

**Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die Cu-
abhängige dissimilatorische Nitritreduktase
und
deren Anwendung zum *in situ*-Nachweis der
Denitrifikationsaktivität von Bakterien**

Sigrun Metz

**GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Institut für Bodenökologie**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

eingereicht am 31. 10. 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 03. 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH unter der Leitung von Prof. Dr. A. Hartmann und Dr. M. Schloter angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. A. Hartmann für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Gelingen der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine menschliche Art.

Herrn Prof. Dr. J. C. Munch für die komfortable Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Herrn Dr. M. Schloter für die kompetente fachliche Betreuung, viele Diskussionen und sein beständiges Interesse an der Arbeit mit Antikörpern, selbst in Zeiten der Oligonukleotidsonden und der Genomforschung.

Herrn Prof. Dr. J. Overmann für die Bereitschaft das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Herrn T. Durkaya für die ausführliche und kompetente Einweisung in die Hybridoma-Technik und viele andere Hilfestellungen.

den „Spurengaslern“, namentlich Herrn Dr. R. Ruser und Herrn F. Buegger für die Hilfe beim Bestimmen der N₂O-Mengen.

Herrn Dr. C. Klaus, Institut für Strahlenbiologie GSF, für Tips beim Klonieren.

Frau Dr. M. Stoffels und Herrn Dr. B. Mogge für die Unterstützung am LSM.

Herrn Dr P. Hutzler (GSF) für die Möglichkeit am LSM arbeiten zu können und Herrn Dr. W. Beisker (GSF) für die gemeinsamen Analysen am Durchflusszytometer.

Herrn Dr. Nishiyama, Universität Tokyo, für die Bereitstellung des polyklonalen anti-dNIR-Serums und des Organismus *Alcaligenes faecalis* S6.

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung finanzieller Mittel im Rahmen des Schwerpunktprogrammes „Struktur- und Funktionsanalyse mikrobieller Lebensgemeinschaften“.

Frau Dr. R. Schulze, für ihre „proofreading-Aktivität“ und Diskussionen bei der Entstehung dieses Manuskriptes, für ihre aufmunternden und lieben, aber auch ihre kritischen Worte zur richtigen Zeit, viele schöne Stunden und Verständnis dafür, dass ich ihr neues zu Hause nach 7 Monaten noch immer nicht in Augenschein genommen habe.

Frau M. Jontofsohn für ihre liebe, witzige und durch nichts zu erschütternde Art und eine schöne Zeit auch ausserhalb der Grenzen der GSF.

allen ehemaligen und jetzigen Kollegen am Insitut für das gute und lockere Arbeitsklima, besonders dem „15.30 h-Tee-und Kaffeekränzchen“. Franz Osl, Martin Brommond und allen anderen Zivis, Hiwis und FÖJs, deren unverbrauchte Art immer für ein besonderes Flair am Iboe sorgte. Frau Birgit Huber für die „Orientierungshilfe“ beim Start am IBOe, Frau B. Eckert für schöne Gespräche und Frau A. Hagn, dass sie mir eine Leidensgenossin zum Probenehmen bei Windstärke 8 war.

meinem „grossen kleinen“ Bruder für die Betreuung bei Computerabstürzen, selbst über die Entfernung bis ins Frankenland hinweg.

Mein grösster Dank jedoch muss meinen Eltern gelten, die mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt haben und immer wieder bewiesen haben, dass auf sie jederzeit und ohne Einschränkung Verlass ist.

Inhaltsverzeichnis:

INHALTSVERZEICHNIS:	III
ABKÜRZUNGEN:	VIII
A. EINLEITUNG	1
1. Methoden zum Nachweis von <i>in situ</i> -Aktivitäten.....	1
2. Antikörper als molekulare Sonden in der mikrobiellen Ökologie.....	2
3. Denitrifikation, ein wichtiger Prozess im Kreislauf des Stickstoffes.....	5
4. Aufgabenstellung.....	7
B. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Verwendete Mikroorganismen und molekulare Sonden	8
1.1 Versuchsorganismen	8
1.2 Stammhaltung.....	9
1.3 Reinheitskriterien für die Versuchsorganismen	9
1.4 Kulturmedien.....	9
1.5 Kulturbedingungen.....	11
1.5 Molekulare Sonden	12
2. Probenmaterial	12
2.1 Klärschlammproben aus der Anlage München Großlappen	12
2.2 Nachweis denitrifizierender Bakterien an Weizenwurzeln.....	13
2.2.1 Sterilisation, Anzucht und Inokulation.....	13
2.2.2 Präparation der Wurzeln.....	14
2.2.3 Extraktion der Bakterien aus der Rhizosphäre von inokulierten Pflanzen.....	15
3. Fixierungsmethoden	15
3.1 Fixierung mit Paraformaldehyd	15
3.2 Fixierung mit Ethanol.....	15
4. Zellaufschluss und Herstellung des zellfreien Rohextraktes	15
5. Methoden zur Enzymanreicherung	16
5.1 Säulenchromatografie.....	16
5.2 Einengen von Enzympräparaten.....	16
5.3 Elektroelution der Cu-dNIR aus einer Acrylamid-Matrix	17
6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	17
6.1 SDS-Gelelektrophorese.....	17
6.2 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese.....	19
6.3 Silberfärbung.....	21
6.4 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.....	22
7. Methoden zur Proteinbestimmung	22

7.1	Proteinbestimmung nach Lowry	22
7.2	Proteinbestimmung im Schnelltest mit dem Bio-Rad Protein Assay.....	23
8.	Methoden zur Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität	24
8.1	Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität mit dem artifiziellen Elektronendonator Methylviologen	24
8.1.1	Testprinzip:.....	24
8.1.2	Bestimmung im flüssigen Test mittels Photometer.....	24
8.1.3	Aktivitätstest für die dissimilatorische Nitritreduktase im nicht- denaturierenden PAGE.....	25
8.2	Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität durch Gaschromatografie	26
8.2.1	Vorbereitung der Gasproben	26
8.2.2	Bestimmung von N ₂ O	26
9.	Präparation von DNS.....	26
9.1	Präparation genomischer DNS	26
9.2	Präparation von Plasmid-DNS	27
9.3	Agarosegelelektrophorese	27
9.4	Präparation von DNS-Fragmenten aus einer Agarosematrix.....	28
9.5	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNS	28
10.	Enzymatische DNS-Modifikationen	29
10.1	Restriktionsverdau mit DNS-Endonukleasen.....	29
10.2	Vorbereitung des Klonierungsvektors pQE 13 für die Ligation.....	30
10.3	Ligation von DNS-Fragmenten:.....	30
11.	Transfer von Plasmid-DNS in Bakterien	31
11.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	31
11.2	Transformation von Bakterien	31
11.3	Identifizierung rekombinanter Klone	31
11.3.1	Anlegen einer „Master-Platte“ mit transformierten <i>E. coli</i> -Zellen	31
11.3.2	Mini-Expressionskulturen zum Screening nach Cu-dNir-positiven <i>E. coli</i> - Klonen	32
11.3.3	PCR zum Nachweis der CudNIR	32
12.	In vitro Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
12.1	Amplifizierung des gesamten Gens für dissimilatorische, kupfer-abhängige Nitritreduktase aus <i>Alcaligenes faecalis</i> S6	33
12.2	Amplifizierung einer konservierten Teilsequenz der dissimilatorischen, kupferabhängigen Nitritreduktase	35
12.3	Aufreinigung und Aufkonzentrieren der PCR-Produkte.....	36
13.	Klonierung von <i>nirK</i> in den Expressionsvektor pQE 13.....	36
13.1	Der Vektor pQE 13	36
14.	Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Hybridoma-Zelllinien.....	38
14.1	Immunisierung der Versuchstiere	38
14.2	Zellfusion von Milzzellen der immunisierten Versuchstiere mit Myelomzellen....	39
14.3	Kultivierung der fusionierten Zellen	40
14.4	Screenen nach Zelllinien, die Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren .	40
14.5	Gewinnung und Lagerung der monoklonalen Antikörper	41
14.6	Aufbewahrung von Hybridoma-Zelllinien.....	41

14.7	Auftauen von Zelllinien	42
14.8	Gewinnung von Feederzellen.....	42
14.9	Kultivierung der Myelomzelllinie X63AG8.563	42
14.10	Zellkulturmedien	43
14.10.1	Serumfreies Medium RPMI 1640	43
14.10.2	Serumhaltiges Medium	43
15.	Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse der monoklonalen Antikörper	43
16.	Antikörper-Techniken	44
16.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	44
16.1.1	Beschichtung der Testplatten	44
16.1.2	Indirekter ELISA mit Peroxidase-gekoppeltem anti- Maus-Antikörper.....	45
16.1.3	Indirekter ELISA mit Biotin-gekoppeltem anti- Maus-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	45
16.1.4	Detektion und Auswertung.....	46
16.2	Western Blotting	46
16.2.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose membran	46
16.2.2	Immunodetektion mit Chemolumineszenz.....	47
16.3	Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern.....	48
16.3.1	Behandlung mit Lysozym	48
16.3.2	Markierung in Lösung.....	49
16.3.3	Markierung auf Objektträger.....	49
16.3.4	Doppelmarkierung mit monoklonalem Antikörper und rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden	50
16.3.5	Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI).....	51
17.	Mikroskopie	51
17.1	Einbettung	51
17.2	Epifluoreszenz-Mikroskopie	52
17.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	52
18.	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	53
C.	ERGEBNISSE.....	54
1.	Gewinnung der Cu-abhängigen dissimilatorischen Nitritreduktase.....	54
1.1	Präparation aus <i>Ochrobactrum anthropi</i> über Chromatografie und einer Acrylamid-Matrix	54
1.1.1	Gewinnung der Zellmasse.....	55
1.1.2	Gewinnung des zellfreien Rohextraktes und Abtrennung hitzelabiler Proteine ..	56
1.1.3	Reinigung über DEAE-Cellulose	56
1.1.4	Reinigung über Molekularsieb Sephacel S 200	57
1.1.5	Auftrennung mit nativer PAGE und anschließende Elektroelution	58
1.1.6	Reinheitskontrolle im SDS-PAGE.....	59
1.2	Präparation aus <i>Alcaligenes faecalis</i> S6 mittels Epitop-tagging.....	60
1.2.1	Amplifizierung des <i>nirK</i> -Gens von genomischer DNS aus <i>Alcaligenes faecalis</i> S6	60
1.2.2	Klonierung des <i>nirK</i> -Gens aus <i>Alcaligenes faecalis</i> S6 in den Expressionsvektor pQE13	61
1.2.3	Überprüfung der Transformanten auf Insertion von <i>nirK</i>	62

1.2.3.1	Amplifikation von <i>nirK</i> mit den Primern NIR- C und NIR-N.....	63
1.2.3.2	Expression der rekombinanten Cu-dNIR	63
1.2.4	Kontrolle der Insertion von <i>nirK</i>	64
1.2.5	Zeitlicher Verlauf der Expression von Cu-dNIR	65
1.2.6	Aufreinigung des Enzyms durch Metall-Affinitätschromatografie und Reinheitskontrolle im SDS-PAGE.....	65
2.	Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Cu-dNIR	68
2.1	Immunisierung	68
2.2	Selektion von Hybridomalinien, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren.....	69
3.	Charakterisierung der ausgewählten Antikörper	72
3.1	Spezifität/Kreuzreaktionen.....	72
3.2	Sensitivität	73
3.3	Bestimmung der Klassen und Subklassen der anti-dNIR Antikörper.....	74
4.	Anwendungen	74
4.1	Differenzierung zwischen Cu-dNIR-induzierten und nicht induzierten Zellen im Western Blot.....	74
4.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Markierungen	75
4.2.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Markierungen an Reinkulturen.....	76
4.2.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Doppelmarkierungen mit dem Antikörper mAkdNIR1a und rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonde.....	78
4.3	Expressionsstudien von CudNIR nach Shift einer aeroben Bakterienkultur zum anaeroben Milieu.....	79
4.4	Sortierung denitrifizierender Bakterien mit dem Durchflusszytometer über anti- dNIR-Antikörper vermittelte Fluoreszenz	82
4.5	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Markierungen in Umweltproben	84
4.5.1	Nachweis denitrifizierender Bakterien an Weizenwurzeln.....	84
4.5.2	Nachweis denitrifizierender Bakterien im Klärschlamm.....	86
D	DISKUSSION	90
1.	Anforderungen an ein Detektionsystems für den <i>in situ</i>-Nachweis von Denitrifikationsaktivität	90
2.	Monoklonale Antikörper gegen Cu-dNIR	92
2.1	Diversität der Cu-dNIR	92
2.2	Strategien zur Gewinnung von Cu-dNIR	95
2.2	Charakterisierung der anti-dNIR-Antikörper mAkdNIR1a und mAkdNIR29	97
3.	<i>In situ</i>-Anwendungen der anti-Cu-dNIR-Antikörper.....	99
3.1	Sortierung Cu-dNIR-induzierter Bakterien durch Antikörper-vermittelte Fluoreszenz mit dem Durchflusszytometer.....	100
3.2	Immunofluoreszenz-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in Laborkulturen... ..	101
3.3	Immunofluoreszenz-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in Umweltproben.. ..	102
3.3.1	Denitrifikation in der Rhizosphäre.....	102
3.3.2	Immunofluoreszenz-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in Klärschlamm	103

4. Ausblick: Anwendungsmöglichkeiten serologischer Testsysteme für <i>in situ</i>- Untersuchungen wichtiger mikrobieller Leistungen in Ökosystemkompartimenten..	104
E ZUSAMMENFASSUNG:	107
F LITERATUR:	109
H ANHANG.....	118
Abbildungsverzeichnis.....	118
Lebenslauf.....	120

Abkürzungen:

A	Adenin, Ampere, Absorption
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-Sulfonsäure]
A. dest	destilliertes Wasser
A demin.	über einen Ionenaustauscher gereinigtes Wasser
AgNO ₃	Silbernitrat
BP	Bandpassfilter
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
cm	Zentimeter
Cu-dNIR	kupfer-abhängige dissimilatorische Nitritreduktase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DNase	Desoxyribonuklease
dNIR	dissimilatorische Nitritreduktase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Immunosorbentansatz (enzyme linked immunosorbent assay)
<i>et al.</i>	et alteri
EtOH	Ethanol
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm; Fallbeschleunigung
GC	Gaschromatograph
h	Stunde
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobase
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LMG	belgische Stammsammlung für Mikroorganismen

LP	Langpassfilter
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
μ	Mikro (10^{-6})
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NB	Nutrient Broth
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
<i>nirK</i>	Strukturgen für die dissimilatorische kupfer-abhängige Nitritreduktase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonale Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
POD	Meerrettichperoxidase
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN	über Nacht
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w	Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

A. Einleitung

Mikroorganismen sind an globalen Stoffkreisläufen der Elemente wie C, N, P und S maßgeblich beteiligt. Sie sind verantwortlich für eine Vielzahl an biogeochemischen Prozessen in der Umwelt (Schlegel, 1992). Die katalytischen Fähigkeiten bekannter Mikroorganismen wurden in der Vergangenheit hauptsächlich im Labor, also anhand von Isolaten, untersucht. Da aber bisher nur ein kleiner Teil der existierenden Prokaryonten kultiviert werden konnte (Amann *et al.*, 1995; Torsvik *et al.*, 1990), ist nicht geklärt, in welchem Maße die untersuchten Organismen in der Umwelt für den jeweiligen Prozess verantwortlich sind. Weiterhin ist nicht mit ausreichender Sicherheit geklärt, ob die unter Laborbedingungen entwickelten Modelle für die Regulation einer stoffwechselphysiologischen Leistung auf Habitate in der Umwelt übertragbar sind. Mit anderen Worten zeigen Laborexperimente nur ein *Potenzial* eines Organismus für die jeweilige Funktion unter Laborbedingungen an, nicht aber die *aktuelle Aktivität* im natürlichen Lebensraum. Es ist also für den Nachweis von mikrobiellen Funktionen im Habitat unerlässlich, in Frage kommende Organismen auf entsprechende Aktivitäten *in situ* zu untersuchen.

1. Methoden zum Nachweis von *in situ*-Aktivitäten

Amann (2000) schlägt vor, zuerst im entsprechenden Habitat eine sog. „Funktionszone“ über Messung der Stoffflüsse zu bestimmen und dann eine ausreichend hohe *in situ*-Populationsdichte von Organismen nachzuweisen, die das Potenzial für die gesuchte physiologische Fähigkeit im Labor gezeigt haben. Dies sollte dann über Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden (Amann *et al.*, 1995; Aßmus *et al.*, 1995) oder quantitativer Dot Blot-Hybridisierung von isolierter rRNS geschehen. Lee *et al.* (1999) kombinierten FISH mit Mikroautoradiografie. Hierbei wird die Aufnahme von markiertem Substrat unter den für die untersuchte Stoffwechselleistung erforderlichen Umweltbedingungen nachgewiesen. Die so markierten Mikroorganismen werden über Hybridisierung mit 16S rRNS gerichteten Sonden detektiert. Beide Kombinationen lassen zwar den Schluss zu, dass die detektierten Organismen für die gesuchte Leistung verantwortlich sind, stellen aber keinen direkten Bezug zwischen Organismus und untersuchter Funktion her.

Direktere Methoden zum Nachweis mikrobieller Funktionen erlaubt die Isolierung von DNS, die entweder unmittelbar aus der Umwelt oder nach vorheriger Gewinnung der Mikroorganismen aufgereinigt werden kann. Rondon *et al.* (2000) legten z. B. eine Bibliothek

aus Umwelt-DNS an. Anschließend wurden 16S rRNS-Analysen zur Erfassung der Diversität und Expressionsstudien für funktionelle Proteine durchgeführt. Nach Amann (2000) sollten Bakterien nach Markierung mit FISH am Durchflusszytometer sortiert und den Organismen nachfolgend Stoffwechselfgene über PCR und Sequenzierung zugeordnet werden. Auf diese Weise könnten Potenziale für *in situ*-Funktionen bisher nicht kultivierter Organismen nachgewiesen werden, eine Aussage über *aktuell* durchgeführte Stoffwechselfleistungen im Habitat ist jedoch nicht möglich.

Weitere Ansätze nutzen die mRNA zum Nachweis bestimmter Funktionen. Bach *et al.* (1999) führten einen direkten Nachweis der Transkripte von Proteasegenen mit Blot-Hybridisierung nach vorhergehender Isolierung der mRNA mit paramagnetischen Partikeln aus *B. cereus* durch. Um die Methode in einer Umweltprobe anzuwenden, ist jedoch die räumliche Auflösung und Zuordnung zu bestimmten Organismen nicht ausreichend. Hahn *et al.* (1993) markierten spezifische Messengers durch Ganzzell-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten und Tolker-Nielsen *et al.* (1997) wiesen mRNA nach vorheriger *in situ*-PCR mit FITC-markierten Primern nach. Diese Ansätze sind vielversprechend, da sie das *aktuelle* Geschehen im jeweiligen Habitat zur Zeit der Probenahme erfassen und Aufschluss über Regulationsmechanismen geben könnten. Sie wurden bisher aber nur in Laborstudien durchgeführt. Der Nachweis für eine Anwendbarkeit in Umweltproben muss noch erbracht werden.

Ein sehr direkter Nachweis einer Stoffwechselfleistung ist die Detektion des entsprechenden Schlüsselenzyms. Die *in situ*-Detektion von Proteinen ist mit spezifischen Antikörpern möglich. (siehe A.2).

2. Antikörper als molekulare Sonden in der mikrobiellen Ökologie

Antikörper sind hochspezifische diagnostische Werkzeuge. Unter 10^8 ähnlichen Molekülen können sie ein ganz bestimmtes Proteinantigen gezielt herausfinden (Janeway und Travers, 1997). Dies macht sie als Sonden für biologische Prozesse sehr begehrt. Man unterscheidet polyklonale, monoklonale und rekombinante Antikörper (-fragmente). Polyklonale Seren werden durch Immunisierung eines Versuchstieres von diesem gebildet. Es entsteht ein Gemisch aus Immunglobulinen verschiedener Spezifität und Affinität für das gleiche Antigen. Monoklonale Antikörperlösungen besitzen dagegen eine homogene Struktur und gleiche Affinität zu einem bestimmten Antigen. Sie werden aus Hybridoma-Zellkulturen gewonnen.

Diese entstehen aus der Fusion von *in vitro* nicht lebensfähiger Milzzellen eines zuvor immunisierten Versuchstieres, welche Antikörper definierter Spezifität produzieren mit *in vitro* lebensfähigen Myelomzellen (Köhler und Milstein, 1975). Polyklonale Seren besitzen mehrere Nachteile gegenüber monoklonalen Antikörpern. Zum einen lassen sie sich nur in begrenzten Mengen produzieren. Zum anderen sind Antiseren jedoch immer unterschiedlich, selbst wenn sie in genetisch identischen Tieren mit identischem Immunisierungsschema erzeugt werden. Ein weiteres Problem der Heterogenität eines Serums ist, dass selbst nach Aufreinigung durch Affinitätschromatografie oft noch Verunreinigungen mit kleinen Mengen nicht gewünschter Antikörper auftreten. Dies kann zu unerwarteten Kreuzreaktionen führen.

Serologische Methoden finden in der mikrobiellen Ökologie schon seit langer Zeit Anwendung (Überblick in Schloter *et al.*, 1995). So können Bakterien mit Antikörpern gegen Zelloberflächenstrukturen markiert werden. Die Detektion erfolgt über Goldpartikel, Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe. Diese werden direkt an den Antikörper gekoppelt oder über einen Sekundärantikörper vermittelt. In Kombination mit Fluoreszenz- bzw. Laserscanning-Mikroskopie kann das Verhalten von Organismen in den unterschiedlichsten Habitaten bis auf Einzelzellniveau studiert werden. So konnte nach Inokulation von Weizenwurzeln mit *Azospirillum brasilense* das Besiedlungsverhalten dieser Bakterien über stammspezifische monoklonale Antikörper verfolgt werden (Schloter *et al.*, 1993). Macario *et al.* (1989) untersuchten in einem Bioreaktor zur Behandlung von Abwasser mit einem Set von Antiseren Verschiebungen von methanogenen Bakterien in den Subpopulationen. Faude und Höfle (1997) bestimmten mit monoklonalen Antikörpern in einem aquatischen Ökosystem Zellmorphologie und Mikrohabitate distinkter Bakterienstämme.

Die spezifische Erkennung von Mikroorganismen durch Antikörper wurde ausserdem erfolgreich zur Sortierung und Anreicherung markierter lebender Zellen eingesetzt. Dies erfolgte zum einen über Antikörper-vermittelte Fluoreszenz im Durchflusszytometer aus aquatischen Ökosystemen (Porter *et al.*, 1993; Diaper und Edwards, 1994) und zum anderen durch Kopplung mit Magnetpartikel im magnetischen Feld aus Boden- oder Wasserproben (Page und Burns, 1991; Christensen *et al.*, 1992; Schloter, unveröffentlicht).

Die Kombination von Antikörper-vermittelter Fluoreszenz und Mikroautoradiografie erlaubten Fliermans und Schmidt (1975) eine simultane immunologische Detektion von *Nitrobacter*-Zellen und ihrer metabolischen Aktivität durch Dunkelfeld- und Epifluoreszenzmikroskopie.

In einem ultrasensitiven Enzym-Immunoassay konnten mit einer CCD-Kamera über Antikörper-vermittelte Chemolumineszenz einzelne Zellen sowie ganze Kolonien von

Lactobacillus brevis nach Filtern auf eine Membran als Verunreinigungen in Bier nachgewiesen werden (Yasui und Yoda, 1997).

In taxonomischen Studien findet seit Ende der achtziger Jahre allerdings vorwiegend die Methode der *in situ*-Hybridisierung Anwendung. Hierbei werden einzelne Mikroorganismen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden, welche den Nachweis einzelner Arten oder ganzer Bakteriengruppen erlauben, direkt in der Umweltprobe nachgewiesen (De Long *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990). Die Methode hat gegenüber der Markierung mit Antikörpern den Vorteil, dass auch Sonden gegen bisher nicht kultivierte Organismen konstruiert werden können. Auch ist die Herstellung von rRNS-gerichteten Sonden erheblich weniger zeitaufwendig. Zur Entwicklung von Antikörpern ist dagegen ein Isolat zur Immunisierung eines Versuchstieres notwendig. Ein Vorteil der Antikörper ist jedoch die Fähigkeit auch nicht aktive Bakterien, welche aufgrund der zu geringen rRNS-Mengen mit FISH nicht mehr nachweisbar sind, zu detektieren. Es konnte z.B. nach Inokulationsversuchen in der Rhizosphäre von Weizen eine Besiedlung mit *Azospirillum brasilense* Wa3 mit Hilfe eines stammspezifischen monoklonalen Antikörpers, nicht jedoch mit FISH nachgewiesen werden (Aßmus, 1995). Oerther *et al.* (1999) konnten den schaubildenden Organismus *Gordona* in Klärschlammproben auch in metabolisch inaktivem Zustand detektieren, was mit FISH unmöglich war. Benutzt man beide Methoden gleichzeitig, hat man eine grössere Sicherheit gegen unspezifische Kreuzreaktionen der jeweiligen Sonde mit z. B. bisher unbekanntem Organismen. Ausserdem bekommt man gleichzeitig einen Hinweis auf den Aktivitätszustand der untersuchten Mikroorganismen.

Große Bedeutung könnten Antikörper in der Zukunft als „Werkzeug“ zum Nachweis von *aktuellen* physiologischen *in situ*-Leistungen erlangen. Der Nachweis des jeweiligen Schlüsselenzyms für eine physiologische Leistung in einem Organismus ist ein sehr deutlicher Hinweis auf dessen aktuelle Aktivität bezüglich der untersuchten Leistung. Zur spezifischen Detektion von Proteinen stellen Antikörper eine ideale Sonde dar. So untersuchten z.B. Lin *et al.* (1998) mit einem spezifischen Serum und Fluoreszenzfarbstoffen die Expression von Nitrogenase in Kulturen mariner Cyanobakterien, welche aerob ohne Bildung von Heterocysten N₂ fixieren können. Spieck *et al.* (1998) bewiesen anhand eines monoklonalen Antikörpers die Lokalisation des Nitrit-oxidierenden-Systems im Periplasma von *Nitrospira moscoviensis*-Kulturen. Bartosch *et al.* (1999) detektierten nitrifizierende Bakterien mit Antikörpern gegen die Nitrit-Oxidoreduktase in Anreicherungskulturen aus Klärschlamm.

3. Denitrifikation, ein wichtiger Prozess im Kreislauf des Stickstoffes

Denitrifikation stellt eine Möglichkeit der anaeroben Atmung bei fakultativ anaeroben heterotrophen Bakterien dar. Durch diesen Prozess wird mineralischer Nitrat-Stickstoff in die Gasphase überführt, was einen Netto-Verlust von Stickstoff für terrestrische und aquatische Ökosysteme bedeutet. Nitrat wird dabei schrittweise über Nitrit, NO und N₂O zu elementarem Stickstoff reduziert (Abb.1). Die Denitrifikationsgene scheinen normalerweise bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck oder anoxischen Verhältnissen und gleichzeitiger Anwesenheit von N-Oxiden exprimiert zu werden. (Zusammenfassung in Zumft, 1997). Es sind jedoch auch mehrere Organismen bekannt, die unter aeroben Bedingungen denitrifizieren können (Lloyd *et al.*, 1987; Robertson *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1995). Die Verteilung der Denitrifizierer unter den Prokaryonten folgt keinem bestimmten Muster. Zumft (1997) nennt mehr als 50 verschiedene Genera, denen Denitrifizierer zugeordnet werden können. Enzyme der Denitrifikation wurden ausserdem in den Mitochondrien von Pilzen nachgewiesen (Kobayashi und Shoun, 1995). Das Schlüsselenzym des Prozesses stellt die dissimilatorische Nitritreduktase (dNIR) dar, weil sie die Umwandlung von feste in gasförmige N-Verbindungen katalysiert und somit die Denitrifikation von der Nitratatmung abgrenzt. Man unterscheidet in Bakterien und Archaeen grundsätzlich zwei verschiedene dNIR-Typen, die funktionell und physiologisch äquivalent sind: 1. Enzyme mit häm c und häm d₁ als prosthetische Gruppe (cd₁-dNIR) und 2. Proteine mit Kupfer im aktiven Zentrum (Cu-dNIR).

Es gibt verschiedene Gründe warum man den Prozess der Denitrifikation untersucht:

- Denitrifikation führt zu Verlusten von fixiertem Stickstoff in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen und ist daher ein wichtiger Faktor im globalen N-Budget.
- Das bei der Denitrifikation freigesetzte N₂O zerstört als klimarelevantes Spurengas die Ozonschicht und trägt zum Treibhauseffekt bei (Zusammenfassung in Conrad, 1996).
- Eine grosse Zahl denitrifizierender Bakterien sind zum biologischen Schadstoffabbau von Xenobiotika unter anoxischen Bedingungen in der Lage. Das Spektrum an Substraten, die unter denitrifizierenden Bedingungen abgebaut werden, umfasst Toluol, Xylen, Phenole, Cresole, Phthalate, Cyclohexanol, aromatische Säuren, Alkohole und Aldehyde (Zumft, 1997; van Schie und Young, 1998). Die gute Löslichkeit, die niedrigen Kosten und die Ungiftigkeit von Nitrat machen die Atmung mit N-

Verbindungen beim Abbau von aromatischen Verbindungen durch Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen interessant (Rhee *et al.*, 1997).

- Genauere Kenntnisse über die Steuerung der Denitrifikation und die beteiligten Organismen könnten ein Beitrag zur Entwicklung von nachhaltigen landwirtschaftlichen Bewirtschaftungsmethoden sein. Als Beispiel sei die Düngeproblematik angesprochen: Überdüngung oder Düngung zum falschen Zeitpunkt kann zu einer Auswaschung von Nitrat und zu Eutrophierung der Gewässer führen. Die Denitrifikation bei der Abwasserbehandlung führt zur Freisetzung von N_2O und somit zur Förderung des Treibhauseffektes.

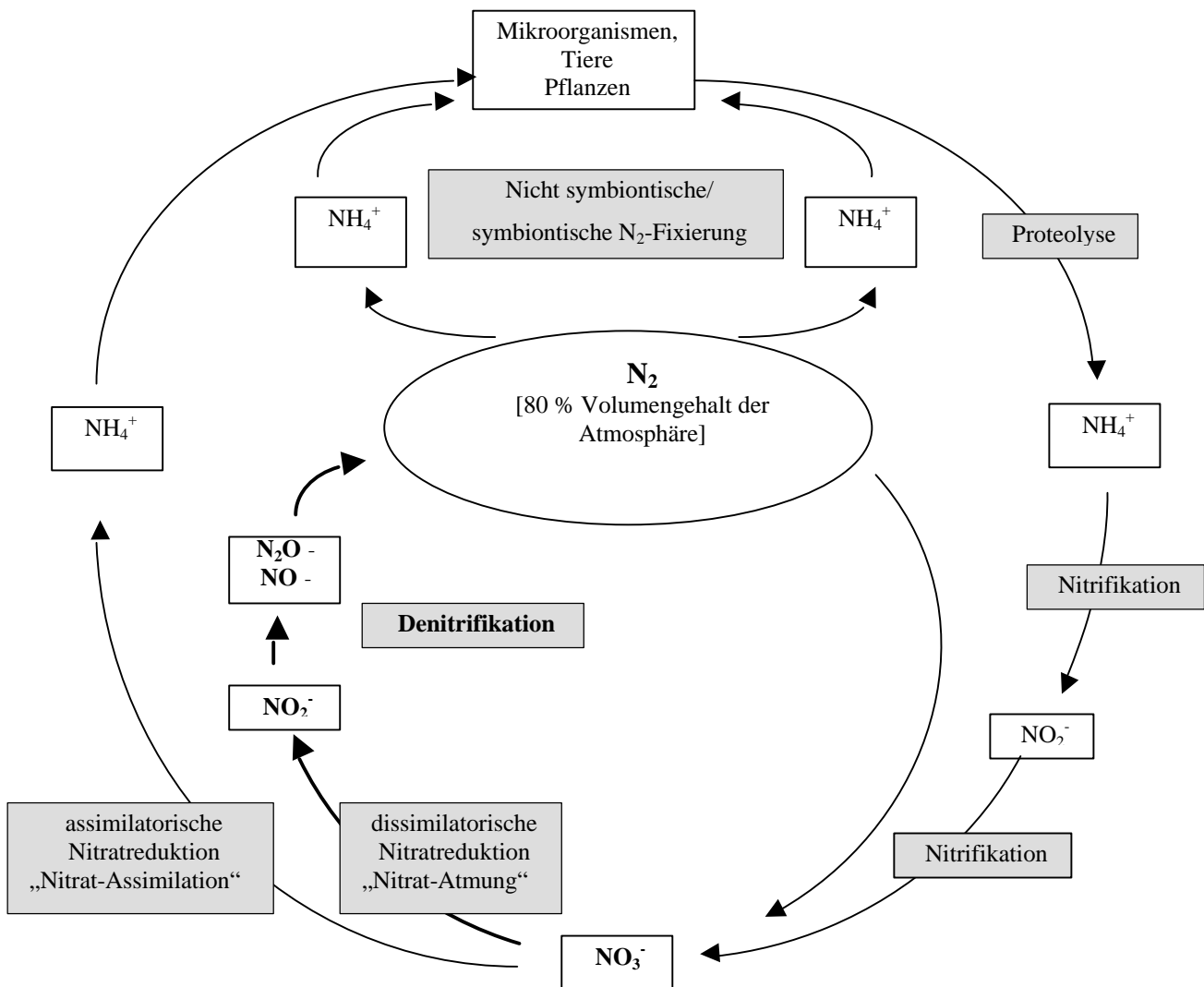


ABB. 1: DER KREISLAUF DES STICKSTOFFES NACH RICHTER (1988)

4. Aufgabenstellung

Antikörper wurden zur Untersuchung der Denitrifikation bis heute nur an Isolaten eingesetzt (Übersicht in Bothe *et al.*, im Druck). Dies ermöglicht allerdings nur eine Aussage über Stoffwechselfpotenziale, jedoch nicht über die *aktuellen* Leistungen. In der vorliegenden Arbeit war deshalb die Aufgabenstellung ein serologisches Testsystem zu entwickeln, das die *in situ*-Identifizierung von aktuell denitrifizierenden Mikroorganismengemeinschaften eines Habitates erlaubt. Der Test sollte auf dem Nachweis der Expression der dissimilatorischen Nitritreduktase (dNIR) als Schlüsselenzym der Denitrifikation durch monoklonale Antikörper beruhen. Als Antigen wurde die Cu-haltige dNIR ausgewählt, weil dieses Protein eine grössere Verbreitung unter unterschiedlichen bakteriellen Taxa aufweist (Coyne *et al.*, 1989) und die Struktur des Enzyms stärker konserviert zu sein scheint als die der häm-abhängigen dNIR (Ye *et al.*, 1993).

Die Antikörper sollten dann in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen die direkte Detektion *aktuell* denitrifizierender Cu-dNIR-haltiger Bakteriengemeinschaften in ihrem natürlichen Habitat mit dem Epifluoreszenz- bzw. Laserscanning-Mikroskop ermöglichen. In Kombination mit dem Durchflusszytometer sollte die Sortierung denitrifizierender Bakterien erfolgen, um zukünftig Untersuchungen zur Diversität dieser Bakteriengruppe zu ermöglichen.

B. Material und Methoden

1. Verwendete Mikroorganismen und molekulare Sonden

1.1 Versuchsorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

TAB 1: ZUSAMMENSTELLUNG DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN MIKROORGANISMEN

Organismus	Herkunft
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DSM 30205
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	DSM 30026
<i>Alcaligenes faecalis</i> S6	Nishiyama, Universität Tokyo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	DSM 30030
<i>Alcaligenes</i> sp.	DSM 30128
<i>Bacillus azotoformans</i>	DSM1046
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	DSM 30131
<i>Corynebacterium</i> sp.	DSM20150
<i>Escherichia coli</i> JM 105 (*Genotyp s. unten)	Amersham Pharmacia Biotech
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601
<i>Hyphomicrobium zavarzini</i> ZV 620	DSM 1566
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LMG 2136
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LMG 3333
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LMG 5440
<i>Ochrobactrum anthropi</i> Bodenisolat 1a	Schlöter, GSF Neuherberg
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	LMG 18955
<i>Ochrobactrum tritici</i>	LMG 18957
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 10
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50342
<i>Pseudomonas denitrificans</i> ssp. den.	DSM 1650
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090

(*): Zur rekombinanten Enzymexpression wurde *E. coli* JM 105 mit dem Genotyp (*thi*, *rpsL*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *SupE*, **D**(*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB*⁺, *LacI*^f *LacZDM15*]) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) eingesetzt.

1.2 Stammhaltung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Medium bei 30 °C kultiviert. Nach ungefähr 4-wöchiger Lagerung bei 4 °C war eine Überimpfung erforderlich. Für längerfristige Lagerung wurden Lyophilisate hergestellt, die bei Raumtemperatur in der institutseigenen Sammlung aufbewahrt wurden.

1.3 Reinheitskriterien für die Versuchsorganismen

Die Bakterienkulturen wurden durch Verdünnungsausstriche und mikroskopisch im Phasenkontrast (Axioplan; ZEISS, Oberkochen) auf Reinheit überprüft. Kulturen von *Ochrobactrum anthropi* 1a wurden zusätzlich mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper markiert (13.3.2) und unter dem Epifluoreszenzmikroskop auf Kontaminanten geprüft.

