-agar plates. During growth on other polymers these mutants had a phenotype comparable to the wild type which indicated that the mutations were specific for NR-degradation.
3. Screening of a complete cosmid library of *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y in *E. coli* did not reveal any NR degrading clones which led to the supposition that the genes were insufficiently expressed or the gene products were less active in *E. coli*. Therefore a broad host range cosmid vector was constructed which is able to replicate in *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y stably and which should allow a complementation of the negative mutants obtained by UV-mutagenesis.
4. A protein of 65 kDa, which *Pseudoxanthomonas* sp. 35Y specifically expressed in high concentrations during growth on NR or DPNR latex, was almost completely purified.

5. The N-terminal amino acid sequences of four HPLC separated peptides of the trypsin digested 65 kDa protein revealed no significant sequence homologies to other proteins available in public databases. So it is proposed that the 65 kDa protein is a hitherto unknown protein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Achenbach, H., Kohl, W., Reichenbach, H. & Kleinig, H. (1974). Zur Struktur des Flexirubins. *Tetrahedron Lett.* **30**, 2555-2556.

Andrewes, A. G., Hertzberg, S., Liaaen-Jensen, S. & Starr, M. P. (1973). *Xanthomonas* pigments. 2. The *Xanthomonas* "carotenoids" -non-carotenoid brominated aryl-polyene esters. *Acta Chem. Scand.* **27**, 2383-2395.

Andrewes, A. G., Jenkins, C. L., Starr, M. P., Shepherd, J. & Hope, H. (1976). Structure of xanthomonadin I, a novel dibrominated aryl-polyene pigment produced by *Xanthomonas juglandis*. *Tetrahedron Lett.* **45**, 4023-4024.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Babcock, M. J. & Kendrick, K. E. (1988). Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **170**, 2802-2808.

Bachmann, B. J. (1987). Linkage map of *E. coli* K-12. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium- cellular and molecular biology*, pp. 807-876. Edited by F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington D.C., USA: American Society for Microbiology.

Baily, R. C. & Winstanley, D. J. (1986). Inhibition of restriction of *Streptomyces clavuligerus* by heat treatment. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2945-2946.

Bairoch, A. (1993). The prosite dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3097-3103.

Baltz, R. H. (1978). Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 93-102.

Baltz, R. H. & Matsushima, P. (1981). Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 137-146.

Barry, T. (1991). The bovine serumalbumin mRNA. In *GenBank X58989*.

Berekaa, M. M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A. (2000). Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 199-206.

Berkelmann, T. & Stenstedt, T. (1998). *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & methods*: Amersham Pharmacia Biotech Inc.

Bibb, M. J. & Cohen, S. N. (1982). Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 265-277.

Binnie, C., Warren, M. & Butler, M. J. (1989). Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *J. Bacteriol.* **171**, 887-895.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Blaak, H., Schnellmann, J., Walter, S., Henrissat, B. & Schrempf, H. (1993). Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *Eur. J. Biochem.* **214**, 659-669.

Bloch, K. & Hayaishi, O. (1966). *Biological and chemical aspects of oxygenases. Proceedings of the United States-Japan symposium on oxygenases.* Tokyo: Maruzen Company, Ltd.

Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

Bode, H. B., Kerkhoff, K. & Jendrossek, D. (submitted). Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Macromolecules* .

Bode, H. B., Zeeck, A., Plückhahn, K. & Jendrossek, D. (2000). Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic Poly(*cis*-1,4-isoprene) [In Process Citation]. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3680-3685.

Borel, M., Kergomard, A. & Renard, M. F. (1982). Degradation of natural rubber by *Fungi imperfecti*. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 877-881.

Bradbury, J. F. (1984). Genus II. *Xanthomonas*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 199-200. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Braun, V. & Wu, H. C. (1994). Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and a model for protein export. In *New comprehensive biochemistry*, pp. 319-341. Edited by J.-M. Ghuyesen & R. Hakenbeck. Amsterdam: Elsevier Science.

Briese, B. H. (1997). Charakterisierung der Poly(3-Hydroxybutyrat)-Depolymerase A aus *Pseudomonas lemoignei*. In *Institut für Mikrobiologie und Genetik. Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen.*

Bullock, W. O., Fedorak, P. M. & Page, W. J. (1992). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.

Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S. & Fall, R. R. (1978). Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **135**, 324-333.