1.4 Kulturmedien

Alle Medien wurden zur Sterilisation 20 min bei 121 °C und 1,013 x 10⁵ Pa Überdruck autoklaviert. Hitzelabile Substanzen, wie Antibiotika und Vitamine, wurden steril filtriert (0,2 µm Spritzenvorsatz; MILLIPORE, Eschborn) und nach Abkühlen des Mediums auf circa 60 °C zugegeben. Für die Kultur auf Festmedien wurden den Nährmedien vor dem Autoklavieren 15 g Agar (GIBCO BRL, Eggenstein) zugegeben.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; Miller, 1972)

Pepton aus Casein	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	2,0 g
pH 7,0	
ad 1000 ml A. dest	

Nutrient Broth:

NB (MERCK, Darmstadt)	8,0 g
ad 1000 ml A. dest	

Medium für *Ochrobactrum anthropi* im 20 Liter-Fermenter:

Fleischpepton	5,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
Glucose	16,0 g
Ammoniumnitrat	2,0 g
ad 1000 ml A. _{demin}	

Medium für *Bacilli* (Medium 257 DSMZ)

Hefeextrakt	3,0 g
Pepton	0,6 g
ad 1000 ml mit Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,5)	

Medium für *Rhizobien* (Medium 98, DSMZ)

Hefeextrakt	1,0 g
Mannitol	10,0 g
Bodenextrakt	200 ml
ad 1000 ml A. _{demin}	
pH 7,0	
Bodenextrakt:	
Luftgetrockneter Boden	80,0 g
Na ₂ CO ₃	0,2 g
A. _{demin}	200 ml

Die Bodensuspension wurde eine Stunde autoklaviert. Nachdem sich die Bodenpartikel abgesetzt hatten, wurde kurz abzentrifugiert, um einen klaren Überstand zu erhalten und der pH auf 7,2 eingestellt.

Medium für *Hyphomicrobium* (Hirsch et al, 1964; verändert nach Matzen et al, 1982):

KH ₂ PO ₄	1,36 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	2,67 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
Spurenelementelösung	3,0 ml
Methanol	2,0 ml

ad 1000 ml A. _{dest}

pH 7,4 – 7,5 mit NaOH

Spurenelementelösung:

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,99 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,44 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g

ad 1000 ml A. _{dest}

Methanol wurde nach dem Autoklavieren steril zuzufiltriert.

1.5 Kulturbedingungen

Anzucht im kleinen Maßstab:

Alle Bakterien wurden, so weit im speziellen Versuch nicht anders angegeben, bei der entsprechenden Temperatur im Anaerobentopf kultiviert.

Massenanzucht für *Ochrobactrum anthropi* 1a:

Vorkultur:

Es wurden 8 x 200 ml Medium mit dem Versuchsorganismus im 1 l Erlenmeyerkolben beimpft und über Nacht bei 30 °C und 150 rpm geschüttelt.

Hauptkultur:

Mit der Vorkultur wurden 16 l Medium im Fermenter (BIOSTAT® C, BRAUN, Melsungen) inokuliert und bei 30 °C und 50 % Sauerstoffsättigung kultiviert. Die Belüftung der Hauptkultur wurde in der stationären Phase zur Induktion des denitrifizierenden Enzymsystems bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 12 abgestellt. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen über Nacht bei 300 rpm gerührt, durch Zentrifugation (10.000 x g; 4 °C; 10 min) geerntet, in Parafilm verpackt und bei -20 °C gelagert. Es konnte eine Ausbeute von 19,9 g Zellen (Feuchtgewicht) pro l Kulturmedium erreicht werden.

1.5 Molekulare Sonden

Die verwendeten Oligonukleotidsonden und Antikörper, die nicht in dieser Arbeit entwickelt wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

TAB. 2: LISTE DER VERWENDETEN MOLEKULAREN SONDEN

Sonde	Zielmolekül bzw. -organismus	Referenz
Eub338	16S rRNS <i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> (1990)
Alf1b	16S rRNS a-Unterklasse der <i>Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> (1992)
mAk2.11	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
Polykoniales Serum	Cu-dNIR	Nishiyama <i>et al.</i> (1993)

2. Probenmaterial

2.1 Klärschlammproben aus der Anlage München Großlappen

Die Probennahme erfolgte mit einem Schöpfer. Dieser wurde mit Klärwasser ausgespült. Anschließend wurden die Proben aus dem Denitrifikationsbecken circa 30 cm unter der Wasseroberfläche entnommen, in 1 l-Glasflaschen abgefüllt und auf Eis gestellt. Ein Aliquot der Probe wurde sofort in ein steriles 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und zur Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (B 3.1) gemischt. Die Endfixierung erfolgte im Labor.

Saure Hypochloritlösung:

Lösung A	20	ml
Lösung B	4	ml
Lösung C	2	ml
ad 200 ml A. _{demin}		

Je 5 vorgekeimte Körner wurden in einen Topf (\varnothing 10 cm) mit feuchtem Ackerboden (Braunerde aus geringfügigen Lößauflagen) überführt. Nach zwei Wochen wurden die Keimlinge mit *Ochrobactrum anthropi* 1a inokuliert. Hierzu wurde eine Übernacht-Kultur nach zweimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) auf $OD_{436}=1$ eingestellt (6×10^7 Bakterien pro Milliliter). Pro Pflänzchen wurde 1 ml Bakteriensuspension zugegeben.

PBS:

NaCl	8,0	g
KCl	0,2	g
Na ₂ HPO ₄	1,44	g
NaH ₂ PO ₄	0,2	g
pH 7,0		
ad 1000 ml A. _{demin}		

2.2.2 Präparation der Wurzeln

Drei Wochen nach Inokulation der Pflanzen wurden die Wurzeln präpariert. Die Weizenpflänzchen wurden vorsichtig mit dem durchwurzelteten Boden aus den Töpfen geholt. Mit einem semisterilen (mit 70% EtOH behandelt) Spatel und einer Pinzette wurden anschließend die Wurzeln von anhaftenden Partikeln befreit, dreimal in sterilem PBS gewaschen und in Stücke von circa 3 cm Länge zerschnitten. Nach Fixierung in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C (B 3.1)) wurden die Proben in PBS (B 2.2.1) gewaschen und in aufsteigender EtOH-Reihe (je 5 min 50/80/96 % EtOH) entwässert, mit 0,3 % (w/v) Agarose auf Objektträger fixiert und bei Raumtemperatur staubfrei bis zur Markierung mit Antikörpern aufbewahrt.

2.2.3 Extraktion der Bakterien aus der Rhizosphäre von inokulierten Pflanzen

Die Bakterien wurden, wie bei Aßmus (1995) beschrieben, mit einer Kombination aus mechanischen und chemischen Techniken extrahiert.

3. Fixierungsmethoden

3.1 Fixierung mit Paraformaldehyd

Die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) erfolgte nach Amann *et al.* (1990a):

Drei Teile 4 %-iger frisch bereiteter PFA-Lösung wurden mit einem Teil Zellsuspension gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min bzw. bei +4 °C bis zu 16 Stunden inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert (6000 x g; 10 min), mit PBS (B 2.2.1) gewaschen, erneut zentrifugiert, in PBS resuspendiert und mit gleichem Volumen eiskaltem Ethanol_{abs} gemischt. Die fixierten Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

PFA-Lösung:

PFA 4 % (w/v) in PBS bei 60 °C lösen

Steril filtrieren (0,2 µm Spritzenvorsatz; MILLIPORE, Eschborn)

3.2 Fixierung mit Ethanol

Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen absoluten Ethanols versetzt und bei minus 20 °C gelagert

4. Zellaufschluss und Herstellung des zellfreien Rohextraktes

Die gefrorenen Zellen wurden im Verhältnis 1:2 in 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 resuspendiert. Weiterhin wurde dem Ansatz der Proteaseinhibitor Leupeptin in einer Konzentration von

0,5 µg/g Zellen zugegeben. Um eine Verstopfung der Säulen während der Anreicherung des Enzyms durch genomische DNS zu vermeiden, wurden außerdem 2,5 Units/ml DNaseI (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) zugefügt.

Die Zellen wurden dann mechanisch durch 2 x 2 min Schütteln mit Glasperlen (0,17-0,18 mm Durchmesser) im Homogenisator (BRAUN, Melsungen) aufgebrochen. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (20.000 x g, 20 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

5. Methoden zur Enzymanreicherung

5.1 Säulenchromatografie

Zur Aufreinigung der dissimilatorischen Nitritreduktase wurden verschiedene Chromatografiematerialien eingesetzt. Neben dem Ionenaustauscher DEAE-CELLULOSE (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim) wurde zur Gelfiltration SEPHACRYL S 200 (Amersham PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) benutzt. Die Trennvorgänge wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Säulen wurden bei Trenntemperatur gepackt und mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert.

Zur Präparation der rekombinanten Nitritreduktase diente Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA) von QIAGEN GmbH (Hilden). Die Trennung erfolgte in diesem Falle bei RT. Es wurden Aufreinigungen unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff durchgeführt. Der Rohextrakt wurde im Batch-Verfahren an die Affinitätsmatrix gebunden und in eine Säule gefüllt. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 4 ml Waschpuffer. Die Elution des rekombinanten Enzyms erfolgte unter nativen Bedingungen durch Konkurrenz mit Imidazol, unter denaturierenden Bedingungen durch Reduktion des pH-Wertes. Herstellung des Rohextraktes und Pufferzusammensetzung entsprechen den Herstellerangaben (The QIAexpressionist, 1998, QIAGEN GmbH, Hilden).

5.2 Einengen von Enzympräparaten

Die Enzymlösungen wurden mit den Ultrafiltrations-Einheiten Centriprep-10S-Zellen (AMICON) eingengt. Hierbei wird die Proteinlösung durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kD zentrifugiert (1.500 x g, 4 °C).

5.3 Elektroelution der Cu-dNIR aus einer Acrylamid-Matrix

Die Elektroelution wurde nach Stepien *et al.* (1992) durchgeführt. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch mit dem Ausschlussvolumen von 12 kDa mit 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 gespült und mit 3 ml des Puffers befüllt. Nach Zugabe der Acrylamid-Gelstreifen, welche die Nitritreduktase enthielten, wurde der Schlauch in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit 1 x SDS-Laufpuffer (B 6.1) senkrecht zur Laufrichtung fixiert. Die Elution erfolgte über Nacht bei 3 mA und 4 °C. Um Verluste durch elektrostatische Wechselwirkungen der Nitritreduktase mit dem Dialyseschlauch zu vermeiden, wurde die Spannung vor Entnahme des Eluats für 15 min umgepolt. Das Eluat wurde aus dem Schlauch entnommen und durch 3 ml frischen Puffer ersetzt. Danach wurde für weitere 4 h eluiert. Vor Entnahme der Lösung wurde wie vorher umgepolt.

Die Eluate wurden vereinigt und aufkonzentriert (B 5.2).

6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Alle Acrylamidgelelektrophoresen wurden in einer vertikalen Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) durchgeführt. Die Gele hatten eine Grösse von 6,0 cm x 8,5 cm x 0,1 cm.

6.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Lämmler (1970) durchgeführt. Sie diente zur Auftrennung von Proteingemischen und zur Reinheitskontrolle der verschiedenen Enzympräparate. Hierbei bilden einzelne Polypeptidketten einen Komplex mit negativ geladenen Molekülen des Natriumdodecylsulfat (SDS), wobei die individuellen Ladungsunterschiede der Proteine aufgehoben werden. Sie wandern als negativ geladene SDS-Protein-Komplexe durch ein poröses Gel von Polyacrylamid. Da die Wanderungsgeschwindigkeit unter diesen Bedingungen umso grösser ist, je kleiner das Polypeptid, werden die Proteine nach ihrer molaren Masse aufgetrennt.

Zur Größenbestimmung wurden Standardproteine (Premixed Protein Molecular Weight Marker, low range; ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) mit bekanntem Molekulargewicht von 14,4 bis 97,4 kDa benutzt.

Trenngel:

30 % Acrylamid-Bisacrylamid	5,00	ml
Trenngelpuffer	5,00	ml
A _· demin	4,75	ml
Temed (10 %)	0,25	ml
Ammoniumpersulfat (0,1 g/ml)	0,10	ml

Trenngelpuffer:

SDS	1,50	g
Tris	68,1	g
pH 8,8		
ad 500 ml A _· demin		

Die Lösung wurde zum Polymerisieren in die Gelkammer pipettiert und mit EtOH überschichtet.

Sammelgel:

30 % Acrylamid-Bisacrylamid	1,0	ml
Sammelgelpuffer	1,0	ml
A _· demin	2,9	ml
Temed (10 %)	0,1	ml
Ammoniumpersulfat (0,1 g/ml)	0,03	ml

Sammelgelpuffer:

SDS	2,50	g
Tris	37,8	g
pH 6,8		
ad 500 ml A _· demin		

Das EtOH wurde vom auspolymerisierten Trenngel abgegossen, ein Probenkamm eingesetzt und die Sammelgellösung einpipettiert.

Vorbereitung der Proben:

Die Proben wurden 1:2 mit dem Probenauftragspuffer gemischt, 2 min gekocht, in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (BIOMETRA, Göttingen) und in die Taschen des Gels pipettiert.

2 x Probenauftragspuffer:

β-Mercaptoethanol	6,0	%
SDS	6.0	%
Bromphenolblau	0,6	%
Glycerin	20,0	%

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer anfänglichen Stromstärke von 10 mA, die nach dem Einlaufen der Proben in das Gel auf maximal 25 mA erhöht wurde. Nachdem der Farbmarker die Lauffront erreicht hatte, wurden die Gele gefärbt (B 4.3) oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (B 13.2.1).

Laufpuffer (10-fach):

Tris-HCl	30	g
Glycin	154	g
SDS (Natriumdodecylsulfat)	10	g
ad 1000 ml A. _{demin}		

6.2 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Die nicht denaturierende Elektrophorese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Maurer (1967) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrer Nettoladung, Masse und nativer Gestalt der Polypeptidkette im elektrischen Feld. Die Aktivität der Proteine bleibt erhalten.

Trenngel:

3 M Tris-HCl; pH 8,9	0,625	ml
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	1,25	ml
A ₂ -demin	3,025	ml
Temed	65,0	µl
Ammoniumpersulfat (0,1 g/ml)	35,0	µl

Die Lösung wurde zum Polymerisieren in die Gelkammer pipettiert und mit EtOH überschichtet.

Sammelgel:

500 mM Tris-HCl, pH 6,7	0,5	ml
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	0,6	ml
Saccharose (40 %)	2,0	ml
A ₂ -demin	840	µl
Temed	65,0	µl
Ammoniumpersulfat (0,1 g/ml)	35,0	µl

Das EtOH wurde vom auspolymerisierten Trenngel abgegossen, ein Probenkamm eingesetzt und die Sammelgellösung einpipettiert.

Vorbereitung der Proben:

Die Proteinlösungen wurden 1:2 mit 40 % Saccharose gemischt. Außerdem wurde zur Markierung der Laufmittelfront 2 µl Bromphenolblaulösung (0,01 %; w/v) zugegeben.

Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C mit konstanter Stromstärke von 10 mA. Nachdem der Farbmarker die Lauffront erreicht hatte, wurden die Gele sofort für den Enzymtest eingesetzt.

Laufpuffer (2-fach):

Tris-HCl	12,1	g
Glycin	57,5	g
ad 2000 ml A ₂ -demin		

6.3 Silberfärbung

Zur Kontrolle des Präparationserfolges wurden die SDS-Acrylamidgele von verschiedenen Reinigungsstufen für die Cu-dNIR mit AgNO_3 nach Harlow und Lane (1988) gefärbt:

Fixierung:	mind. 30 min	EtOH (96%, v/v)	30,0 ml
		Essigsäure	10,0 ml
		ad 100 ml A. _{demin.}	
Inkubation	30 min oder ü.N.	Na-Acetat	6,8 g
		ad 70 ml A. _{demin.}	
		EtOH (96%, v/v)	30,0 ml
		Vor Gebrauch zugeben:	
		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
		Glutaraldehyd (25% w/v)	0,5 ml
Waschen	3 x 5 min	A. _{demin.}	
Versilberung	20 min	AgNO_3	0,2 g
		Formaldehyd (37% w/v)	50,0 μl
		ad 100 ml A. _{demin.}	
Entwicklung	1 min, 50 ml	Na_2CO_3	3,75 g
	7 min, 150 ml	Formaldehyd (37% w/v)	15,0 μl
		ad 150 ml A. _{demin.}	
Stoppen	10 min	Glycin	1,0 g
		ad 100 ml A. _{demin.}	
Waschen	3 x 5 min	A. _{demin.}	

6.4 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Gele wurden zur Färbung 30 min in der Färbelösung mit Coomassie-Brilliant-Blue R 250 (SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim) auf dem Schüttler inkubiert, wobei gleichzeitig eine Fixierung der Proteine im Gel stattfindet. Durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung wurde der ungebundene Farbstoff entfernt.

Färbelösung:

Coomassie-Brilliant-Blue R 250	1,5	g
Methanol	454,0	ml
Eisessig	92,0	ml
ad 1000 ml A. _{demin.}		

Entfärbelösung:

Ethanol (98%; v/v)	250,0	ml
Eisessig	100,0	ml
ad 1000 ml A. _{demin.}		

7. Methoden zur Proteinbestimmung

7.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Das Prinzip dieses Nachweises nach Lowry *et al.* (1951) beruht auf der Bildung eines Komplexes zwischen Protein und Kupfer-II-Sulfat-Lösung im alkalischen Milieu. Die Komplexbildung ist der Menge an Protein in der Lösung proportional und kann photometrisch bei 650 nm gemessen werden. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:10 und 1:20 verdünnt. Zu je 100 µl der verdünnten Proteinlösungen wurden 5 ml Lowry-Reagenz 1 gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Lowry-Reagenz 2 und 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bildete sich der Farbkomplex aus. Aus den Extinktionswerten wurde der Proteingehalt anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (SERVA ELECTROPHORESIS GmbH, Heidelberg) ermittelt.

Lowry-Reagenz 1:

LÖSUNG A

Na ₂ CO ₃ wasserfrei	30	g
NaOH	4	g
ad 1000 ml A. _{demin}		

LÖSUNG B

Kaliumnatriumtartrat x 2 H ₂ O	40	g
ad 1000 ml A. _{demin}		

LÖSUNG C

CuSO ₄ x 5 H ₂ O	20	g
ad 1000 ml A. _{demin}		

FERTIGE LÖSUNG

Lösung A	100	Volumenanteile
Lösung B	1	Volumenanteil
Lösung C	1	Volumenanteil

Lowry-Reagenz 2:

Folin-Ciocalteu -		
Phenolreagenz	1	Volumenanteil
A. _{demin}	4	Volumenanteile

7.2 Proteinbestimmung im Schnelltest mit dem Bio-Rad Protein Assay

Der Bio-Rad Protein-Test (BIORAD LABORATORIES GmbH, München) basiert auf der Farbänderung von Coomassie Brilliant Blue G-250 in Abhängigkeit von verschiedenen Proteinkonzentrationen. Der Farbstoff bindet hauptsächlich an basische und aromatische Aminosäuren. Der Assay kann für Proteine und Polypeptide mit einem Molekulargewicht

größer 3.000-5.000 verwendet werden, entweder als Standard-Test im Konzentrationsbereich von 0,2-1,4 mg/ml Protein oder als Test im Mikrotiterplattenformat im Konzentrationsbereich von 1,25-25 µg/ml Protein. Der Farbstoff-Protein-Komplex wird photometrisch bei 595 nm bestimmt. Aus den Extinktionswerten wird der Proteingehalt anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (SERVA ELECTROPHORESIS GmbH, Heidelberg) ermittelt.

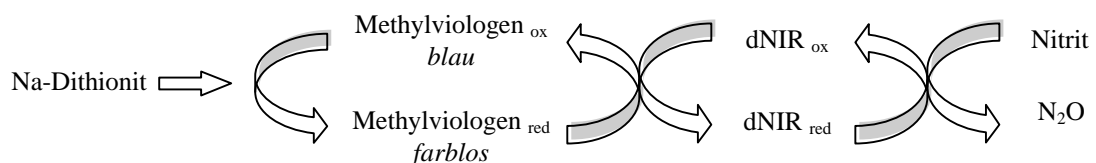
Die Durchführung des Tests erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers.

8. Methoden zur Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität

8.1 Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität mit dem artifiziellen Elektronendonator Methylviologen

8.1.1 Testprinzip:

Zur Bestimmung der Nitritreduktaseaktivität nach Kristjansson *et al.* (1980) diente mit Dithionit reduziertes Methylviologen als artifizieller Elektronendonator für die Cu-dNIR. Das Enzym reicht die Elektronen schließlich auf Nitrit weiter. Methylviologen erscheint im reduzierten Zustand blau und im oxidierten Zustand farblos. Der Elektronenfluss ist in Abb.1 dargestellt.



[dNIR = Kupfer-abhängige dissimilatorische Nitritreduktase]

ABB. 2: BESTIMMUNG DER NITRITREDUKTASE-AKTIVITÄT MIT METHYLVIOLENEN

8.1.2 Bestimmung im flüssigen Test mittels Photometer

Die Aktivität der Nitritreduktase kann spektrophotometrisch anhand des Redoxfarbstoffes Methylviologen bestimmt werden. Die Aktivität der Nitritreduktase ist im Test direkt

proportional zur Abnahme der Blaufärbung und wird im Photometer als Extinktionsabnahme bei 550 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten nach Michalski *et al.* (1984).

Zusammensetzung des Messansatzes:

Methylviologen	1,0	ml	(Endkonz.: 0,4 mM)
reduzieren durch Zugabe			
von Na-Dithionit	0,02	ml	(Endkonz.: 2mM)
Nitrit (12 mM)	0,1	ml	(Endkonz.: 1mM)

Die Absorption bei 550 nm ergab einen Wert von 1,8-1,9. Nachdem die Basislinie 2 min stabil war, wurde die Enzymlösung zum Starten des Tests zugegeben und die Aktivitätsraten bei 550 nm verfolgt.

Methylviologenlösung:

Methylviologen	0,48	mM
in 200 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4		

Na-Dithionit-Lösung:

Na Dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)	24,0	mM
in 1% w/v Natrium-Bicarbonat		

8.1.3 Aktivitätstest für die dissimilatorische Nitritreduktase im nicht-denaturierenden PAGE

Die Elektrophorese wurde wie unter B 6.2 beschrieben durchgeführt. Für den Test (verändert nach Zumft *et al.*; 1987) wurde das Gel mindestens 5 min mit einer reduzierten Methylviologenlösung dunkelblau eingefärbt und in Nitritlösung überführt. Dort, wo sich die Nitritreduktase befand, kam es durch Oxidation des Farbstoffes zu einer Entfärbung des Gels.

Reduzierte Methylviologenlösung:

Methylviologen	10	mM
in 200 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4		
100 ml durch Zugabe von 0,2 g Natriumdithionit reduzieren.		

Nitritlösung:

Natriumnitrit 1 M

in 200 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4

8.2 Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität durch Gaschromatografie

8.2.1 Vorbereitung der Gasproben

Aus der Gasphase einer anaeroben Bakterienkultur wurden 10 ml mit einer gasdichten Spritze (HAMILTON, Reno, USA) in Helium-gespülte Serum-Flaschen überführt, die mit einem Septum verschlossen waren. Die Flaschen wurden zur Messung über einen 3-Wegehahn an das Gaschromatografie-System angeschlossen.

8.2.2 Bestimmung von N₂O

Die Aktivität der Nitritreduktase kann anhand ihres Endproduktes N₂O bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das automatische Gaschromatografie-System nach Lotfield *et al.* (1997) eingesetzt. Die Probe wurde von einem Autosampler im N₂-Trägergasstrom nach Entfernen des Wassers an einer Vorsäule (Poropack Q mesh 80-100; 1 m) zum Gaschromatografen (GC 14A, SHIMADZU, Duisburg) geleitet, wo die Trennung an einer Poropack Q Säule (mesh 80-100; 3 m) erfolgte. N₂O wurde anhand eines „Electron Capture Detector“ (ECD) identifiziert, im Vergleich mit einem Eichgas quantifiziert und mit dem Softwarepaket Probe 64 (UFE, Göttingen) ausgewertet. Das System hat eine Nachweisgrenze für N₂O von 10⁻³ µl/l.

9. Präparation von DNS

9.1 Präparation genomischer DNS

Für die Präparation genomischer DNS aus Bakterien wurde der DNA Tissue Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte hierbei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die DNS wurde anschließend über Glasmilch-

säulen aufgereinigt und mit sterilem A_{dest} eluiert. Der Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet.

9.2 Präparation von Plasmid-DNS

Plasmid-DNS wurde mit dem Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Der Zellaufschluss erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die DNS wurde an einem Ionentauscher aufgereinigt, mit einem Hochsalzpuffer eluiert und durch Isopropanol-Präzipitation entsalzt. Die Puffer und Säulen wurden nach Empfehlung des Herstellers eingesetzt.

9.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung von DNS-Präparationen und enzymatischen DNS-Behandlungen wurde eine Auftrennung der Probe in einer Agarosematrix durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Wanderung linearer DNS-Fragmente im elektrischen Feld ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes, so dass anhand eines Standards eine Größenabschätzung der Fragmente möglich wird.

Agarose wurde in einer Konzentration von 1 % bzw. 1,5 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde das Gel mit 1 x TAE-Puffer bedeckt und die DNS-Proben in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100 mA konstanter Stromstärke bei Raumtemperatur bis der Farbmaler den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Gele mit Low-Melting-Agarose (BIORAD LABORATORIES GmbH, München) wurden bei 4 °C polymerisiert, die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum.

Als Größenstandard diente die *1 kb-Leiter bzw. 100 bp-Leiter* (GIBCO BRL, Heidelberg).

Die DNS wurde anschließend durch 30-minütige Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromid (1 %; w/v)- bzw. *Sybr Green*-Lösung (MOLECULAR PROBES, Leiden) angefärbt und das Bandenmuster mit einer Polaroid-Sofortbildkamera (Typ 667, POLAROID) unter Anregung mit UV-Licht bei 254 nm aufgenommen.

50 x TAE-Puffer:

Tris-HCl	2,0 M
NaCl	0,5 M
EDTA	0,05 M
pH 8,0	

Probenauftragspuffer:

Bromphenolblau	0,25 % (v/v)
Xylencyanol	0,25 % (v/v)
Ficoll 400	15,0 % (w/v)
EDTA	50 mM
pH 8,0	

9.4 Präparation von DNS-Fragmenten aus einer Agarosematrix

Die gewünschten Fragmente wurden im Low-Melting-Agarosegel (B 7.2) nach elektrophoretischer Trennung und Färbung mit Ethidiumbromid anhand ihrer Größe unter Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm identifiziert. Die entsprechenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Kunststoffgefäß überführt.

Zur Isolierung der DNS wurde der *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die Gelstruktur wurde hierbei durch chaotrope Salze aufgelöst und die DNS-Fragmente über eine Glasmilchsäule aufgereinigt und in sterilem A_{dest} eluiert.

9.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNS

Der DNS-Gehalt wurde mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers (PU 8625 UV/VIS Spectrophotometer; PHILIPS, Cambridge) ermittelt. Die Menge an UV-Strahlung, die bei 260 nm von einer DNS-Lösung in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) absorbiert wird, ist dem DNS-Gehalt direkt proportional. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1,0 ungefähr

einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger oder 20 µg einzelsträngiger DNS (Sambrook *et al.*, 1989).

Eine Abschätzung der DNS-Konzentration ist ausserdem anhand der Bandenstärken in Agarosegelen (B 7.2) im Vergleich mit einem Standard (DNA Quantitation Standard-λ DNA; GIBCO BRL, Heidelberg), dessen Fragmente jeweils eine bekannte Menge an DNS enthalten, möglich.

Die Reinheit einer DNS-Lösung kann anhand des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 nm (E_{260}) und 280 nm (E_{280}) überprüft werden. Bei einer reinen DNS-Probe liegt der Quotient aus E_{260}/E_{280} bei 1,8-2,0. Geringere Werte weisen auf Verunreinigung mit Protein, höhere auf Verunreinigung mit RNS hin. Der Quotient OD_{260}/OD_{230} sollte größer als 2,2 sein (Sambrook *et al.*, 1989).

10. Enzymatische DNS-Modifikationen

10.1 Restriktionsverdau mit DNS-Endonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GmbH (Mannheim) bezogen. Da die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme Bam HI und Hind III bei gleichen Pufferbedingungen optimale Aktivität zeigen, konnte der Verdau mit beiden Enzymen in einem Ansatz durchgeführt werden.

Restriktionsansatz:

PCR-Produkt	50	µl
Restriktionspuffer	5	µl
Bam HI	3	U
Hind III	3	U

Der Ansatz wurde 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und zum Inaktivieren der Enzyme für 10 min auf 80 °C erhitzt.

Die restringierte DNS wurde mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt (s. Abschnitt 12.3) und bei -20 °C bis zur Ligation gelagert.

10.2 Vorbereitung des Klonierungsvektors pQE 13 für die Ligation

Der Klonierungsvektor pQE 13 wurde in *E.coli* JM 105 vermehrt. Nach Präparation mit Hilfe des Plasmid-Midi-Kits (B 9.2) wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Hind III geschnitten (B 10.1), über einen PCR-Kit (B 12.3) aufgereinigt und bis zur Ligation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

10.3 Ligation von DNS-Fragmenten:

Ligationen wurden mit dem Enzym T4-DNS-Ligase (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die erforderlichen Mengen an Vektor (B 10.2) und Insert wurden nach Restriktionsverdau und Aufreinigung mit einem kommerziellen Kit (B 12.3) über Agarosegele abgeschätzt. Die Mengen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Länge des Inserts [kb]}}{\text{Länge des Vektors [kb]}} \times 3 = \text{Insert [ng]}$$

Ligationsansatz:

Vektor-DNS	x	μl
Insert-DNS	y	μl
T4-DNS-Ligase	2,0	U
Ligase-Puffer	2,0	μl
ad 20 μl steriles A. _{dest}		

Der Ansatz wurde 5 Stunden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock inkubiert und bis zur Transformation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

11. Transfer von Plasmid-DNS in Bakterien

11.1 Herstellung kompetenter Bakterien

E. coli JM 105 wurde über Nacht in 2 ml LB-Medium (B 1.4) bei 37 °C kultiviert. 40 ml frisches LB-Medium wurde mit 200 µl der Übernachtskultur inokuliert und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 x g, 15 min, 4 °C) und in 10 ml gekühlte 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml gekühlte 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nochmals abzentrifugiert und in 1 ml gekühlte 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und auf Eis gestellt. Die kompetenten Zellen wurden direkt für die Transformation eingesetzt.

11.2 Transformation von Bakterien

Zu 200 µl kompetenter Zellen von *E.coli* JM 105 wurden 1-10 µl des Ligationsansatzes zugefügt und gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde ein Hitzepuls von 2 min bei 42 °C gegeben. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und für weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (B 1.4) und 1 h Inkubation im Schüttler (50 rpm) bei 37 °C wurde ein Aliquot der transformierten Zellen auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

11.3 Identifizierung rekombinanter Klone

11.3.1 Anlegen einer „Master-Platte“ mit transformierten *E. coli*-Zellen

Transformanten wurden über die Vektor-vermittelte Ampicillinresistenz identifiziert. Über kleine Expressionskulturen wurde die korrekte Insertion der kodierenden DNS überprüft. Hierzu wurden einzelne transformierte Kolonien in Mikrotiterplatten mit LB-Medium plus 100 µg Ampicillin/ml (B 1.4) überpickt und bei 37 °C über Nacht geschüttelt (=Master-Platte). Die Kulturen konnten in der Master-Platte bei 4 °C bis zu 4 Wochen gelagert und auf Expression der Nitritreduktase überprüft (B 11.3.2) werden.

11.3.2 Mini-Expressionskulturen zum Screening nach Cu-dNir-positiven *E. coli*-Klonen

Die einzelnen *E. coli*-Klone aus der Master-Platte (B 11.3.1) wurden auf korrekte Bildung der rekombinanten dissimilatorischen Nitritreduktase aus *A. faecalis* S6 durch Herstellen kleiner Expressionskulturen untersucht. Hierzu wurden jeweils 1,5 ml LB-Medium (B 1.4) mit einem Klon inokuliert und bei 37 °C im Schüttler bei 250 rpm inkubiert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 0,9 erreicht war. Nach Zugabe von 2 mM IPTG zur Induktion des lac-Promotors wurden die Kulturen unter den gleichen Bedingungen weitere 3,5 h zur Expression der Nitritreduktase kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (6000 x g, 4 °C, 10 min) und in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer (B 6.1) aufgenommen. Eine Lagerung bei -20 °C kann zu diesem Zeitpunkt erfolgen. Ein Aliquot wurde nach 10-minütigem Erhitzen auf 100 °C in der SDS-PAGE (B 6.1) aufgetrennt. Die Cu-dNIR wurde anhand ihrer Größe nach Silberfärbung des Gels (B 6.3) und im Western-Blot (B 16.2) mit einem polyklonalen anti-dNIR-Serum (Nishiyama *et al.*, 1993) identifiziert.

11.3.3 PCR zum Nachweis der CudNIR

Zum Nachweis des Gens für die kupferhaltige dissimilatorische Nitritreduktase in den Kulturen der Master-Platte (B 11.3.1) wurde eine PCR nach Braker *et al.* (1998) durchgeführt, mit welcher konservierte Bereiche des Proteins amplifiziert werden. Detaillierte Angaben sind in Kapitel B 12.2 zu finden.

12. In vitro Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Ehrlich *et al.*, 1988) ist ein enzymatisches Verfahren, das der *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte dient. Diese DNS-Bereiche werden von zwei Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, flankiert, die eine zu je einem der beiden Matrizenstränge komplementäre Sequenz besitzen und an den jeweiligen 3'-terminalen Bereich dieses Abschnittes binden. Die PCR umfasst drei Schritte: Zuerst wird die zu amplifizierende DNS thermisch in die Einzelstränge überführt (Denaturierung), anschließend binden die Primer an komplementäre Sequenzabschnitte auf den Matrizensträngen (Annealing) und schließlich werden die 3'-Enden der gebundenen Primer durch eine DNS-Polymerase verlängert (Elongation). Es kommt zur Bildung eines neuen Doppelstranges. Durch die Verwendung einer

thermostabilen DNS-Polymerase können diese drei Schritte mehrfach wiederholt werden damit der zu amplifizierende DNS-Abschnitt in ausreichender Menge vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR im Thermocycler des Typs Gene Amp PCR System 9600 (PE-BIOSYSTEMS, Darmstadt) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. DNA-Polymerase (Goldstar™ „Red“), Reaktionspuffer und MgCl₂ wurden von EUROGENTEC (Seraing, Belgien) und die Nukleotide von ROCHE DIAGNOSTICS GmbH (Mannheim) bezogen. Es wurde standardmäßig ein sogenannter „Hot-Start“ (Chou *et al.*, 1992) durchgeführt. Dabei wird die Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben. Dies verhindert die Amplifikation mit unspezifisch gebundenem Primer.

12.1 Amplifizierung des gesamten Gens für dissimilatorische, kupfer-abhängige Nitritreduktase aus *Alcaligenes faecalis* S6

Zur geplanten Aufreinigung der Cu-dNir durch „Epitop-Tagging“ wurde das *nirK*-Gen aus *Alcaligenes faecalis* S6 amplifiziert und kloniert. Hierzu wurden die Primer so gewählt, dass sie das komplette Gen einschließen. Gleichzeitig wurden die Restriktionsschnittstellen für Hind III und Bam HI eingeführt.

TAB. 3: PRIMER ZUR AMPLIFIZIERUNG VON *nirK* AUS *Alcaligenes faecalis* S6

Primer	Primer Sequenz	Position*
NIR-C	5'-CCCC <u>AAG CTT</u> CGT GCC AGA TGG TGC GA-3' Hind III	1862-1878
NIR-N	5'-CCCC <u>GGA TCC</u> ATG GCC GAA CAG ATG CAA A-3' Bam HI	751-769

*Position in *nirK* von *Alcaligenes faecalis* S6 EMBL D13155

Reaktionsansatz:

Goldstar Reaction Buffer	10	µl
dNTP-Mischung (10 mM)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
Primer NIR-C	30	pmol
Primer NIR-N	30	pmol
DNA	30-50	ng

ad 100 µl mit H₂O_{milliQ}

nach „hot start“:

DNA-Polymerase

(Goldstar™ „Red“, EUROGENTEC) 2,5 Units (0,5 µl)

TAB. 4: PCR-PROGRAMM ZUR AMPLIFIZIERUNG DES KOMPLETTEN GENS FÜR Cu-dNIR AUS *Alcaligenes faecalis* S6

10 min 94 °C	Denaturierung	1 Zyklus
5 min 80 °C	Hot Start Zufügen der Polymerase	
1 min 94 °C	Denaturierung	
1 min 54 °C	Annealing	30 Zyklen
2 min 72 °C	Elongation	
10 min 72 °C	finale Elongation	1 Zyklus

12.2 Amplifizierung einer konservierten Teilsequenz der dissimilatorischen, kupferabhängigen Nitritreduktase

Das Cu-dNIR-Gen wurde durch PCR-Amplifikation mit den Primern NIR-K2F und NIR-K5R von Braker *et al.* (1999) nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde DNA von *E. coli* JM105, als Positivkontrolle DNA von *Alcaligenes faecalis* S6 verwendet.

TAB. 5: PRIMER ZUR AMPLIFIZIERUNG KONSERVIERTER BEREICHE VON *nirK*- NACH BRAKER *et al.* (1998)

Primer	Primer Sequenz	Position*
NIR-K2F	5'-GC(C/G)(C/A)T(C/G)ATGGT(C/G)CTGCC-3'	565-581
NIR-K5R	5'-GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG-3'	1023-1040

*Position in *nirK* von *Alcaligenes faecalis* S6 EMBL D13155

Reaktionsansatz:

Goldstar Reaction Buffer	5	µl
dNTPs (0,8 mM)	1	µl
MgCl ₂ (25 mM)	5	µl
Primer NIR-K2F	25	pmol
Primer NIR-K5R	25	pmol
DNA	50-100	ng

ad 50 µl mit H₂O_{milliQ}

nach „hot start“:

DNA-Polymerase

(Goldstar™ „Red“, EUROGENTEC) 1-2 Units

TAB. 6: PCR-PROGRAMM ZUR AMPLIFIZIERUNG KONSERVIERTER BEREICHE VON *nirK* NACH BRAKER *et al.* (1998)-LEICHT VERÄNDERT

10 min 94 °C	Denaturierung	1 Zyklus
5 min 80 °C	Hot Start	
	Zufügen der Polymerase	
30 s 94 °C	Denaturierung	11 Zyklen, → Annealing-Temperatur jeweils um 0,5 °C erniedrigen
40 s 45 °C	Annealing	
40 s 72 °C	Elongation	
30 s 94 °C	Denaturierung	20 Zyklen
40 s 43 °C	Annealing	
40 s 72 °C	Elongation	
10 min 72 °C	finale Elongation	1 Zyklus

12.3 Aufreinigung und Aufkonzentrieren der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte werden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) aufgereinigt. Hierbei wird die DNS an ein Glasfaservlies gebunden. Nach Auswaschen der Verunreinigungen wird die DNS in sterilem A_{dest} eluiert. Die Puffer und Bestandteile des Kits wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Aufreinigungsprodukt wurde mittels Agarosegelelektrophorese (B 9.3) überprüft

13. Klonierung von *nirK* in den Expressionsvektor pQE 13

13.1 Der Vektor pQE 13

Die Expression der dissimilatorischen Nitritreduktase aus *A. faecalis* S6 wurde mit Hilfe des Expressionsvektors pQE 13 von QIAGEN (Hilden) durchgeführt. Der Vektor pQE 13 gehört zur pDS-Familie von Plasmiden (Bujard *et al.*, 1987) und wurde vom Plasmid pDS781/RBSII-

DHFRS (Stüber *et al*, 1990) abgeleitet. In Abbildung 3 und 4 und Tabelle 7 sind die wichtigsten Eigenschaften des Vektors zusammengefasst.

TAB. 7: EIGENSCHAFTEN DES VEKTORS pQE 13

Phage T5 Promotor/2 lac-Operator Sequenzen
6xHis-Affinitäts-tag Codierungssequenz (N-terminal)
Synthetische Ribosomen Bindungsstelle (RBS II)
beta-Lactamase Gen (bla)
Transkriptions-Terminator t _o des Phagen Lambda
Multiple Cloning site
ColE1 origin of replication

Abbildung 3 zeigt die variable Region des Vektors pQE 13.

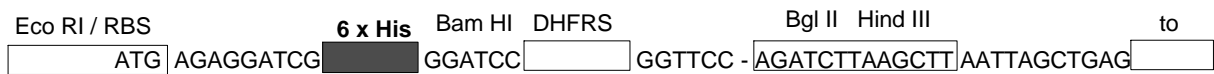


ABB. 3: VARIABLE REGION DES EXPRESSIONSVEKTORS pQE 13

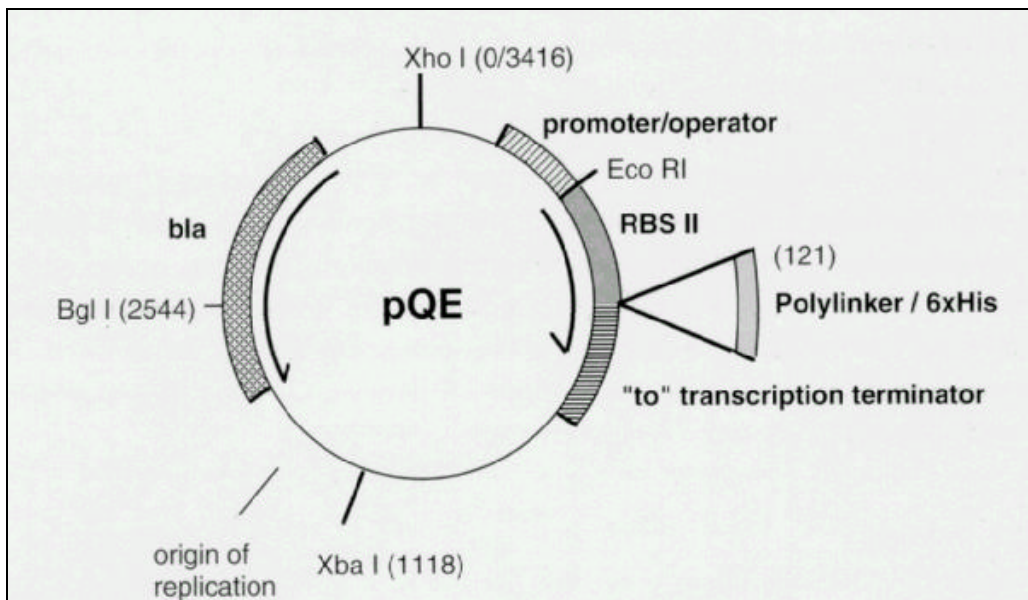


ABB. 4: KONTROLLREGIONEN DER QIAexpress pQE-VEKTOREN

14. Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Hybridoma-Zelllinien

1975 entdeckten Milstein und Köhler, dass man große Mengen homogener Antikörper fast jeder beliebigen Spezifität herstellen kann, wenn man eine antikörperproduzierende Zelle (einen B-Lymphocyten) einer immunisierten Maus mit einer Mausmyelomzelle (Tumorzelle eines B-Lymphocyten) fusioniert. So entstehen Hybridzellen, die sich unbegrenzt vermehren. Gleichzeitig sezernieren die Zellen spezifische Antikörper gegen das Antigen, mit dem die Maus immunisiert wurde, von der die Milz stammt. Die Milzzelle liefert die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, während die Myelomzelle die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit und die kontinuierliche Antikörpersekretion beisteuert. Die Selektion auf Hybridzellen findet über das Wachstumsmedium statt. Dieses enthält Aminopterin als Inhibitor der *de novo* Biosynthesewege zur Nukleotidherstellung. Die Zellen müssen also einen Stoffwechselnebenweg benutzen, um ihre Nukleinsäuren zu bilden. Die für die Fusion verwendeten Myelomzellen wurden zuvor mit 8-Azaguanin behandelt, um eine Mutation in diesem Synthesenebenweg zu erzeugen (speziell: Hypoxanthin-Guanin-Phospho-ribosyltransferase = HPGRT: katalysiert die Synthese einer gemeinsamen Vorstufe von AMP und GMP aus Hypoxanthin). Die fusionierten Zellen werden dann in einem Medium kultiviert, das Hypoxanthin und Thymin als Vorstufen für die Synthesewege und Aminopterin enthält (HAT-Medium). Nicht fusionierte Krebszellen sterben ab, da sie kein Hypoxanthin verwenden können. Milzzellen sterben ab, da sie *in vitro* nicht proliferieren können. Es wachsen ausschließlich Hybridzellen heran, da sie fähig sind, ihre Nukleotide über den Nebenweg zu synthetisieren und den neoplastischen Charakter ihrer Myelomelternzellen besitzen.

14.1 Immunisierung der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 7-10 Wochen alte Mäuse (BALB/c, weiblich). Es wurden drei Immunisierungen subcutan am Nacken mit einem Gemisch aus gleichen Volumenanteilen Antigen und Adjuvans durchgeführt:

TAB. 8: IMMUNISIERUNGSPLAN VON BALB/C-MÄUSEN MIT Cu-dNIR

Immunisierung	t [Tage]	Cu-dNIR [μg]	Freund's Adjuvans
I	1	100	komplett
II	15	100	inkomplett
III	22	100	inkomplett

Blut zur Kontrolle der Immunantwort wurde im ELISA (B 16.1) direkt vor der ersten Immunisierung und 5 Tage nach der zweiten Immunisierung retrobulbär entnommen. Die Zellfusion fand 4 Tage nach der dritten Immunisierung statt.

Gewinnung des Serums aus Kontrollblut:

Das Blut wurde nach Koagulation der Blutkörperchen in einem 1 ml-Reaktionsgefäß, welches vorher eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin blockiert worden war, bei 1200 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues, blockiertes 1 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dies wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar war. Das Serum wurde in einem Glasgefäß bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für den ELISA wurden Verdünnungen von 1:10-1:10.000 hergestellt.

14.2 Zellfusion von Milzzellen der immunisierten Versuchstiere mit Myelomzellen

Die Maus wurde 5 Tage nach der dritten Immunisierung mit Ether getötet. Nach Öffnen der Bauchdecke wurde die Milz steril entnommen und in 10 ml PBS (s. Abschnitt 2.2.1) mit 10 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin aufgenommen. Das Gewebe wurde mit einer sterilen Pinzette zerkleinert und durch mehrfaches Aufziehen in einer sterilen 10 ml Pipette homogenisiert. Die homogenisierte Milz und Myelomzellkulturen wurden zentrifugiert (200 x g, 10 min, RT) und vorsichtig in je 20 ml serumfreies Medium (RPMI 1640, B 14.10.1) aufgenommen. Anschließend wurden beide Zelltypen in gleichem Verhältnis vereinigt und erneut zentrifugiert (200 x g, 10 min, RT). Das Pellet wurde innerhalb einer min in 1 ml auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes Polyethylenglycol (PEG 1500 in 75 mM HEPES; 50 % (w/v); ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) gelöst. Anschließend wurden langsam 25 ml serumfreies

Medium zupipettiert (die ersten 5 ml in einem Zeitraum von 5 min). Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (200 x g, 10 min, RT), vorsichtig in 10 ml serumhaltigem Medium (B 14.10.2) resuspendiert und eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Zugabe weiterer 20 ml serumhaltigen Mediums und der erforderlichen HAT-Menge (Endkonz.: Hypoxanthin 13,6mg/l; Aminopterin 0,18 mg/l; Thymidin 3,88 mg/l) wurden die Zellen auf 10 Mikrotiterplatten mit Feederzellen (B 14.8) verteilt und wiederum bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

14.3 Kultivierung der fusionierten Zellen

Die Zellfusionen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Täglich erfolgte eine mikroskopische Kontrolle auf Kontaminationen und Entwicklung von Hybridklonen. 4 Tage nach der Zellfusion wurde 180 µl serumhaltiges Medium pro Kavität zugegeben. Am 10. Tag wurden die herangewachsenen Klone im ELISA (B 16.1) auf Antikörperproduktion getestet. Positive Klone wurden unter dem Binokular mit einer 50 µl Automatikpipette in Mikrotiterplatten mit Feederzellen überführt und nach Anwachsen der Zellen so rekloniert, dass pro Napf beim Überimpfen statistisch weniger als eine Zelle entfielen („limiting dilution“). Nach Anwachsen der Zellen wurde erneut auf Antikörperproduktion getestet und positive Klone ein zweites Mal rekloniert. Die Klone wurden zunächst an das Wachstum in Mikrotiterplatten ohne Feederzellen und schließlich an Wachstum in 100 ml-Zellkulturflaschen adaptiert. Die Kulturen mussten je nach Wachstum täglich oder alle zwei Tage geteilt und mit gleichem Volumen frischem serumhaltigem Medium aufgefüllt werden.

14.4 Screenen nach Zelllinien, die Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren

Zum Identifizieren von Klonen, die spezifische Antikörper gegen die kupferabhängige Nitritreduktase bilden, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Es wurden jeweils zwei Immunoassays durchgeführt: der erste zum Durchscreenen der Platten mit den fusionierten Zellen und ein weiterer zur genaueren Spezifikation der ausgewählten Hybridome nach der Reklonierung. Da die Präparation der dissimilatorischen kupferabhängigen Nitritreduktase aus *Ochrobactrum anthropi* 1a sehr zeitaufwendig war, wurde nach Immunisierung mit diesem Enzym zuerst nach Klonen gesucht, die Immunglobuline der Klasse G produzieren. Somit konnte der Verbrauch des Antigens für den Cu-dNIR spezifischen ELISA mit den positiven Klonen deutlich reduziert werden. Um eine Auswahl an Antikörpern mit einem nicht zu engen

Spektrum für Cu-dNIR aus unterschiedlichen Organismen zu erhalten, wurde nach Immunisierung mit rekombinanter Cu-dNIR auf Klone gescreent, die Immunglobuline gegen Cu-dNIR sowohl aus *Ochrobactrum anthropi* 1a als auch *Alcaligenes faecalis* S6 sezernieren.

Strategie A: (nach Immunisierung mit dNIR aus *Ochrobactrum anthropi* 1a)

ELISA1: Screening nach Klonen, die Immunglobuline der Klasse G sezernieren

ELISA2: Screening nach Klonen, die spezifische Immunglobuline für dNIR aus *Ochrobactrum anthropi* 1a sezernieren

Strategie B: (nach Immunisierung mit rekombinanter dNIR)

ELISA1: Screening nach Klonen, die spezifische Immunglobuline für die rekombinante dNIR sezernieren

ELISA2: Screening nach Klonen, die sowohl spezifische Immunglobuline für die dNIR aus *Ochrobactrum anthropi* 1a als auch aus *Alcaligenes faecalis* S6 sezernieren

14.5 Gewinnung und Lagerung der monoklonalen Antikörper

Um die Antikörper zu gewinnen wurden die Zellen aus den Hybridomakulturen durch Zentrifugation (200 x g; 10 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand, der die Antikörper enthielt, wurde mit 0,02 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C in sterilen Glasgefäßen gelagert.

14.6 Aufbewahrung von Hybridoma-Zelllinien

Die etablierten Zelllinien werden in der institutseigenen Zellkultursammlung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden die Hybridomazellen im Medium zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand mit den sezernierten Antikörpern abgenommen. Das Pellet wurde vorsichtig in Einfriermedium resuspendiert, auf sterile, vorgekühlte Kryoampullen (Cryo Tube™, NUNC, Dänemark) verteilt (5 x 10⁶ Zellen pro Ampulle) und sofort auf Eis gestellt. Nach anschließender Inkubation von circa 48 Stunden bei -80 °C wurden die Ampullen in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Kontrolle wurde jeweils nach drei Tagen eine Ampulle aufgetaut und auf Reinheit und Vitalität überprüft. Die Zelllinien wurden bis zum positiven Vitalitätstest zur Sicherheit weiter in Kultur gehalten.

Einfriermedium:

7 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

in fötalem Kälberserum (FKS)

14.7 Auftauen von Zelllinien

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und nach Auftauen aus den Kryoampullen in ein vorgekühltes steriles Zentrifugengefäß überführt. Tropfenweise wurden unter Schwenken 3 ml und anschließend ganz langsam weitere 7 ml serumhaltiges Medium (B 14.10.2) zugegeben. Nach Zentrifugation (200 x g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 22 ml serumhaltiges Medium mit dem Wachstumsfaktor-Zuastz HFCS (Konzentration nach Empfehlung des Herstellers; ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) aufgenommen und auf je zwei Mikrotiterplatten pro tiefgefrorener Ampulle verteilt.

14.8 Gewinnung von Feederzellen

Ungefähr zwei Monate alte Mäuse (BALB/c, weiblich) wurden mit Ether getötet und das Bauchfell abgezogen. Zur Gewinnung der Feederzellen wurde in die Bauchhöhle 10 ml steriler, gekühlter PBS (s. Abschnitt 2.2.1), welcher zuvor mit 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt worden war, injiziert. Nach kurzem Spülen wurde der Puffer mit den Feederzellen durch eine Spritze aus der Bauchhöhle entfernt, zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4°C), das Pellet in 15 ml serumhaltiges Medium (B 14.10.2) aufgenommen und auf Mikrotiterplatten verteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

14.9 Kultivierung der Myelomzelllinie X63AG8.563

Die Zellen wurden in 250 ml-Zellkulturflaschen in serumhaltigem Medium (B 14.10.2) kultiviert. Gut wachsende Zellen wurden alle 48 Stunden im Verhältnis 1:3 gesplittet. Für die Fusion wurden logarithmisch wachsende Zellen verwendet. Alle zwei Wochen wurde dem Medium 20 µg/ml 8-Azaguanin zugesetzt. Durch diese Behandlung können Spontanmutanten mit defektem Reservestoffwechsel für die Nukleinsäuresynthese angereichert werden, da durch das Zellgift 8-Azaguanin eine Mutation im Synthesenebenweg erzeugt wird.

14.10 Zellkulturmedien

14.10.1 Serumfreies Medium RPMI 1640

Das serumfreie Medium RPMI 1640 ist kommerziell erhältlich bei BIOCHROM LIFE TECHNOLOGIES (Berlin).

14.10.2 Serumhaltiges Medium

Für die Kultivierung der Zellkulturen wurde ein Medium mit 8 % fötalem Kälberserum nach Schlöter (unveröffentlicht) benutzt.

Zusammensetzung (500 ml):

RPMI 1640	400	ml
Fötales Kälberserum	40	ml
Basal Medium Supplement	40	ml
Medium M 199	20	ml
Glutamin (40 mg/ml)	5	ml
Arginin (10 mg/ml)	5	ml
Natrium-Pyruvat (10mg/ml)	5	ml
Nicht Essentielle Aminosäuren	5	ml
TTI	15	ml

(= Thyroglobulin, Transferrin, Insulin je 5 mg/ml)

15. Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse der monoklonalen Antikörper

Die Subklasse der gewonnenen Antikörper wurde mit dem *Mouse Isotyping Kit* (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) bestimmt. Hierbei wird der zu untersuchende Antikörper an eine Matrix aus gefärbten Kügelchen gebunden. Diese wandern durch Kapillarkraft an einem Teststreifen entlang, an welchem Subklassen-spezifische Antikörper immobilisiert sind. Durch

Bindung mit den zu testenden monoklonalen Antikörpern kommt es zu je einer spezifischen Bande für Klasse und Subklasse. Der Kit wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

16. Antikörper-Techniken

16.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ermöglicht ein quantitatives Screening nach einem bestimmten Antigen mit Antikörpern bekannter Spezifität. Bei Einsatz eines Antigens bekannter Struktur ist es weiterhin möglich nach spezifischen Antikörpern für diese Substanz zu suchen. Der Assay wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Im indirekten ELISA wird hierzu das Antigen über elektrostatische Wechselwirkung an der Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nichtbesetzte Bindungsplätze werden durch eine Blockierlösung abgesättigt, um unspezifische Bindung der Antikörper an die Mikrotiterplatte zu verhindern. Anschließend wird der erste Antikörper im Überschuss zugegeben und für die Bindung mit seinem Antigen inkubiert. Die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt mit einem zweiten Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym kann entweder ein Farbstoff- oder ein Chemolumineszenz-Substrat umsetzen und somit ein spezifisches Signal, welches zur Menge des gewünschten Antigen-Antikörper-Komplexes proportional ist, erzeugen. Das Signal kann durch Einsatz eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Streptavidin-Enzymkomplexes verstärkt werden.

16.1.1 Beschichtung der Testplatten

Der ELISA wurde in weißen FluoroNUNCTM-Mikrotiterplatten mit MaxisorpTM-Oberfläche (NUNC; Dänemark) für luminometrische Detektion bzw. in durchsichtigen Microlon 96 K Mikrotiterplatten (GREINER LABORTECHNIK GMBH, Frickenhausen) durchgeführt, die eine Bindungskapazität von 400 ng Protein/Kavität besitzen. Die Nitritreduktase wurde mit Carbonat-Puffer auf pH 9,6 eingestellt und jeweils 1 µg in einem Volumen von 50 µl pro Kavität in die Mikrotiterplatte gegeben. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Platten mit Haushaltsfolie überzogen und über Nacht oder bis zu einer Woche bei 4 °C mit dem Enzym beschichtet.

Carbonat-Puffer:

ca. 195 ml 0,2 M NaHCO_3

ca. 75 ml 0,2 M Na_2CO_2

Na_2CO_2 mit NaHCO_3 auf pH 9,6 titrieren.

16.1.2 Indirekter ELISA mit Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper

Die Antigenlösung wurde ausgeschlagen und die Platten mit 300 μl Waschlösung/Kavität gewaschen. Anschließend wurde 1 Stunde mit 300 μl Blockierlösung bei 37 °C inkubiert. Nach Ausschlagen der Blockierlösung wurden 50 μl des monoklonalen Antikörpers in geeigneter Verdünnung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C und dreimaligem Waschen (s. oben) wurden 50 μl anti-Maus-Peroxidase-Konjugat 1:200 verdünnt in Waschlösung (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH; Freiburg) zupipettiert. Nach 45 min bei 37 °C und 5 Waschschritten erfolgte die Detektion mit dem Enzymsubstrat (B 16.1.4.).

Blockierlösung:

3% BSA (FraktionV) in 1/10 PBS (w/v)

Waschlösung:

0,5% BSA in 1/10 PBS (w/v)

16.1.3 Indirekter ELISA mit Biotin-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat

Die Blockierung und Bindung mit dem monoklonalen Antikörper erfolgte wie oben beschrieben. Anstelle des Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper wurde ein biotinyliertes anti-Maus-Immunglobulin verwendet. Der Antikörper wurde 1:200 in Waschlösung verdünnt und je 50 μl in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 45 min Inkubation und drei Waschschritten wurde das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat 1:100 in Waschlösung

verdünnt und je 50 µl pro Napf zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C und 5 Waschschritten erfolgte die Detektion durch Substratzugabe.

16.1.4 Detektion und Auswertung

Die Detektion erfolgte entweder mit dem Farbsubstrat 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline]-Sulfonsäure (ABTS) oder einem Chemolumineszenzsubstrat.

Nachweis mit ABTS:

Pro Kavität wurden 100 µl ABTS in einem wasserstoffperoxidhaltigen Puffer (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) zupipettiert. Nach 20 min wurde die Reaktion mit Zitronensäure gestoppt. Die Auswertung erfolgte im Plattenphotometer bei 405 nm.

Nachweis mit Chemolumineszenz:

Pro Kavität wurden 100 µl Luminollösung in einem wasserstoffperoxidhaltigen Puffer (BM Chemoluminescence ELISA Substrat/POD; ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim) zugegeben. Nach Oxidation emittiert das Substrat Licht, welches nach 5, 10 und 15 min im Luminometer (Dynatech ML 1000, DYNATECH; Denkendorf) gemessen wurde.

16.2 Western Blotting

Um die Nitritreduktase nach Auftrennung im SDS-PAGE (B 4.1) spezifisch nachweisen zu können, wurde das Proteingemisch, wie bei Kyhse-Andersen (1984) beschrieben, auf eine Membran überführt. Die Detektion erfolgte immunologisch.

16.2.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose membran

Für den Nachweis der Nitritreduktase mit monoklonalen Antikörpern im Western-Blot wurden die Proteine aus dem SDS-PAGE (B 6.1) mit einer Semi-Dry-Elektroblotting-Apparatur (Biometra-Fast Blot, BIOMETRA, Göttingen) auf die Nitrocellulosemembran überführt. Hierzu wurde folgende Schichtung aufgebaut:

KATHODE

5 Lagen Whatman®-Papier

SDS-Polyacrylamidgel

Nitrocellulosemembran (Hybond™ECL™, AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, Braunschweig)

5 Lagen Whatman®-Papier

ANODE

Das Gel, die Membran und das Filterpapier mußten zuvor in Transferpuffer getränkt werden. Es wurde 20 min bei einer konstanten Stromstärke von 5 mA/cm² Gelfläche geblottet. Die Proteine wandern hierbei im elektrischen Feld aufgrund ihrer SDS-vermittelten negativen Nettoladung in Richtung Anode. Um den Transfererfolg zu kontrollieren wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt (B 6.4). Die Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Immuno-detektion (B 16.2.2) zwischen zwei Lagen Whatman®-Papier bei 4 °C aufbewahrt.

Blottingpuffer (Harlow und Lane, 1988):

Tris-HCl	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Methanol	200 ml
ad 1000 ml A.demin pH 7,0	

16.2.2 Immunodetektion mit Chemolumineszenz

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde diese mit Blockierlösung bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Nach zweimaligem Abspülen mit Waschlösung wurde dreimal 10 min mit Waschlösung bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde der monoklonale Antikörper in entsprechender Verdünnung in Waschlösung zur Membran zugegeben und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut gewaschen (s. oben) und für eine Stunde mit dem biotinylierten anti-Maus-Antikörper (AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, Braunschweig), welcher zuvor 1:3000 in Waschlösung verdünnt worden war, bei Raumtemperatur behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift (s. oben) wurde das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:3000 in Waschlösung verdünnt) für 1 h zur Membran gegeben. Nach einem letzten Waschschrift (s. oben) erfolgte die Detektion mit dem

Signalreagenz ECL RPN 2109 (AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, Braunschweig). Hierzu wurde die Membran mit 0,125 ml Signalreagenz/cm² bedeckt und für 1 min inkubiert. Nach Abgießen des überschüssigen Signalreagenz und Einschweißen des Blots in Plastikfolie, erfolgte die Dokumentation durch Belichten eines Röntgenfilmes (X Ray 90, CEA, STÄNGNÄS, Schweden) für 1-10 min mit anschließender Entwicklung (Curix 60, AGFA, Leverkusen). Dieses Vorgehen erlaubt eine semiquantitative Auswertung anhand der Bandendicke.

Blockierlösung:

Magermilchpulver 5,0 % (w/v)
in 1/10 PBS

Waschlösung:

Magermilchpulver 0,5 % (w/v)
Tween 80 0,1 % (v/v)
in 1/10 PBS

16.3 Markierung mit Flureszenz-gekoppelten Antikörpern

Für den *in situ*-Nachweis der dissimilatorischen Nitritreduktase wurden die monoklonalen, Cu-dNIR-spezifischen Antikörper über einen sekundären Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Schloter *et al.*, 1993; verändert nach Schmidt, 1974). Die markierten Zellen wurden mikroskopisch (B 17) oder im Durchflußzytometer (B 18) untersucht.

16.3.1 Behandlung mit Lysozym

Die fixierten Proben mußten vor der Markierung durch enzymatische Behandlung für die Antikörper durchlässig gemacht werden. Hierzu wurde die Probe abzentrifugiert (4.500 x g, 4 min, Tischzentrifuge: "µ-Centrifuge" BIOMETRA, Göttingen) und in Lysozymbelösung aufgenommen. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler wurde die Reaktion durch zweimaliges Abzentrifugieren und Waschen in 1/10 PBS abgestoppt.

Lysozymlösung:

Lysozym (66200 U/mg) 10 mg/ml

in 1/10 PBS

16.3.2 **Markierung in Lösung**

Die für die Markierungen benutzten ERGs wurden mit 3 % Rinderserumalbumin Fraktion V in 1/10 PBS (B 2.2.1) blockiert, um während der Inkubationsschritte unspezifisches Binden der Antikörper an die Gefäßwände zu verhindern.

Die Probe wurde abzentrifugiert (4.500 x g, 4 min, Tischzentrifuge: “ μ -Centrifuge“; BIOMETRA, Göttingen) und in 200 μ l Antikörperlösung in entsprechender Verdünnung mit Waschlösung resuspendiert. Nach 1,5 Stunden bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert und dreimal für 5 min mit 200 μ l Waschlösung inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 200 μ l Fluoreszenz-gekoppelten anti-Maus-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung mit Waschlösung aufgenommen. Nach einer Stunde im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur wurde dreimal gewaschen (s. oben). Die markierten Zellen wurden in PBS (s. Abschnitt 2.2.1) aufgenommen.

Sekundär-Antikörper:

- anti-Maus-FLUOS-Fab-Fragment (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH; Mannheim) 1:20 verdünnt in Waschlösung
- anti-Maus-Alexa 546-IgG (MOLECULAR PROBES, Leiden) 1:400 verdünnt in Waschlösung

Waschlösung:

Rinderserumalbumin Fraktion V 0,5 %

Tween 80 0,5 %

in 1/10 PBS (s. Abschnitt 13.1.2)

16.3.3 **Markierung auf Objektträger**

Objektträger mit aufgetropften Zellen wurden 1 h mit einer Blockierlösung aus 3 % Rinderserumalbumin in 1/10 PBS beschickt, um unspezifische Bindung von Antikörpern zu

verhindern. Anschließend wurden die Proben kurz mit Waschlösung (B 16.3.3) gespült, mit 10-30 µl einer geeigneten Verdünnung des monoklonalen Antikörpers bedeckt und weitere 1,5 Stunden inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimal 5 min Inkubation der Objektträger in Waschlösung entfernt. Die Proben wurden mit 10-30 µl Fluoreszenz-markierten anti-Maus-Antikörper (B 16.3.3) bedeckt. Nach einer Stunde wurden die Objektträger erneut gewaschen, mit sterilem A_{dest} abgespült und an der Luft getrocknet. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer ausgeführt

16.3.4 Doppelmarkierung mit monoklonalem Antikörper und rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden

Zur Doppelmarkierung der Bakterien mit monoklonalem Antikörper und der rRNA-Sonde EUB 338 (Amann *et al*, 1990b) wurden die PFA-fixierten Zellen (B 3.1) zuerst an die Oberflächen von Objektträgern gebunden (PAUL MARIENFELD KG, Bad Mergentheim), mit der Sonde hybridisiert (Amann *et al*, 1990a) und anschließend mit dem Antikörper markiert.

Die Objektträger mit aufgetropften Zellen wurden je drei min in 50%-, 80%- und 96%-igem (v/v) EtOH entwässert. Nach Trocknen an der Luft erfolgte die Oligonukleotidhybridisierung. Hierzu wurden 8 µl Hybridisierungspuffer je Vertiefung aufgetragen und 1 µl der Sondenlösung (50 µg/ml) vorsichtig mit einer Pipettenspitze darin verteilt. Der Objektträger wurde für 1,5-4 Stunden bei 46 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit 48 °C warmen Hybridisierungspuffer gespült und im gleichen Puffer bei 48 °C 20 min lang gewaschen. Schließlich wurde der Objektträger mit sterilem A_{dest} gespült und luftgetrocknet.

Hybridisierungspuffer

Tris-HCl	20	mM
SDS	0,02	% (w/v)
EDTA	5,0	mM
NaCl	0,9	M
pH 7,4		

Die Markierung mit dem Antikörper erfolgte wie unter B 16.3.3 beschrieben, mit folgenden Änderungen:

- alle Lösungen wurden auf 0,9 M NaCl eingestellt
- alle Inkubationsschritte erfolgten bei +4 °C
- die Inkubationszeiten wurden verlängert (für den Primärantikörper auf 2,5 Stunden; für den Sekundärantikörper auf 1,5 Stunden)

Optional wurde mit DAPI gegengefärbt (B 16.3.5)

16.3.5 Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (SIGMA, Deisenhofen) zeigt ein Anregungsoptimum bei 365 nm und ein Emissionsmaximum bei 418 nm (Porter und Feig, 1980). Er bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNS. Gefärbte Zellen erscheinen blau, während unspezifische Bindung von DAPI an Polyanionen wie Polyphosphat und Natriumlaurylsulfat zu einer Gelbfärbung der Partikel führt.

Zur Markierung der Zellen wurden 10 µl der DAPI-Lösung (1 µg/ml) in die Aussparung der Objektträger pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit sterilem A. _{dest} gespült und an der Luft getrocknet.

17. Mikroskopie

17.1 Einbettung

Alle Präparate wurden nach Markierung zum Schutz vor Ausbleichen in Citifluor AF1 (CITIFLUOR LTD., London) eingebettet. Falls die Zellen nicht bereits an die Objektträger fixiert waren, wurden zuvor 1-5 µl des Präparates auf den Objektträger getropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Citifluor AF1 entwickelte seine optimale Wirkung 5 min nach dem Einbetten.

17.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Für *in situ*-Darstellungen der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen wurde ein Axioplan-Mikroskop (CARL ZEISS, Jena) verwendet. Das Phasenkontrastbild wurde immer mit dem jeweiligen Epifluoreszenzbild verglichen. Hierbei wurden Filtersätze von ZEISS, sowie folgende Plan-Neofluar-Objektive: 100 x 1,3 (Ölimmersion), 40 x 0,75 und 20 x 0,50 benutzt. Das Mikroskop war mit einer MC 100 Kamera (CARL ZEISS, Jena) ausgestattet, an der Kleinbildaufnahmen durchgeführt werden konnten. Routinemäßig wurde ein Kodak EPS 800/1600-Diafilm verwendet. Bei Phasenkontrast-Aufnahmen wurde ca. 0,01-0,08 s, bei Fluoreszenz-Aufnahmen zwischen 4 und 75 s belichtet.

Die für die verschiedenen Fluorochrome eingesetzten Filtersätze sind in Tabelle 9 aufgelistet.

TAB.9: KENNDATEN DER ZUR EPIFLUORESZENZ-MIKROSKOPIE VERWENDETEN FILTERSÄTZE

Farbstoffe	DAPI	FLUOS	Alexa 546 / Cy3
Anregungsmaximum	345 nm	494 nm	555 nm
Emissionsmaximum	442 nm	518 nm	566 nm
verwendeter Filtersatz	4879 01	4879 09	4879 15
Anregungswellenlängen	359-371 nm	450-490 nm	540-552 nm
Farbteiler	395 nm	510 nm	580 nm
Emmissionsfilter	LP 397 nm	LP 520 nm	LP 590 nm

LP = Longpassfilter

17.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) können im Vergleich zu einem klassischen Epifluoreszenz-Mikroskop Aufnahmen mit sehr hoher Auflösung und Tiefenschärfe aufgenommen werden. Das Präparat wird punktförmig mit monochromatischem Licht angeregt, wobei als Lichtquellen Laserlinien verschiedener Wellenlänge verwendet werden. Das Objekt wird sukzessiv in verschiedenen optischen Ebenen und in zwei Raumrichtungen abgerastert. Eine Lochblende („pinhole“) im Strahlengang bewirkt, dass das Streulicht aus den nicht fokussierten Bildebenen ausgeblendet und nur Licht aus einer definierten Brennebene detektiert wird. Die Lichtstrahlen aus der aktuellen Bildebene treffen auf einen Photomultiplier, welcher die optischen Signale in digitale Bilddaten umwandelt. Die Bildinformation steht dabei pixelweise in digitaler Form zur Verfügung und kann durch anschließende Bildverarbeitung und Erschließung mittels eines mitgelieferten Programmpakets weiter aufbereitet werden.

Eine detaillierte Beschreibung des Prinzips der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie findet sich in Wilson & Sheppard (1984).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein inverses konfokales Laserscanning-Mikroskop vom Typ Zeiss LSM 410 (CARL ZEISS, Jena) mit zwei internen Helium-Neon-Lasern (543 und 633 nm), sowie zwei externen Argon-Lasern (364 und 488/514 nm) verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte mit der vom Hersteller mitgelieferten Software (Zeiss LSM Version 3.70). Die im TIFF-Format gespeicherten LSM-Bilder wurden mit dem Software-Paket CorelDRAW[®] 5.0 in Diapositive umgewandelt und mit einem Agfa Forte[®] Belichtungsgerät (AGFA, Leverkusen) und der Software Freedom-of Press[®] auf einem Farbdiafilm (KODAK Ektachrome 100 Professional) dokumentiert.

18. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine leistungsfähige Methode zur Analyse und Sortierung von Zellen nach ihrem Gehalt an Fluoreszenzmarker und anderen Parametern wie Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die zu untersuchende Zellsuspension wird dafür durch eine Düse gepresst und in Tröpfchen aufgeteilt, von denen jedes nur eine Zelle enthalten soll. Diese passieren einen oder mehrere Laserstrahlen zur Anregung der von den Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Oberflächen von Tröpfchen mit Zellen, die am Anregungspunkt vorher festgelegten optischen Parametern entsprechen, werden elektrisch geladen und können mit ebenfalls geladenen Ablenkplatten in einzelne Gefäße sortiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein FACStar^{Plus} Gerät (BECTON DICKINSON; Mountain View, Kalifornien), das mit zwei Argon-Lasern (364 und 488/514 nm) ausgestattet ist, benutzt. Eine detaillierte Beschreibung des Gerätes und der Anwendung findet sich bei Wallner (1993).

Die zu untersuchende Zellsuspension wurde mit der Vortex[®] kräftig geschüttelt, um aggregierte Zellen zu trennen und anschließend in Polystyren-Röhrchen umgefüllt. Das Durchflusszytometer wurde vor jeder Messung anhand eines Standards fluoreszierender Kügelchen (Polychromatic Beads, POLYSCIENCES; Eppelheim) neu kalibriert. Es wurden jeweils circa 20.000 Ereignisse gemessen.

C. ERGEBNISSE

1. Gewinnung der Cu-abhängigen dissimilatorischen Nitritreduktase

Für die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern wurde in einem ersten Schritt die Kupfer-abhängige dissimilatorische Nitritreduktase (Cu-dNIR) präpariert. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde das Enzym aus der Zellmasse eines von *O. anthropi* mit klassischen chromatographischen Methoden gewonnen. Zum anderen wurde die Nitritreduktase von *A. faecalis* S6 als Fusionsprotein mit einem 6 x Histidinrest in *E. coli* überexprimiert und an einer, für den Histidinrest spezifischen Affinitätsmatrix aufgereinigt. Die beiden Methoden werden in diesem Kapitel ausführlich beschrieben.