Castellino, F. J. & Barker, R. (1968). The denaturing effectiveness of guanidinium, carbamoylguanidinium, and guanylguanidinium salts. *Biochemistry* **7**, 4135-4138.

Chester, N. & Marshak, D. R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **209**, 284-290.

Chevet, E., Lemaitre, G. & Katinka, M. D. (1995). Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3343-3344.

Chou, F. L., Chou, H. C., Lin, Y. S., Yang, B. Y., Lin, N. T., Weng, S. F. & Tseng, Y. H. (1997). The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 265-269.

Clarke, L. & Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**, 91-99.

Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. & Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**, 1102-1126.

Collmer, A., Bauer, D. W., He, S. Y., Lindeberg, M., Kelemu, S., Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T. J. & Chatterjee, A. K. (1990). Pectic enzyme production and bacterial plant pathogenicity. In *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, pp. 65-72. Edited by H. Hennecke & D. P. S. Verma. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Cox, K. L. & Baltz, R. H. (1984). Restriction of bacteriophage formation in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **159**, 499-504.

Crawford, D. L. (1978). Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 1041-1045.

Cundell, A. M. & Mulcock, A. P. (1972). Microbiological deterioration of vulcanized rubber. *Int. Biodetn. Bull.* **8**, 119-125.

Delafield, F. P., Cooksey, K. E. & Doudoroff, M. (1965). β -Hydroxybutyric dehydrogenase and dimer hydrolase of *Pseudomonas lemoignei*. *J. Biol. Chem.* **240**, 4023-4028.

Ducki, A. (1995). Molekularbiologische, immunologische und strukturell vergleichende Untersuchungen der thermostabilen Glucoamylase aus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. In *Institut für Mikrobiologie*. Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen.

Duckworth, I. H. (1972/73). Natural rubber. In *Kimia-Publication of the Malaysian Institute of Chemistry*, pp. 70-79.

Eggert, C., Temp, U. & Eriksson, K. E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1151-1158.

Engel, P. (1987). Plasmid transformation of *Streptomyces tendae* after heat attenuation of restriction. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1-3.

Erdtman, H. (1948). Corticrocin, a pigment from the mycelium of a mycorrhiza fungus. *Acta chem. scand.* **2**, 209-219.

Fox, G. E., Peckman, K. J. & Woese, C. R. (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, 44-57.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R., Magrum, L., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N. & Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science* **209**, 457-463.

Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M. & Timmis, K. N. (1981). A molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta*-cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .

Gibson, J., Stackebrandt, E., Zablen, L. B., Gupta, R. & Woese, C. R. (1979). A phylogenetic analysis of the purple photosynthetic bacteria. *Curr. Microbiol.* **3**, 59-64.

Gomez, J. B. & Hamzah, S. (1989). Particle size distribution in *Hevea* latex - some observations on the electron microscopic method. *J. Nat. Rubb. Res.* **4**, 204-211.

Greene, J. R. & Guarente, L. (1987). Subcloning. *Methods Enzymol.* **152**, 512-522.

Gripenberg, J. (1952). Cortisalin, a new polyethanoid pigment. *Acta chem. scand.* **6**, 580-586.

Grupe, H. (1987). Untersuchungen zur Verpackung und Transduktion chromosomaler DNA aus *Clostridium acetobutylicum* mit Hilfe von Cosmiden. In *Institut für Mikrobiologie*. Diplomarbeit: Georg-August-Universität Göttingen.

Gusek, T. W. & Kinsella, J. E. (1992). Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 247-260.

Haeckel, K. & Bahl, H. (1989). Cloning and expression of a thermostable α -amylase gene from *Clostridium thermosulfurogenes* DSM 3896 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 333-338.

Hamel, C. P., Tsilou, E., Pfeffer, B. A., Hooks, J. J., Detrick, B. & Redmond, T. M. (1993). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**, 15751-15757.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E. L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 565-601.

Hayaishi, O. (1962). *Oxygenases*. New York, London: Academic Press Inc.

Heisey, R. M. & Papadatos, S. (1995). Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3092-3097.

Hohn, B. & Collins, J. (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**, 291-298.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins Co.

Hopwood, D. A. (1981). Genetic studies with bacterial protoplasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**, 237-272.

Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. & Schrempf, H. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual*. Norwich: The John Innes Foundation.

Hopwood, D. A., Wright, H. M., Bibb, M. J. & Cohen, S. N. (1977). Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces* [letter]. *Nature* **268**, 171-174.

Ikeda, K., Suzuki, K., Yoshioka, H., Miyamoto, K., Matsujima, T. & Sugiyama, M. (1998). Construction of a new cloning vector utilizing a cryptic plasmid and the highly melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 195-199.

Ikram, A. & Zainul, A. M. (1995). Biodegradation of natural rubber by an actinomycete. In *UNIMAS-MSM 18th Malaysian Microbiology Symposium*. Kuching, Sarawak.

Innis, M. A. & Gelfand, D. H. (1990). Optimization in PCRs. In *Protocols. A guide to methods and applications*, pp. 3-12. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. San Diego, USA: Academic Press, Inc.

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Jaurin, B. & Cohen, S. N. (1984). *Streptomyces lividans* RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcriptional signals. *Gene* **28**, 83-91.

Jendrossek, D., Müller, B. & Schlegel, H. G. (1993). Cloning and characterization of the PHA depolymerase gene locus, *phaZ1*, from *Pseudomonas lemoignei*. *Eur. J. Biochem.* **218**, 701-710.

Jendrossek, D., Schirmer, A. & Schlegel, H. G. (1996). Degradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotech.* **49**, 451-463.

Jendrossek, D., Tomasi, G. & Kroppenstedt, R. M. (1997). Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 179-188.

Jenkins, C. L. & Starr, M. P. (1982). The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Curr. Microbiol.* **7**, 323-326.

Jensen, S. L. (1965). Biosynthesis and function of carotenoid pigments in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **19**, 163-182.

Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J. & Kretz, P. L. (1992). XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR- derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**, 81-83.

Johann, A. (1998). Identifizierung und Charakterisierung regulatorischer Komponenten des Isopropylbenzolabbauweges in *Pseudomonas* sp. JR1. In *Institut für Mikrobiologie und Genetik*. Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen.

Jüttner, F. & Höflacher, B. (1985). Evidence of β -carotene 7,8-(7',8') oxygenase (β -cyclocitral crocetinidial generating) in *Microcystis*. *Arch. Microbiol.* **141**, 337-343.

Kado, C. I. & Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**, 1365-1373.

Kakinuma, S., Ikeda, H. & Omura, S. (1991). Genetic studies of the biosynthesis of kalafungin, a benzoisochromquinone antibiotic. *Tetrahedron* **47**, 6059-6068.

Kakinuma, S., Ikeda, H., Tanaka, H. & Omura, S. (1990). Isolation of restriction-reduced mutants from *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2611-2617.

- Kakinuma, S., Takada, Y., Ikeda, H., Tanaka, H., Omura, S. & Hopwood, D. A. (1991).** Cloning of large DNA fragments, which hybridize with actinorhodin biosynthesis genes, from kalafungin and nanaomycin A methyl ester producers and identification of genes for kalafungin biosynthesis of the kalafungin producer. *J. Antibiot. (Tokyo)* **44**, 995-1005.
- Kalienenko, V. O. (1938).** The role of *Actinomyces* and bacteria in decomposing rubber. *Mikrobiologiya (U.S.S.R.)* **17**, 119-128.
- Kalkus, J. (1992).** Untersuchungen zum Aufbau der Enden des linearen Plasmids pHG207 aus *Nocardia opaca*. In *Institut für Mikrobiologie*. Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen.
- Kamoda, S. & Saburi, Y. (1993).** Cloning, expression, and sequence analysis of a lignostilbene- α,β -dioxygenase gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 926-930.
- Kamoda, S. & Saburi, Y. (1993).** Structural and enzymatical comparison of lignostilbene- α,β -dioxygenase isozymes, I, II, and III, from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 931-934.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Katz, E., Thompson, C. J. & Hopwood, D. A. (1983).** Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2703-2714.
- Kendrick, K. E. & Wheelis, M. L. (1982).** Histidine dissimilation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2029-2040.
- Keursten, G. T. & Groenevelt, P. H. (1996).** Biodegradation of rubber particles in soil. *Biodegradation* **7**, 329-333.
- Kieser, T. & Hopwood, D. A. (1991).** Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement. *Methods Enzymol.* **204**, 430-458.
- Kirk, T. K., Tien, M., Kersten, P. J., Mozuch, M. D. & Kalyanaraman, B. (1986).** Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* **236**, 279-287.
- Klingbeil, B., Kroppenstedt, R. M. & Jendrossek, D. (1996).** Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**, 215-221.

Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Leach, B. S., Collawn, J. F. & Jr., F., W. W. (1980). Behaviour of glycopolypeptides with empirical molecular weight estimation methods. 1. in sodium dodecylsulfate. *Biochemistry* **19**, 5734-5741.

Lengeler, J. W., Drews, G. & Schlegel, H. G. (1999). *Biology of the prokaryots*, 1st edn. Stuttgart: Thieme Verlag.

Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford: Oxford University Press.

Liao, C. H., Gaffney, T. D., Bradley, S. P. & Wong, L. C. (1996). Cloning of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and comparison of its sequence relationship with *pel* genes of soft-rot *Erwinia* and *Pseudomonas*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**, 14-21.

Liao, C. H., Sasaki, K., Nagahashi, G. & Hicks, K. B. (1992). Cloning and characterization of a pectate lyase gene from the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**, 301-308.

Lindley, H. K., Deeble, V. J., Peschke, U., O'Neill, M., Baumberg, S. & Cove, J. (1995). Dependence on reporter gene of apparent activity in gene fusions of a *Streptomyces griseus* streptomycin biosynthesis promoter. *Can. J. Microbiol.* **41**, 407-417.

Linos, A., Berekaa, M. M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H. C., Kroppenstedt, R. M. & Steinbüchel, A. (2000). Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1639-1645.

Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A. (2000). A gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic *cis*-1, 4-polyisoprene. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 155-161.

Linos, A. & Steinbüchel, A. (1998). Microbial degradation of natural and synthetic rubbers by novel bacteria belonging to the genus *Gordona*. *Kautsch. Gummi Kunstst.* **51**, 496-499.

Linos, A., Steinbüchel, A., Sproer, C. & Kroppenstedt, R. M. (1999). *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 4**, 1785-1791.

Lomovskaya, N. D., Chater, K. F. & Mkrtumian, N. M. (1980). Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. *Microbiol. Rev.* **44**, 206-229.

Lomovskaya, N. D., Mkrtumian, N. M., Gostimskaya, N. L. & Danilenka, V. N. (1972). Characterization of the temperate actinophage Φ C31 isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Virol.* **9**, 258-262.

Low, F. C., Tan, A. M. & John, C. K. (1992). Microbial degradation of natural rubber. *J. Nat. Rubb. Res.* **7**, 195-205.

Lowry, J. R., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, J. R. (1951). Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

MacNeil, D. J. (1987). Introduction of plasmid DNA into *Streptomyces lividans* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **42**, 239-244.

Maeng, J. H., Sakai, Y., Tani, Y. & Kato, N. (1996). Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* **178**, 3695-3700.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, N. Y.: Cold Spring Harbour Laboratory.

Martin, B., Alloing, G., Boucraut, C. & Claverys, J.-P. (1989). The difficulty of cloning *Streptococcus pneumoniae mal* and *ami* loci in *Escherichia coli* - toxicity of *malX* and *amiA* gene products. *Gene* **80**, 227-238.

Mayer, F. & Spiess, E. (1976). Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden: Negativ-Kontrastierung. In *Begleiveröffentlichung C 1191. Inst. wiss. Film, Göttingen*.

Mazodier, P., Petter, R. & Thompson, C. (1989). Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **171**, 3583-3585.

Mazy-Servais, C., Baczkowski, D. & Dusart, J. (1997). Electroporation of intact cells of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces vinaceus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 135-138.

Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**, 328-334.

Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R. & Kluepfel, D. (1986). Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene* **49**, 323-329.

Müller, B. (1992). Reinigung und Charakterisierung von Poly(Hydroxyalkanoat)-Depolymerasen aus *Pseudomonas lemoignei* und Klonierung der Gene. In *Institut für Mikrobiologie*. Diplomarbeit: Georg-August-Universität Göttingen.

Murooka, Y., Ishizaki, T., Nimi, O. & Maekawa, N. (1986). Cloning and expression of a *Streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptomyces lividans* with plasmid pIJ702. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1382-1385.

Nishizawa, M., Ozawa, F. & Hishinuma, F. (1987). Molecular cloning of an amylase gene of *Bacillus circulans*. *DNA* **6**, 255-265.

Ohnishi, H., Sakai, H. & Ohta, T. (1992). Purification and some properties of a glucoamylase from *Clostridium* sp. G0005. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1901-1902.