1.1 Präparation aus *Ochrobactrum anthropi* über Chromatografie und einer Acrylamid-Matrix

Das Aufreinigungsschema für Cu-dNIR aus *O. anthropi* (Abb. 5) wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Kakutani *et al.* (1981) und Michalski *et al.* (1984) entwickelt, die das Enzym aus *Rhodobacter sphaeroides* bzw. *Alcaligenes faecalis* S6 präpariert haben. Nach Fällung der hitzelabilen Proteine, folgte eine Ionenaustauscher- und Gelfiltrationschromatografie. Die aktiven Fraktionen der Säuleneluate wurden spektralphotometrisch ermittelt (B 8.1.2). Das angereicherte Enzym wurde schließlich über ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel gereinigt.

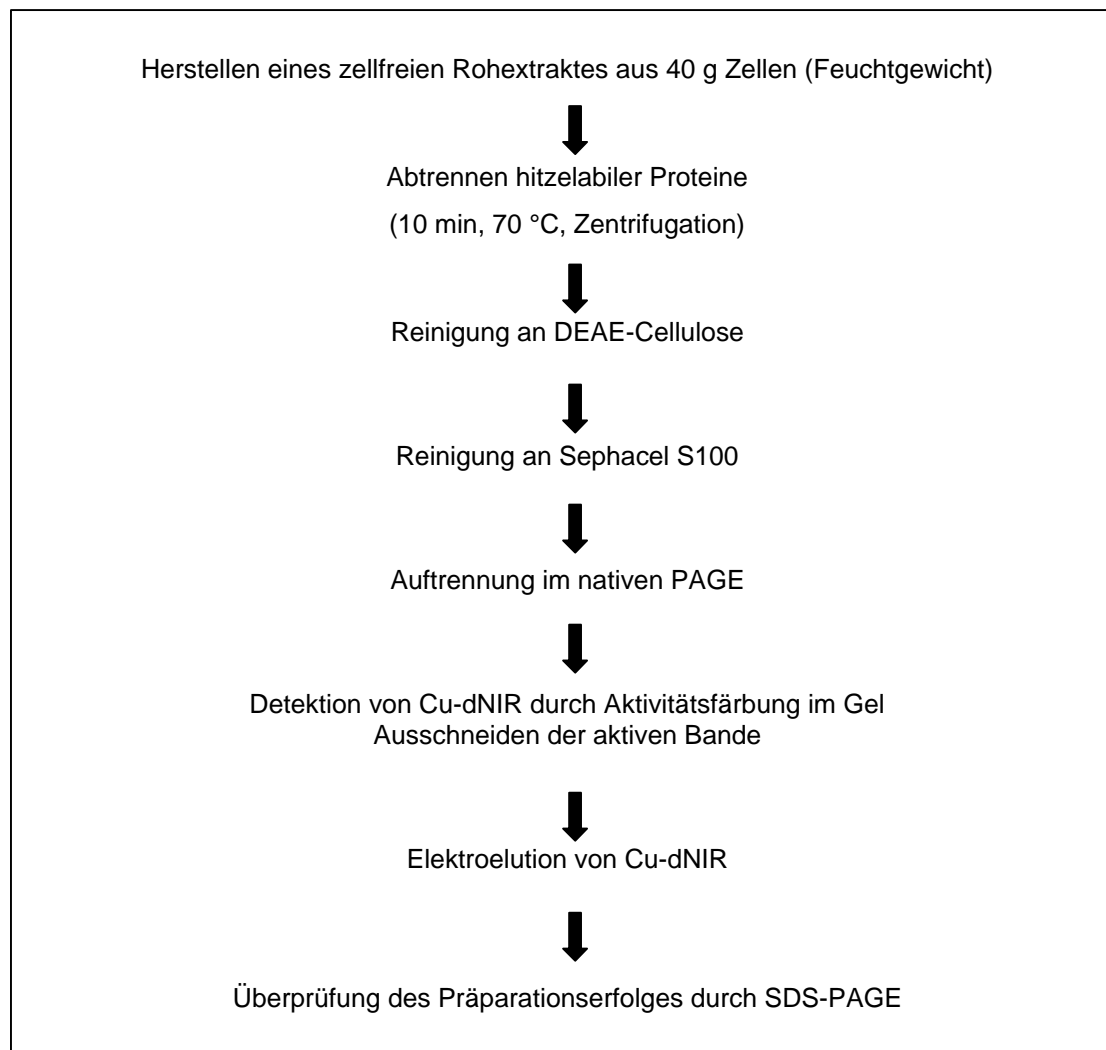


ABB. 5: FLUSSDIAGRAMM ÜBER DIE PRÄPARATION VON Cu-dNIR AUS *O. anthropi* 1a

Ein typischer Verlauf der Präparation wird im Folgenden gezeigt.

1.1.1 Gewinnung der Zellmasse

Die Zellmasse für die Enzympräparation wurde wie in B.1.5 beschrieben, gewonnen. Es wurde 12 Stunden bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 8,3 fermentiert, wobei der pO_2 auf mindestens 50% eingestellt wurde. Zur Induktion des denitrifizierenden Enzymsystems wurden die Zellen über Nacht ohne Belüftung bei einer Rührergeschwindigkeit von 100 rpm inkubiert. Es konnten 19,9 g Zellen (Feuchtgewicht) pro ml Kulturmedium erzielt werden.

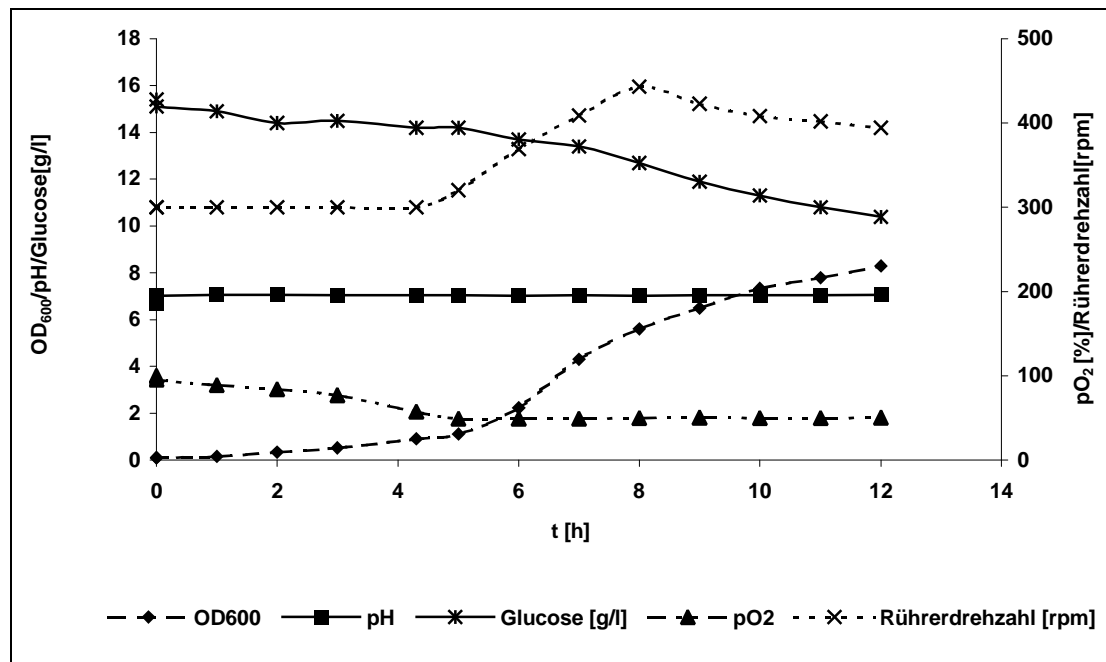


ABB. 6: FERMENTATION VON *O. anthropi*

Die Fermentation erfolgte in einem Volumen von 35 l. Der Sauerstoffpartialdruck wurde über die Rührerdrehzahl automatisch vom Fermenter auf mindestens 50% einreguliert. Nach 12 h wurde die Belüftung zur Induktion des denitrifizierenden Enzymsystems eingestellt.

1.1.2 Gewinnung des zellfreien Rohextraktes und Abtrennung hitzelabiler Proteine

Aus 40 g Zellen des Organismus *O. anthropi* (Feuchtgewicht) wurde der zellfreie Rohextrakt gewonnen (B 4). 10-minütige Inkubation bei 70 °C führte zur Fällung hitzelabiler Proteine, welche anschließend durch Zentrifugation (4000 x g, 10 min, 4 °C) abgetrennt wurden.

1.1.3 Reinigung über DEAE-Cellulose

Der Hitzeextrakt wurde anschließend auf eine Säule (30 cm x 2,5 cm) mit dem Ionentauscher DEAE-Cellulose aufgetragen und mit einem Säulenvolumen Äquilibrationpuffer nachgewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in einem Stufengradienten von 220 mM, 280 mM und 400 mM NaCl. Die mit 220 mM NaCl eluierten Fraktionen (0 bis 10) zeigten keine Aktivität für dNIR. Die Cu-dNIR eluierte vollständig bei einer Salzkonzentration von 280 mM NaCl in den Fraktionen 11 bis 13. Nach Waschen der Säule mit 400 mM Salz war keine Restaktivität im Säulenauslauf detektierbar (Abb. 7). Die Menge an Gesamtprotein wurde um 47,3% verringert.

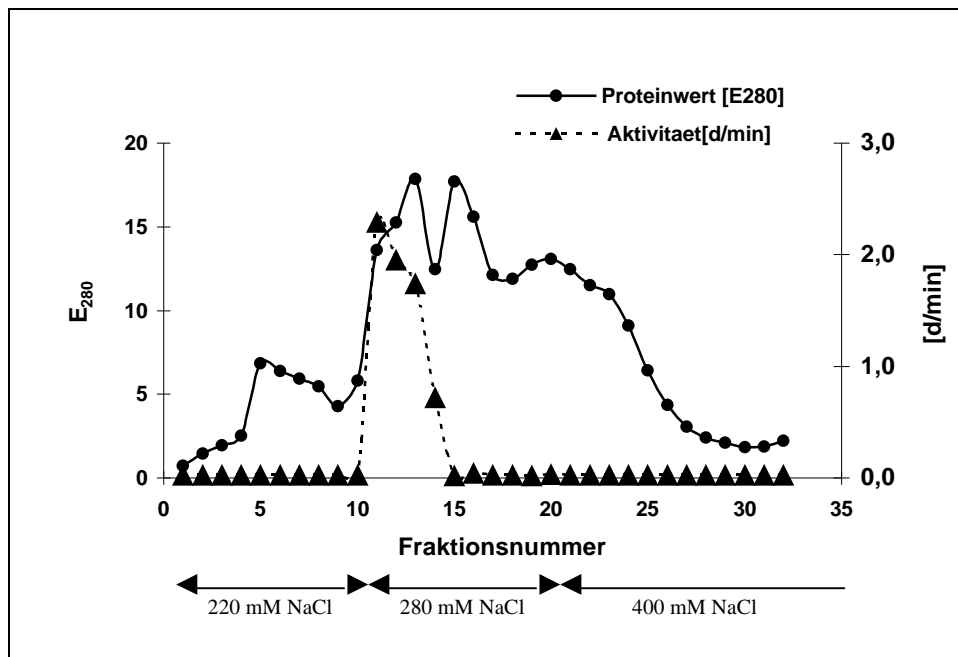


ABB. 7: REINIGUNG VON Cu-dNIR ÜBER DEN IONENAUSTAUSCHER DEAE-CELLULOSE

Trennmateriale: DEAE-Cellulose, äquiliibriert mit 50 mM Kaliumphosphat pH 7,4

Fraktionsgröße 10,0 ml

Elutionspuffer 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH7,4 mit Salzstufen:

1) 220 mM NaCl (100ml)

2) 280 mM NaCl (100ml)

3) 400 mM NaCl (200ml)

Die Fraktionen 11 mit 13 wurden vereinigt und auf 2 ml Endvolumen eingengt (B 5.2).

1.1.4 Reinigung über Molekularsieb Sephacel S 200

Die vereinigten aktiven Fraktionen des Ionentauschers wurden über ein Molekularsieb Sephacel S 200 (Säulengröße: 70 cm x 1,5 cm) gereinigt. Hierbei erfolgte vorwiegend eine Abtrennung niedermolekularer Proteine (Abb. 8).

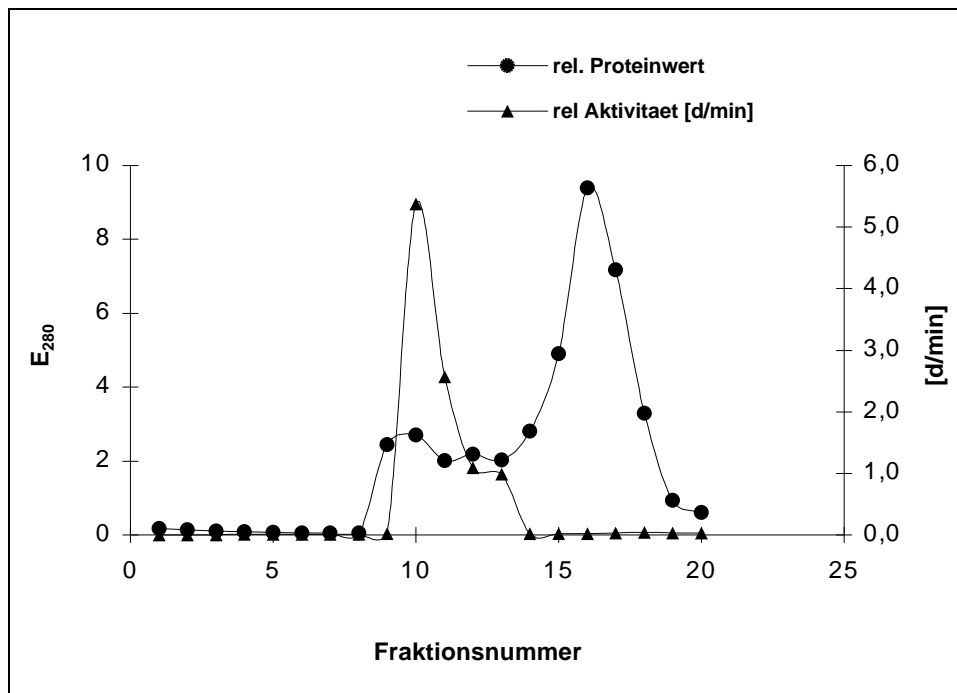


ABB. 8: REINIGUNG VON dNIR ÜBER EIN MOLEKULARSIEB

Trennmaterial: Sephacryl S200 äquilibriert mit 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Fraktionsgröße: 2,5 ml

Elutionspuffer: 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Fraktionen 10 und 11 wurden vereinigt, auf 2,1 ml eingengt und für die weitere Präparation verwendet.

1.1.5 Auftrennung mit nativer PAGE und anschließende Elektroelution

Zur weiteren Aufreinigung wurde die angereicherte Cu-dNIR im präparativen nativen PAGE (B 6.2) aufgetrennt. Die Nitritreduktase wurde durch Aktivitätsfärbung mit Benzylviologen (B 8.1.3) im Gel identifiziert, die entsprechende Bande ausgeschnitten und das Enzym eluiert (B 5.3). Pro Präparation konnten circa 120 µg Nitritreduktase bei einer Ausbeute von 4,2 % der ursprünglichen Aktivität gewonnen werden. Das eingengte und gereinigte Protein wurde bis zur Immunisierung bei -20 °C gelagert.

In Tab. 10 ist der Verlauf der Reinigung nochmals zusammengefasst:

TAB. 10: REINIGUNGSTABELLE ÜBER DIE PRÄPARATION VON Cu-dNIR AUS *O. anthropi*

Probe	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Protein ges. [mg]	rel. Aktivität [(d*min ⁻¹)/ml]	rel. Aktivitaet ges. [d*min ⁻¹]	rel. spez. Aktivität [(d*min ⁻¹)/mg]
Rohextrakt nach Hitzebehand- lung	97,0	2,4	232,8	25,0	2425,0	10,4
DEAE	2,0	55,0	110,0	72,0 ^(*)	144,0 ^(*)	0,7 ^(*)
S200	2,5	2,4	6,0	99,9	249,8	41,6
Elektro- elution	0,4	0,3	0,1	257,0	102,8	1028,0

^(*) Einfluss der Salzkonzentration aus dem Elutionspuffer auf die Aktivitätsmessung

1.1.6 Reinheitskontrolle im SDS-PAGE

Der Verlauf der Reinigung wurde durch 10 %-ige SDS-PAGE (B 6.1) überprüft. Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen und das Gel anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Abb. 9 zeigt das nach Aufreinigung über eine Polyacrylamid-Matrix elektrophoretisch homogene Enzympräparat.

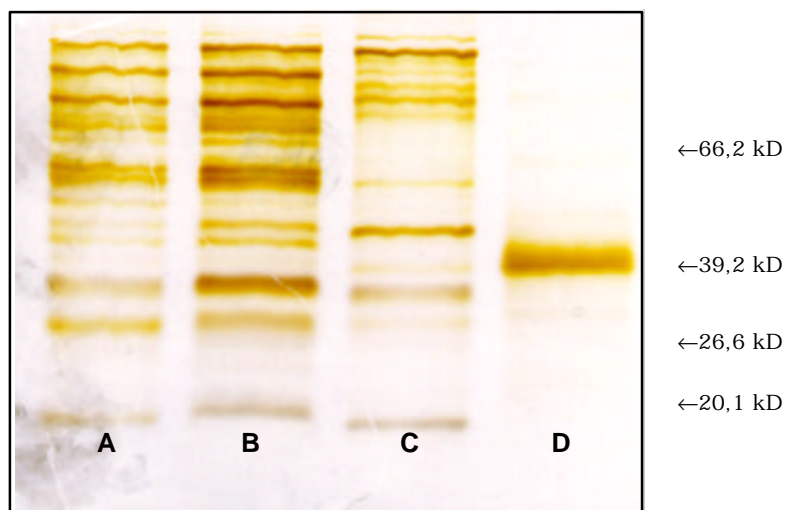


ABB. 9: PRÄPARATION DER Cu-dNIR AUS *O. anthropi*

Von jedem Reinigungsschritt wurden 20 µg Gesamtprotein im SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde anschließend mit Silbernitrat gefärbt.

A=Rohextrakt; B=nach Aufreinigung an DEAE-Cellulose; C=nach Aufreinigung an Sephacel S200; D=nach Elektroelution

1.2 Präparation aus *Alcaligenes faecalis* S6 mittels Epitop-tagging

In einem weiteren Ansatz zur Gewinnung der Nitritreduktase wurde *nirK* aus *A. faecalis* S6 kloniert, in *E. coli* als Fusionsprotein mit 6 Histidinresten überexprimiert und an einer speziellen Affinitätsmatrix aufgereinigt

1.2.1 Amplifizierung des *nirK*-Gens von genomischer DNS aus *Alcaligenes faecalis* S6

Aus einer Übernachtskultur von *A. faecalis* S6 wurde die genomische DNS präpariert (B 9.1). Zur Amplifizierung von *nirK* wurden neue Primer entworfen (B 12.1), um geeignete Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den Expressionsvektor einzuführen. Der N-terminale Primer (NIR-N) wurde direkt in das Startcodon und der C-terminale Primer (NIR-C) an das Ende der codierenden Sequenz für *nirK* (Nishiyama *et al.*, 1993) gelegt, jedoch ohne das Stopcodon mit einzuschließen. Der Translationsstop erfolgte über die Terminationssequenzen des Expressionsvektors (B 13.1). Abb. 10 zeigt die Lage der Primer in der Sequenz von *nirK*.

541	ggccaaacc	cttcggctga	gcctttgttc	cagcgcaaat	aaagcgggac	agacatcaat
601	aagctagctt	aagtatttga	tattaaacgc	ctaataattac	ccaatTTTTT	gtgtcacctt
661	gatcgcagtc	aaggaacatc	gaagtgcctc	ttcctatagt	cggcatgaca	gagcaggaaa
721	tgctcggctc	tatcgt aaag	gag agtatcg	atggccgaac	agatgcaaat	cagtcgccgc
781	accatattgg	caggagccgc	cctggctggg	gcgcttgccg	cggttctggc	aaccacatcc
841	gcctggggac	aaggcgcggt	gcggaaggca	actgcggcag	aaatagcagc	acttccacgc
901	cagaagggtg	agcttgtgga	ccctcccttc	gtgcatgccc	atagtcaggt	tgcaagaagg
961	ggacccaagg	tggtcgaatt	caccatggtg	atcgaggaaa	agaagatcgt	catcgatgat
1021	gcgggaaccg	aagttcacgc	catggcattc	aacggcaccg	taccaggacc	gctgatggtc
1081	gtgcatcagg	acgattatct	cgaactgaca	ctcatcaacc	ctgaaacca	cacgctgatg
1141	cacaatatcg	atttccatgc	ggcaaccggt	gcattgggcg	gcggcgggct	gaccgaaatc
1201	aatccgggag	aaaagacat	cctgcgcttc	aaggcgacca	agcccggcgt	cttcgtctac
1261	cactgcgcac	ctcccggaat	ggttccctgg	catgtcgtat	cgggcatgaa	tggtgcgatc
1321	atggtgctgc	cgcgcgaggg	tctgcatgac	ggcaaaggca	aagcactgac	ctacgacaag
1381	athtattatg	tcggcgaaca	ggatttctat	gtaccgcgcg	acgagaacgg	caaatacaag
1441	aaatacgagg	cgcccggcga	cgcttatgaa	gacaccgtca	aggtcatgcg	cactctcact
1501	ccgacccatg	tggtgttcaa	cggcgctgtg	ggcgactga	ctggcgacaa	ggccatgacg
1561	gcggcggttg	gcgagaaagt	cctgatcgtc	cactcgcagg	ccaaccgcca	tacgagacca
1621	catctgatcg	gggggcatgg	ggattatgtc	tgggcgaccg	gcaagttcaa	tacgccgccc
1681	gacgtcgatc	aggaaacctg	gttcattccg	ggtggtgccg	cgggagcagc	cttctacacg
1741	ttccagcagc	ccggcatcta	cgctatgtg	aaccacaatc	tgatcgaggc	ttttgaactc
1801	ggcgctgccg	cccacttcaa	ggtcacgggt	gaatggaacg	acgatctgat	gagtcgggtt
1861	ctcgaccat	ctggcacgta	a agcgaatgt	atgaaggcgc	ttcgctccc	agagcgctt

ABB. 10: LAGE DER PRIMER NIR-N UND NIR-C IN DER SEQUENZ VON *nirK* AUS *A. faecalis* S6 (EMBL D13155)

Die kodierende Sequenz für *nirK* wurde fett gedruckt und die Lage der Primer rot markiert. Die natürliche Ribosomenbindungsstelle (nach Nishiyama *et al.*, 1993) wurde blau markiert, die Signalsequenz für den Transport ins Periplasma unterstrichen.

Durch Schnittstellen für unterschiedliche Restriktionsenzyme am N-bzw.C-terminalen Ende von *nirK* wurde eine gerichtete Klonierung möglich. Nach Amplifizierung entsteht ein Fragment von 1139 bp Länge. Das PCR-Produkt wurde restringiert (B 10.1) und aufgereinigt (B 12.3).

1.2.2 Klonierung des *nirK*-Gens aus *Alcaligenes faecalis* S6 in den Expressionsvektor pQE13

Die Nitritreduktase wurde so in den Vektor (B 13.1) kloniert, dass ein Fusionsprotein mit 6 N-terminalen Histidinresten exprimiert wird, welches eine Aufreinigung an Ni-NTA erlaubt (B 5.1). Nishiyama *et al.* (1993) identifizierten für Cu-dNIR in *A. faecalis* eine potentielle Shine Dalgarno Sequenz kurz oberhalb des Startcodons. Über die Lage der Primer NIR-C und NIR-N (B 12.1) wurde die Amplifikation dieser nativen Ribosomenbindungsstelle von *nirK* für das Insert-Vektorkonstrukt vermieden, um Störungen mit den Regulationseinheiten des Vektors auszuschließen. Die Signalsequenz für den Transport des Proteins ins Periplasma (Aminosäuren 1-33; Nishiyama *et al.*, 1993) wurde jedoch erhalten um sicher zu gehen, dass das rekombinante Enzym korrekt prozessiert werden konnte.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die Einführung der Restriktionsschnittstellen durch PCR und Subklonierung der Cu-dNIR:

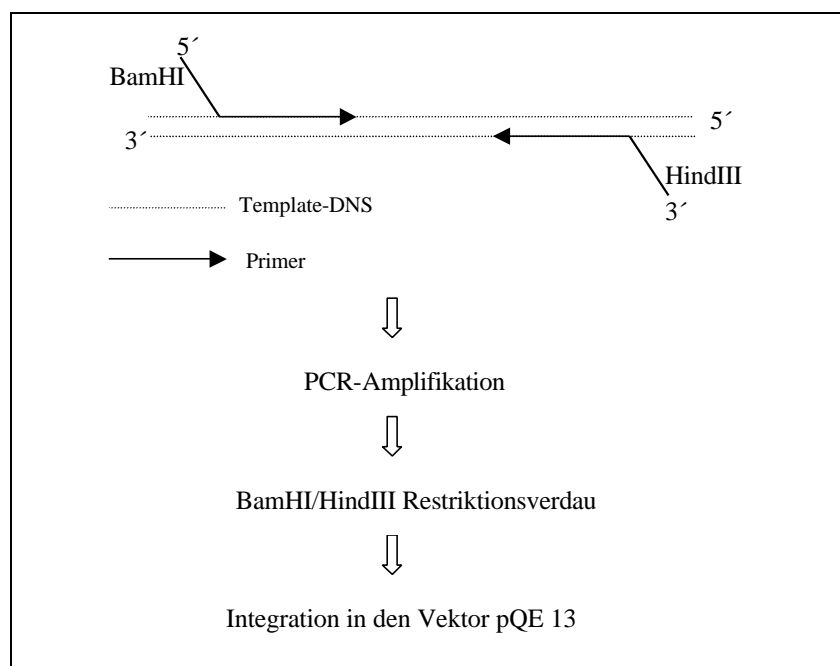


ABB. 11: Klonierung von *nirK* aus *A. faecalis* S6 in den Vektor pQE 13

Für die Ligation wurden für Vektor- und Insert-DNS Standardmengen nach Maniatis *et al.*, 1982 (B 10.3) eingesetzt. Da der Vektor pQE 13 drei mal so gross ist wie das Insert konnten bei Beachtung der Formel aus B 10.3 die Mengenverhältnisse durch Vergleich der Bandenstärke in einem Agarosegel abgeschätzt werden, d.h. gleich starke Banden von pQE13 und *nirK* zeigen das richtige Verhältnis von Vektor zu Insert an.

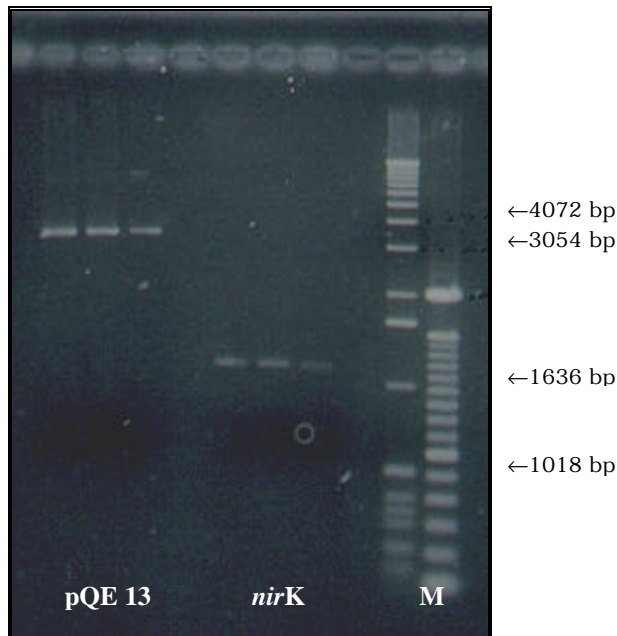


ABB. 12: AGAROSEGEL ZUR ABSCHÄTZUNG DER EINZUSETZENDEN MENGEN VON *nirK* AUS *A. faecalis* S6 UND VEKTOR pQE 13

Das Amplifikat und der Vektor wurden mit BamHI und HindIII verdaut, aufgereinigt und jeweils 4, 2, 1 μ l Vektor bzw. 8, 4, 2 μ l Amplifikat in einem 1 %-igem Agarosegel aufgetrennt.

M=Größenmarker

In den Ligationsansatz (B 10.3) wurden aus den in Abb. 12 gezeigten Restriktionsansätzen 1 μ l aufgereinigte Vektor-DNS im Verhältnis zu 8 μ l aufgereinigte *nirK*-DNS eingesetzt, ohne vorher die absoluten Mengen an DNS zu bestimmen.

1.2.3 Überprüfung der Transformanten auf Insertion von *nirK*

Nach Integration von *nirK* in den Vektor pQE13 wurde *E. coli* JM 105 transformiert (B 11.2) und auf LB-Medium (B 1.4), welches 100 μ g Ampicillin/ml enthielt, ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde von den Selektionsplatten eine Masterplatte einzelner Klone angelegt (B 11.3.1). 10 willkürlich ausgewählte Klone wurden durch PCR und Expressionskulturen näher untersucht.

1.2.3.1 Amplifikation von *nirK* mit den Primern NIR-C und NIR-N

10 transformierte *E. coli* JM 105-Klone der Master-Platte wurden durch PCR (B 12.1) auf Insertion von *nirK* hin überprüft. Für die Amplifikation wurden je 2 µl einer Übernacht-Kultur ohne vorherige Aufreinigung der DNS als Template eingesetzt. Bei 7 Klonen konnte ein Fragment der erwarteten Länge von 1139 bp amplifiziert werden (Abb.13).

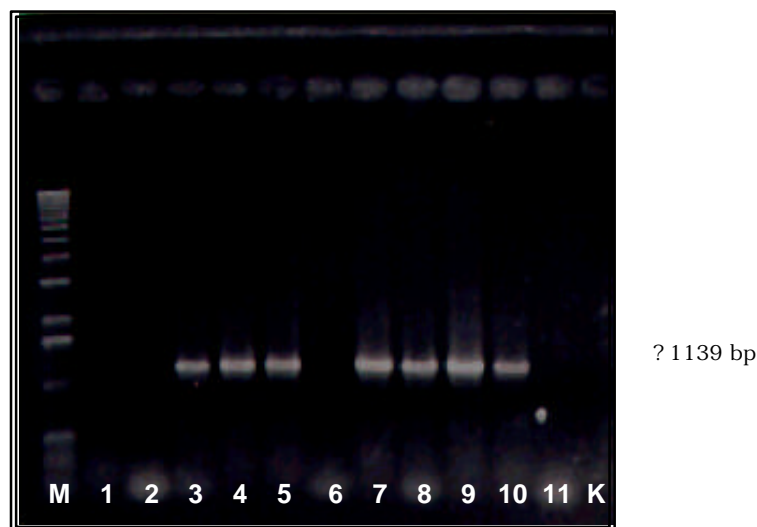


ABB. 13: AMPLIFIZIERUNG VON *nirK*-AUS TRANSFORMIERTEN KLONEN VON *E. coli* JM 105

Pro Ansatz wurden 2 µl Bakterienkultur als Template zum Nachweis von *nirK* eingesetzt. Die Zellen wurden durch Erhitzen auf 94 °C zu Beginn der PCR geöffnet.
M=Größenmarker; 1-10=transformierte Klone; 11=nicht transformierter *E. coli* JM105;
K=PCR-Ansatz ohne DNS

1.2.3.2 Expression der rekombinanten Cu-dNIR

Die 7 Klone, die im PCR-Test positiv waren, wurden auf ihre Fähigkeit zur Expression von Cu-dNIR überprüft. Hierzu wurden Miniexpressionskulturen hergestellt (B 11.3.2). Nach Zellaufschluss der Bakterien und Trennung des Rohextraktes im SDS-PAGE wurde die Cu-dNIR mit einem polyklonalen Serum (Nishiyama *et al.*; 1993) im Immunoblot detektiert. Bei 5 Klonen konnte eine eindeutige Bande nachgewiesen werden. Klon 3 und 8 zeigen nur eine schwache bis sehr schwache Schwärzung des Röntgenfilmes (Abb. 14).

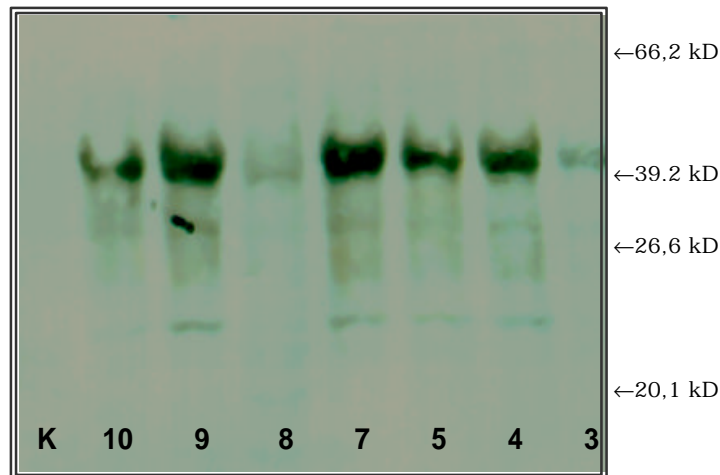


ABB. 14: NACHWEIS DER Cu-dNIR IN MINIEXPRESSIONSKULTUREN REKOMBINANTER KLONE VON *E. coli*-JM 105

Die Expression der rekombinanten Cu-dNIR wurde mit 1mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen im SDS-Probenpuffer aufgeköcht und ein Aliquot des Extraktes im Immunoblot untersucht. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz und wurde auf einem Röntgenfilm dokumentiert (B 16.2)

K=nicht induzierte Kontrolle; 3-10=Nummer der Klone, die im PCR-Test auf *nirK* positiv waren

1.2.4 Kontrolle der Insertion von *nirK*

Zur Gewinnung der Cu-dNIR für die Antikörperherstellung wurde *E. coli*-Klon 9 verwendet. Um die stabile Insertion von *nirK* während der Lagerung des Bakterienstammes zu überprüfen und einen, von der in dieser Arbeit entwickelten PCR, unabhängigen Nachweis zu führen, wurde *nirK* mit dem Primerpaar nach Braker *et al.* (B 12.2) amplifiziert. Hierbei wird eine konservierte Region des Gens vervielfältigt. Abb.15 zeigt ein PCR-Produkt mit der erwarteten Länge von 514 bp.

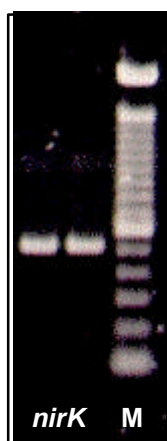


ABB. 15: AMPLIFIZIERUNG EINES KONSERVIERTEN TEILBEREICHES VON *nirK* BRAKER *et al.*

Klon 9 wurde über Nacht bei 37 °C kultiviert. 2 µl Bakterienkultur wurden ohne vorherige Aufreinigung der DNS als Template in die PCR eingesetzt.

←514 bp

1.2.5 Zeitlicher Verlauf der Expression von Cu-dNIR

Um den Zeitpunkt der optimalen Ausbeute von Cu-dNIR nach Zugabe von IPTG zu finden, wurden 500 ml Medium im Verhältnis 1:10 mit einer Übernacht-Kultur des transformierten *E. coli*-Klones 9 inokuliert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die Expression des Enzyms durch Zugabe von 2 mM IPTG gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 1 ml Bakterienkultur entnommen, abzentrifugiert, in SDS-Probenauftragspuffer (B 6.1) resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Um den Expressionslevel der Cu-dNIR über die Zeit verfolgen zu können, wurden die einzelnen Proben über die optische Dichte (OD₆₀₀) normalisiert, ein Rohextrakt hergestellt (B 4) und mittels SDS-PAGE (B 6.1) aufgetrennt und mit Silber gefärbt (B 6.3). In Abb. 16 ist zu sehen, dass die Cu-dNIR-Bande vier Stunden nach Induktion am stärksten exprimiert wurde, danach kommt es zum langsamen Abbau des Enzyms. In einer nicht induzierten Kultur (Spur 1), die mit der gleichen Vorkultur inokuliert wurde, fehlt die Bande erwartungsgemäß.

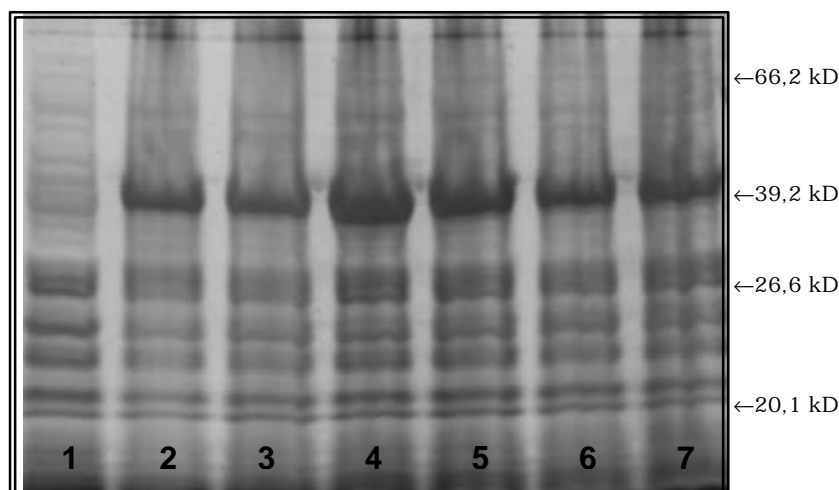


ABB. 16: ZEITLICHER VERLAUF DER HETEROLOGEN EXPRESSION VON Cu-dNIR in *E. coli*

Gezeigt werden Extrakte der induzierten Bakterien, die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen worden waren. Die Bakterien wurden nach Normalisierung abzentrifugiert, in SDS-Auftragspuffer gekocht und durch SDS-PAGE getrennt.

1=nicht induzierte Kultur; 2-7=Proben von 2.5 h , 3.5 h, 4.0 h, 4.5 h, 5.0 h und 6.0 h nach Induktion mit IPTG

1.2.6 Aufreinigung des Enzyms durch Metall-Affinitätschromatografie und Reinheitskontrolle im SDS-PAGE

Es wurden Expressionskulturen in 500 ml Volumen LB-Medium hergestellt. Die Zellen wurden 4 h nach Induktion der Cu-dNIR geerntet. Die überexprimierte Cu-dNIR wurde anhand des

Histidin-tags unter denaturierenden Bedingungen mit 8M Harnstoff an einer Metallaffinitätschromatografie-Matrix aufgereinigt. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über den Ablauf der Präparation:

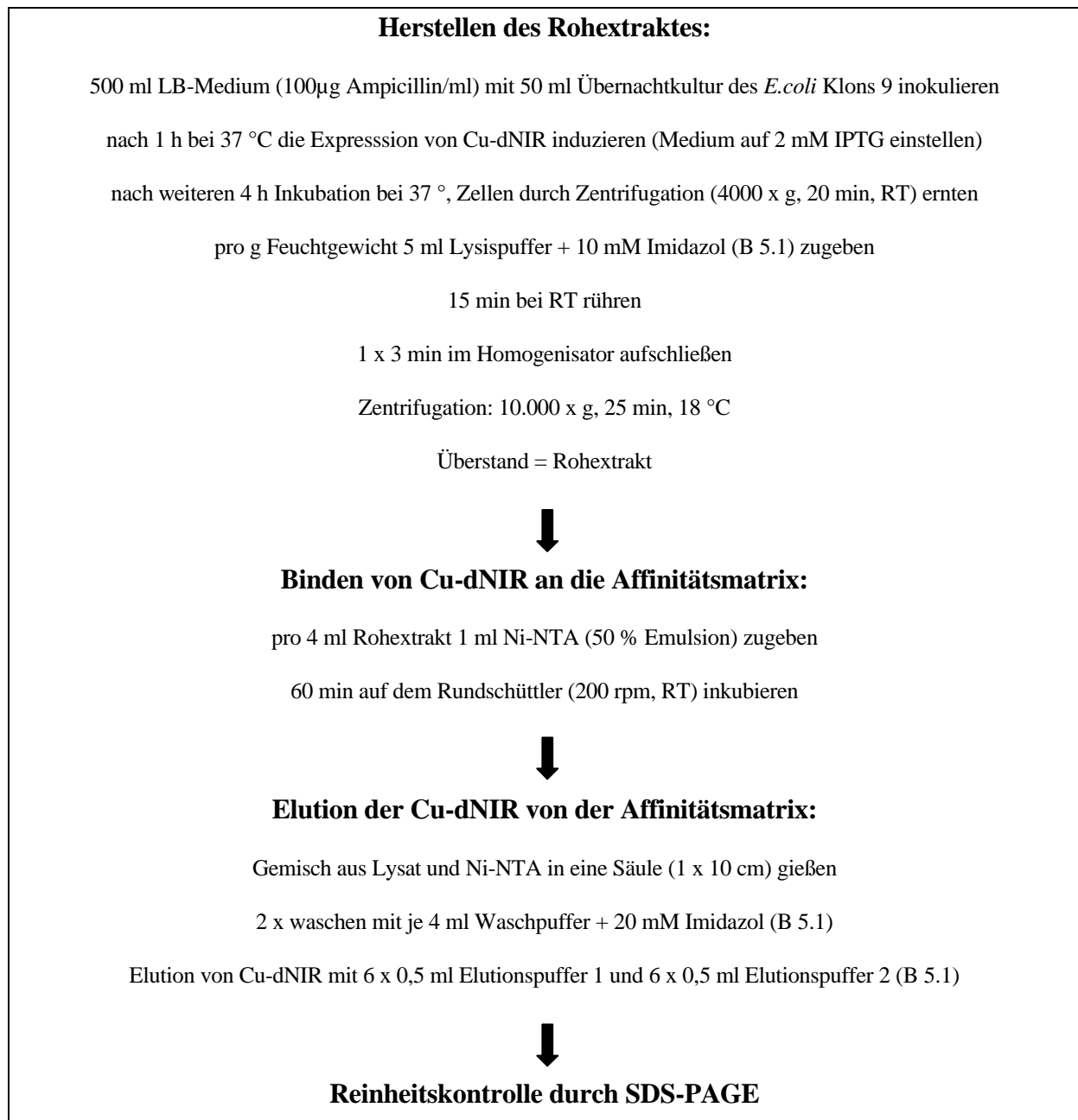


ABB. 17: FLUSSDIAGRAMM ÜBER DIE PRÄPARATION REKOMBINANTER Cu-dNIR

Unter nativen Bedingungen war nur eine sehr schwache Bindung des Enzyms an die Reinigungsmatrix möglich, so dass ein großer Teil der Cu-dNIR im Durchfluss der Säule zu finden war (Daten nicht gezeigt).

Deshalb wurde ein Protokoll zur Aufreinigung der Cu-dNIR unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff entwickelt, da in diesem Falle die Bindung an das Säulenmaterial besser ist und somit eine höhere Ausbeute zu erwarten war.

Die Bindung des Enzyms an die Affinitätsmatrix und die Waschschrte erfolgten unter Zugabe von Imidazol zur Abtrennung von Proteinen mit schwacher Affinität zur Säulenmatrix. Optimal waren Konzentrationen von 10 mM zur Bindung und 20 mM im Waschpuffer. Eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 40 mM im Waschpuffer führte zu Verlusten von Cu-dNIR während der Waschschrte durch frühzeitige Elution. Zugabe von 2% Tween 80 (w/v) ließ keine Verbesserung des Reinigungsergebnisses zu. Die Elution erfolgte durch stufenweise Reduktion des pH Wertes über 5,9 auf 4,5 durch Zugabe von jeweils 6 x 0,5 ml Elutionspuffer pH 5,9 (EL 1-6) bzw. pH 4,5 (EL 7-12).

Abb.18 A zeigt ein typisches Reinigungsergebnis im SDS-PAGE: Im Durchlauf der Säule und in den Waschfraktionen finden sich nach Optimierung der Imidazolkonzentrationen nur sehr geringe Mengen an nicht gebundener Cu-dNIR. Der größte Anteil des Enzyms eluiert nach Absenken des pHs im Elutionspuffer auf 4,5. Allerdings eluieren unter diesen Bedingungen auch Aggregate und Proteine, die mehr als einen His-tag enthalten. Um zu prüfen, ob die Proteine, die in ihrem Molekulargewicht nicht der Nitritreduktase entsprechen Verunreinigungen darstellen, wurde ein Western-Blot mit einem anti-dNIR-Serum (Nishiyama *et al.*, 1993) durchgeführt. Abb. 18 zeigt, dass die Proteinbanden im SDS-Gel identisch mit dem Bandenmuster im Immunoblot sind. Die eluierten Proteine sollten somit Aggregate oder Bruchstücke der Cu-dNIR darstellen und wurden daher zur Immunisierung verwendet.

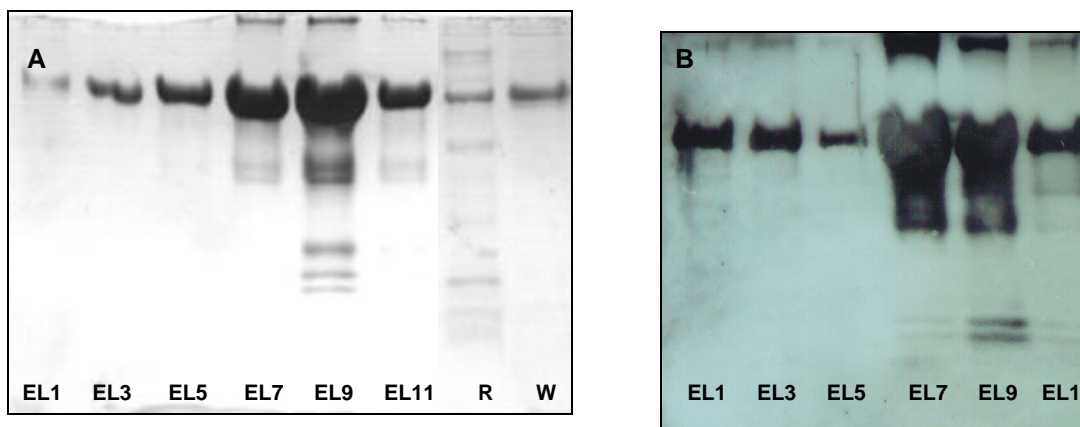


ABB. 18: VERLAUF DER REINIGUNG VON Cu-dNIR UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN

Von folgenden Fraktionen wurden von links nach rechts jeweils 10 µl aufgetragen:

- Fraktionen 1, 3, 5 → eluiert mit Puffer pH 5,9
- Fraktionen 7, 9, 11 → eluiert mit Puffer pH 4,5,

R=Rohextrakt, W=vereinigte Waschfraktionen, EL=Elutionsfraktionen

A zeigt das SDS-PAGE nach Färbung mit Silbernitrat; B zeigt den korrespondierenden Immunoblot nach Detektion mit anti-dNIR-Serum

Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt, zur Reinheitskontrolle im SDS-PAGE (B 6.1) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (B 6.4)

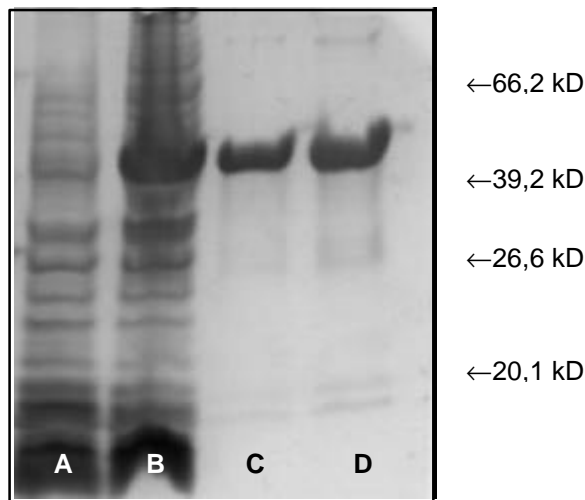


ABB. 19: PRÄPARATION DER REKOMBINANTEN Cu-dNIR AUS *E. coli* JM 105 UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN

Rohextrakte von *E. coli*-Kulturen wurden mit und ohne Induktion durch IPTG und das daraus präparierte Enzym im SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde anschließend mit Silbernitrat gefärbt.

A vor Induktion mit IPTG; B nach Induktion mit IPTG; C nach Aufreinigung über Affinitäts-säule; (5 µg Ges.-Prot.); D nach Aufreinigung über Affinitätssäule (10 µg Ges.-Prot.)

Aus einem Liter Bakterienkultur konnten 4,5 mg elektrophoretisch reine, rekombinante Cu-dNIR gewonnen werden.

2. Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Cu-dNIR

2.1 Immunisierung

Mit der gereinigten Cu-dNIR, die mit den verschiedenen Präparationstechniken gewonnen (C 1.1; C 1.2.6) worden waren, wurden jeweils drei Mäuse immunisiert (B 14.1). Mit dem Enzympräparat aus *O. anthropi* wurde eine Maus, nach Immunisierung mit Cu-dNIR aus *A. faecalis* S6 zwei Mäuse immunisiert. Vor der ersten und fünf Tage vor der zweiten Injektion wurden pro Maus retrobulbär circa 200 µl Blut entnommen und mit dem daraus gewonnenen Serum (B 14.1) der Immunisierungserfolg im ELISA (B 16.1) überprüft.

TAB. 11A: ELISA ZUR ÜBERPRÜFUNG DES IMMUNISIERUNGSERFOLGES MIT Cu-dNIR AUS O. anthropi

Die ELISA-Platten wurden entweder mit Cu-dNIR oder Rinderserumalbumin als Kontrolle beschichtet. Anschließend wurde das Serum zugegeben. Waren anti-Cu-dNIR Antikörper im Serum vorhanden, konnten sie mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Immunglobulin detektiert werden. Der Nachweis erfolgte mit ABTS (B 16.1.4). Die Werte zeigen die Absorption bei 405 nm an

Antigen:	Cu-dNir aus <i>O. anthropi</i>	Cu-dNir aus <i>O. anthropi</i>	BSA	BSA
Protein pro Kavität [ng]	Präimmunserum (1:50 mit PBS)	Postimmunserum (1:50 mit PBS)	Präimmunserum (1:50 mit PBS)	Postimmunserum (1:50 mit PBS)
400	1,1	2,2	1,0	0,8
200	0,9	2,6	1,1	1,2

TAB. 11B: ELISA ZUR ÜBERPRÜFUNG DES IMMUNISIERUNGSERFOLGES MIT REKOMBINANTER Cu-dNIR

Die ELISA-Platten wurden entweder mit Cu-dNIR oder Rinderserumalbumin als Kontrolle beschichtet. Anschließend wurde das Serum zugegeben. Waren anti-Cu-dNIR Antikörper im Serum vorhanden, konnten sie mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Immunglobulin detektiert werden. Der Nachweis erfolgte durch Luminol. Die Werte stellen relative Lichteinheiten (rlu) aus der Messung im Chemoluminometer dar.

Antigen:	rekombinante Cu-dNIR	rekombinante Cu-dNIR	BSA	BSA
Protein pro Kavität [ng]	Präimmunserum (1:1000 mit PBS)	Postimmunserum (1:1000 mit PBS)	Präimmunserum (1:1000 mit PBS)	Postimmunserum (1:1000 mit PBS)
400	230	738	85	167
200	253	762	94	112

Durch die Immunisierung konnte eine 2-3-fache Erhöhung des Cu-dNIR-spezifischen ELISA-Signals erreicht werden. Wurde Rinderserumalbumin als Antigen eingesetzt, so waren die Signale immer entweder niedriger oder höchstens gleich hoch wie die Cu-dNIR-spezifischen ELISA-Signale vor der Immunisierung (Tab.11A, 11B).

2.2 Selektion von Hybridomalinien, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren

Fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse durch Äther getötet und die Fusionen aus Milzzellen und Mausmyelomzellen durchgeführt (B 14.2).

Nach Immunisierung mit Cu-dNIR aus *O. anthropi* konnte nach dem ersten spezifischen Screening 2 Zelllinien selektiert werden, die Antikörper gegen das gewünschte Enzym produzierten. Im Laufe der Kultivierung verlor eine der beiden Linien ihre Fähigkeit zur Antikörperproduktion. Die Antikörper der verbliebenen Zelllinie werden im weiteren mAk dNIR1a genannt.

Nach den beiden Zellfusionen, die der Immunisierung mit Cu-dNIR aus *A. faecalis* S6 folgten, konnten über ein erstes Screening insgesamt 81 positive Klone im ELISA nachgewiesen werden. Diese Klone wurden weiterhin mit Rohextrakten der Bakterien *O. tritici* und *A. faecalis* S6 auf Reaktion mit Cu-dNIR getestet. Die Expression des Enzyms war zuvor durch Test auf N₂O mittels Gaschromatografie (B 8.2) nachgewiesen worden. Der ELISA ergab 41 positive Zellklone. Mit Überständen dieser 41 Hybridomazelllinien wurde anschließend ein Immunoblot mit Rohextrakten aus Bakterien verschiedener phylogenetischer Herkunft durchgeführt. Die Kulturen waren zuvor durch Gaschromatografie auf Produktion von N₂O untersucht worden. Die 10 Klone, die das weiteste Spektrum zeigten wurden ein zweites Mal getestet. Die Ergebnisse sind in Tab.12 zusammengefasst. *Ps. aeruginosa* besitzt eine hämhaltige dNIR und *E. coli* eine Sirohäm-haltige Nitritreduktase; sie wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

TAB. 12: KREUZREAKTIONEN VERSCHIEDENER anti-dNIR-ANTIKÖRPER MIT DENITRIFIZIERENDEN BAKTERIENROHEXTRAKTEN IM WESTERN IMMUNOBLOT

	mAk9	mAk15	mAk17	mAk20	mAk23	mAk24	mAk29	mAk34	mAk37	mAk38
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> DSM 30205	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> DSM 30030	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i> S6	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Alcaligenes</i> sp. DSM 30128	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> DSM 30131	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus azotoformans</i> DSM 1046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i> 1a	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>Ochrobactrum grignonense</i> LMG 18955	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>Ochrobactrum tritici</i> LMG 18957	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas denitrificans</i> ssp. den. DSM1650 *	-	-	-	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)
<i>E. coli</i> JM 105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Ps. denitrificans* zeigte mit allen positiv reagierenden mAks eine zusätzliche Bande bei ca. 24 kD.

Klon 29 wurde genauer charakterisiert (weiterhin als mAk dNIR29 bezeichnet), da mit mAk dNIR29 unter Standardbedingungen für den Immunoblot keine Hintergrundreaktionen auftraten, er ein weites Spektrum für Cu-dNIRs aus unterschiedlichen Bakterien zeigte und in einem Vorversuch ein Signal nach Immunofluoreszenz-*in situ*-Markierung zu sehen war.

3. Charakterisierung der ausgewählten Antikörper

3.1 Spezifität/Kreuzreaktionen

Die Kreuzreaktivität von mAk dNIR1a und mAk dNIR29 wurden im indirekten Immunoassay mit Chemolumineszenzdetektion getestet (B 16.1). Die zu untersuchenden Bakterien wurden anaerob mit 2 g/l KNO_3 kultiviert und mittels Gaschromatografie (B 8.2) auf Denitrifikationsaktivität untersucht. Mit einem Rohextrakt der verschiedenen Bakterien wurden Mikrotiterplatten beschichtet und ein ELISA durchgeführt. Zur Negativkontrolle wurden *E.coli* und *Ps. aeruginosa* ausgewählt, da diese Organismen alternative Nitritreduktasen (Sirohäm- bzw. Häm-abhängige NIR) besitzen.

Abb. 20 zeigt, dass sich die beiden untersuchten Antikörper in ihrer Spezifität sehr stark unterscheiden. Während mAk dNIR1a nur mit der Nitritreduktase aus *O. anthropi*, also dem Protein, mit dem die Immunisierung erfolgte, kreuzreagiert, zeigt der Antikörper mAk dNIR29 ein weitaus größeres Spektrum für kupferabhängige Nitritreduktasen aus Bakterien unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen. Definiert man die Reaktion von *Pseudomonas aeruginosa* als Hintergrund, so konnte außer bei *Agrobacterium tumefaciens* DSM 30205 und *Pseudomonas alcaligenes* DSM 50342 mit den Rohextrakten aller untersuchten Organismen ein Signal detektiert werden. Beide Antikörper zeigen keine oder nur geringe Kreuzreaktionen mit den Kontrollbakterien *E. coli* JM 105 und *Ps. aeruginosa* DSM 10.

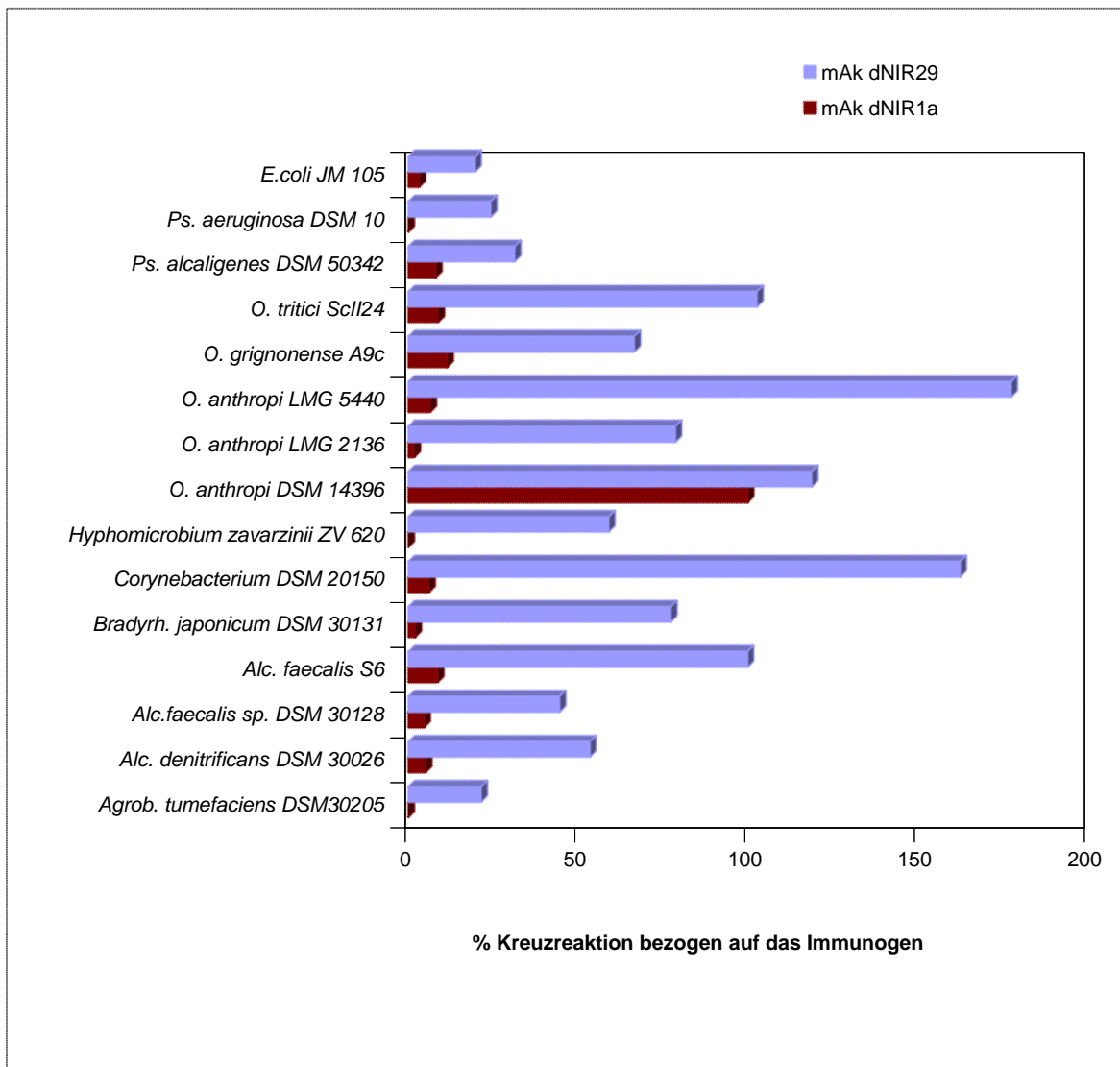


ABB. 20: KREUZREAKTIVITÄT DER ANTIKÖRPER mAk dNIR1a UND mAk dNIR29

Es wurde ein indirekter ELISA mit Rohextrakten verschiedener Organismen durchgeführt. Hierzu wurde jede Kavität der Mikrotiterplatte mit 1µg Gesamtprotein beschichtet. Die Detektion erfolgte chemoluminometrisch. Für den Antikörper mAk dNIR29 wurden die gemessenen Werte auf *Alcaligenes faecalis* S6 bezogen; für den Antikörper mAk dNIR1a auf *Ochrobactrum anthropi* 1a

3.2 Sensitivität

Die Sensitivität der beiden monoklonalen Antikörper mAk dNIR1a und mAk dNIR29 für Cu-dNIR wurde im ELISA mit Chemolumineszenzdetektion bestimmt. Die Platten wurden mit der rekombinanten bzw. der aus *O. anthropi* isolierten Cu-dNIR im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 ng beschichtet und ein indirekter Immunoassay (B 16.1) durchgeführt. Für mAk dNIR1a lag die Nachweisgrenze bei 2 ng Cu-dNIR und für mAk dNIR29 bei 5 ng Cu-dNIR (Abb. 21).

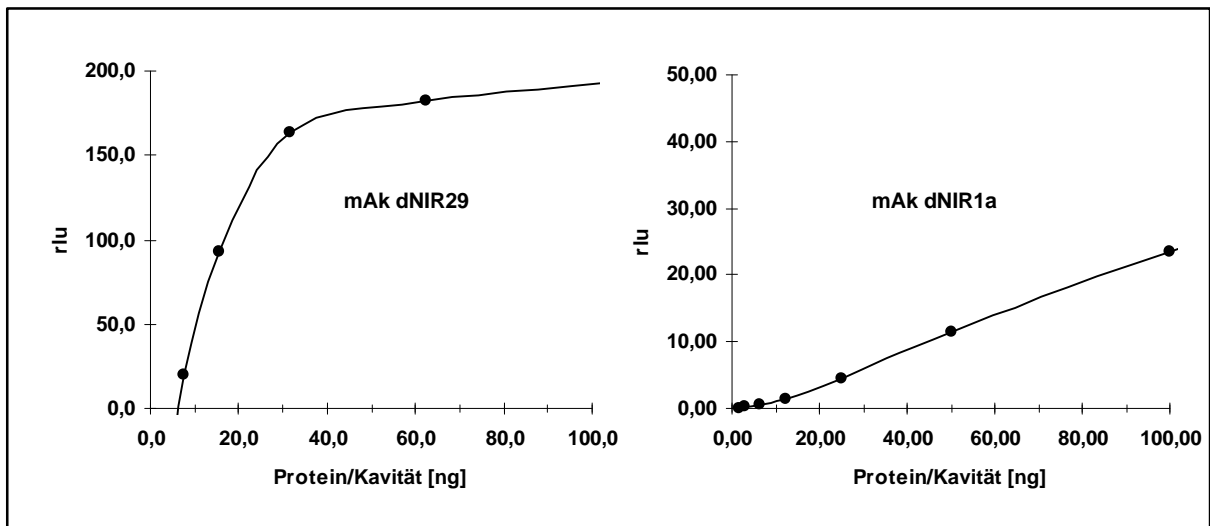


ABB. 21: SENSITIVITÄT DER BEIDEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPER mAk dNIR1a UND mAk dNIR29 FÜR Cu-dNIR

rlu=relative light units

3.3 Bestimmung der Klassen und Subklassen der anti-dNIR Antikörper

Die Subklassen von mAk dNIR1a wurden mit dem *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit* (B 15) ermittelt. Die leichte Kette gehört zur Lambda-Subklasse. Für die schweren Ketten konnten IgG1 und IgG3 Subtypen nachgewiesen werden. Dies widerspricht nicht der Monoklonalität der Hybridoma-Zelllinie, denn es kann aufgrund des modularen Aufbaus der Antikörpergene zu einem sog. Klassenswitch kommen, so dass ein Teil der Hybridoma-Zellen Antikörper einer anderen Subklasse bildet.

Die Subklassen von mAk dNIR29 wurden mit dem *Isostrip Kit* (B 15) bestimmt. Es handelt sich um einen Antikörper der Klasse IgG1; die leichte Kette gehört zur „Kappa“-Subklasse.

4. Anwendungen

4.1 Differenzierung zwischen Cu-dNIR-induzierten und nicht induzierten Zellen im Western Blot

Kakutani *et al.* (1981) beschrieben für die Cu-dNIR aus *Alcaligenes faecalis* S6 eine Reprimierung der Enzymsynthese unter hohen Sauerstoffkonzentrationen und Anwesenheit von Nitrit. Im folgenden Versuch wurde *A. faecalis* S6 sowohl im aeroben als auch im anaeroben Milieu kultiviert. Weiterhin wurde zur Induktion des denitrifizierenden Enzymsystems bei

anaerobem Wachstum Nitrat (2 g / l) zugegeben, welches von den Bakterien selbst zu Nitrit umgesetzt wird. Hierdurch wurden toxische Effekte durch zu hohe Nitritkonzentrationen ausgeschlossen. Von den Bakterien wurden zellfreie Rohextrakte hergestellt (B 4) und im SDS-Gel (B 6.1) aufgetrennt. Ein Teil des Gels wurde mit Silber gefärbt (B 6.3), der andere auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (B 16.2.1). Nach Detektion mit dem Antikörper mAk dNIR29 (B 16.2.2) konnte bei aerobem Wachstum (I) keine Bande, bei anaerobem Wachstum mit Nitrat im Medium (II) dagegen eine klare Bande bei 39 kD nachgewiesen werden (Abb.22). Die Ergebnisse zeigen, dass der Antikörper mAk29 zum Nachweis der Induktion von Cu-dNIR eingesetzt werden kann.

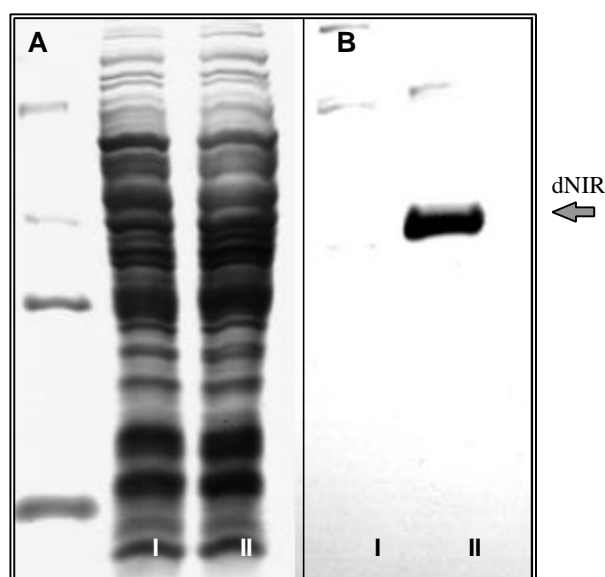


ABB. 22: NACHWEIS DER INDUKTION VON *A. faecalis* S6 FÜR Cu-dNIR MIT mAk29

Alcaligenes faecalis S6 wurde aerob ohne Nitrat (I) bzw. anaerob mit 2 mg/ml Nitrat im Medium (II) kultiviert. Von beiden Kulturen wurden Rohextrakte hergestellt und durch PAGE aufgetrennt.

Abb. 22A zeigt das Gel nach Silber-Färbung Abb. 22B zeigt einen Immunoblot mit anti-dNIRmAk (Detektion mittels anti-Maus Peroxidase-Konjugat und Chemolumineszenz).

4.2 Fluoreszenz-*in situ*-Markierungen

Um festzustellen, ob die entwickelten Antikörper Cu-dNIR auf Einzelzellebene detektieren, musste erst ein Vorgehen etabliert werden, welches die Diffusion der Antikörper ins Periplasma ermöglicht. Weiterhin musste eine Fixierungsmethode gefunden werden, die die antigenen Determinanten der Cu-dNIR für die Bindung der Antikörper nicht zerstört.

4.2.1 Fluoreszenz-in situ-Markierungen an Reinkulturen

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden anaerob mit 2 g/l NO_3^- kultiviert und mit dem Gaschromatografen auf Produktion von N_2O getestet (B 8.2). Anschließend wurden die Bakterien mit verschiedenen Methoden fixiert und vorbehandelt. Es folgte eine indirekte Markierung der Bakterien mit den anti-dNIR-Antikörpern (B 16.3). Hierbei musste die Konzentration des Sekundärantikörpers und die Konzentration zur Einstellung der Stringenz optimiert werden, um unspezifische Bindung und somit falsch positive Signale zu vermeiden. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Inkubation mit anti-dNIR-Antikörper und *E. coli*, der keine Cu-dNIR enthält. Die verschiedenen Ansätze wurden anschließend im Epifluoreszenz- bzw. Laserscanning-Mikroskop (B 17) ausgewertet.

Fixierungsmethode:

Verglichen wurde Fixierung mit 4% PFA (Amann *et al.* 1990), mit 50% EtOH und mit 4% Glutaraldehyd. Die Fixierung mit Glutaraldehyd führte zu Autofluoreszenz im grünen, blauen und roten Wellenlängenbereich, so dass eine Detektion durch Immunofluoreszenz unmöglich war. Sowohl nach Fixierung mit PFA als auch EtOH konnte eine Markierung mit den anti-dNIR Antikörpern durchgeführt werden. Das Signal nach Fixierung mit EtOH war etwas intensiver als nach Fixierung mit PFA, jedoch waren die Zellen nicht so lange haltbar. Nach ca. 4 Wochen konnte nur noch ein sehr schwaches Antikörper-Signal erzielt werden. Die PFA-fixierten Zellen konnten mehrere Monate bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden (Daten nicht gezeigt).

Permeabilisieren der Cytoplasmamembran:

Die fixierten Zellen mussten zusätzlich einer weiteren Behandlung unterzogen werden, um Zellwand und äussere Membran durchlässig zu machen. Hierzu wurden Behandlungen mit Lysozym (10 mg/ml in PBS) bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Das stärkste Fluoreszenzsignal wurde nach 15-minütiger Inkubation bei RT erzielt. Längere Inkubationszeiten führten zu einer Abnahme der Antikörper-vermittelten Fluoreszenz; nach 45 min war fast kein Signal mehr sichtbar. 30-minütige Lysozymbehandlungen auf Eis erzielten gleich gute Ergebnisse wie eine 15-minütige Inkubation bei RT, ebenso wie eine viertelstündige Behandlung mit DMSO (0,5 % in PBS, v/v) bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ (Daten nicht gezeigt).

Blockieren

Es wurden Rinderserumalbumin und fötales Kälberserum in verschiedenen Konzentrationen zur Reduzierung des Hintergrundes getestet.

Abb. 23 zeigt Epifluoreszenzaufnahmen von *O. anthropi* nach Markierung mit mAk-dNIR1a und anti-Maus-FLUOS. Die Hintergrundfluoreszenz konnte durch 30-minütige Inkubation mit 3 % Rinderserumalbumin bei RT deutlich reduziert werden. Höhere Albumin-Konzentrationen brachten keine weitere Verbesserungen. Blockierungen mit 10 % fötalem Kälberserum zeigten vergleichbare Ergebnisse wie Behandlungen mit 3 % Albumin.

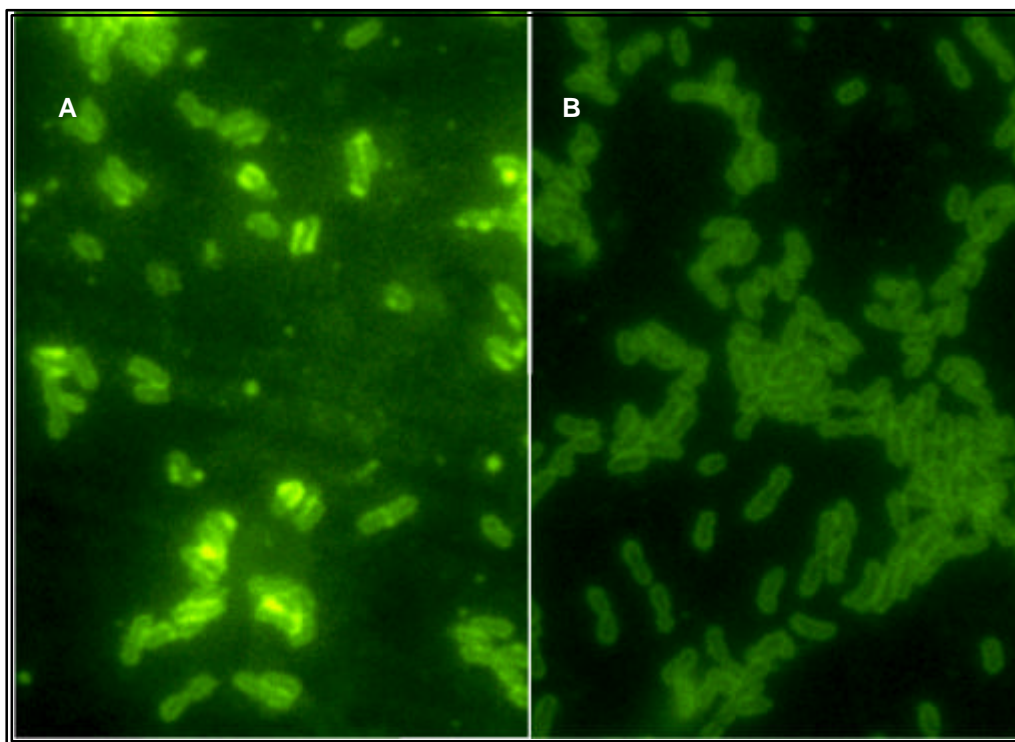


ABB. 23: EFFEKT DER BLOCKIERUNG BEI IMMUNOFLUORESCENZMARKIERUNG VON *O. anthropi* MIT DEM ANTIKÖRPER mAk-dNIR1a AUF DEN HINTERGRUND

A = ohne Blockierung B = vor Zugabe des anti-dNIR-Antikörpers wurde der OT 30 min bei RT in einer 3 %-igen Lösung (w/v) von Rinderserumalbumin inkubiert.

Die Aufnahmen entstanden am Epifluoreszenzmikroskop (B 17.2). Vergrößerung: 100 x

Dauer und Temperatur für die Inkubation mit dem anti-dNIR Antikörper

Inkubationen bei RT für 1,5 h und Inkubation ü. N. bei 4 °C mit den anti-dNIR Antikörpern ergaben vergleichbare Signalstärken, ohne dass falsch-positive Bindungen an den Kontrollen nachgewiesen werden konnten.

Markierungen mit den anti-dNIR Antikörpern erfolgten somit in der Regel nach 15-minütiger Lysozymbehandlung bei RT, 30-minütiger Blockierung mit 3 %-iger Rinderserumalbuminlösung für 1,5 h Inkubation bei RT und anschließender Detektion mit einem Sekundärantikörper (Daten nicht gezeigt).

Abb. 24 zeigt Epifluoreszenzaufnahmen von dNIR-induzierten Bakterien nach indirekter Immunfluoreszenz-Markierung mit den beiden Antikörpern mAk-dNIR1a bzw. mAk-dNIR29.

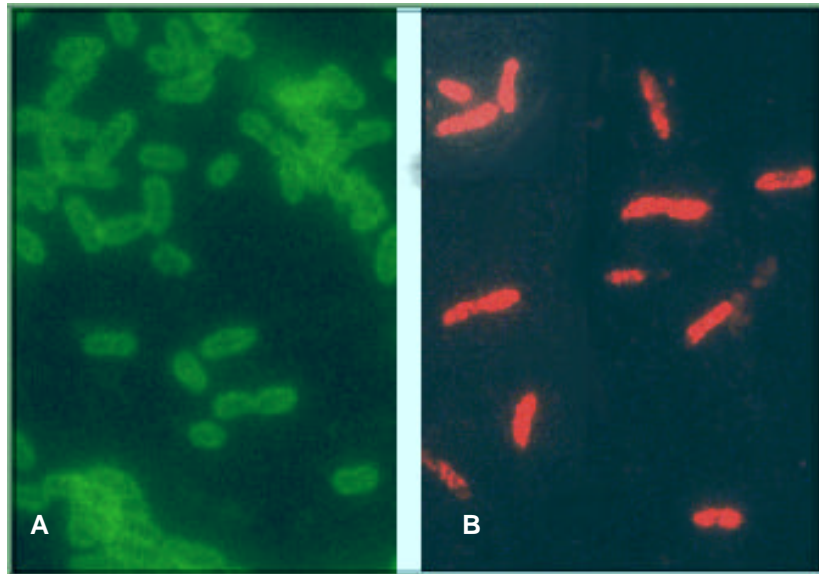


ABB. 24: IMMUNOFLUORESCENZMARKIERUNG VON *O. anthropi* UND *A. faecalis* MIT DEN ANTIKÖRPERN mAk-dNIR1a UND mAk-dNIR29

A = *O. anthropi* nach Markierung mit mAk-dNIR1a und Detektion mit anti-Maus-Fluorescein B = *A. faecalis* nach Markierung mit mAk-dNIR29 und Detektion mit anti-Maus-Cy3

Die Aufnahmen entstanden am Epifluoreszenzmikroskop (B 17.2). Vergrößerung: 100 x

Man kann deutlich eine ringförmige Markierung erkennen, welche die Lokalisation der Cu-dNIR im Periplasma widerspiegelt. In Bild B ist dies weniger deutlich erkennbar, da die stärkere Intensität des roten Fluoreszenzfarbstoffes die Ringform etwas überstrahlt.

4.2.2 Fluoreszenz-*in situ*-Doppelmarkierungen mit dem Antikörper mAk-dNIR1a und rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonde

Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde mit der *in situ*-Hybridisierung mit rRNS-gerichteten Sonden kombiniert (B 16.3.4). Es konnte kein SONDENSIGNAL nachgewiesen werden, wenn zuerst mit dem Antikörper markiert und dann die *in situ*-Hybridisierung durchgeführt wurde. Auch

nach Einfügen eines zusätzlichen Fixierungsschrittes zwischen den beiden Markierungstechniken, wie bei Aßmus (1995) beschrieben, konnte ein Sondensignal nur bei den Zellen, die keine Antikörpermarkierung zeigten, detektiert werden.

Wurde andererseits die *in situ*-Hybridisierung vor der Inkubation mit dem Antikörper durchgeführt, so war eine simultane Markierung mit beiden Methoden möglich. Allerdings mussten sämtliche Lösungen während der Inkubationsschritte mit dem Antikörper auf die optimale Salzkonzentration für die rRNS-gerichtete Sonde während der Hybridisierung eingestellt werden, um ein Abdiffundieren von ihrem Zielmolekül zu verhindern. Ohne diese Maßnahme konnte kein Sondensignal detektiert werden. Das Sondensignal nahm bei Verringerung der Salzkonzentration proportional zu diesem ab (nicht gezeigt). Abb. 26 zeigt Cu-dNIR-induzierte Zellen des Organismus *O. anthropi* nach simultaner Markierung mit mAk-dNIR1a und der Sonde Eub 338. Es konnten alle durch den DNS-Farbstoff DAPI anfärbbaren Zellen sowohl mit der Sonde, als auch mit dem Antikörper detektiert werden. Die ringförmige Antikörperfärbung ist deutlich zu erkennen.

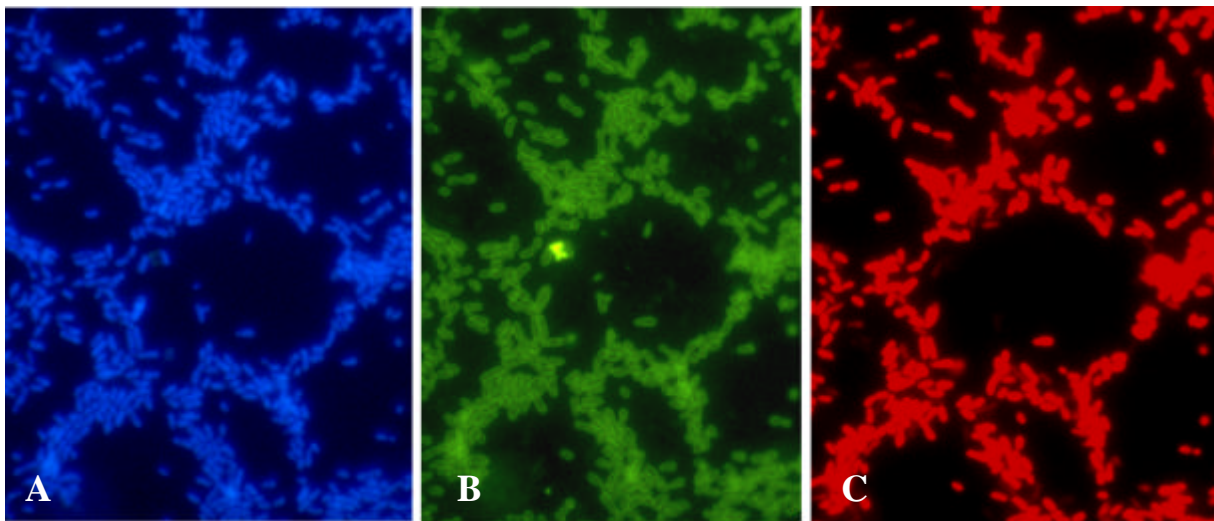


ABB. 25: SIMULTANE MARKIERUNG VON *O. anthropi* MIT mAk-dNIR1a UND DER rRNS-GERICHTETEN SONDE Eub 338

Die drei Epifluoreszenz-Aufnahmen zeigen identische Bildausschnitte. A = Färbung mit DAPI; B = Markierung mit mAk-dNIR1a und anti-Maus-Fluorescein; C = *in situ*-Hybridisierung mit Cy3-markierter Sonde Eub 338; Vergrößerung: 100 x

4.3 Expressionsstudien von Cu-dNIR nach Shift einer aeroben Bakterienkultur zum anaeroben Milieu

Zur Untersuchung der Expression von Cu-dNIR in Zellen von *O. anthropi* wurde das Bakterium über Nacht unter aeroben Bedingungen in NB-Medium (B 1.4) kultiviert. Es wurden

9 Parallelansätze von 50 ml NB-Medium, dem 5 g/l Nitrat zugegeben worden waren, in Serumflaschen angesetzt. Die Flaschen wurden verschlossen, mit Helium gespült und im Verhältnis 1:20 mit der Vorkultur inokuliert. Anschließend wurde zur Induktion des denitrifizierenden Enzymsystems unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 10 % (v/v) Acetylen wurde die Umsetzung von N_2O zu N_2 blockiert. Die Kulturen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten abgeerntet. Zuvor wurde jeweils die N_2O -Konzentration in der Gasphase mittels Gaschromatografie (B 8.2) gemessen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden die Nitrit-Konzentrationen im Medium bestimmt. Als Kontrollen dienten nicht inokulierte Ansätze.

Nach ca. 29 h war das Nitrat bis auf einen kleinen Rest verbraucht (nicht gezeigt). Weitere Inkubation führte zu keiner Abnahme mehr. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Kultur das stationäre Wachstumsstadium erreicht, so dass keine hohe physiologische Aktivität mehr zu erwarten war. Das Maximum der Nitritkonzentration konnte 23 h nach Inokulation gemessen werden (Abb.26 A). Das Maximum der N_2O -Konzentration trat erwartungsgemäss etwas zeitlich nach hinten versetzt bei ca. 27 h nach Inokulation auf. Die Kurve folgt der Wachstumskurve (OD_{500} ; Abb.26 B). Um etwas über die Expression pro Zelle sagen zu können ist es sinnvoll die N_2O -Produktionsrate auf die Anzahl der Zellen zu beziehen. Es zeigte sich, dass die stärkste Freisetzung von N_2O pro Zelle und Zeiteinheit 7 h nach Inokulation stattfand; bei Erreichen der stationäre Phase ging die N_2O -Produktionsrate stark zurück (Abb.26 C).

Zu den Zeitpunkten, zu denen die Produktionsrate von N_2O am höchsten ist sollte auch die Expression der Cu-dNIR pro Zelle am stärksten sein. Um dies zu überprüfen wurden Zellen der verschiedenen Probenahmezeitpunkte mit dem Antikörper mAkdNIR29 und einem FLUOS-gekoppelten Sekundärantikörper markiert und unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet. Abb. 27 zeigt den Anstieg der Fluoreszenz-Intensität bis zu 8 Stunden nach Inokulation. Zu späteren Zeitpunkten ist keine Zunahme der Signalstärke mehr zu erkennen.

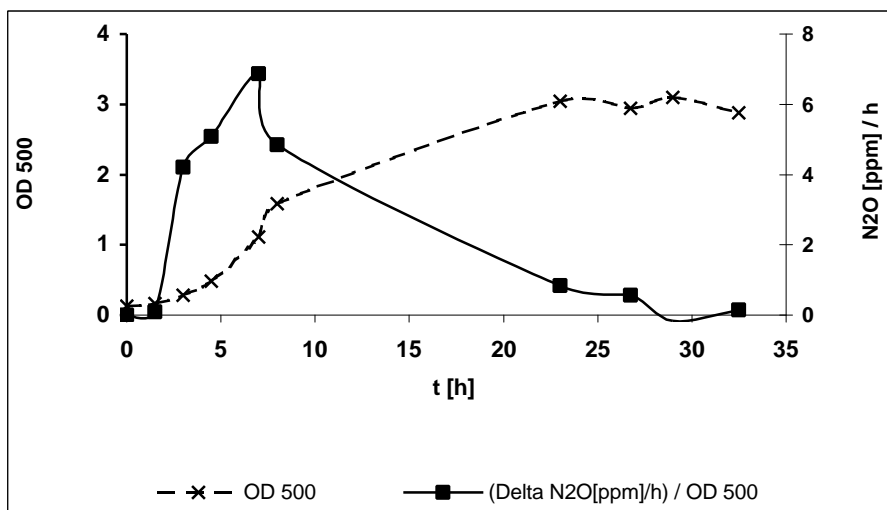
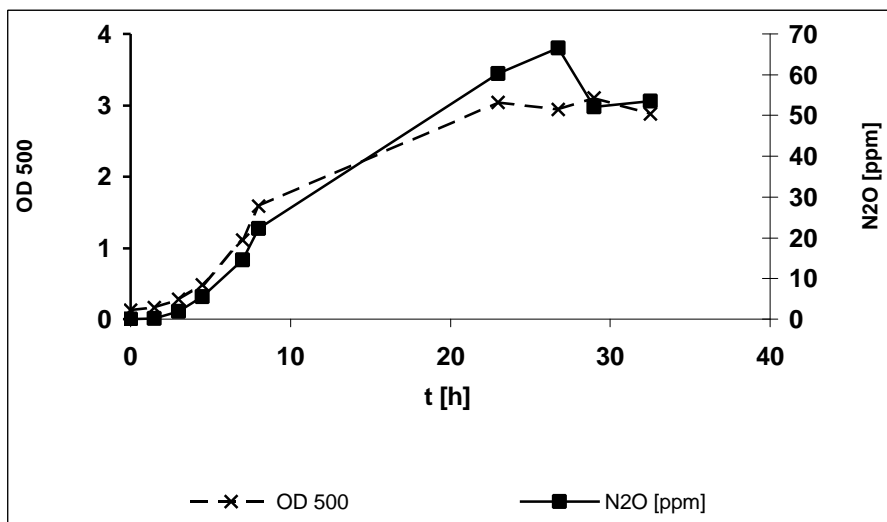
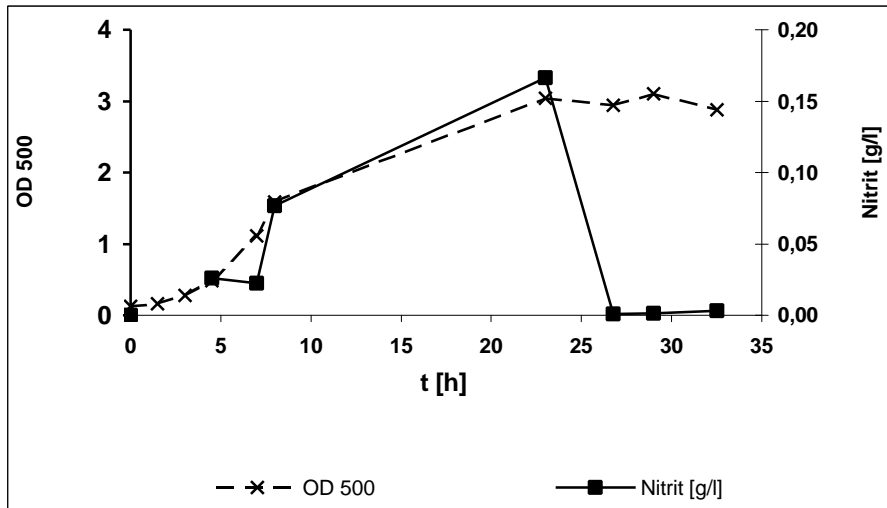


ABB. 26: KONZENTRATIONEN VON NITRIT UND N₂O ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN NACH WECHSEL DER INKUBATIONSBEDINGUNG VON AEROB ZU ANAEROB

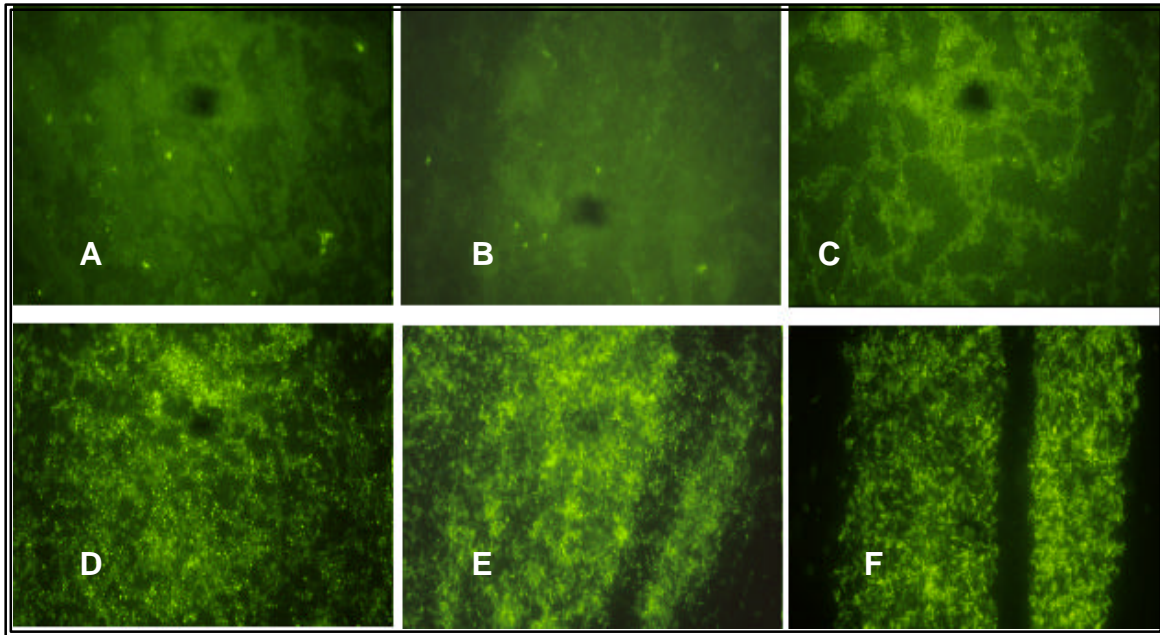


ABB. 27: EXPRESSION VON Cu-dNIR IN *O. anthropi* NACH EINEM WECHSEL DER INKUBATIONS BEDINGUNGEN VON AEROB ZU ANAEROB

Immunofluoreszenzmarkierung von Cu-dNIR mit mAkdNIR29 und FLUOS-gekoppeltem Sekundärantikörper. Epifluoreszenzaufnahme. Vergrößerung: 10 x.

4.4 Sortierung denitrifizierender Bakterien mit dem Durchflussszytometer über anti-dNIR-Antikörper vermittelte Fluoreszenz

Es sollte überprüft werden, ob der Antikörper mAkdNIR29 eine Sortierung denitrifizierender Zellen am Durchflussszytometer erlaubt. Hierzu wurden Zellen einer teilinduzierten Kultur von *O. anthropi* mit dem Antikörper dNIR29 und einem sekundären Fluorescein-gekoppelten Antikörper markiert. Im Durchflussszytometer wurde von einem Aliquot gleichzeitig das Antikörper-vermittelte Fluoreszenzsignal und das Streulicht als Parameter für jede einzelne Zelle gemessen. Als Kontrolle dienten unmarkierte und nur mit dem Sekundär-Antikörper behandelte Zellen. In Abb. 28 sind Dot-Plots der gemessenen Parameter zu sehen. Die Zellen in der unmarkierten Probe (A) ergaben einen Bereich hoher Ereignisdichte ohne Hintergrundsignale störender nichtzellulärer Partikel. Wurde nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert, also ohne dNIR-spezifischen monoklonalen Antikörper, so konnte keine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden (B). Markierung mit beiden Antikörpern ergab dagegen zwei klar voneinander abgegrenzte Populationen von dNIR-induzierten und dNIR-nicht induzierten Zellen(C).

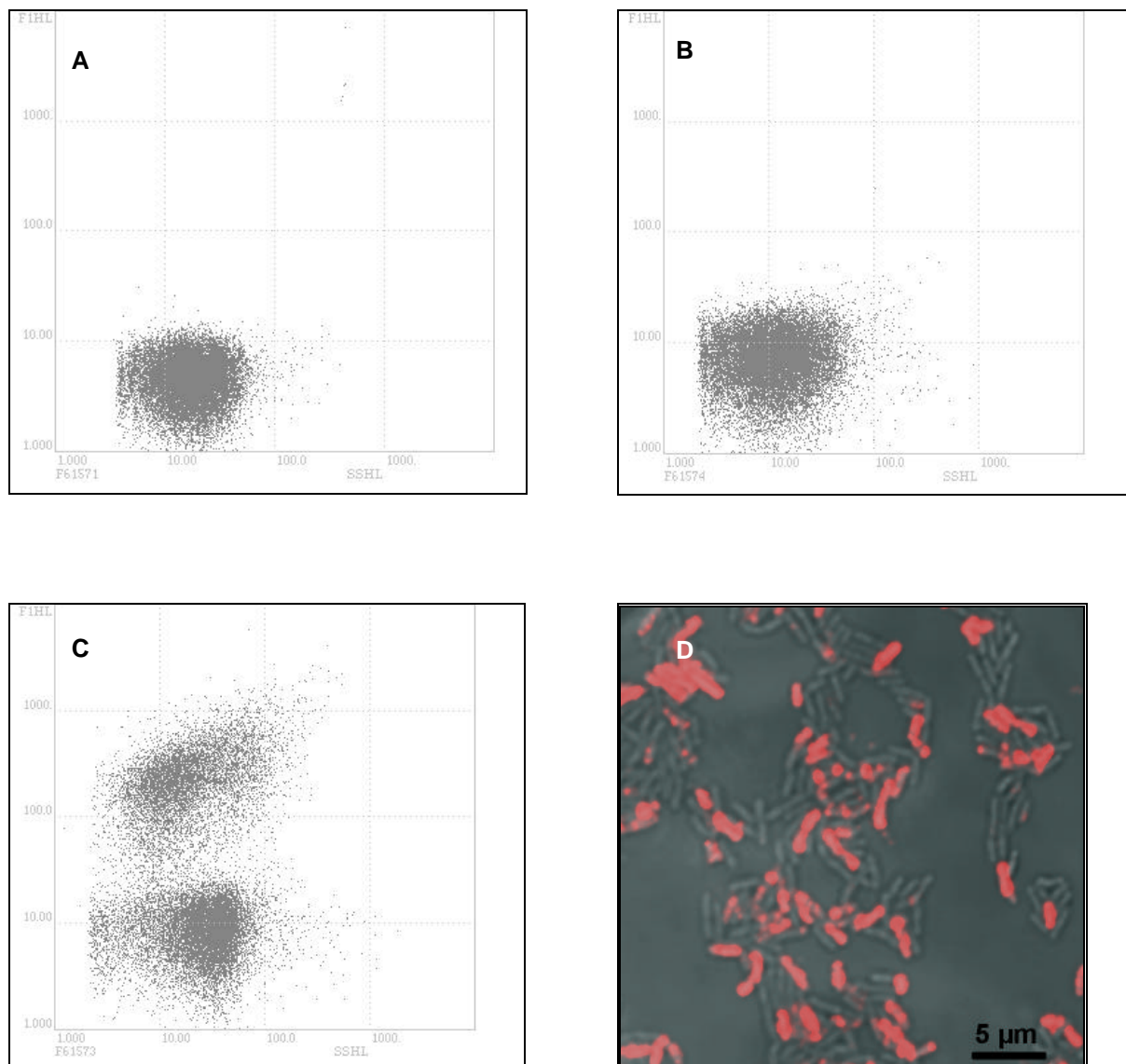


ABB. 28: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE EINER dNIR-INDUZIERTEN KULTUR VON *O. anthropi* NACH MARKIERUNG MIT mAk-dNIR29 UND EINEM SEKUNDÄREN FLUOS-GEKOPPELTEN ANTIKÖRPER

Darstellung von Streulicht (SSHL) und Antikörper-vermittelter Fluoreszenz (F1HL) in relativen Einheiten. Es wurden jeweils 20.000 Ereignisse erfasst. A = nicht markierte Kontrolle; B = Markierung nur mit FLUOS-gekoppeltem Sekundärantikörper; C = Markierung mit mAk-dNIR29 und FLUOS-gekoppeltem Sekundärantikörper; D = CLSM-Aufnahme der gleichen Kultur nach Markierung mit mAk-dNIR29 und ALEXA₅₄₆-gekoppeltem Sekundärantikörper

4.5 Fluoreszenz-*in situ*-Markierungen in Umweltproben

4.5.1 Nachweis denitrifizierender Bakterien an Weizenwurzeln

Zwei Wochen alte Weizenpflänzchen wurden mit *O. anthropi* 1a inokuliert (B 2.2.1). Nach weiteren 3 Wochen wurden die Wurzeln präpariert (B 2.2.2). Ein Teil der Wurzeln wurde mit PFA fixiert (B 3.1) und für *in situ*-Markierungen benutzt. Ein anderer Teil wurde zur Quantifizierung der Besiedlung mit den inokulierten Bakterien eingesetzt. Hierzu wurde die Bakterienfraktion isoliert (B 2.2.3) und im ELISA (B 16.1.3) quantifiziert. Es konnte eine Besiedlung der Rhizosphäre mit $1,3 \times 10^5$ Zellen pro g Wurzeln (Frischgewicht) ermittelt werden.

Die Besiedlung durch *O. anthropi* konnte außerdem durch *in situ*-Markierungen gezeigt werden. Fixierte Wurzelstücke wurden mit der rRNS-gerichteten Sonde alf1b hybridisiert und sowohl mit dem für *O. anthropi* spezifischen Antikörper 2.11, als auch dem für die dissimilatorische Nitritreduktase spezifischen Antikörper dNIR1a am CLSM untersucht. Es konnten dichte Besiedelungen mit α -Proteobakterien vor allem an den Wurzelhaaren und Wurzelverzweigungen detektiert werden (Abb 29A). *O. anthropi* 1a konnte durch Immunofluoreszenz mit dem stammspezifischen Antikörper 2.11 nachgewiesen werden. Abb. 29 B zeigt eine Gruppe markierter Bakterien an einer Seitenwurzel.

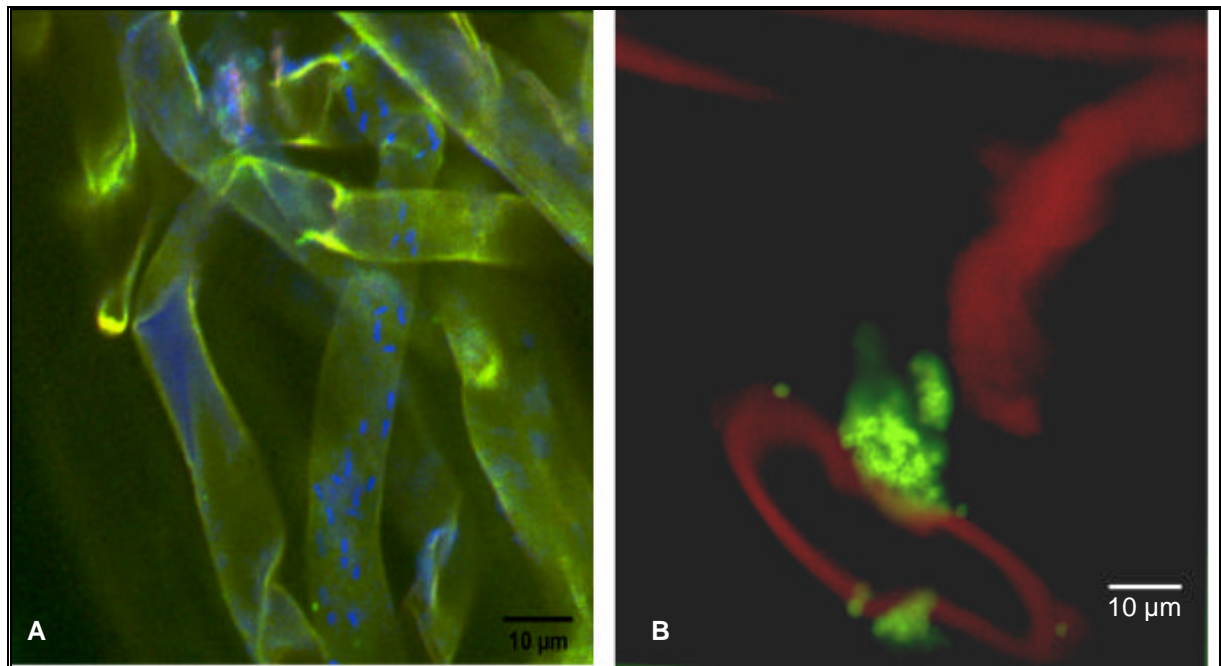


ABB. 29: BESIEDLUNG VON 5 WOCHEN ALTEN WEIZENWURZELN NACH INOKULATION MIT *O. anthropi*

A = *in situ*-Hybridisierung mit der Cy5-gekoppelten rRNS-gerichteten Sonde alf1b (blau);
B = Immunofluoreszenz-Markierung von *O. anthropi* mit dem Antikörper 2.11 und einem FLUOS-gekoppelten Sekundärantikörper (grün). CLSM-Aufnahmen.

Nachdem die Etablierung *O. anthropi* durch ELISA und Immunofluoreszenz nachgewiesen worden war, wurden *in situ*-Markierungen mit dem anti-dNIR-Antikörper 1a und einem FLUOS-gekoppelten sekundären Antikörper durchgeführt. Aufgrund der hohen Spezifität von mAk dNIR1a für Cu-dNIR aus *O. anthropi* 1a, war er zur Untersuchung der Expression von Cu-dNir in den Wurzelpräparaten bestens geeignet. Die Abbildungen 28A und 28B stellen Aufnahmen am CLSM dar. Es konnten vereinzelte und in Gruppen vorkommende Bakterien detektiert werden. Abb. 30 A zeigt eine Seitenwurzel mit einer Gruppe denitrifizierender Bakterien. In Abb. 30 B ist das gleiche Wurzelstück in einer etwas tiefer liegenden Fokusebene mit einer weiteren Gruppe denitrifizierender Bakterien zu sehen.

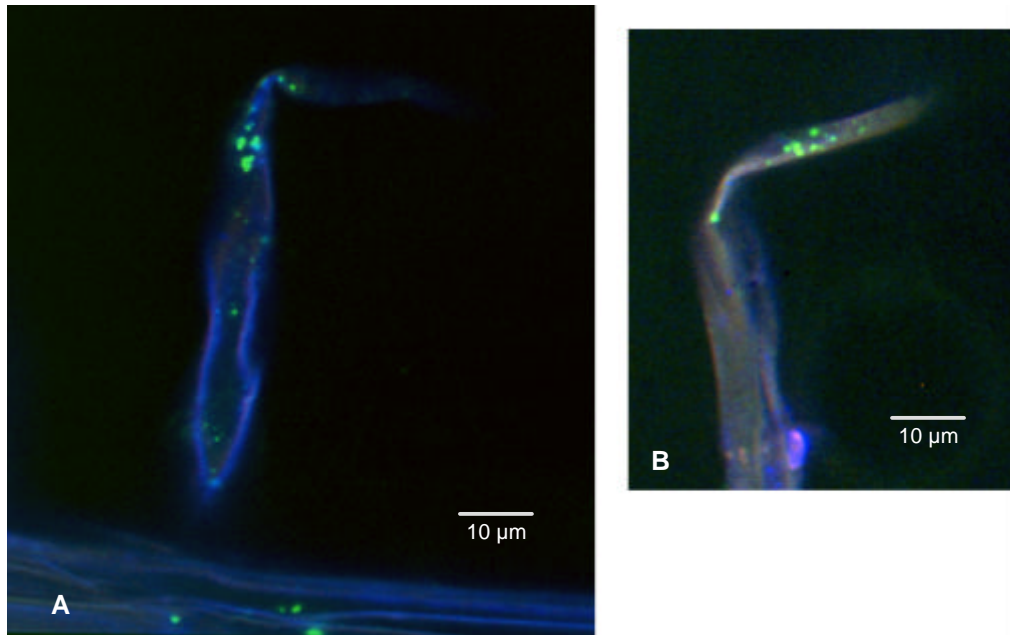


ABB 30. 5 WOCHEN ALTE WEIZENWURZELN:-DETEKTION DENITRIFIZIERENDER BAKTERIEN

Die Wurzeln wurden mit dem Antikörper mAk dNIR1a und einem FLUOS-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) markiert. CLSM-Aufnahmen.

4.5.2 Nachweis denitrifizierender Bakterien im Klärschlamm

Proben aus der Kläranlage München I und der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried wurden mit dem Antikörper dNIR29 auf Denitrifikationsaktivität untersucht. Vor allem in der Probe aus der Anlage München I traten jedoch unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers in den Kontrollansätzen ohne Primärantikörper auf. Dies machte eine Erhöhung der Stringenz erforderlich. Es wurden Markierungen mit Tween80 in Konzentrationen von 0,1; bis 1 % (v/v) während der Waschschriffe und Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchgeführt. Ab einer Konzentration von 0,5 % (v/v) waren keine unspezifischen Markierungen in der Kontrolle mehr nachweisbar (Abb. 31). Eine weitere Erhöhung der Tween-Konzentration verringerte die Anzahl der spezifischen Markierungen. Da die Zugabe von 0,5 % Tween keinen Einfluss auf die spezifischen Immunofluoreszenzsignale hatte, erfolgten alle Markierungen in Proben aus Klärschlamm unter diesen Bedingungen, auch mit dem ALEXA-gekoppelten Sekundärantikörper.

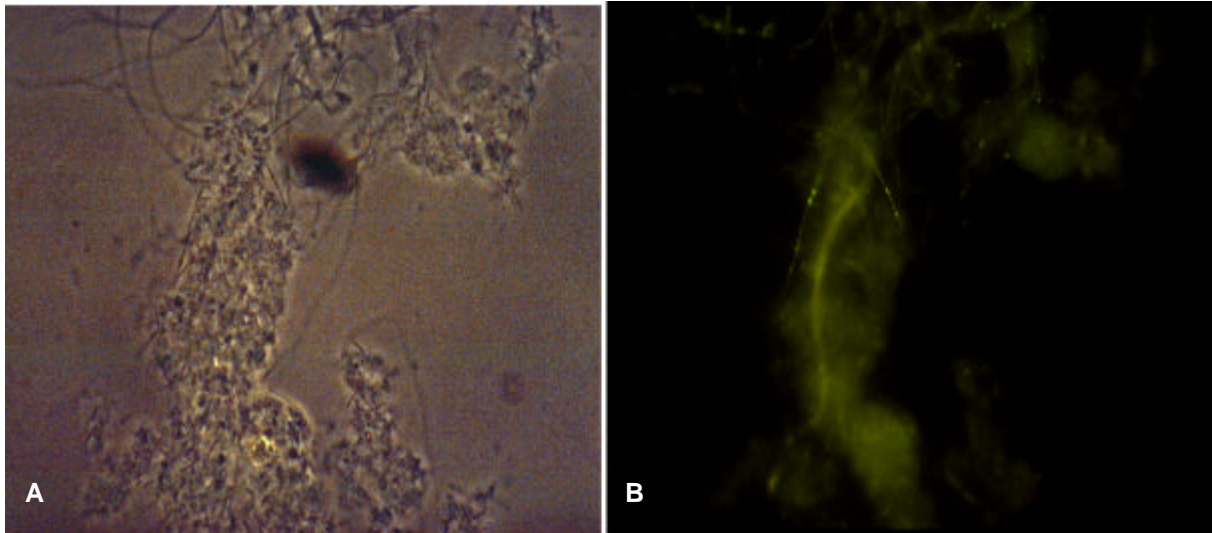


ABB. 31: EINSTELLEN STRINGENTER INKUBATIONSBEDINGUNGEN FÜR DEN SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Proben aus der Anlage München I wurden mit dem FLUOS-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Während der Waschschrte und der Inkubation mit dem Antikörper wurden 0,5 % Tween (v/v) zugegeben. Anschließend waren keine unspezifischen Markierungen nachweisbar. Die beiden Fotos zeigen identische Bildausschnitte. A = Phasenkontrastaufnahme; B = Epifluoreszenz-Aufnahme. Vergrößerung 100 x

Für die Expressionsuntersuchungen im Klärschlamm wurde der Antikörper mAk dNIR29 eingesetzt, da er ein weites Spektrum unterschiedlicher dNIRs erkennt. Der Antikörper ermöglichte in Proben aus zwei verschiedenen Kläranlagen die Detektion von Bakterien, die die Cu-dNIR exprimiert haben. In der Probe aus Kraftisried konnten hauptsächlich am Rande der Flocken stäbchenförmige Bakterien markiert werden (Abb. 30). Im Klärschlamm aus München I dagegen wurden auch im Innern der Flocken markierte Bakterien beobachtet. Sie waren meist zu Gruppen oder in Ketten angeordnet; es kamen aber auch einzeln liegende Zellen vor (Abb. 32). Es konnten sowohl kokkoide als auch stäbchenförmige denitrifizierende Organismen nachgewiesen werden. In den CLSM-Aufnahmen (Abb. 34) ist die Lokalisierung der dNIR im Periplasma der Bakterien als Ringmarkierung sehr gut zu sehen.

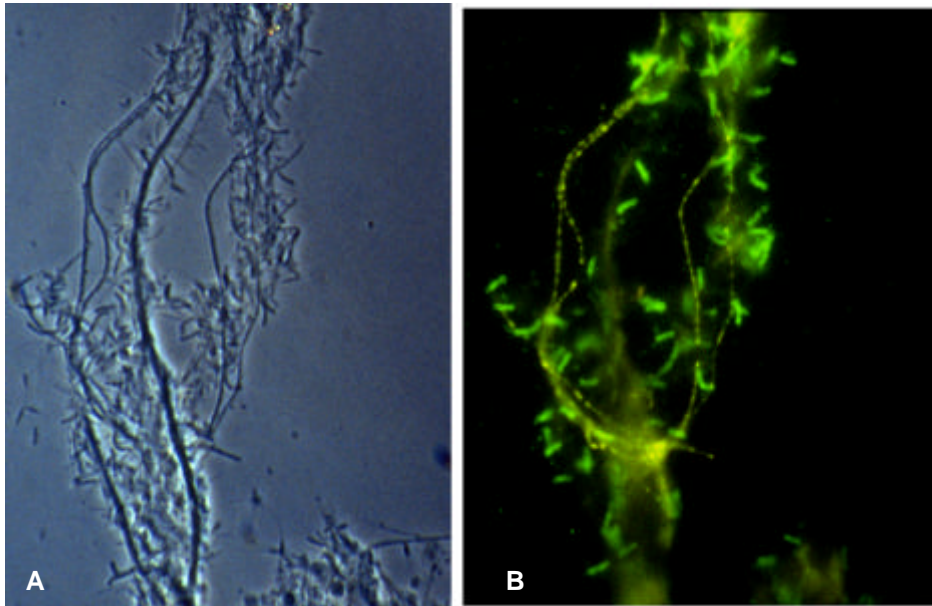


ABB. 32: EXPRESSION VON Cu-dNIR IN PROBEN AUS DER TIERKÖRPERVERWERTUNGSANLAGE KRAFTISRIED

Die Zellen wurden mit dem anti-dNIR-Antikörper und einem FLUOS-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die beiden Fotos zeigen identische Bildausschnitte. A = Phasenkontrastaufnahme; B = Epifluoreszenzaufnahme; Vergrößerung: 100 x

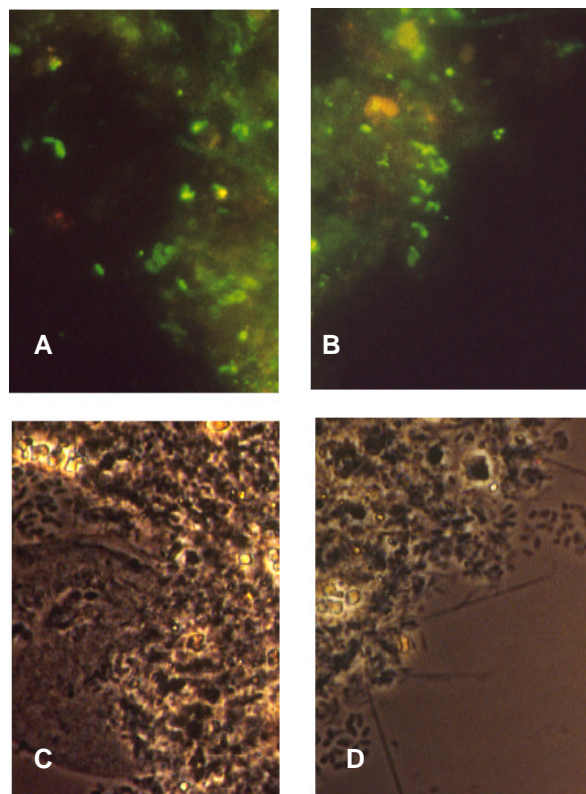


ABB. 33: EXPRESSION VON Cu-dNIR IN PROBEN AUS DEM DENITRIFIKATIONSBECKEN DER KLÄRANLAGE MÜNCHEN I

Die Zellen wurden mit dem anti-dNIR-Antikörper und einem FLUOS-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) markiert. Jeweils zwei übereinanderliegende Fotos zeigen identische Bildausschnitte.

A, B = Epifluoreszenzaufnahme; C, D = Phasenkontrastaufnahme; Vergrößerung: 40 x

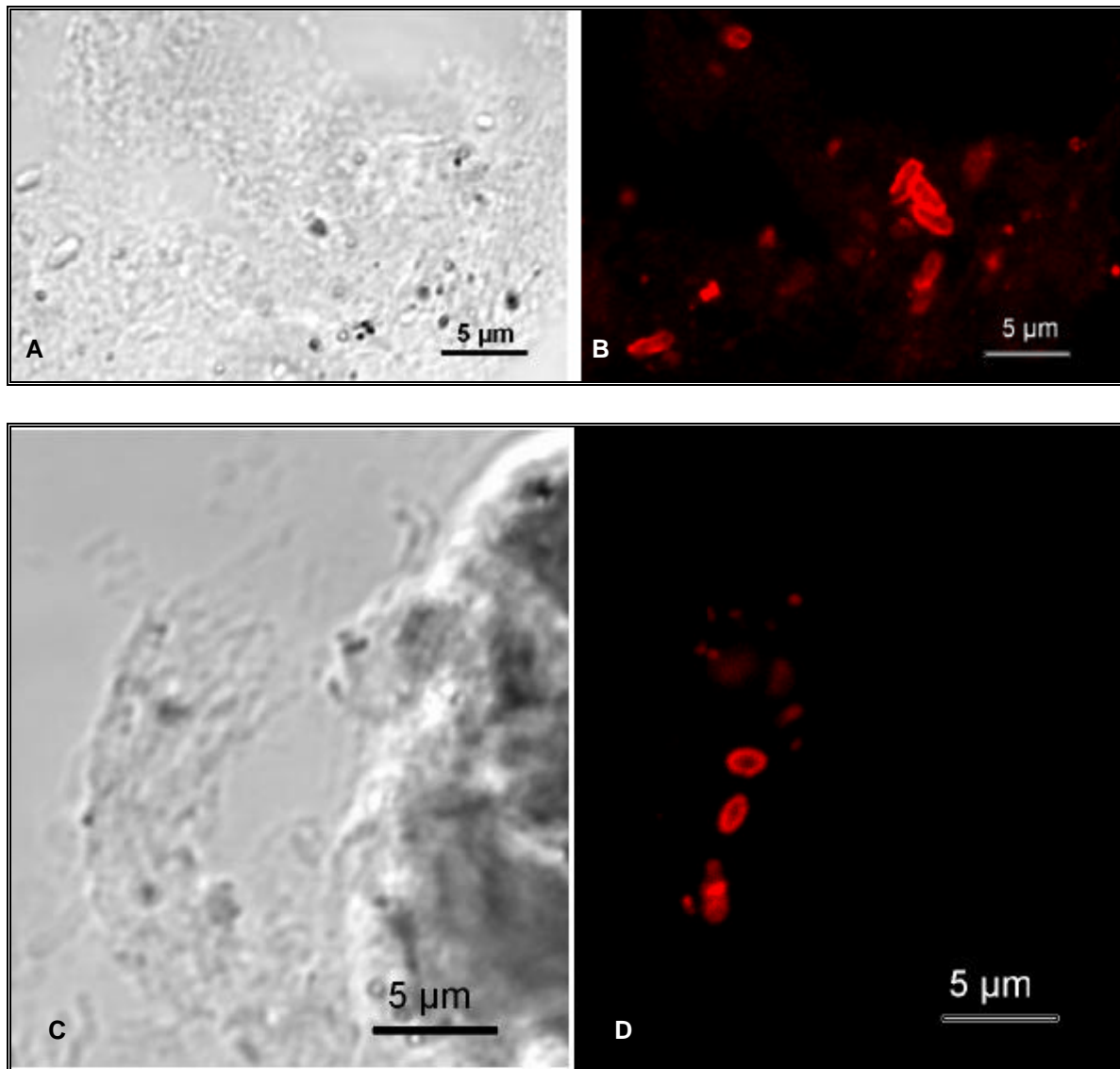


ABB. 34: EXPRESSION VON Cu-dNIR IN PROBEN DER KLÄRANLAGE MÜNCHEN I

Die Zellen wurden mit dem anti-dNIR-Antikörper29 und einem ALEXA₅₄₆-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die beiden CLSM- Fotos zeigen jeweils identische Bildausschnitte. A und C = Helfeldaufnahme; B und D = Fluoreszenzaufnahme

D Diskussion

1. Anforderungen an ein Detektionssystem für den *in situ*-Nachweis von Denitrifikationsaktivität

In dieser Arbeit wurde ein Detektionssystem für den *in situ*-Nachweis der Expression der Cu-haltigen dissimilatorischen Nitritreduktase in Bakterien entwickelt.

Denitrifikationsmessungen in der Umwelt wurden in der Vergangenheit hauptsächlich durch die Bestimmung einer mittleren Denitrifikationsrate über N_2O -Messungen auf einer Versuchsfläche in Kombination mit der Acetylen-Inhibierungstechnik (Ryden *et al.*, 1978) durchgeführt. Da Acetylen die N_2O -Reduktase inhibiert, entsteht als Endprodukt der Denitrifikation hauptsächlich N_2O . Jedoch besitzen verschiedene Mikroorganismen nach einer gewissen Adaption die Fähigkeit Acetylen als zusätzliche Kohlenstoff- bzw. Energiequelle zu nutzen (Haider *et al.*, 1983; Yeomanis und Beauchamp, 1982). Dies erschwert eine genaue Konzentrationseinstellung des Hemmstoffes. Zusätzlich wird durch Acetylen auch der Prozess der Nitrifikation (Mosier, 1980) gehemmt. Dies schließt zwar Nitrifikanten als Quelle für N_2O aus, hat aber zur Folge, dass die Nitratmengen, und somit auch die Denitrifikationsraten, geringer sind als in der unbehandelten Fläche. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Verzögerung der Diffusionsrate von Acetylen bei Verdichtung und Vernässung der untersuchten Fläche dar (Walenzik und Heinemeyer, 1989). Zudem gibt es innerhalb einer Untersuchungsfläche in natürlichen Proben immer Mikroheterogenitäten in den physikalischen, chemischen und biologischen Parametern, welche die Aktivität von Bakterien auf kleinstem Raum beeinflussen. Ein blosses Messen der Stoffflüsse lässt keine Zuordnung der Aktivität zu einem Mikrohabitat und dessen spezifischen Parametern zu.

Weiterhin lässt der Nachweis des Endproduktes einer Reaktion nicht immer eindeutig Rückschlüsse auf eine bestimmte stoffwechselphysiologische Leistung zu. Am Beispiel der Denitrifikation wird dies besonders deutlich. Es gibt mindestens drei verschiedene Quellen für N_2O . Es kann chemisch durch den Abbau von Hydroxylamin entstehen (Bremner *et al.*, 1980). Mikrobiologisch wird N_2O sowohl durch Nitrifikation, als auch durch Denitrifikation freigesetzt (Abb. 1). Ausserdem wird N_2O nicht nur durch denitrifizierende Bakterien im engeren Sinne zu N_2 reduziert, sondern dies kann auch durch Bakterien geschehen, die normalerweise Nitrat zu Ammonium reduzieren, den sog. DNRA-(dissimilatory reduction of nitrate to ammonia) Bakterien (Samuelsson *et al.*, 1985; Schumacher *et al.*, 1992). Die Messung der N_2O -Konzentration ist also

ein unsicherer Bezugsfaktor für die Bestimmung der Denitrifikationsaktivität und der Zuordnung zu den ihr zugrunde liegenden Induktionsbedingungen.

Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass bei einer Summenmessung von N_2O in einem Bodenvolumen bzw. einer Fläche keine Zuordnung von Denitrifikationsaktivität zu bestimmten Organismen möglich ist. Es ist z. B. bekannt, dass Denitrifikation bei verschiedenen Bakteriengruppen unter sehr unterschiedlichen pO_2 -Levels stattfinden kann (Conrad, 1996; Robertson *et al.*, 1995). Dies lässt auf eine unterschiedliche Regulation schließen. So könnte z. B. eine Veränderung der Umweltbedingungen bei gleicher Gesamtumsatzrate im Habitat zu verschiedenen Auswirkungen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der denitrifizierenden Gemeinschaft führen.

Ein Detektionssystem, das zusätzliche Information zum Denitrifikationsgeschehen in der Umwelt bringen will, sollte also folgendes leisten können:

- Der Nachweis der Denitrifikationsaktivität muss auf einer sehr hoch auflösenden Skala durchführbar sein.
- Es sollte die Möglichkeit zur Kombination des Detektionssystems mit Methoden geschaffen werden, die eine Abtrennung und Identifizierung der denitrifizierenden Bakterien erlauben.
- Das System sollte die Denitrifikationsaktivität von Organismen verschiedener phylogenetischer Taxa detektieren können.

Innerhalb dieser Arbeit konnte ein Detektionssystem entwickelt werden, welches diesen drei Forderungen gerecht wird. Die entwickelten Antikörper erlauben den Nachweis von Cu-dNIR in der natürlichen Mikrostruktur von Umwelthabitaten durch Immunofluoreszenzmarkierung auf Einzelzellniveau (Abb. 30, 32, 33, 34). Dies ermöglicht, in Kombination mit bildverarbeitenden und mikroskopischen Techniken wie CLSM, eine Zuordnung zu definierten Mikrohabitaten. Nach Immunofluoreszenzmarkierung mit den anti-dNIR-Antikörpern ist außerdem am Durchflusszytometer eine Trennung von Bakterienzellen, die Cu-dNIR exprimiert haben und solchen die keine Cu-dNIR exprimiert haben möglich (Abb. 28). Die sortierten Bakterien könnten durch anschließende 16S-Studien phylogenetisch eingeordnet werden. Wallner *et al.* (1997) zeigten nach durchflusszytometrischer Sortierung von fixierten Bakterien, die mit 16S rRNS-gerichteten Sonden markiert waren, dass eine anschließende direkte Amplifizierung der rDNS möglich ist. Da der zur Zellsortierung verwendete Antikörper mAkdNIR29 ein breites Spektrum Cu-haltiger dissimilatorischer Nitritreduktasen von Bakterien unterschiedlicher phylogenetischer

Herkunft erkennt (Abb. 20), würde dies die Erfassung der phylogenetischen Diversität einer Teilpopulation von Denitrifikanten bedeuten.

Weiterhin besteht mit den anti-dNIR Antikörpern die Möglichkeit zur Etablierung eines quantitativen und eines semiquantitativen Testsystems für die Expression der Cu-dNIR basierend auf ELISA- und Western-Blot-Techniken. Zusammen mit einem noch zu entwickelnden Antikörper gegen cd_1 -dNIR könnte im Vergleich mit Messungen der N_2O -Konzentrationen somit der Anteil der Denitrifikation an der Entstehung und Umsetzung von N_2O ermittelt werden.

2. Monoklonale Antikörper gegen Cu-dNIR

2.1 Diversität der Cu-dNIR

Die Diversität von *nirK*, dem Gen für Cu-dNIR scheint nach den bisherigen Untersuchungen nicht mit der phylogenetischen Diversität der Denitrifizierer zu korrelieren (Braker *et al.*, 1998; Hallin und Lindgren, 1999; Ward, 1995). So verteilen sich die Cu-dNIRs aus verschiedenen Stämmen von *Alcaligenes faecalis*, welche das Enzym des Cu-Typs besitzen, in zwei verschiedene Hauptcluster. Der Stamm A15 enthält sogar die häm-abhängige dNIR (Abb. 35).

Für die Immunisierung der Versuchstiere zur Gewinnung der anti-dNIR-Antikörper wurde zunächst die Cu-dNIR aus *Ochrobactrum anthropi* 1a, einem Isolat aus landwirtschaftlich genutzten Böden in Scheyern, ausgewählt. *O. anthropi* ist ein Bakterium der α -2-Unterklasse der Proteobakterien (Holmes *et al.*, 1988). Die ubiquitäre Verbreitung sowie die Fähigkeit zur Denitrifikation und zum Abbau verschiedener organischer Verbindungen wie z. B. 2,4 D, Atrazin und Mineralöl (Schloter *et al.*, 1998) macht den Organismus für Untersuchungen zur Denitrifikation interessant. Durch Tests mit Gensonden für die an der Denitrifikation beteiligten Reduktasen war bekannt, dass *O. anthropi* 1a eine dNIR des Cu-Typs besitzt (K. Kloos, Bot. Inst., Universität zu Köln; persönliche Mitteilung). Braker *et al.*, (1998) verglichen die Sequenzen konservierter Bereiche der Cu-dNIR aus verschiedenen Bakterien. Sie konnten zeigen, dass die Teilsequenz der Cu-dNIR von *O. anthropi* LMG 2136 zwischen 67,5 und 99,5 % Ähnlichkeit zu der anderer untersuchter denitrifizierender Bakterien aufweist. Die bisher sequenzierten *nirK*-Fragmente von verschiedenen Stämmen von *O. anthropi* (unter anderem Isolat 1a, persönliche Mitteilung G. Braker) weisen eine Homologie zwischen 98,8 und 100 % auf. Dies ließ den Schluss zu, dass das Enzym aus *O. anthropi* 1a eine durchschnittliche Sequenzähnlichkeit mit Cu-dNIRs anderer Organismen aufweist und somit zur Produktion von Antikörpern mit einem weiten

Spektrum für Cu-dNIR aus Bakterien unterschiedlicher phylogenetischer Zugehörigkeit geeignet ist.

Weiterhin wurde mit der Cu-dNIR aus *A. faecalis* S6 immunisiert. Die von Braker *et al.* (1998) untersuchte Teilsequenz von *nirK* hat 99,5 % Ähnlichkeit mit der von *O. anthropi* LMG 2136. Dies ließ den Organismus als ebenso gut geeignet erscheinen für die Gewinnung des Antigens wie *O. anthropi* 1a.

2.2 Strategien zur Gewinnung von Cu-dNIR

Zur Herstellung von Antikörpern gegen die Cu-dNIR war es nötig das Protein aufzureinigen. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde die dNIR von *O. anthropi* mit einer Kombination aus verschiedenen Chromatografiertechniken und Reinigung über eine Polyacrylamidmatrix gewonnen. Zum anderen wurde das Enzym aus *A. faecalis* kloniert und über einen fusionierten 6 x His-tag aufgereinigt.

Nach Fermentation von *O. anthropi* und Induktion der Nitritreduktase durch Reduzierung des pO_2 im Kulturmedium wurde ein Rohextrakt hergestellt, der anschließend für 10 Min bei 70 °C zur Abtrennung hitzelabiler Proteine inkubiert wurde. Michalski *et al.* (1984) zeigten anhand der Präparation von dNIR aus *Rhodopseudomonas spaeroides*, dass durch Hitzefällung eine Abtrennung von bis zu 60 % der Gesamtproteinmenge ohne nennenswerten Aktivitätsverlust möglich ist.

Aus Arbeiten von Kakutani *et al.* (1985) war bekannt, dass die Cu-dNIR aus *A. faecalis* S6 in einem Gradienten von 0-300 mM Salz eluiert. Durch die Auftrennung dieses Gradienten in drei Stufen von 220 mM, 280 mM und 400 mM NaCl konnte mit einer DEAE-Ionenaustauschersäule eine gute Abtrennung der Cu-dNIR von anderen Zellproteinen erreicht werden (Abb. 7).

Nach der Reinigung über den Ionenaustauscher war die spezifische Aktivität stark vermindert, stieg aber nach Reinigung über das Molekularsieb, verglichen mit dem Rohextrakt, wieder um das Vierfache an. Möglicherweise wurde der Enzymtest für Cu-dNIR durch die hohen Salzkonzentrationen aus dem Elutionspuffer gestört, so dass die tatsächliche Aktivität nach Abtrennung des NaCl in der anschließenden Molekularsiebtrennung erst wieder messbar war.

Zwar konnte im Vergleich zum Rohextrakt hoch aktives Enzym aufgereinigt werden, jedoch war die Ausbeute an Cu-dNIR mit 2,5 µg/g Zellen (Feuchtgewicht) sehr gering und unbefriedigend. Pro Immunisierung und Maus musste somit eine Präparation aus 40 g Zellen (Feuchtgewicht) durchgeführt werden, um die erforderlichen 100 µg Cu-dNIR zu erhalten. Daher wurde das Enzym im folgenden über heterologe Expression in *E. coli* gewonnen. Hierzu wurde die Cu-dNIR aus *A. faecalis* S6 ausgewählt, da das entsprechende *nirK*-Gen bereits sequenziert, in der Datenbank abgelegt und gut charakterisiert war (Nishiyama *et al.*, 1993).

Das komplette Gen wurde in einen Expressionsvektor kloniert und als Fusionsprotein mit einem 6 x Histidin-Rest am N-terminalen Ende exprimiert. Die Primer (B. 1.2.1) wurden auf der Basis

der Nukleotidsequenz entworfen. Der N-terminale Primer startet am 5'-Ende der kodierenden *nirK*-Sequenz (Abb. 10). Er bindet somit in der kodierenden Sequenz für das Signalpeptid zur Sekretion ins Periplasma. Dies bedeutet, dass im rekombinanten Protein eine Fusion zwischen Signalsequenz und 6 x Histidinrest stattfindet (Abb.3), welcher somit bei der Prozessierung des Enzyms abgespalten werden müsste. Da aber *E. coli* und *A. faecalis* S6 verschiedene Proteintranslokalisationswege benutzen (Prudencio *et al.*, 1999) und *E. coli* die Transportsequenz aus *A. faecalis* S6 nicht erkennt (Kukimoto *et al.*, 1994) und somit nicht abspaltet, war es nicht notwendig, die Signalsequenz zu entfernen, um den 6 x Histidin-Rest im reifen Protein zu erhalten.

Nach Klonierung und Transformation von *E. coli* JM105 konnte in 7 von 10 getesteten Klonen *nirK* reamplifiziert werden (Abb. 13). Rohextrakte aus Miniexpressionskulturen der positiven Klone wurden im Immunoblot auf Expression von Cu-dNIR überprüft. 5 Klone zeigten eine eindeutige Bande (Abb. 14). Möglicherweise erfolgte für die beiden negativen Klone die Aufarbeitung der Zellen zum falschen Zeitpunkt, so dass die maximale Expressionsrate entweder schon überschritten und das Enzym von den Zellen abgebaut oder der maximale Expressionslevel noch nicht voll erreicht worden war. Klon 9 zeigte die stärkste Bande im Immunoblot und wurde daher für die Präparation des Enzyms ausgewählt. Das Plasmid wurde ohne Zugabe von IPTG vollständig reprimiert (Abb. 16). Die stärkste Expression erfolgte 4 h nach Induktion mit IPTG (Abb. 16).

Die überexprimierte Cu-dNIR wurde aus einem Gesamtzellextrakt des *E. coli*-Klones 9 anhand des Histidin-tags über eine Metallaffinitätschromatografie-Matrix aufgereinigt. Hierzu gibt es prinzipiell zwei verschiedene Möglichkeiten: Aufreinigung unter nativen Bedingungen bzw. Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Möglichkeiten getestet.

Unter nativen Bedingungen fand nur eine sehr geringe Bindung der Cu-dNIR an die Affinitätsmatrix statt (nicht gezeigt). Möglicherweise war durch die dreidimensionale Struktur des Proteins ein Teil des Histidin-tags maskiert. Da es für die Produktion von Antikörpern nicht erforderlich ist, die native Konformation des antigenen Proteins zu erhalten wurde ein Protokoll zur Aufreinigung der Cu-dNIR unter denaturierenden Bedingungen entwickelt. In diesem Falle sollte die Bindung an das Säulenmaterial verbessert und somit eine höhere Ausbeute zu erwarten sein.

Der Zellaufschluss erfolgte unter Zugabe von 10 mM Imidazol zum Lysispuffer; die Waschlösung wurde auf 20 mM Imidazol eingestellt (Abb. 17). Imidazol wirkt aufgrund von

Strukturähnlichkeit mit dem Histidinrest als Kompetitor zu Histidinresten von verunreinigenden Proteinen, welche schwache Wechselwirkungen mit der Affinitätsmatrix eingehen können. Da Proteine mit einer 6-fachen Histidinmarkierung eine stärkere Affinität zur Reinigungsmatrix besitzen, bewirken niedrige Imidazolkonzentrationen in Lysis- und Waschpuffer eine Reduzierung der Hintergrundproteine. Durch Reduzierung des pH-Wertes auf 4,5 erfolgte die Elution des Enzyms (Abb 17). Allerdings eluieren unter diesen Bedingungen auch Aggregate und Proteine, die mehr als einen His-tag enthalten, wie in der Literatur beschrieben (The QIAexpressionist™ Quiagen, 1998), ebenso wie Abbruchproteine. Durch einen Immunoblot mit einem spezifischen anti-dNIR Serum von Nishiyama *et al.* (1993) konnte gezeigt werden, dass die mit der rekombinanten dNIR ko-eluierenden Proteine keine Verunreinigungen, sondern Abbruchproteine der Cu-dNIR darstellen (Abb. 18). Die vollständige Cu-dNIR besaß mit 42 kD ein etwas höheres Molekulargewicht (Abb. 19) als die aus *O. anthropi* präparierte dNIR, weil die Signalsequenz von 33 Aminosäuren Länge durch die Expression in *E. coli* nicht abgespalten wurde. Pro Liter Bakterienkultur konnten durch die verwendete Präparationsmethode 4,5 mg elektrophoretisch reine Cu-dNIR gewonnen werden. Dies stellt eine 9-fach höhere Ausbeute als bei Prudencio *et al.* (1999) dar. Sie exprimierten die Cu-dNIR aus *Alcaligenes xylosoxydans* und konnten durch Reinigung unter nativen Bedingungen aus einem periplasmatischen Extrakt eine Ausbeute von 0,5 mg pro Liter Bakterienkultur erzielen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Gewinnung der Cu-dNIR nach Fusion mit einem 6 x Histidinrest und heterologer Expression in bezug auf die erforderliche Zeitdauer und Ausbeute erheblich effektiver ist als die Reinigung mit konventionellen Methoden.

2.2 Charakterisierung der anti-dNIR-Antikörper mAkdNIR1a und mAkdNIR29

Nach den Immunisierungen mit der aus den beiden Reinigungsverfahren gewonnenen Cu-dNIR wurden zwei prinzipiell verschiedene Antikörpertypen gewonnen: Ein Antikörper (mAkdNIR1a) mit einer sehr engen Spezifität auf Stammebene und ein Antikörper (mAkdNIR29) mit einer breiteren Spezifität für Cu-dNIR aus Bakterien verschiedener phylogenetischer Herkunft (Abb. 20). Nach Braker *et al.* (1998) stimmen die Immunogene, die für die Produktion der beiden verschiedenen Antikörper eingesetzt wurden, in ihren konservierten Bereichen zu nahezu 100 % überein. Dies legt den Schluss nahe, dass der stammspezifische Antikörper in den weniger konservierten Bereichen des Enzyms binden muss. Andernfalls müsste er auch die Cu-dNIR aus *A. faecalis* S6 erkennen können. Dieser

Antikörper ist aufgrund seiner fehlenden Kreuzreaktionen für weitere Cu-dNIRs nur für ganz bestimmte Untersuchungen - wie Inokulationsversuche mit *O. anthropi* 1a und anschließendes Verfolgen der Denitrifikationsaktivität - oder für Expressionsstudien der Cu-dNIR speziell geeignet.

Der Antikörper mAkdNIR29 zeigt ein breiteres Spektrum für Cu-dNIRs aus Bakterien unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft. Dies lässt vermuten, dass er in den mehr konservierteren C-Terminalen Bereichen (Braker *et al.*, 1998; Hallin and Lindgren, 1998) oder den ebenfalls hoch konservierten Cu-Bindungsstellen (Prudencio *et al.*; 1999) des Enzyms bindet.

Der Antikörper mAkdNIR29 gestattete den Nachweis der Cu-dNIRs aus Organismen der α - und β - Unterklasse der Proteobakterien; ebenso konnte das Enzym aus *Corynebacterium* als Vertreter der Gram-positiven Niedrig-GC-Bakterien detektiert werden. Phylogenetisch sehr unterschiedliche Bakterien scheinen jedoch ähnliche dNIRs zu besitzen. Coyne *et al.* (1989) fanden mit polyklonalen Seren und Ye *et al.* (1993) mit Gensonden bei unterschiedlichen Stämmen der Gattungen *Pseudomonas* und *Alcaligenes* jeweils sowohl die Cu-dNIR als auch die häm-cd₁-dNIR (Abb. 35). Kreuzreaktion des Antikörpers mit dNIRs aus phylogenetisch sehr verschiedenen Bakterien muss folglich nicht gleichzeitig bedeuten, dass auch sehr unterschiedliche dNIRs detektiert werden können.

Vergleicht man nun das Spektrum der Kreuzreaktivität von mAkdNIR29 mit den Sequenzähnlichkeiten der von Braker *et al.* (1998) ausgewählten Teilsequenzen verschiedener Cu-dNIRs, so zeigt sich, dass der Antikörper auch dNIRs mit geringen Ähnlichkeiten erkennt. Als Beispiel seien die Enzyme von *A. faecalis* S6 und *A. xylosoxydans* DSM 30026 erwähnt. Die *nirK*-Fragmente besitzen eine Sequenzähnlichkeit von 67,4 %, was im niedrigsten Bereich für die bisher untersuchten Fragmente liegt. Dies wird auch deutlich im Stammbaum, wo sie sich auf die zwei verschiedenen Hauptcluster verteilen (Abb. 35). Im ELISA mit mAkdNIR29 (Abb: 20) konnte das Enzym aus *A. xylosoxydans* mit 50 % der Signalstärke von *A. faecalis* S6 detektiert werden. Fast identische dNIRs zu der aus *A. faecalis* S6, wie die von *O. anthropi* DSM 2136 und *O. anthropi* 1a, dagegen ergaben knapp 80 – 115 % der Signalstärke von *A. faecalis* S6. Dies könnte auf eine schwache Korrelation zwischen Ähnlichkeit der dNIRs und Signalstärke hindeuten. Da aber von den meisten im ELISA getesteten Bakterienstämmen keine *nirK*-Sequenzen vorliegen, kann hierüber keine weitergehende Aussage getroffen werden.

Die Nachweisgrenze der Antikörper für Cu-dNIR ist bei 2 bzw. 5 ng. Sie liegt somit in der gleichen Größenordnung wie das anti-dNIR-Serum von Ward *et al.* (1993) für die cd₁-NIR.

Dieses Serum ergab in Western Blots mit Rohextrakten aus denitrifizierenden Reinkulturen von *Ps. stutzeri* ein anti-dNIR-Signal bis zu einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen. Aufgrund der Induzierbarkeit von dNIR scheint es jedoch wenig sinnvoll das Antikörpersignal, bezogen auf die Anzahl denitrifizierender Bakterien umzurechnen. Vielmehr sollte die Signalstärke immer wieder neu in jeder untersuchten Probe an Hand von mikroskopischen Techniken auf die Anzahl der denitrifizierenden Bakterien bezogen werden. Es ist unwahrscheinlich, dass *in situ* eine homogene Verteilung der dNIR-Moleküle innerhalb der denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft auftritt. Vor allem in Umweltproben, wo ein Wechsel von aeroben zu anaeroben Verhältnissen auf kleinstem Raum auftritt, dürfte der Induktionslevel für dNIR sehr unterschiedlich sein. Untersuchungen hierzu können daher nicht im Western Blot durchgeführt werden. Es muss vielmehr eine Auflösung auf Einzelzellniveau *in situ* angestrebt werden.

3. *In situ*-Anwendungen der anti-Cu-dNIR-Antikörper

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Protokoll zur *in situ*-Immunofluoreszenz-Markierung der Cu-dNIR in Bakterien entwickelt werden. Um eine Diffusion der Antikörper in das Periplasma zu erlauben, mussten die Zellen durch Behandlung mit Lysozym permeabilisiert werden. Alleinige Behandlung mit Formaldehyd, wie für Immunofluoreszenz-Markierungen der Nitritoxidierenden Enzyme bei *Nitrococcus*-, *Nitrospina*- und *Nitrospira*-Arten beschrieben (Bartosch *et al.*, 1999), genügte nicht. Die Immunofluoreszenz-Signale korrespondierten mit der Lage der Cu-dNIR im Periplasma (Abb. 24).

Mit mAkdNIR1a war eine simultane Markierung von denitrifizierenden *O. anthropi*-Zellen mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden und Antikörper möglich (Abb. 25). Die Hybridisierung mit der Sonde musste dabei vor der Markierung mit dem Antikörper durchgeführt werden. Vermutlich behinderte bei umgekehrter Reihenfolge der Komplex aus dNIR und Primär- und Sekundär-Antikörper im Periplasma die Durchlässigkeit für die Sonde. Um das 16S rRNS-Sondensignal während der anschließenden Antikörpermarkierung zu erhalten, mussten die Inkubationslösungen auf hohe Salzkonzentrationen zur Stabilisierung des 16S rRNS-Oligonukleotidsonden-Komplexes eingestellt werden. Da die Bindung von mAkdNIR29 unter diesen Bedingungen nicht möglich war, konnte mit diesem Antikörper keine gleichzeitige Markierung mit Sonde und Antikörper durchgeführt werden. Auch eine gleichzeitige Inkubation der Bakterien mit Sonde, Primär- und Sekundär-Antikörper oder gleichzeitige Inkubation mit Sonde und Primär-Antikörper unter stringenten Bedingungen für die Sonde und

anschließender Detektion des anti-dNIR-Antikörpers führten zu keinem positiven Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

3.1 Sortierung Cu-dNIR-induzierter Bakterien durch Antikörper-vermittelte Fluoreszenz mit dem Durchflusszytometer

Der in dieser Arbeit entwickelte Antikörper mAkdNIR29 wurde in Kombination mit dem Durchflusszytometer angewandt. Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit grosse Mengen an Zellen in kurzer Zeit nach verschiedenen Parametern zu sortieren.

Es wurde in einer Kultur von *O. anthropi* eine Trennung zwischen Bakterien, die Cu-dNIR exprimiert hatten und Zellen, die für dieses Enzym nicht induziert waren, durchgeführt. Die Bakterien waren aerob gewachsen und nach Erreichen des stationären Stadiums unter Ausschluss von O₂ in einem Anaerobentopf inkubiert worden. Markierungen mit dem Antikörper mAkdNIR29 zeigten im CLSM, dass bei circa 50 % der Bakterien eine Induktion für Cu-dNIR stattgefunden hatte (Abb. 28D). Nach Überführen der Kultur in anaerobe Bedingungen fand keine Begasung und kein Durchmischen der Kultur statt. Vermutlich führten Reste an O₂ im Kulturmedium dazu, dass ein Teil der Bakterien die Reduktasen des Denitrifikationssystems nicht exprimierten. Die durchflusszytometrische Analyse der Bakterien nach Markierung mit mAkdNIR29 und einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper erlaubte die Identifizierung der für Cu-dNIR induzierten Population. Das Antikörper-vermittelte Fluoreszenzsignal war stark genug, um in Kombination mit dem Seitwärtsstreulicht eine eindeutige Trennung in zwei Populationen zu erreichen (Abb. 28C). Falsch positive Signale aufgrund des Sekundärantikörpers konnten durch Kontrollmarkierungen ohne anti-dNIR-Antikörper ausgeschlossen werden (Abb. 28B).

Die Ergebnisse zeigen, dass in einer Probe die Sortierung der aktuell denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft mit Nitritreduktase des Cu-Typs, über anti-dNIR-Antikörper-vermittelte Fluoreszenz möglich ist. Die Durchflusszytometrie wurde schon häufig in Kombination mit Antikörpern eingesetzt, um spezifische Bakterien aus einer Umweltprobe zu gewinnen (Porter *et al.*, 1993; Diaper und Edwards, 1994). Porter *et al.* konnten nach Immunofluoreszenzfärbung *Staphylococcus aureus* aus einem künstlichen Bakteriengemisch wiedergewinnen, in welchem das Zielbakterium nur 0,4 % der gesamten Bakterien ausmachte; in Umweltproben aus Seewasser und dem Abfluss einer Kläranlage war eine Sortierung aus der indigenen Bakterienflora möglich, in der das Zielbakterium mit weniger als 1 % vorhanden war. Die

Anreicherung in den künstlichen Zellgemischen war bis zu 90 % möglich, in den Umweltproben bis 70 %. Bach (1996) ermittelte eine MPN-der potentiell denitrifizierenden Bakterien im Oberboden bis zu $4,6 \times 10^6$ /g Trockenboden, während die MPN aller isolierten heterotrophen Bakterien im Bereich zwischen $4,9 \times 10^6$ und $5,3 \times 10^7$ /g Trockenboden lag. Somit ist zu erwarten, dass eine Sortierung mit den in dieser Arbeit entwickelten anti-dNIR-Antikörpern aus einer Umweltprobe für weitere molekularbiologische Studien realisierbar ist.

3.2 Immunofluoreszenz-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in Laborkulturen

Die Cu-dNIR ist ein induzierbares Enzym. So muss bei Veränderungen der Umweltbedingungen, welche die Denitrifikation beeinflussen, eine Veränderung des Expressionslevels am Schlüsselenzym nachweisbar sein. Physiologische Studien haben gezeigt, dass die Denitrifikationsenzyme bei niedrigem pO_2 und in der Gegenwart von N-Oxiden exprimiert werden. Expressionsversuche fanden bisher hauptsächlich an Bakterien statt, die eine dissimilatorische Nitritreduktase des cd_1 -Typs besitzen. Baumann *et al.* (1996) zeigten an kontinuierlichen Kulturen von *Ps. denitrificans* nach einem Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen, dass die Menge an mRNA für *nirS* nach ca. 5 h ihr Maximum erreicht hatte und danach auf einen stabilen niedrigeren Wert absank, während die cd_1 -dNIR innerhalb von ca. 30 h allmählich auf einen stabilen Level in der Zelle stieg. Härtig und Zumft (1999) konnten in einer Batch-Kultur von *Ps. stutzeri* die Transkription von *nirS* nach Wechsel von Aerobiose zu Anaerobiose und Zugabe von Nitrat oder Nitrit nach 15 min maximal induzieren. Dabei blieb der Level der *nirS*-Messengers für die 3h-Periode, in der gemessen wurde, konstant. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Markierung mit dem Antikörper mAk dNIR29 in anaeroben Batch-Kulturen von *O. anthropi* maximale Enzymexpression von Cu-dNIR nach ca. 8 h gezeigt (Abb. 27). Dies konnte mit der Produktion von N_2O bezogen auf die Bakterienzahl korreliert werden (Abb. 26). Obwohl noch ausreichend Nitrit im Medium vorhanden war, ist die Abnahme der N_2O -Produktion nach ca. 24 h, vermutlich auf die Erschöpfung der C-Quellen im Medium und somit fehlender Reduktionsäquivalente zurückzuführen. Der zeitliche Verlauf der Expression von Cu-dNIR in *O. anthropi* stimmt gut mit dem überein, wie ihn Dendoooven und Anderson (1994) in Ansätzen von Boden in Erlenmeyerkolben ermittelt haben. Durch Hemmversuche mit Chloramphenicol zeigten sie volle Derepression der dNIRs zwischen 4 und 8 h nach Sauerstoffentzug.

3.3 Immunofluoreszenz-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in Umweltproben

3.3.1 Denitrifikation in der Rhizosphäre

Der Antikörper mAkNIR1a ist aufgrund seiner hohen Spezifität optimal geeignet für *in situ*-Expressionsstudien der dNIR aus *O. anthropi* 1a in Umweltproben. Haller und Stolp (1986) zeigten an Maispflänzchen, die in zuvor mit *Ps. aeruginosa* inokuliertem Boden gewachsen waren, dass unter künstlich durch Begasung mit Helium plus 10 % (v/v) Acetylen herbeigeführten anaeroben Bedingungen nur 1-2 % des entstehenden N₂O aus freiem Boden, die restlichen 98-99 % dagegen aus der Rhizosphäre freigesetzt wurden. Dies macht deutlich, dass die Rhizosphäre unter anaeroben Bedingungen offensichtlich ein bevorzugtes Kompartiment für Denitrifikation und somit der Freisetzung des klimaschädlichen Lachgases N₂O im Boden darstellt. Knowles *et al.* (1982) zeigten weiterhin, dass die in der Rhizosphäre angesiedelten Denitrifikantenpopulationen um den Faktor 514 mal höher waren als in wurzelfreiem Boden. Dieses Potenzial für Denitrifikationsaktivität machte sich als eine gesteigerte N₂O-Abgabe im Wurzelbereich bemerkbar, die mit der Entfernung von der Wurzel abnahm (Killham *et al.*; 1994). N₂O muss jedoch nicht immer mikrobiellen Ursprungs sein. Dean und Harper (1986) beschrieben z. B. die Produktion und anschließende Freisetzung von N₂O in Blättern von Sojabohnen durch die Nitratreduktase. Der Nachweis von Bakterien mit der Fähigkeit zur Denitrifikation beweist deshalb nicht zwingend ihre Aktivität in Zonen mit erhöhten N₂O-Konzentrationen. In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob mit monoklonalen Antikörpern gegen dNIR ein System zum *in situ*-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in denitrifizierenden Bakterien auf Einzelzellebene etabliert werden kann. Dies würde eine eindeutige Zuordnung der gemessenen N₂O-Abgaben zu denitrifizierenden Organismen zulassen und Untersuchungen zur Expression der Cu-dNIR unter verschiedenen Umweltbedingungen erlauben.

Lebuhn *et al* (1999) zeigten durch Immunotrapping mit spezifischen monoklonalen Antikörpern das natürliche Vorkommen von *Ochrobactrum* spp. im Wurzelbereich von Weizenpflanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wurzeln von 5 Wochen alten Weizenpflänzchen mit *O. anthropi* 1a inokuliert. Die Etablierung des inokulierten Bakteriums wurde sowohl *in situ* (Abb. 29B), als auch *ex situ* gezeigt. Im ELISA wurde eine Zellzahl von $1,3 \times 10^5$ Bakterien pro g Wurzelfrischgewicht nachgewiesen. Dies liegt in der gleichen Größenordnung wie sie Schloter (1993) für Inokulationsversuche mit *Azospirillum* ermittelt hat. Nachdem *O. anthropi*

mit Hilfe artspezifischer Antikörper in der Probe nachgewiesen worden war, fand eine Markierung mit dem Antikörper mAk dNIR1a zur Untersuchung des Expressionsstatus für Cu-dNIR statt. An den Wurzelhaaren konnten, meist in kleinen Gruppen angeordnete, denitrifizierende Bakterienzellen detektiert werden (Abb. 30). Aufgrund der hohen Spezifität des Antikörpers ist es wahrscheinlich, dass es sich dabei um den inokulierten Organismus handelt. Die Untersuchungen zeigen prinzipiell, dass die entwickelten anti-dNIR-Antikörper eine Möglichkeit bieten, die Expression der Cu-dNIR *in situ*, also z. B. in der Rhizosphäre, zu detektieren.

Da Abbaureaktionen oftmals kometabolisch in hoch aktiven Zellen ablaufen, hat die Rhizosphäre als Habitat mit der höchsten metabolischen Aktivität im Boden, eine wichtige Rolle für den Abbau von Xenobiotika. Walton und Anderson (1990) zeigten, dass der mikrobielle Abbau von Trichlorethylen in der Rhizosphäre schneller vonstatten ging als im nicht durchwurzelten Boden. Weitere Versuche gingen dahin, das Abbaupotential rhizosphärenkompetenter Bakterien durch genetische Techniken zu erweitern. Brazil *et al.* (1995) konstruierten z.B. einen Pseudomonaden mit der Fähigkeit zum Abbau von polychlorierten Biphenylen und wiesen nach Inokulation und erfolgreicher Etablierung des Organismus in der Rhizosphäre die Expression der Abbaugene nach. Eine Reihe von Denitrifizierern ist sowohl zum Abbau von Xenobiotika befähigt (A 3), als auch Teil der Rhizosphärenflora. Die Möglichkeit gleichzeitig einen Einblick in die aktuelle Aktivität der Organismen über die Verfolgung der Expression von Enzymen zur Energiegewinnung, wie z.B. Cu-dNIR, zu bekommen, könnte in der Optimierung von Sanierungsverfahren mit Denitrifizierern eine Rolle spielen.

3.3.2 Immunofluoreszenz-Nachweis der Expression von Cu-dNIR in Klärschlamm

Die Aufbereitung von Abwasser in Kläranlagen ist einer der wichtigsten biotechnologischen Prozesse. Ein Problem dabei stellt die Freisetzung von N₂O dar. Es gibt Hinweise, dass ein grosser Teil des freigesetzten N₂O aus nicht optimal betriebenen Kläranlagen stammt (Körner *et al.*, 1993; Schön *et al.*, 1994). Ein Verständnis für die Prozesse der Denitrifikation und Nitrifikation als Quellen biogenen N₂O ist somit von großem Interesse. Auch hier ist die Frage zu klären, durch welchen der beiden genannten Prozesse und unter welchen Bedingungen N₂O freigesetzt wird. Ein wichtiger Modulator der Denitrifikation ist der pO₂. Viele Kläranlagen werden in einem Wechsel von aeroben und anaeroben Bedingungen betrieben, um

Denitrifikation und Nitrifikation im selben Becken durchführen zu können. Die Regulation der an der Denitrifikation beteiligten Reduktasen ist jedoch nicht gleich und variiert zusätzlich in verschiedenen Organismen. Eine Unausgewogenheit in Expression und Aktivität der Enzyme kann schließlich dazu führen, dass vermehrt Zwischenprodukte wie N_2O freigesetzt werden. Otte *et al.* (1996) untersuchten z. B. an *Alcaligenes faecalis*, ein Bakterium welches häufig in Kläranlagen auftritt, die Produktion von N_2O unter verschiedenen O_2 -Bedingungen. Sie stellten durch Aktivitätsmessungen an *Alcaligenes faecalis* TUD fest, dass nach einem Wechsel von aerob zu anaerob erhöhte N_2O -Mengen entstehen, da die Reduktasen sequentiell exprimiert werden; d. h. Nitritreduktase wird mehrere Stunden vor der N_2O -Reduktase gebildet. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die Nitritreduktase aus *Alcaligenes faecalis* TUD weniger empfindlich gegen O_2 -Inhibition ist als die N_2O -Reduktase. Dies führt bei einem Wechsel von anaerob zu aerob ebenfalls zu Akkumulation von N_2O . Die Nitritreduktasen aus *Paracoccus denitrificans* und *Pseudomonas nautica* dagegen werden durch O_2 irreversibel gehemmt (Bonin *et al.*, 1989; Waki *et al.*, 1980). Sie müssen also nach einem Wechsel von aerob zu anaerob neu exprimiert werden.

Um den Prozess der Denitrifikation in Kläranlagen zu optimieren, könnten Markierungen zur Erfassung der Expression von dNIR unter verschiedenen Bedingungen hilfreich sein. In der vorliegenden Arbeit wurden Klärschlämme aus zwei verschiedenen Anlagen mit dem monoklonalen Antikörper mAkNIR29 auf Expression der Cu-dNIR untersucht. Es konnte in beiden Proben gezeigt werden, dass die Antikörper geeignet sind die Expression von Cu-dNIR auf Einzelzellebene im Mikroskop zu detektieren (Abb. 32, 33 und 34). Dies lässt die Zuordnung von entstehendem N_2O zur Denitrifikation zu. In Kombination mit dem Durchflusszytometer könnte eine Sortierung der markierten Zellen erfolgen und durch die nachfolgende Anwendung molekularbiologischer Methoden (16S rRNS-Analysen; Fingerprinttechniken wie z. B. DGGE) ein Einblick in die Zusammensetzung der denitrifizierenden Gemeinschaft gewonnen werden.

4. Ausblick: Anwendungsmöglichkeiten serologischer Testsysteme für *in situ*-Untersuchungen wichtiger mikrobieller Leistungen in Ökosystemkompartimenten

Spezifische Antikörper bieten die hervorragende Möglichkeit, *in situ*-Aktivitäten von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. Die Detektion des Schlüsselenzyms eines Stoffwechselweges stellt einen direkten Nachweis auf der Expressions-,

also der „Wirk“-ebene dar. Durch die Kombination von Antikörpern zum Nachweis von *in situ*-Funktionen und anderen Methoden öffnet sich ein weiter Bereich interessanter Fragestellungen.

Untersuchungen zur funktionellen Diversität:

In Kombination mit der Technik der *in situ*-Hybridisierung mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden können Untersuchungen zur funktionellen Diversität direkt in der Umweltprobe durchgeführt werden. Die Sortierung der markierten Organismen mittels Durchflusszytometrie oder mittels Kopplung der Antikörper an Magnetpartikeln sind Voraussetzungen für Untersuchungen zur Diversität der erfassten „funktionellen Organismengruppe“ durch genetische Fingerprinttechniken. Anhand von 16S rRNS-Analysen kann eine Identifizierung der sortierten Organismen erfolgen.

Quantifizierung:

Der ELISA erlaubt die quantitative Erfassung des jeweiligen Schlüsselenzyms im Mikrotiterplatten-Maßstab. Mittels Western Blot kann anhand der Bandenstärke ein semiquantitativer Nachweis erfolgen.

Expressionsstudien unter verschiedenen Umweltbedingungen

Detailuntersuchungen der Regulation eines Stoffwechselprozesses könnte durch gleichzeitige Erfassung der mRNA eines Schlüsselenzyms im Northern Blot und des exprimierten Enzyms im Western Blot erfolgen. Auf Transkriptionsebene zeigt sich die unmittelbare Reaktion des Organismus auf Veränderung der Umweltbedingungen. Die Katalyse kann jedoch erst nach Bildung des Enzyms erfolgen. Die Konzentration eines Enzyms hängt naturgemäß jedoch nicht nur von seiner Bildungs-, sondern auch von der Abbaurate ab. Somit ist es sinnvoll nach Veränderung der Umweltbedingungen auch den jeweiligen Enzymlevel zu bestimmen.

Screening mit hohem Durchsatz nach ausgewählten Stoffwechselleistungen:

Microarraysysteme erlauben die Automatisierung und ein schnelles Screenen zu niedrigen Kosten. Bisher wurden hauptsächlich Systeme mit DNS als Biorezeptoren entwickelt. Es gibt jedoch in der jüngsten Zeit auch Beispiele für Biochips, wo Antikörper als Rezeptoren beschrieben werden. Für medizinische Zwecke konnte sogar ein Chip etabliert werden, der sowohl DNS als auch Antikörper als Rezeptoren benutzt (Vo-Dinh und Cullum; 2000). Weller *et al.* (1999) entwickelten einen Antikörper-basierenden Chip zur Detektion von Triazin-

Herbiziden. Sie erreichten eine Spot-Dichte von 9 Spots pro mm^2 und konnten so 1600 parallele Proben in einem Array testen.

Die Regeneration des Chips konnte mehr als 100 x durchgeführt werden. Dieses System könnte z. B. durch Immobilisierung von Antikörpern gegen die Schlüsselenzyme bestimmter Abbauwege von Xenobiotika die Expression dieser Enzyme unter verschiedenen Bedingungen in einem Sanierungsverfahren nachweisen und somit einen Beitrag zu dessen Optimierung leisten.

E Zusammenfassung:

Ziel dieser Arbeit war es ein serologisches Testsystem für die Beantwortung ökologischer Fragestellungen zur Denitrifikation zu etablieren. Für den *in situ*-Nachweis der Expression des denitrifizierenden Enzymsystems in Bakterien wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen die Cu-haltige dissimilatorische Nitritreduktase (Cu-dNIR) entwickelt.

Die für die Produktion der Antikörper benötigte Cu-dNIR wurde mit Hilfe zweier Ansätze präpariert. Der erste Ansatz, die Kombination verschiedener Säulenchromatografien und Reinigung über eine Polyacrylamid-Matrix, erlaubte das Enzym aus einem Bodenisolat von *Ochrobactrum anthropi* mit einer Ausbeute von 2,5 µg/g Zellen (Feuchtgewicht) zu gewinnen. In einem zweiten Ansatz wurde die Cu-dNIR aus *Alcaligenes faecalis* S6 nach Fusion mit einem 6 x His-tag in *E. coli* exprimiert und anschließend über eine spezifische Affinitätsmatrix aufgereinigt. Hiermit konnte eine Ausbeute von 4,5 mg/l [2,25 mg/g Zellen (Feuchtgewicht)] Bakterienkultur gewonnen werden.

Mit der Cu-dNIR der beiden Präparationsansätze wurden Mäuse immunisiert und nach drei Zellfusionen 41 verschiedene Hybridomalien etabliert, deren sezernierte Antikörper in einem ersten Screening im Chemolumineszenz-ELISA mit der für die Immunisierung benutzten Cu-dNIR reagierten. Hieraus wurden über weitere Screeningschritte im Western-Blot zwei Antikörper zur genaueren Charakterisierung ausgewählt: Ein sehr spezifischer Antikörper (mAk dNIR1a), der ausschließlich die zur Immunisierung eingesetzte Cu-dNIR aus *Ochrobactrum anthropi* 1a erkennt; und ein zweiter Antikörper (mAk dNIR29) mit einem breiteren Reaktionsspektrum für Cu-dNIRs aus Bakterien unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft. Beide Antikörper zeigten keine Kreuzreaktionen mit alternativen dissimilatorischen Nitritreduktasen des cd₁-bzw. Sirohäm-Typs aus *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *E. coli*. Die im Chemolumineszenz-ELISA bestimmte Sensitivität für mAk dNIR1a liegt bei 2 ng Cu-dNIR. Mit mAk dNIR29 konnte rekombinante Cu-dNIR bis 5 ng nachgewiesen werden.

Mit dem Antikörper mAk dNIR29 konnte eine Differenzierung zwischen Reinkulturen von *Alcaligenes faecalis* S6, die unter denitrifizierenden bzw. nicht denitrifizierenden Bedingungen gewachsen waren, im Western Blot gezeigt werden. Weiterhin wurde der zeitliche Verlauf der Expression von Cu-dNIR in *Ochrobactrum anthropi* nach Shift vom aeroben in anaerobes Milieu mittels Immunofluoreszenz mit mAk dNIR29 auf Einzelzellniveau verfolgt. Das Maximum der Expression wurde nach 7 h erreicht. Der Verlauf der Expressionsstärke folgt der Zunahme der N₂O-Produktion pro Zeiteinheit bezogen auf die Zellzahl. Die Expressionsrate der Cu-dNIR ist am stärksten während der exponentiellen Wachstumsphase.

Die beiden anti-dNIR-Antikörper konnten in Kombination mit Epifluoreszenz- und Laser-scanning-Mikroskopie erfolgreich zur *in situ*-Detektion der Expression von Cu-dNIR durch Immunofluoreszenz in Reinkulturen und Umweltproben eingesetzt werden. Der Antikörper mAkdNIR1a wurde wegen seiner Spezifität zum Nachweis von Cu-dNIR-induzierten Bakterien an Wurzeln von Weizenpflänzchen eingesetzt, die zuvor mit *Ochrobactrum anthropi* inokuliert worden waren. Mit dem Antikörper mAkdNIR29 wurden Cu-dNIR-induzierte Bakterien in Klärschlammproben aus zwei verschiedenen Kläranlagen detektiert. Ein Protokoll zur simultanen Markierung von denitrifizierenden Zellen von *Ochrobactrum anthropi* 1a mit dem Antikörper mAkdNIR1a und einer rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonde wurde entwickelt.

Immunofluoreszenzmarkierungen mit mAkdNIR29 ermöglichten die Trennung von Cu-dNIR-induzierten und Cu-dNIR-nicht-induzierten Zellen von *O. anthropi* mittels Durchflusszytometrie in zwei klar abgegrenzte Populationen.

F Literatur:

- Amann, R. I.** 2000: Methoden zur Bestimmung der *in situ*-Funktion von Mikroorganismen. *Biospektrum*, **4**, 274-277.
- Amann, R. I.; Krumholtz, L. and Stahl, D.** 1990a: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, **172**, 762-770.
- Amann, R. I.; Binder, B. J.; Olson, R. J.; Chisholm, S. W.; Devereux, R. and Stahl, D. A.** 1990b: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919-1925.
- Amann, R. I.; Ludwig, W. and Schleifer, K. H.** 1995: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.
- Aßmus, B.** 1995: *In situ*-Detektion von Bakterien aus Boden- und Gewässerhabitaten mit spezifischen Markierungen sowie optischen und zytometrischen Methoden. *Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München*.
- Bach, H. J.,; Hartmann, A.; Trevors, J. T. and Munch J. C.** 1999: Magnetic capture-hybridization method for purification and probing of mRNA for neutral protease of *Bacillus cereus*. *J. of Microbiol. Meth.*, **37**, 187-192.
- Bartosch, S.; Wolgast, I.; Spieck, E. and Bock, E.** 1999: Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4126-4133.
- Baumann, B., Snozzi, M.; Zehnder, A. J. B. and van der Meer, J. R.** 1996: Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. of Bacteriol.*, **178**, 4367-4374.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bonin, P; Gilewicz, M. and Bertrand, J. C.** 1989: Effects of oxygen on each step of denitrification activity of *Pseudomonas nautica*. *Can. J. of Microbiol.*, **35**, 1061-1064.
- Bothe, H.; Jost, M.; Schloter, M; Ward, B. B. and Witzel, K. P.** 2000: Molecular aspects of nitrification and denitrification in environments. *Micro. Ecol., in press*.

- Braker, G.; Fesefeldt, A. and Witzel, K. P. 1998:** Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3769-3775.
- Brazil, G. M.; Kenefick, L.; Callanan, M.; Haro, A.; de Lorenzo, V.; Dowling, D. N. and O'Gara, F. 1995:** Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1946-1952.
- Bremner, J. M.; Blackmer, A. M. and Waring, S. A. 1980:** Formation of nitrous oxide and dinitrogen by chemical decomposition of hydroxylamine in soils. *Soil Biol. Biochem.*, **12** 263-269.
- Bujard, H.; Gentz, R.; Lanzer, M.; Stüber, D.; Müller, M.; Ibrahimi, I.; Häuptle, M. D. and Dobberstein, B. 1987:** A T5 promotor based transcription translation system for the analyses of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **155**, 416-433.
- Chou, Q., Russell, M.; Birch, D. E.; Raymond, J. and Bloch, W. 1992:** Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy number amplification. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1717-1723.
- Christensen, B.; Torsvik, T. and Lien, T. 1992:** Immunomagnetically captured thermophilic sulfate-reducing bacteria from north sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1244-1248.
- Conrad, R. 1996:** Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS; N₂O and NO). *Microbiol. Rev.*, **60**, 609-640.
- Coyne, M. S.; Arunakumari, A.; Averill, B. A. and Tiedje, J. M. 1989:** Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd₁ and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2924-2931.
- Dean, J. V. and Harper, J. E. 1986:** Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. *Plant Physiol.*, **82**, 718-723.
- Dendooven, L. and Anderson, J. M. 1994:** Dynamics of reduction enzymes involved in the denitrification process in pasture soil. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 1501-1506.

- DeLong, E. F.; Wickham, G. S. and Pace, N. R. 1989:** Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, **243**, 1360-1363.
- Diaper, J. P.; Edwards, C. 1994:** Survival of *Staphylococcus aureus* in lakewater monitored by flow cytometry. *Microbiology*, **140**, 35-42.
- Ehrlich, H. A.; Gelfand, D. and Saiki, R. 1988:** Specific DNA amplification. *Nature*, **331**, 461-462.
- Faude, U. C.; Höfle, M. G. 1997:** Development and application of monoclonal antibodies for *in situ* detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4534-4542.
- Fliermanns, C. B. and Schmidt, E. L. 1975:** Autoradiography and immunofluorescence combined for autecological study of single cell activity with *Nitrobacter* as a model system. *Appl. Microbiology*, **30**, 676-684.
- Härtig, E. and Zumft, W. G. 1999:** Kinetics of *nirS* expression (cytochrome *cd₁* nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system. *J. of Bacteriol.*, **181**, 161-166.
- Hahn, D.; Amann, R. I. and Zeyer, J. 1993:** Detection of mRNA in *Streptomyces* cells by whole-cell hybridization with digoxigenin-labeled probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2753-2757.
- Haider, K.; Mosier, A. R. and Heinemeyer, O. 1983:** Side effects of acetylene on the conversion of nitrate in soil. *Zentralblatt für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **146**, 623-633.
- Haller, T. and Stolp, H. 1985:** Quantitative estimation of root exudation of maize plants. *Plant and soil*, **86**, 207-216.
- Hallin, S. and Lindgren, P.-E. 1999:** PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1652-1657.
- Harlow, E. and Lane, D. 1988:** Antibodies: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Hirsch, P. and Conti, S. F. 1964:** Biology of budding bacteria. I. Enrichment, isolation, and morphology of *Hyphomicrobium* spp., *Arch. Microbiol.*, **48** 339.
- Holmes, B.; Popoff, M. and Kersters, K. J. 1988:** *Ochrobactrum anthropi* gen. Nov., sp. Nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int J. Syst. Bacteriol.*, **10**, 406-416.

- Hovanec, T. A. and DeLong, E. F.** 1996: Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2888-2896.
- Janeway, C. A. and Travers, P.** 1997: Immunologie. 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford*.
- Kakutani, T.; Watanabe, H.; Arima, K. and Beppu, T.** 1981: Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6. *J. Biochem.*, **89**, 453-461.
- Karsten, G. R. and Drake, H. L.** 1997: Denitrifying bacteria in the earthworm gastrointestinal tract and *in vivo* emissions of nitrous oxide (N₂O) by earthworm. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1878-1882.
- Killham, K.** 1994: Soil Ecology. *University Press, Cambridge*
- Knowles, R.** 1982: Denitrification. *Microbiol. Rev.*, **46**, 43-70.
- Köhler, G. and Milstein, C.** 1975: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- Körner, R.; Benckiser, G. und Ottow, J. C. G.** 1993: Quantifizierung der Lachgas (N₂O)-Freisetzung aus Kläranlagen unterschiedlicher Verfahrensführung. *Abwasserreinigung*, **40**, 514-525.
- Kobayashi, M. and Shoun, H.** 1995: The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4146-4151.
- Kristjansson, J. K. and Hollocher, T. C.** 1980: First practical assay for soluble nitrous oxide reductase of denitrifying bacteria and a partial kinetic characterization. *The J. of Biol. Chem.*, **255**, 704-707.
- Kukimoto, M.; Nishiyama, M.; Murphy, M. E. P.; Turley, S.; Adman, E. T.; Horinouchi, S. and Beppu, T.** 1994: X-ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis*-S6: roles of two copper atoms in nitrite reduction. *Biochem.*, **33**, 5246-5252.
- Kyhse-Andersen, J.** 1984: Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**, 213-209.
- Lämmli, U. K.** 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lebhuhn, M.; Achouak, W.; Schloter, M.; Berge, O.; Hartmann, A. and Heulin, T.** 1999: Geno- and phenotypic diversity of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil and wheat roots. *13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Book of Abstracts*, 54-55.
- Lee, N.; Nielsen, P. H.; Andreasen, K. H.; Juretschko, S.; Nielsen, J. L.; Schleifer, K. H. and Wagner, M.** 1999: Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1289-1297.
- Lin, S.; Henze, S.; Lundgren, P.; Bergman, B. and Carpenter E. J.** 1998: Whole-cell immunolocalization of nitrogenase in marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3052-3058.
- Lloyd, D.; Boddy, L. and Davies, K. J. P.** 1987: Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: the rule rather than the exception. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**, 185-190.
- Lotfield, N.; Flessa, H.; Augustin, J. and Beese, F.** 1997: Automated gas chromatographic system for rapid analyses of the atmospheric trace gases methane, carbon dioxide, and nitrous oxide. *J. Environ. Qual.*, **26**, 560-564.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J.** 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Macario, A. J. L.; Conway de Macario, E.; Ney, U.; Schoberth, S. M. and Sahn, H.** 1989: Shifts in methanogenic subpopulations measured with antibody probes in a fixed-bed loop anaerobic bioreactor treating sulfite evaporator condensate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1996-2001.
- Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Wagner, M. and Schleifer, K. H.** 1992: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600.
- Matzen, N. Hirsch, P.** 1982: Improved growth conditions for *Hyphomicrobium* sp. B522 and two additional strains. *Arch. Microbiol.*, **131**, 32.
- Michalski, W. P. and Nicholas, D. J. D.** 1985: Molecular characterization of a copper-containing nitrite reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **828**, 130-137.
- Michalski, W. P. and Nicholas, D. J. D.** 1984: The adaptation of *Rhodopseudomonas sphaeroides* f. sp. *denitrificans* for growth under denitrifying conditions. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 155-165.

- Michalski, W. P. and Nicholas, D. J. D.** 1985: Molecular characterization of a copper-containing nitrite reductase from *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans. *Biochimica et Biophysica Acta*, **828**, 130-137.
- Mosier, A. R.** 1980: Acetylene inhibition of ammonium oxidation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **12**, 443-444.
- Nishiyama, M.; Suzuki, J.; Kukimoto, M.; Ohnuki, T.; Horinouchi, S. and Beppu, T.** 1993: Cloning and characterization of a nitrite reductase gene from *Alcaligenes faecalis* and its expression in *Escherichia coli*. *J. of Gen. Microbiol.*, **139**, 725-733.
- Oerther, D. B.; de Los Reyes III, F. L.; Hernandez, M. and Raskin, L.** 1999: Simultaneous oligonucleotide probe hybridization and immunostaining for *in situ* detection of Gordona species in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **29**, 129-136.
- Otte, S.; Grobbs, N. G.; Robertson, L. A.; Jetten, M. S. M. and Kuenen, J. G.** 1996: Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2412-2426.
- Page, S. and Burns, R. G.** 1991: Flow cytometry as a means of enumerating bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 1025-1028.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S.** 1980: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- Porter, J.; Edwards, C.; Morgan, A. W. and Pickup, R.W.** 1993: Rapid automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3327-3333.
- Prudencio, M.; Eady, R. R. and Sawers G.** 1999: The blue copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans*: cloning of the *nirA* gene and characterization of the recombinant enzyme. *J. of Bacteriol.*, **181**, 2323-2329.
- Rhee, S.-K.; Lee, G. M.; Yoon, J.-H.** 1997: Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2578-2585.
- Richter, G.** 1988: Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. 5. Auflage. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*.
- Robertson, L. A. and Kuenen, J. G.** 1984: Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.*, **139**, 351-354.

- Robertson, L. A.; Dalsgaard, T.; Revsback, N. P. and Kuenen, J. G. 1995:** Confirmation of “aerobic denitrification” in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **18**, 113-119.
- Rondon, M. R.; August, P. R.; Bettermann, A. D.; Brady, S. F.; Grossman, T. H.; Liles, M. R.; Loiacono, K. A.; Lynch, B. A.; Mac Neill, I. A.; Minor, C.; Tiong, C. L.; Gilman, M.; Osburne, M. S.; Clardy, J.; Handelsman, J. and Goodman, R. M. 2000:** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2541-2547.
- Ryden, J. C.; Lund, L. J. and Focht, D. D. 1978:** Direct in-field measurement of nitrous oxide flux from soils. *Soil Science Society of America Journal*, **42**, 731-737.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989:** Molecular cloning- A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Samuelsson, M.-O. 1985:** Dissimilatory nitrate reduction to nitrite, nitrous oxide, and ammonium by *Ps. putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 812-815.
- Schön, G.; Bussmann, M. Geywitz-Hetz, G. 1994:** Bildung von Lachgas (N_2O) im belebten Schlamm aus Kläranlagen. *Wasser Abwasser*, **135**, 293-301.
- Schlöter, M. 1993:** Entwicklung von Methoden zur Identifizierung, Lokalisierung und Quantifizierung von *Azospirillum brasilense* Stämmen mit monoklonalen Antikörpern. *Dissertation Universität Bayreuth.*
- Schlöter, M. Borlinghaus, R.; Bode, W. and Hartmann, A. 1993:** Direct identification, and localization of *Azospirillum* in the rhizosphere of wheat using fluorescence-labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. *J. Microsc.*, **171**, 173-177.
- Schlöter, M.; Aßmus, B. and Hartmann, A. 1995:** The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotech. Adv.*, **13**, 75-90.
- Schlöter, M.; Zelles, L.; Hartmann, A. and Munch, J. C. 1998:** New quality of assessment of microbial diversity in arable soils using molecular and biochemical methods. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **161**, 425-431.
- Schlegel, H. G. 1992:** Allgemeine Mikrobiologie. 6. Auflage. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.*
- Schmidt, E. L. 1974:** Quantitative autecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. *Soil Sci.*, **118**, 141-149.

- Schumacher, W. and Kroneck, P. M. H.** 1992: Anaerobic energy metabolism of the sulfur-reducing bacterium "Spirillum" 5175 during dissimilatory nitrate reduction to ammonia. *Arch. Microbiol.*, **157**, 464-470.
- Spieck, E.; Ehrich, S.; Aamand, J. and Bock, E.** 1998: Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Arch. Microbiol.*, **169**, 225-230.
- Stepien, V. and Martin** 1992: Purification, characterization and localization of the bark storage proteins. *Plant Physiol. Biochem.*, **30**, 399-407.
- Stüber, D.; Matile, H. and Garotta, G.** 1990: System for high level production in *E. coli* and rapid purification of proteins: application to epitop mapping, preparation of antibodies, and structure-function analyses. In: *Immunological Methods*, Lefkvits, I. And Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press New York, 121-152
- The QIAexpressionist™** 1998: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. QUIAGEN GmbH, Hilden.
- Tolker-Nielsen, T.; Holmstrøm, K. and Molin, S.** 1997: Visualization of specific gene expression in individual *Salmonella typhimurium* cells by *in situ* PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4196-4203.
- Torsvik, V.; Salte, K.; Sorheim, R. and Goksoyr, J.** 1990: Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 776-781.
- Vo-Dinh, T. and Cullum, B.** 2000: Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 540-551.
- Van Schie, P. M. and Young, L. Y.** 1998: Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2432-2438.
- Walenzik, G. and Heinemeyer, O.** 1989: Direkte Messung der N₂ + N₂O Abgabe aus mechanisch belastetem Boden im Freiland. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft*, **59**, 629-634.
- Wallner, G.; Fuchs, B.; Spring, S.; Beisker, W. and Amann R.** 1997: Flow sorting of microorganisms for molecular analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4223-4231.
- Wagner, M.; Rath, G.; Koops, H.-P.; Flood, J. and Amann, R. I.** 1996: *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plant. *Water Sci. Technol.*, **3**, 237-244.

-
- Waki, T.; Murayama, K; Kawato, Y. and Ichikawa, K. 1980:** Transient characteristics of *Paracoccus denitrificans* with changes between aerobic and anaerobic conditions. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 243-249.
- Walton, B. T. and Anderson, T. A. 1990:** Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential applications for biological remediation of waste sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1012-1016.
- Wallner, G. 1993:** Durchflusszytometrische Analyse von Mikroorganismen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten, rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden. *Dissertation, Technische Universität München.*
- Ward, B. B. 1996:** Nitrification and denitrification: Probing the nitrogen cycle in aquatic environments. *Microb. Ecology*, **33**, 247-261.
- Ward, B. B.; Cockcroft, A. R. and Kilpatrick, K.A. 1993:** Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater. *J. of Gen. Microbiol.*, **139**, 2285-2293.
- Weller, M. G.; Schuetz, A. J.; Winklmair, M. and Niessner, R. 1999:** Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Anal. Chim. Acta*, **393**, 29-41.
- Wilson, T. and Sheppard, C. 1984:** Theory and practise of scanning optical microscopy. *Academic Press, London, England.*
- Yasui, T. and Yoda, K. 1997:** Imaging of *Lactobacillus brevis* single cells and microcolonies without a microscope by an ultrasensitive chemoluminescent enzyme immunoassay with a photon-counting television camera. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4528-4533.
- Ye, R. W.; Fries, M. R.; Bezborodnikov, S. G.; Averill, B. A. and Tiedje, J. M. 1993:** Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 250-254.
- Yeomanis, J. C. and Beauchamp, E. G. 1982:** Acetylene as possible substrate in the denitrification process. *Canadian J. of Soil Science*, **62**, 139-144.
- Zumft, W. G.; 1997:** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533-616.
- Zumft, W.G.; Gotzmann, D. J. and Kroneck, P. M. H. 1987:** Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite reducing system in *Ps. aureofaciens*. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 301-307.

H Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der Kreislauf des Stickstoffes nach Richter (1988)	6
Abb. 2:	Bestimmung der Nitrireduktase-Aktivität mit Methylviologen	24
Abb. 3:	Variable region des Expressionsvektors pQE 13	37
Abb. 4:	Kontrollregionen der QIAexpress pQE-Vektoren	37
Abb. 5:	Flussdiagramm über die Präparation von Cu-dNIR aus <i>O. anthropi</i> 1a	55
Abb. 6:	Fermentation von <i>O. anthropi</i>	56
Abb. 7:	Reinigung von Cu-dNIR über den Ionenaustauscher DEAE-Cellulose	57
Abb. 8:	Reinigung von dNIR über ein Molekularsieb	58
Abb. 9:	Präparation der Cu-dNIR aus <i>O. anthropi</i>	59
Abb.10:	Lage der Primer NIR-n und NIR-C in der Sequenz von <i>nirK</i> aus <i>A. faecalis</i> S6	60
Abb. 11:	Klonierung von <i>nirK</i> aus <i>A. faecalis</i> S6 in den Vektor pQE 13	61
Abb. 12:	Agarosegel zur Abschätzung der einzusetzenden Mengen von <i>nirK</i> aus <i>A. faecalis</i> S6 und Vektor pQE 13	62
Abb. 13:	Amplifizierung von <i>nirK</i> -aus transformierten Klonen von <i>E. coli</i> JM 105	63
Abb. 14:	Nachweis der Cu-dNIR in Miniexpressionskulturen rekombinanter Klone von <i>E. coli</i> -JM 105	64
Abb.15:	Amplifizierung eines konservierten Teilbereiches von <i>nirK</i> nach Braker <i>et al.</i>	64
Abb.16:	Zeitlicher Verlauf der heterologen Expression von Cu-dNIR in <i>E. coli</i>	65
Abb. 17:	Flussdiagramm über die Präparation von rekombinanter Cu-dNIR	66
Abb. 18:	Verlauf der Reinigung von Cu-dNIR unter nativen Bedingungen	67
Abb. 19:	Präparation der rekombinanten Cu-dNIR aus <i>E. coli</i> JM 105 unter denaturierenden Bedingungen	68
Abb. 20:	Kreuzreaktivität der Antikörper mAk dNIR1a und mAk dNIR29	73
Abb. 21:	Sensitivität der beiden monoklonalen Antikörper mAk dNIR1a und mAk dNIR29 für Cu-dNIR	74
Abb. 22:	Nachweis der Induktion von <i>A. faecalis</i> S6 für Cu-dNIR mit mAk29	75
Abb. 23:	Effekt der Blockierung bei Immunofluoreszenzmarkierung von <i>O. anthropi</i> mit dem Antikörper mAk-dNIR1a auf den Hintergrund	77
Abb. 24:	Immunofluoreszenzmarkierung von <i>O. anthropi</i> und <i>A. faecalis</i> mit den Antikörpern mAk-dNIR1a und mAk-dNIR29	78
Abb. 25:	Simultane Markierung von <i>O. anthropi</i> mit mAk-dNIR1a und der rRNS-gerichteten Sonde Eub 338	79
Abb. 26:	Expression von Cu-dNIR in <i>O. anthropi</i> nach einem Wechsel der Inkubationsbedingungen von aerob zu anaerob	82
Abb. 27:	Konzentrationen von Nitrit und N ₂ O zu verschiedenen Zeitpunkten nach Wechsel der Inkubationsbedingung von aerob zu anaerob	81
Abb. 28:	Durchflussscytometrische Analyse einer dNIR-induzierten Kultur von <i>O. anthropi</i> nach Markierung mit mAk-dNIR29 und einem sekundären FLUOS-gekoppelten Antikörper	83
Abb. 29:	Besiedlung von 5 Wochen alten Weizenwurzeln nach Inokulation mit <i>O. anthropi</i>	85
Abb 30.	5 Wochen alte Weizenwurzeln:-Detektion denitrifizierender Bakterien	86
Abb. 31:	Einstellen Stringenter Inkubationsbedingungen für den Sekundäntikörper	87
Abb. 32:	Expression von Cu-dNIR in Proben aus der Tierkörperverwertungsanlage Kraftisried	88

Abb. 33:	Expression von Cu-dNIR in Proben aus dem Denitrifikationsbecken der Kläranlage München I	88
Abb. 34:	Expression von Cu-dNIR in Proben der Kläranlage München I	89
Abb. 35:	Average Distance Tree berechnet aus konservierten Teilsequenzen von <i>nirK</i>	94

Der Antikörper mAkdNIR29 wurde am Deutschen Patent-und Markenamt zum Patent angemeldet.
(Deutsche Patentanmeldung 100 00 440.7)