Ohnuki, T., Imanaka, T. & Aiba, S. (1983). Isolation and characterization of pock-forming plasmids for *Streptomyces griseus* from soil actinomycetes. *Gene* **25**, 155-159.

Okanishi, M., Katagiri, K., Furumai, T., Takeda, K., Kawaguchi, K., Saitoh, M. & Nabeshima, S. (1983). Basic techniques for DNA cloning and conditions required for streptomycetes as a host. *J. Antibiot. (Tokyo)* **36**, 99-108.

Okanishi, M., Suzuki, K. & Umezawa, H. (1974). Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389-400.

Olsen, J. A. & Hayaishi, O. (1965). The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1364-1369.

Palleroni, N. J. (1984). Family I. *Pseudomonadaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Pfennig, N. (1974). *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of the rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol.* **100**, 197-206.

Pigac, J. & Schrempf, H. (1995). A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 352-356.

Pirnik, M. P. (1977). Microbial oxidation of methyl branched alkanes. *Crit. Rev. Microbiol.* **5**, 413-422.

Poplawsky, A. R. & Chun, W. (1997). *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* **179**, 439-444.

Poplawsky, A. R. & Chun, W. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 466-475.

Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**, 711-753.

Priest, F. G. (1992). Synthesis and excretion of extracellular enzymes in bacteria. In *Microbial degradation of natural products*, pp. 1-25. Edited by G. Winkelmann. Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH.

Rajagopal, L., Sundari, C. S., Balasubramanian, D. & Sonti, R. V. (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.* **415**, 125-128.

Reichenbach, H., Kleinig, H. & Achenbach, H. (1974). The pigments of *Flexibacter elegans*: novel and chemosystematically useful compounds. *Arch. Microbiol.* **101**, 131-144.

Ribbons, D. W., Wigmore, G. J. & Chakrabarty, A. M. (1979). Expression of TOL genes in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Soc. Gen. Microbiol. Quart.* **6**, 24-25.

Roberts, R. J. (1983). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**, 135-167.

Rook, J. J. (1955). Microbiological deterioration of vulcanized rubber. *Appl. Microbiol.* **3**, 302-309.

Rothe, B., Roggentin, R., Frank, R., Blöcker, H. & Schauer, R. (1989). Cloning, sequencing and expression of a sialidase gene from *Clostridium thermosulfurogenes* EM1. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 3087-3096.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Schirmer, A. (1994). Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zum extrazellulären Abbau von Polyhydroxyalkanoaten durch *Pseudomonas fluorescens* GK13. In *Institut für Mikrobiologie*. Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen.

Schlegel, H. G., Kaltwasser, H. & Gottschalk, G. (1961). Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Microbiol.* **38**, 209-222.

Schlochtermeier, A., Niemeyer, F. & Schrempf, H. (1992). Biochemical and electron microscopic studies of the *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase) in its mycelium-associated and extracellular forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3240-3248.

Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. & McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872-1874.

Segrest, J. P. & Jackson, P. (1972). Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Methods Enzymol.* **28**, 54-63.

Seubert, W. (1960). Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. *J. Bacteriol.* **79**, 426-434.

Seubert, W. & Fass, E. (1964). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isopenoiden. IV. Reinigung und Eigenschaften der β -Isohexenylglutaconyl-CoA-Hydratase und β -Hydroxy- β -Isohexenylglutaryl-CoA-Lyase. *Biochem. Z.* **341**, 23-24.

Seubert, W. & Fass, E. (1964). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isopenoiden. V. Der Mechanismus des Isopenoid-Abbaus. *Biochem. Z.* **341**, 35-44.

Seubert, W., Fass, E. & Remberger, U. (1963). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isopenoiden. III. Reinigung und Eigenschaften der Geranyl-Carboxylase. *Biochem. Z.* **338**, 265-275.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.

Shirahama, T., Fumumai, T. & Okanishi, M. (1981). A modified regeneration method for Streptomyces protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1271-1273.

Siddiqui, R. A., Schlegel, H. G. & Meyer, M. (1988). Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J. Bacteriol.* **170**, 4188-4193.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 784-791.

Söhngen, N. L. & Fol, J. G. (1914). Die Zersetzung des Kautschuks durch Mikroben. *Zbl. Bakt., II. Abt.* **40**, 87-98.

Sokol, P. A., Darling, P., Woods, D. E., Mahenthalingam, E. & Kooi, C. (1999). Role of ornibactin biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia*: characterization of *pvdA*, the gene encoding L-ornithine N(5)-oxygenase. *Infect. Immun.* **67**, 4443-4455.

Southern, E. M. (1979). Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **100**, 319-323.

Specka, U. (1991). Isolierung und Charakterisierung einer thermostabilen Glucoamylase aus *Clostridium thermosaccharolyticum*. In *Institut für Mikrobiologie*. Dissertation: Georg-August-Universität Göttingen.

Specka, U., Mayer, F. & Antranikian, G. (1991). Purification and properties of a thermoactive glucoamylase from *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2317-2323.

Spence, D. & van Niel, C. B. (1936). Bacterial decomposition of the rubber in *Hevea* latex. *Ind. Eng. Chem.* **28**, 847-850.

Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31-43.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846-849.

Stackebrandt, E., Murray, R. G. E. & Trüper, H. G. (1988). *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 321-325.

Starr, M. P., Jenkins, C. L., Bussey, L. B. & Andrewes, A. G. (1977). Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch. Microbiol.* **113**, 1-9.

Starr, M. P. & Stephens, W. L. (1964). Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* **87**, 293-302.

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.

Stassi, D. L. & Lacks, S. A. (1982). Effect of strong promoters on the cloning in *Escherichia coli* of DNA fragments from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **18**, 319-328.

Stephens, W. L. & Starr, M. P. (1963). Localization of carotenoid pigment in the cytoplasmic membrane of *Xanthomonas juglandis*. *J. Bacteriol.* **86**, 1070-1074.

Subramaniam, A. (1995). The chemistry of natural rubber latex. *Immunol. Allergy Clin.* **15**, 1-20.

Sutcliffe, I. C. & Russell, R. R. B. (1995). Lipoproteins of Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **177**, 1123-1128.

Sutcliffe, I. C., Tao, L., Ferretti, J. J. & Russell, R. R. B. (1993). MsmE, a lipoprotein involved in sugar transport in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **175**, 1853-1855.

Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M. & De Ley, J. (1983). Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 409-413.

Tarr, G. E. (1986). Manual Edman sequencing systems. In *Methods of protein microcharacterization, a practical handbook*, pp. 155-194. Edited by J. E. Shively. Clifton, NJ: Humana Press.

Terpe, K., Kerkhoff, K., Pluta, E., Jendrossek, D. (1999). Relationship between succinate transport and production of extracellular poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase in *Pseudomonas lemoignei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1703-1709.

Thompson, C. J., Ward, J. M. & Hopwood, D. A. (1982). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol.* **151**, 668-677.

Thompson, D. & Larson, G. (1992). Western blots using stained protein gels. *BioTechniques* **12**, 656-658.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Tien, M. & Kirk, T. K. (1984). Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2280-2284.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**, 4350-4354.

Tsuchii, A., Hayashi, K., Hironiwa, T., Matsunaka, H. & Takeda, K. (1990). The effect of compounding ingredients on microbial degradation of vulcanized natural rubber. *J. Appl. Pol. Sci.* **41**, 1181-1187.

Tsuchii, A., Suzuki, T. & Fukuoka, S. (1984). Bacterial degradation of 1,4-type polybutadiene. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 621-625.

Tsuchii, A., Suzuki, T. & Takahara, Y. (1979). Microbial degradation of *cis*-1,4-polyisoprene. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2441-2446.

Tsuchii, A., Suzuki, T. & Takeda, K. (1985). Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 965-970.

Tsuchii, A. & Takeda, K. (1990). Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 269-274.

Tsuchii, A., Takeda, K., Suzuki, T. & Tokiwa, Y. (1996). Colonization and degradation of rubber pieces by *Nocardia* sp. *Biodegradation* **7**, 405-413.

Tsuchii, A., Takeda, K. & Tokiwa, Y. (1996). Degradation of the rubber in truck tires by a strain of *Nocardia*. *Biodegradation* **7**, 405-413.

Tsuchii, A. & Tokiwa, Y. (1998). Microbial degradation of natural rubber. In *Proceedings of the international symposium*.

Valentine, R. C., Shapiro, B. M. & Stadtman, E. R. (1968). Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **7**, 2143-2152.

Van den Mooter, M. & Swings, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 348-369.

van Zyl, E. & Steyn, P. L. (1992). Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maltophilia* and taxonomic criteria in this genus. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 193-198.

Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y. G., Donadio, S. & Hutchinson, C. R. (1989). Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bacteriol.* **171**, 5872-5881.

Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.

von Heinje, G. (1989). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Prot. Eng.* **2**, 531-534.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464.

Willemot, K. & Cornelis, P. (1983). Growth defects of *Escherichia coli* cells which contain the gene of an α -amylase from *Bacillus coagulans* on a multicopy plasmid. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 311-319.

Wirth, R., Friesenegger, A. & Fiedler, S. (1989). Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 175-177.

Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J. & Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *System. Appl. Microbiol.* **6**, 143-151.

Yang, M., Galizzi, A. & Henner, D. (1983). Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **11**, 237-249.

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.

DANKSAGUNGEN

Herrn PD Dr. D. Jendrossek danke ich für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen eines sehr selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens.

Bei Herrn Prof. Dr. G. H. Braus möchte ich mich für die (kurzfristige) Übernahme des Referates und die zur Verfügungstellung von Räumlichkeiten in der Endphase meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. W. Liebl und Herrn Dr. W. Streit danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe während der letzten Monate.

Ebenso bin ich Frau Prof. Dr. H. Schrempf und den Mitgliedern der gesamten „AGM“, sowie Prof. Dr. W. Piepersberg und seinem „Männerlabor“, insbesondere Sven Thamm, dankbar für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei Streptomyccetenproblemen.

Dr. H. U. Mösch und Olav Grundmann danke ich für hilfreiche Tips und das kritische Korrekturlesen des Manuskriptes.

Desweiteren bedanke ich mich bei Dr. M. Hoppert für seine unermüdliche Geduld bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten, sowie Kerstin Helmstaedt für die Einführung in Proteinaufreinigungstechniken und ihre jederzeitige Hilfsbereitschaft.

Ich danke Dr. Kratzin, Dr. Mavridis, Dr. H. B. Bode, Elke Heinz und Christiane Scherp für ihre Hilfe und Unterstützung bei speziellen Techniken.

Allen ehemaligen Mitgliedern der Labore 44 und 48, René Handrick, Christian Thiel, Kay Terpe, Naimeh Taheri, Till Sander, Ulrike Technow, Ute Schöber, Bernd Holger Briese, Gianpaolo Tomasi und Letizia Focarete danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Bei allen jetzigen (und ehemaligen) Mitgliedern der Labore 44 und 37, Martin

Armbrecht, Carsten Raasch, Plamena Entcheva, Ole Fütterer, Kai Hofmann, Elke Heinz, Arnim Wiezer, Catrin Weber, Patrick Müller, Julia Busse, Ute Ludwig, Mladen Tzvetkov, Manuala Köthe, Christel Schmeißer und Birgit Veith möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein Dankeschön geht auch an das Team der Werkstatt Charlie Bertram, Gerd Birke und Jürgen Steckel für ihr offenes Ohr bei anfallenden Problemen.

Allen Mitgliedern der AG Braus danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das Gefühl der Dazugehörigkeit auch bei außerwissenschaftlichen Aktivitäten, sowie allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen und hier keine namentliche Erwähnung finden.

Nicht zuletzt geht ein besonders herzliches Dankeschön an meine Eltern und Schwestern für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch während meines gesamten Studiums, sowie natürlich Olav Grundmann, der mir sowohl wissenschaftlich als auch privat sehr viel Rückhalt gegeben hat und ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

| | |
|------------------------------|--|
| 06. Mai 1972 | geboren in Moers |
| 1978 - 1982 | Besuch der Städtischen Gemeinschaftsgrundschule Moers-Hülsdonk |
| 1982 - 1991 | Besuch des Gymnasiums in den Filder Benden |
| Juni 1991 | Allgemeine Hochschulreife |
| Oktober 1991 | Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen für das Studienfach Biologie (Diplom) |
| Oktober 1993 | Diplomvorprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie |
| November 1995 | Diplomprüfung in Mikrobiologie (Hauptfach), Immunologie und Organischer Chemie |
| Dezember 1995 – Februar 1997 | Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen unter Anleitung von PD Dr. D. Jendrossek mit dem Titel: „Untersuchungen zur Transkriptionsregulation der PHA-Depolymerasen aus <i>Pseudomonas lemoignei</i> “ |
| März 1997 | Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation |