

**Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol:
Konstruktion und Charakterisierung einer Mutante des
Lösungsmittel tolerierenden *Pseudomonas putida* Idaho**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Andrea Germer
aus Waldshut

Hauptberichter: Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Mitberichter: Prof. Dr. M. Schlömann
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2002

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
2002

Die experimentellen Arbeiten für vorliegende Dissertation wurden am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 17 |
| 2. Material und Methoden | 23 |
| 2.1. Bakterienstämme und Plasmide | 23 |
| 2.2. Nährmedien und Medienzusätze | 25 |
| 2.2.1. Medien | 25 |
| 2.2.2. Medienzusätze | 26 |
| 2.3. Stammerhaltung | 27 |
| 2.4. Anzucht von Kulturen | 27 |
| 2.4.1 Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen | 27 |
| 2.4.2. Anzucht von <i>Pseudomonas</i> -Stämmen | 27 |
| 2.5. Messung des Bakterienwachstums | 28 |
| 2.6. Zellernte und Herstellung von Rohextrakten | 28 |
| 2.7. Messung von Enzymaktivitäten | 29 |
| 2.7.1. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 29 |
| 2.7.2. Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase | 29 |
| 2.7.3. Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase | 30 |
| 2.7.4. Muconat-Cycloisomerase | 30 |
| 2.7.5. Protocatechuat-3,4-Dioxygenase | 31 |
| 2.7.6. <i>p</i> -Hydroxybenzoat-Hydroxylase | 31 |
| 2.7.7. Messung des Sauerstoffverbrauchs mit der Sauerstoffelektrode | 31 |
| 2.7.8. Quantifizierung des Proteingehalts im Rohextrakt | 32 |
| 2.8. Festphasenextraktion | 32 |
| 2.9. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) | 33 |
| 2.10. DNA-Präparationen | 34 |
| 2.11. Quantifizierung von DNA und Größenbestimmung von linearisierter DNA | 35 |
| 2.12. Gelelektrophorese | 36 |
| 2.13. DNA-Fällung | 36 |
| 2.14. Enzymatische Behandlung von DNA | 36 |
| 2.14.1. Verdau mit Restriktionsenzymen | 36 |
| 2.14.2. Behandlung mit Klenow-Fragment | 37 |
| 2.14.3. Behandlung mit alkalischer Phosphatase | 37 |
| 2.14.4. Behandlung mit T4-DNA-Ligase | 37 |
| 2.14.5. Herstellung eines T-Vektors | 38 |
| 2.15. Herstellung und Einbau eines Linkers mit einer zusätzlichen Schnittstelle in pBENAG21 | 38 |
| 2.16. Transformation | 39 |
| 2.17. Transfer inaktivierter Gene nach <i>P. putida</i> durch Konjugation | 40 |
| 2.17.1. Transfer von pXYLAG22 in <i>P. putida</i> Idaho, Selektion von <i>P. putida</i> Idaho BDH1-Zellen | 40 |
| 2.17.2. Transfer von pBENAG44 in <i>P. putida</i> Idaho BDH1, Selektion von <i>P. putida</i> Idaho BDH2-Zellen | 41 |
| 2.18. Markierung und Detektion von DNA durch Hybridisierung | 42 |
| 2.19. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 43 |
| 2.20. DNA-Sequenzierung | 45 |

| | |
|---|------------|
| 2.21. Computerprogramme | 45 |
| 2.22. Chemikalien und Biochemikalien | 50 |
| 3. Experimente und Ergebnisse | 51 |
| 3.1 Inaktivierung der Toluat- bzw. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Gene | 51 |
| 3.1.1. Ausschalten von <i>xyll</i> | 52 |
| 3.1.1.1. Klonierung und Sequenzierung von <i>xyll</i> | 52 |
| 3.1.1.2. Einfügen einer Deletion in <i>xyll</i> | 55 |
| 3.1.1.3. Einbringen des ausgeschalteten <i>xyll</i> in den Wildtyp <i>P. putida</i> Idaho | 56 |
| 3.1.1.4. Physiologisches Verhalten von <i>P. putida</i> Idaho BDH1 | 59 |
| 3.1.2. Ausschalten von <i>benD</i> | 60 |
| 3.1.2.1. Klonierung und Sequenzierung von <i>benD</i> | 60 |
| 3.1.2.2. Einfügen einer Deletion und Insertion eines Antibiotikaresistenzmarkers in <i>benD</i> | 61 |
| 3.1.2.3. Einbringen des ausgeschalteten <i>benD</i> in <i>P. putida</i> Idaho BDH1 | 66 |
| 3.2. Physiologische Eigenschaften der Doppelmutanten von <i>P. putida</i> Idaho | 69 |
| 3.2.1. Umsatzexperimente mit <i>P. putida</i> Idaho BDH2 | 69 |
| 3.2.2. Untersuchungen zu alternativen mikrobiellen Abbauwegen von Toluol | 72 |
| 3.2.2.1. Überprüfung von Abbauwegen mit <i>o</i> - und <i>m</i> -Kresol als Intermediate | 73 |
| 3.2.2.2. Überprüfung von Abbauwegen mit <i>p</i> -Kresol als Schlüsselmetabolit | 74 |
| 3.2.2.3. Dioxygenierung von Toluol | 79 |
| 3.2.3. Restaktivität einer Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase trotz ausgeschalteter Toluat- bzw. -Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Gene | 84 |
| 3.3. Die Gencluster mit Genen der Toluat- bzw. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 89 |
| 3.3.1. Das Gencluster mit <i>xyll</i> | 89 |
| 3.3.2. Das Gencluster mit <i>benD</i> | 91 |
| 3.3.2.1. Klonierung und Gene des <i>benD</i> -enthaltenden Clusters | 91 |
| 3.3.2.2. PCR-Experiment zur Auffindung von <i>benR</i> | 92 |
| 4. Diskussion | 93 |
| 4.1. Herstellung von Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol mit <i>P. putida</i> Idaho BDH2 | 93 |
| 4.1.1. Ein alternativer Abbauweg von Toluol? | 95 |
| 4.1.2. Die Restaktivität einer Toluat- bzw. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 96 |
| 4.1.3. Ergebnisse und Projektziele | 98 |
| 4.2. Die beiden Gencluster mit der Toluat- bzw. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 100 |
| 4.2.1. Vergleich der Toluat- mit der Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> Idaho | 101 |
| 4.2.2. Charakterisierung des Genclusters mit <i>xyll</i> | 106 |
| 4.2.3. Charakterisierung des Genclusters mit <i>benD</i> | 118 |
| 4.2.4. Homologien zu anderen Clustern | 123 |
| 5. Literatur | 131 |
| 6. Anhang | 144 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|------------------------|---|
| Ap ^R | Ampicillinresistenz |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaare |
| CTAB | Hexadecyltrimethylammoniumbromid |
| C-Terminus | Carboxylterminus |
| DIG | Digoxygenin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat |
| dTTP | Desoxyribothymidin-5'-triphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| g | Erdbeschleunigung |
| HPLC | Hochdrucksflüssigkeitschromatographie |
| IPTG | Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| Km ^R | Kanamycinresistenz |
| Km ^S | Kanamycinsensitivität |
| LB | Luria-Bertani |
| NAD ⁺ /NADH | Nicotinamadenindinukleotid: oxidierte/reduzierte Form |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| OD | Optische Dichte |
| p.A. | pro Analysii |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sm ^R | Streptomycinresistenz |
| Sp ^R | Spectinomycinresistenz |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Tc ^R | Tetracyclinresistenz |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Internationale Enzymeinheit [μmol/min] |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galaktosid |
| % (v/v) | Volumenprozent |
| % (w/v) | Gewichtsprozent |

ENGLISH SUMMARY

Production of benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol from toluene: Construction and characterization of a mutant strain of the solvent tolerant *Pseudomonas putida* Idaho.

The goal of the present work was to develop a biotechnological system for the production of phenol. Phenol was chosen as an example for oxygenated aromatics. The chemical synthesis of oxygenated products is difficult since stereochemical selectivity is low and consequently the yield of racemic product is not economic. It has been shown that biological systems can yield *cis*-diols – monomeric precursors for the synthesis of hydrocarbons - on an industrial scale. In the present work a biocatalyst for the conversion of toluene to benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol is described.

It is reported that strain *Pseudomonas putida* Idaho grows in the presence of 50 % of organic solvents like xylene and toluene. This strain degrades the aromatic compounds further via the oxydation of the methyl group. A metabolite of this pathway is benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol. The high solvent tolerance of this strain and the direct conversion of toluene to benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol is a promising system for the production of a *cis*-diol that can be harvested as a precursor for phenol. This microbial intermediate can be decarboxylated to phenol under acidic conditions. The by-product salicylate can be converted to phenol by thermal treatment.

To establish a mutant strain of *P. putida* Idaho that accumulates benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol it was necessary to inactivate the genes for toluate dihydrodiol dehydrogenase (*xyLL*) and benzoate dihydrodiol dehydrogenase (*benD*) that convert this product to catechol in the wild type strain. The genes for the degradation of toluene are organized in two clusters. The *meta*-pathway containing the genes for the conversion from benzoate to pyruvate and acetyl-CoA which are introduced to the Krebs' cycle is often preceded by another gencluster that converts an aromatic compound like toluene, salicylate, naphtalene or phenol to catechol. The second enzyme encoded by the *meta*-operon is the benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol converting toluate-*cis*-1,2-dihydrodiol-dehydrogenase.

For the degradation of benzoate exists an alternate pathway to the *meta*-pathway. In the so-called *ortho*-pathway the intermediate catechol is cleaved in intradiol position resulting in the product muconat whereas in the *meta*-pathway the extradiol cleaving product is muconic

semialdehyd, a metabolite easy to identify because of its yellow colour. In contrast to the *meta*-pathway that degrades benzoate and methylated benzoates (toluates) the only accepted substrate by the *ortho*-pathway is benzoate. For the construction of the mutant strain *P. putida* Idaho BDH2 it was necessary to inactivate both enzymes that convert benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol to catechol encoded by *xylL* (*meta*-pathway) and *benD* (*ortho*-pathway) respectively.

At the beginning it was not known that both enzymes exist in *P. putida* Idaho. It was assumed that in this strain the *meta*-pathway exists because of homology studies in earlier works that showed genes of the upper operon of the TOL-plasmid. With a DIG-labeled probe amplified with primers designed from the toluate *cis*-1,2-dihydrodiol-dehydrogenase of the *meta*-operon of the TOL-plasmid a 5,2 kb *PstI* gene fragment in *P. putida* Idaho was detected. The fragment was isolated and cloned into pBluescript II SK (+). Sequence analysis showed that it was a part of the *meta* pathway and contained *xylL*. In *xylL* existed two *AccI* restriction sites that were suitable for a deletion and consequently an inactivation of the gene. The fragment with the inactivated gene was cloned into the suicide vector pLO3. The resulting plasmid pXYLAG22 was transformed into *E. coli* S17-1. This strain served as donor for the conjugative transfer of pXYLAG22 to *P. putida* Idaho. The intact gene *xylL* of *P. putida* Idaho was replaced by the inactivated gene. This gave strain *P. putida* Idaho BDH1.

The new mutant strain with a defect in the toluate *cis*-1,2-dihydrodiol dehydrogenase of the *meta*-operon was expected to accumulate benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol when given benzoate as substrate. Furthermore, it was expected that this strain is incapable to grow with this substrate. However, *P. putida* Idaho BDH1 showed no difference compared to the wildtype strain. This demonstrated that there was at least a second gene for the conversion of benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol to catechol. Despite the inactivation of *xylL* a fragment of suitable size could be amplified with the primers designed for the amplification of *xylL*. A second hybridisation with that fragment labeled as a probe with DNA of the newly constructed strain identified a 3 kb *PstI* fragment. Sequence analysis showed homology to *benD* of the β -keto adipate pathway. The inactivation of this gene turned out to be more difficult. The finally successful strategy was to inactivate *benD* by a deletion and additionally an insertion of the Ω -fragment consisting of a streptomycin and a spectinomycin resistance. The fragment of DNA from *P. putida* Idaho BDH1 with the inactivated *benD* was cloned to the suicide vector pSUP301 containing a kanamycin resistance resulting in pBENAG44. This plasmid was transformed into *E. coli* S17-1 and introduced into *P. putida* BDH1 by conjugation. Cells carrying the streptomycin resistance of the Ω -fragment were the mutant strain *P. putida* Idaho BDH2.

Physiological studies with strain BDH2 revealed that it produces benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol. However, it was found that it still can grow with toluene as sole carbon source despite the interruption of its degradative pathway. The yield of product when given toluene was approximately 40 %. When given benzyl alcohol or benzoate the conversion ratio was 100 % and only very little growth during the conversion phase was noticed. After the production of benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol in all conversion experiments with toluene, benzyl alcohol or benzoate as substrates it was found that the product was degraded within two days accompanied by growth of the bacteria.

This finding indicates that there exists a third enzyme in *P. putida* Idaho capable for the degradation of benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol with a weak but stable activity. Its role during the conversion of the substrates toluene, benzyl alcohol or benzoate, respectively to benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol is not clear yet. In the case of toluene as substrate the low yield of product and the immense growth of the bacteria indicate that there might exist a second degradation pathway for this substrate since toluene is degraded twice as fast as benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol is synthesized. The little growth of the bacteria during conversion of benzyl alcohol and benzoate to benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol is an indication that toluene is degraded due to a third benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol degrading enzyme activity. This means that there is a leakage in the common degradation pathway of toluene, benzyl alcohol and benzoate: another benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol converting enzyme.

To get information whether both or only one of these two explanations is true it was examined whether degradation pathways of toluene described for other strains exist in *P. putida* Idaho BDH2 and if an enzyme activity for the conversion of benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol in the mutant strain can be found. In other pathways toluene is attacked by monooxygenases or a dioxygenase. Monooxygenases convert toluene to *ortho*-, *meta*- or *para*-cresole. None of these pathways could be detected in *P. putida* Idaho. *O*- and *m*-cresole seemed to have toxic effects on strain *P. putida* Idaho BDH2 and could not be degraded. *P*-cresole is tolerated by this strain but not or only very slowly degraded, which does not explain the growth during the formation of benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol when fed with toluene. Dioxygenation of toluene resulting in toluene-*cis*-2,3-dihydrodiol is unlikely since no dioxygenase gene could be detected by PCR with primers. Benzene, a typical substrate for a dioxygenase could not be converted to a dihydrodiol by cells of *P. putida* Idaho BDH2. With these findings an alternate pathway for the degradation of toluene could not be identified.

Enzyme tests for the benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol dehydrogenase with crude extracts of cells of *P. putida* Idaho BDH2 grown with toluene and benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol respectively

revealed a weak but significant activity (5×10^{-3} U/mg protein). This activity demonstrates the existence of a third enzyme that is capable to convert benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol. However, little is known about the regulation of this gene product. Experiments performed by E. Payer (Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, FHG Stuttgart) showed that cells of *P. putida* Idaho grown with glucose and induced with toluene converted benzyl alcohol and benzoate only partly to benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol (60 and 70 % respectively). In the present work cells converting benzyl alcohol or benzoate completely to benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol received the same substrate in the preculture and in the conversion experiment. Possibly toluene is involved in the regulation of the unknown benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol dehydrogenase and the enzyme activity is much higher as measured with experiments done here. The unknown protein is not yet identified. An attempt to amplify its gene by primers for *xylL* and *benD* was unsuccessful. The regulation of this enzyme also needs more investigation.

The gene clusters encoding the two inactivated dihydrodiol dehydrogenases of *P. putida* Idaho were sequenced. It was especially necessary to confirm that the genes for enzymes converting benzoate to benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol were present. In fact functional gene clusters could be found that gave evidence for active toluate and benzoate *cis*-1,2-dihydrodiol dehydrogenases. Furthermore, it was interesting to get information about the evolution of the two gene clusters.

The meta-operon was almost identical to that of pWW0. However, in the last sequenced gene, *xylQ*, the similarity to the meta-operon decreased and was almost identical with a cluster from a naphthalene degradation pathway from *P. stutzeri* AN10.

The cluster of the β -keto adipate pathway with *benD* showed more surprises. Its proteins show at least 93 % identical positions to a cluster reported in *P. putida* PRS2000. However, in *P. putida* Idaho an additional gene for the catechol-1,2-dioxygenase CatA could be found being positioned between a gene for BenK, a benzoate transporter and BenE whose function is unknown. CatA from *P. putida* Idaho is most similar to CatA from *P. putida* PRS2000, which is located in another cluster than the β -keto adipate pathway in that strain. The regulatory gene *benR* preceding the degradation genes *benABCDKE* in *P. putida* PRS2000 could not be found in *P. putida* Idaho. The homology between the two gene clusters starts approximately 90 bases upstream of *benA*. This suggests that the cluster with *benD* is regulated by another enzyme, possibly XylS, which according to the literature, can replace BenR and vice versa.

The missing regulator gene for the *ortho*-pathway in *P. putida* Idaho can be an indication for a different regulation of the upper and *meta*-pathway as well. The regulatory genes for these

two clusters that are located downstream of the *meta*-operon in pWW0 were not sequenced in *P. putida* Idaho. Therefore their existence in this strain is not proved and a regulation different from that in the TOL-plasmid pWW0 cannot be excluded. This might explain the different gene regulation for the degradation of toluene compared to benzyl alcohol or benzoate.

The positioning of *catA* shows that a gene recruitment of a dihydrodiol dehydrogenase from one of the two clusters to another locus in the *P. putida* Idaho genome could have been occurred during evolution. This could be a reason for the existence of a third enzyme converting benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol to catechol.

To synthesize benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol the mutant strain *P. putida* Idaho BDH2 was cultivated by E. Payer in the Fraunhofer Institute with glucose as substrate and given toluene to induce its degradation pathway. Harvested cells however showed only very weak conversion of toluene to benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol after 24 hours. This indicates that the induction of the toluene degrading pathway occurs very slowly, which is not attractive for an industrial economic synthesis of benzoate-*cis*-1,2-dihydrodiol.

KURZFASSUNG

Germer, Andrea

Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol: Konstruktion und Charakterisierung einer Mutante des Lösungsmittel tolerierenden *Pseudomonas putida* Idaho

Zur biotechnologischen Produktion der Bulkchemikalie Phenol wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mutante des Bakterienstammes *P. putida* Idaho konstruiert, mit welcher aus Toluol Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol als Precursor für die weitere Umsetzung zu Phenol hergestellt werden sollte. In *P. putida* Idaho ist das gewünschte Produkt Metabolit des Abbauweges von Toluol. Im Wildtypstamm *P. putida* Idaho wird Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol durch zwei Dehydrogenasen, die in verschiedenen Genclustern codiert sind, zu Brenzcatechin umgesetzt. Die Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase XylL, die im *meta*-Operon codiert ist, wurde durch eine Deletion im Gen *xylL* inaktiviert, in Gen *benD* der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase des β -Ketoacidweges wurde zusätzlich zu einer Deletion ein Antibiotikaresistenzmarker, das Ω -Fragment, eingefügt.

Mit dieser Mutante *P. putida* Idaho BDH2 wurden Umsatzexperimente von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Mutante trotz Inaktivierung der beiden Gene, welche das Produkt in Wildtypstamm weiter abbauen, immer noch in der Lage ist, Toluol als Wachstumssubstrat zu nutzen. Aus dem angebotenen Toluol entstand außerdem nur 25-40 % des erwarteten Produktes, das nach etwa 4 Tagen unter weiterer Bildung von Biomasse wieder abgebaut wurde. Wurde statt Toluol Benzylalkohol oder Benzoat angeboten, wurde Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu nahezu 100 % gebildet. Auch während des Umsatzes dieser beiden Substrate konnte eine sehr schwache Zunahme der optischen Dichte beobachtet werden. Wie im Ansatz mit Toluol wurde auch in diesen Ansätzen das gebildete Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol nach einigen Tagen unter Wachstum der Zellen wieder abgebaut. Durch Enzymtests mit Rohextrakten der Doppelmutanten von *P. putida* Idaho konnte eine sehr schwache aber signifikante Aktivität eines Enzyms, das Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umsetzen kann, nachgewiesen werden, was den Abbau des gebildeten Produktes erklärt. Ob die Bilanzlücke bei der Bildung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol allein dieser Aktivität zugrunde liegt, ist nicht geklärt. Ein zusätzlicher Abbauweg von Toluol in *P. putida* Idaho, der nicht über die Metabolite Benzylalkohol und Benzoat geht, konnte nicht nachgewiesen werden.

Experimente von E. Payer im Fraunhofer Institut Stuttgart zeigten, dass die Mutante *P. putida* Idaho BDH2, deren Biomasse mit dem Substrat Glucose produziert wurde, sich nur sehr schlecht mit Toluol induzieren ließ. Eine technische Produktion von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mit *P. putida* Idaho ist, abgesehen vom unvollständigen Umsatz von Toluol ausgehend, weiterhin problematisch.

Die Sequenzierung der beiden Gencluster mit den Dehydrogenasen zeigte, dass beide für den Umsatz zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol erforderlichen Dioxygenasen vorhanden waren.

Die Gencluster aus *P. putida* Idaho zeigten Abweichungen von den sonst fast identischen Clustern, nämlich dem *meta*-Operon aus pWW0 und dem β -Ketoacidweg aus *P. putida* PRS2000. Diese Abweichungen könnten Hinweise auf eine andersartige Regulation für den Aromatenabbau als in den Wegen aus pWW0 oder *P. putida* PRS2000 bergen. Auch ist die Rekrutierung einer *cis*-1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase aus einem der beiden Gencluster an einen anderen Locus des Chromosoms aus *P. putida* Idaho nicht ausgeschlossen.

Die genetische Grundlage des unvollständigen Umsatzes von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol und dessen Regulation ist somit noch nicht aufgeklärt. Für zukünftige Synthesen auf mikrobieller Basis ist somit das tiefere Verständnis von evolutiven und regulatorischen Abläufen in den Produktionsstämmen von Interesse.

1. EINLEITUNG

Die direkte selektive Oxygenierung von nichtaktivierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffen stellt für die chemische Synthese ein weitgehend ungelöstes Problem dar. In der Regel beruht die chemische Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen darauf, dass unter Einsatz von Elektronendonatoren und molekularem Sauerstoff durch einen Katalysator eine reaktive Sauerstoffspezies erzeugt wird, die am nichtaktivierten Kohlenwasserstoff angreift. In der chemischen Synthese sind die Selektivitäten und Ausbeuten bei Hydroxylierungsreaktionen, insbesondere wenn chirale Produkte gewonnen werden sollen, häufig sehr gering und somit wirtschaftlich nicht rentabel.

Neben der Verwendung chemischer Katalysatoren bieten sich biologische Systeme wie Mono- oder Dioxygenasen an, welche die direkte chemo-, regio- und stereoselektive Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen katalysieren. Dioxygenasen erzeugen Dihydrodirole, welche als Ausgangsstoffe für Verbindungen verschiedenster Anwendungen genutzt werden können. 1968 isolierte die Arbeitsgruppe von Gibson eine Mutante des Stammes *Pseudomonas putida* F1, der das Enzym Benzoldihydrodiol-Dehydrogenase fehlte (Gibson et al., 1970). Mit dieser Mutante kann Toluol-2,3-dihydrodiol hergestellt werden, das durch eine Oxidation und anschließender Aldolkondensation in Cyclopentenol (Abb. 1.1A) überführt wird, aus welchem Prostaglandine und carbocyclische Nucleoside hergestellt werden. Andere kommerzielle Anwendungen von Dihydrodiolen sind die Herstellung des HIV-Protease-Inhibitors Indinavir (Abb. 1.1B) aus Inden (Fa. Merck) oder die „grüne“ Produktion des Farbstoffes Indigo (Abb. 1.1C) aus Glucose der Firma Genencor International oder des Kunststoffes Polyphenylen (Fa. ICI, Abb. 1.1D) aus Benzol (Hudlicky und Thorpe, 1996; Boyd und Sheldrake, 1998).

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines Industrieprojektes, in welchem ein biotechnologisches Verfahren für die Herstellung von Phenol durch Hydroxylierung einfacher aromatischer Ausgangsverbindungen entwickelt werden sollte. Phenol diente als Beispiel einer Bulkchemikalie, die in der Farb- und Kunststoffindustrie oder auch in Konservierungs-, Desinfektions- und Arzneimitteln zum Einsatz kommt. Für die biotechnologische Herstellung von Phenol gibt es drei Möglichkeiten. Als Ausgangsstoffe kommen Benzol und Toluol in Frage. Benzol kann mikrobiell entweder durch eine direkte Monooxygenierung zum Phenol umgesetzt werden, oder durch eine Dioxygenierung zum Benzol-*cis*-1,2-dihydrodiol, das unter sauren Bedingungen und Wasserabspaltung zum Phenol rearomatisiert wird (Abb. 1.2).

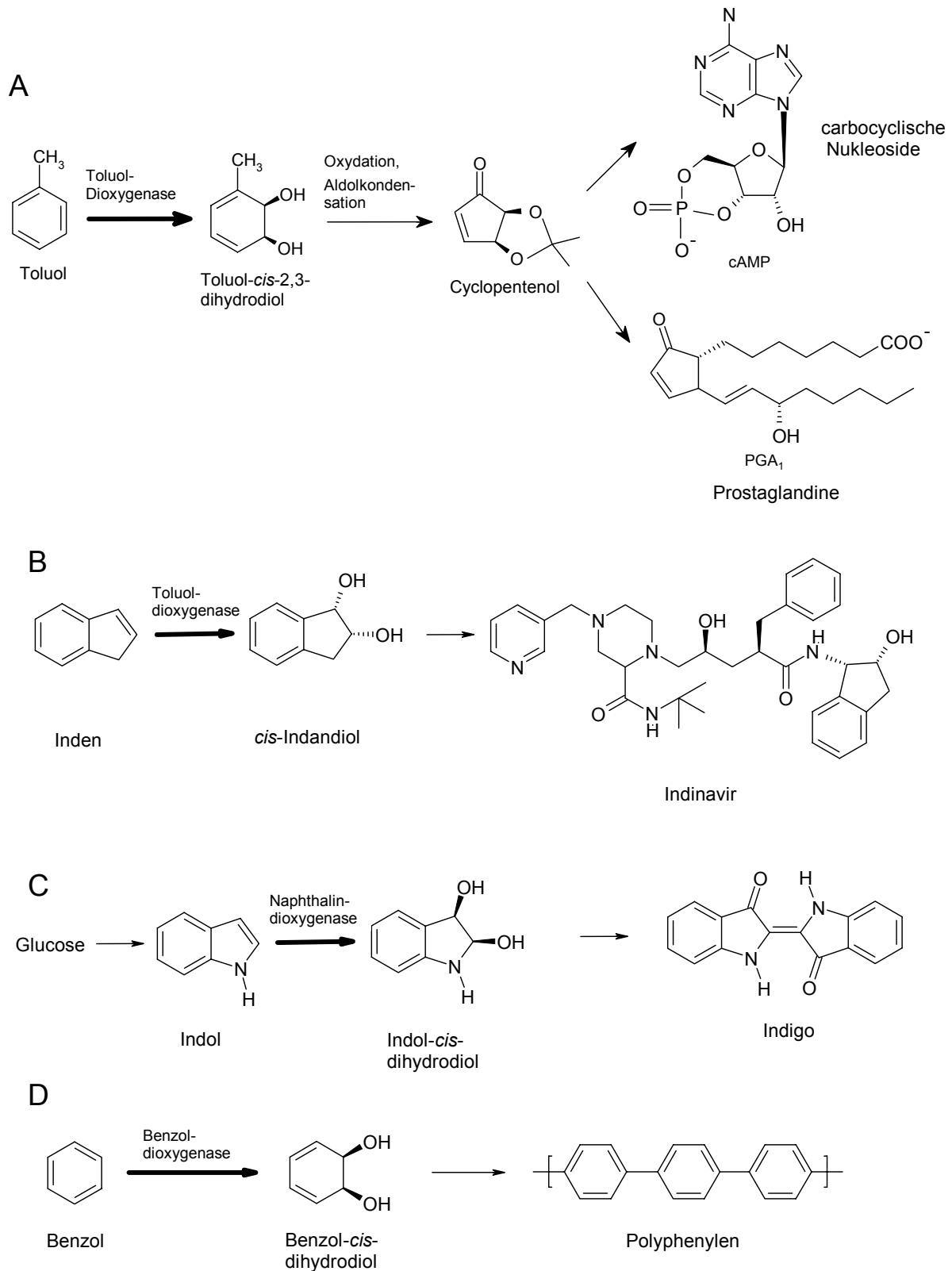


Abb. 1.1: Einige Beispiele für die Verwendung von mikrobiell erzeugten Dihydrodiolen. Der mit einer bakteriellen Dioxygenase erfolgte Schritt ist im jeweiligen Syntheseweg durch einen dicken Pfeil gekennzeichnet. A: Herstellung von Cyclopentenol aus Toluol mit Hilfe einer Dioxygenase aus dem Stamm *P. putida* F39/D. B: Herstellung des Proteaseinhibitors Indinavir aus Inden; C: Herstellung des Farbstoffes Indigo aus Glucose; D: Herstellung des Kunststoffes Polyphenylen aus Benzol. Nach Hudlicky und Thorpe, (1996) bzw. Boyd und Sheldrake (1998).

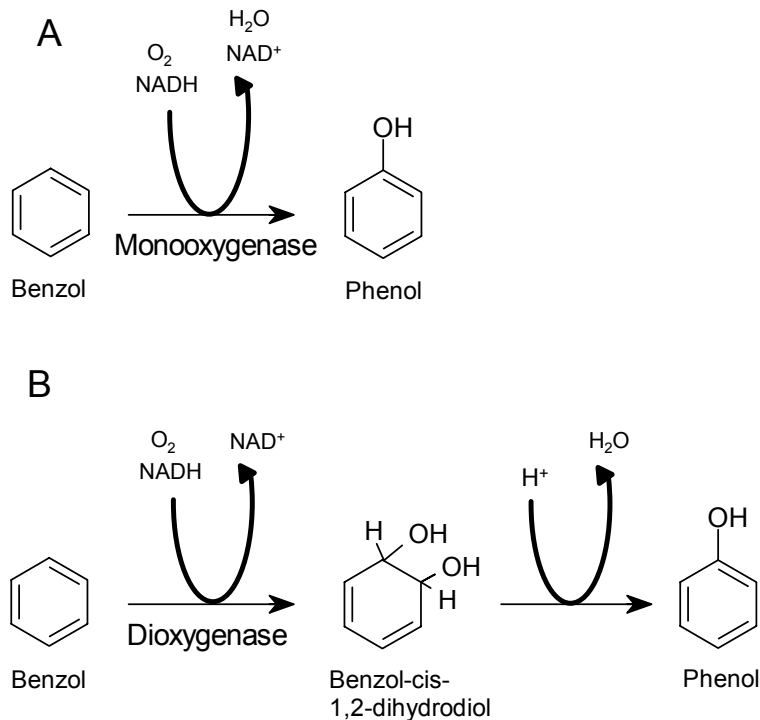


Abb. 1.2: Möglichkeiten der Herstellung von Phenol aus Benzol mittels einer Mono- (A) oder Dioxygenase (B).

Als dritte Möglichkeit zur Herstellung von Phenol kann Toluol als Substrat eingesetzt werden. Der Einsatz von Toluol hat den Vorteil, dass dieses Substrat von mehr Bakterienstämmen und auch in höheren Konzentrationen toleriert wird als Benzol. Desweiteren liefert der Umsatz von Toluol zu Benzoat genauso viele Reduktionsäquivalente, wie für die Oxidation von Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol notwendig sind (Abb. 1.3). Dies lässt erwarten, dass kein oder nur wenig Auxiliarsubstrat als Elektronendonator erforderlich ist. Das mikrobiell gewonnene Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol kann durch Säurezugabe unter Decarboxylierung in Phenol überführt werden. Als Nebenprodukt entsteht bei dieser Methode allerdings Salicylsäure, die aber thermisch ebenfalls zu Phenol decarboxyliert werden kann.

Zur mikrobiellen Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wurde im Rahmen dieser Arbeit der Stamm *Pseudomonas putida* Idaho eingesetzt. Für diesen Stamm wurde beschrieben, dass er bis 50 % Toluol in einem Zweiphasensystem tolerieren kann, und es wurde von homologen Regionen zu Genen des TOL-Plasmids pWW0 berichtet, deren Produkte Toluol über den in Abb. 1.3 gezeigten Abbauweg zu Benzoat umsetzen (Cruden et al., 1992). Daraus wurde für die vorliegende Arbeit gefolgert, dass in *P. putida* Idaho Toluol tatsächlich über diesen Weg abgebaut wird. Zur Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol war es also erforderlich, die Gene, welche Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu Brenzcatechin umsetzen, zu inaktivieren, so dass der Organismus das sich akkumulierende Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol in

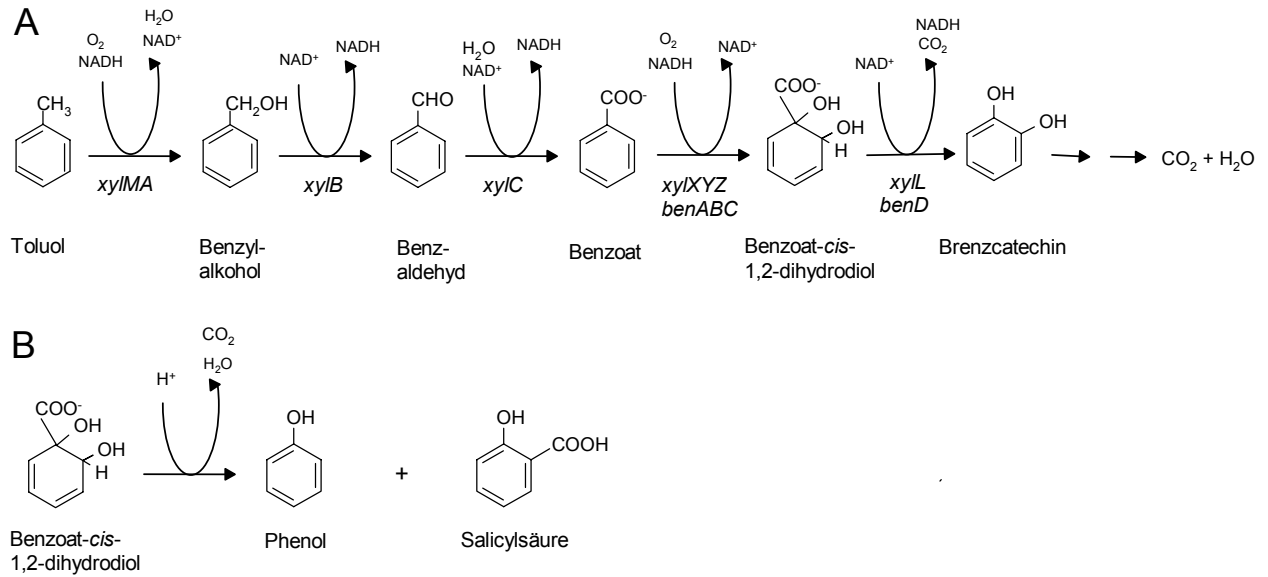


Abb. 1.3: Herstellung von Phenol aus dem biotechnologisch erzeugten Benzoat-cis-1,2-dihydrodiol. A: Bakterieller Abbauweg von Toluol zu Brenzcatechin. B: Chemischer Umsatz von Benzoat-cis-1,2-dihydrodiol zu Phenol und Salicylsäure unter sauren Bedingungen. Salicylsäure kann durch thermische Einwirkung zu Phenol decarboxyliert werden.

das umgebende Medium ausschleust (Abb. 1.4). Bei einer Mutante von *R. eutropha* 335 war die Akkumulation und Ausschleussung von Benzoat-cis-1,2-dihydrodiol als Hydroxylierungsprodukt von Benzoat bereits beschrieben (Reiner und Hegemann, 1971).

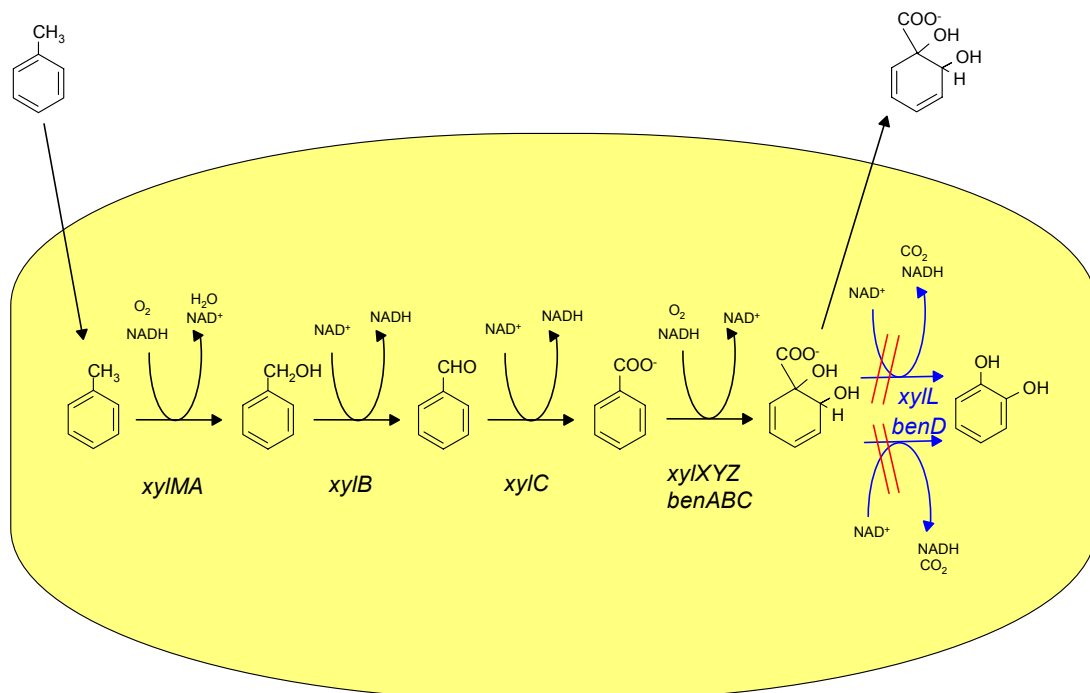


Abb. 1.4: Modell der in der Toluat- bzw. Benzoat-cis-1,2-dihydrodiol Dehydrogenase inaktivierten Mutante von *Pseudomonas putida* Idaho. In die Zelle gelangtes Toluol wird bis zum Benzoat-cis-1,2-dihydrodiol umgesetzt. Da der weitere Abbauweg über Brenzcatechin blockiert ist, wird das sich akkumulierende Produkt aus der Zelle ausgeschleust.

Die Enzyme, die den Umsatz von Toluol zu Benzoat katalysieren, sind im sogenannten upper-Operon codiert. Der weitere Abbau von Benzoat kann durch zweierlei Wege, die in unterschiedlichen Operons codiert vorliegen können, erfolgen. Zum einen existiert der *meta*-Weg („*xyl*-Gene“), der wie auch das upper-Operon auf dem TOL-Plasmid codiert ist (Williams und Murray, 1974; Assinder und Williams, 1990; Jeffrey et al., 1992; Harayama und Rekik, 1993). Zum anderen kann Benzoat auch über den β -Ketoacidweg („*ben*- und *cat*-Gene“) abgebaut werden. Die Gene für diesen Weg liegen chromosomal codiert vor (Nakazawa und Yokota, 1973; Williams und Murray, 1974; Wong und Dunn, 1974; Jeffrey et al., 1992; Cowles et al., 2000).

Von Cruden et al. (1992) wurde festgestellt, dass in *P. putida* Idaho auch die homologen Regionen zum upper-Operon chromosomal vorliegen müssen, denn es konnte kein Plasmid nachgewiesen werden. Chromosomal codierte TOL-Plasmid-DNA wurde schon in anderen *Pseudomonas* Spezies gefunden (Sinclair et al., 1986; Meulien und Broda, 1982). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die *xyl*-Gene von pWW0 auf einem Transposon liegen.

Von *P. putida* Idaho war zu Beginn dieser Arbeit jedoch nicht bekannt, ob ein gesamtes, funktionelles Gencluster vorlag, oder ob nur bruchstückhaft Regionen aus dem TOL-Plasmid in das Chromosom gelangt waren. Es war insbesondere nicht klar, ob die Gene der Toluat-Dioxygenase *xylXYZ* bzw. der Benzoat-Dioxygenase *benABC*, welche die Dioxygenierung von Toluat- bzw. Benzoat zu Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol katalysieren, vorhanden waren. Auch aus diesem Grund, neben dem Ziel der Inaktivierung der beiden Dihydrodiol-Dehydrogenasen, wurden das *meta*-Operon und das Cluster um *benD* kloniert, sequenziert und analysiert.

Im Hinblick auf die großtechnische Produktion von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol erschien die Konstruktion einer in der Toluat- und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase defekten Mutante des Stammes *P. putida* Idaho aus mehreren Gründen vielversprechend:

Das Substrat Toluol ist für viele Bakterienstämme toxisch. Daher könnte in einem technischen Prozess mit *E. coli* nur bei geringen Substratkonzentrationen gearbeitet werden und es bestünde die Gefahr der Vergiftung des Biokatalysators schon bei leichter Überdosierung. *P. putida* Idaho tolerierte dagegen eine hohe Konzentration des Lösungsmittels im Zweiphasensystem (bis zu 50 %).

Neben der guten Lösungsmitteltoleranz von *P. putida* Idaho ist der schon natürlich vorhandene Abbauweg von Toluol über Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol als Metaboliten von Vorteil. Die Mutante, die in der Lage wäre, Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu erzeugen und zu akkumulieren, sollte lediglich einen Defekt in der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase tragen

und sich daher nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheiden. Dagegen müsste bei einer Mutante eines Benzoat- oder toluatdegradierenden Stammes, der die Gene des upper-Operons zusätzlich zugesetzt wurden, die Expression der Fremdgene sowie die Aktivität der Genprodukte gewährleistet sein.

Aufgrund der Lösungsmitteltoleranz und des natürlich vorhandenen Abbauweges von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol von *P. putida* Idaho wurde eine Mutante konstruiert, die Defekte in den Genen *xylL* und *benD* trägt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme mit ihren Eigenschaften und ihrer Herkunft zusammengefasst. Bei den *E. coli*- Stämmen handelt es sich um *E. coli* K12-Derivate.

Tabelle 2.2 stellt die verwendeten Vektoren und die wesentlichen in dieser Arbeit konstruierten Plasmide dar. Auf die Aufzählung von Plasmiden mit subklonierter DNA für Sequenzierzwecke wurde verzichtet.

Tab 2.1: Verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Eigenschaften | Herkunft |
|---|---|---------------------------|
| <i>Pseudomonas putida</i> Idaho | | Cruden et al. (1992) |
| <i>Pseudomonas putida</i> Idaho BDH1 | $\Delta xylL$ | diese Arbeit |
| <i>Pseudomonas putida</i> Idaho BDH2 | $\Delta xylL \Delta benD$, Sm ^R | diese Arbeit |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> λ <i>relA1</i> | Fa. Gibco BRL, Eggenstein |
| <i>Escherichia coli</i> S17-1 | chromosomal integriertes RP4-2-(Tc:: <i>Mu</i>)-(Km:: <i>Tn7</i>) <i>pro</i> , <i>res</i> ⁻ , <i>mod</i> ⁺ | Simon et al. (1983) |
| <i>Pseudomonas putida</i> F1 | | Gibson et al. (1970) |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1 | | Whited und Gibson (1991) |

Tab 2.2: Verwendete Vektoren und Plasmide

| Plasmid / Vektor | Beschreibung | Herkunft |
|---|--|-----------------------------------|
| Vektoren | | |
| pBluescript II SK(+) | Ap ^R , Derivat von pUC19; P _{lac} , lacZ'; fl(+)-Origin; ColE1-Origin | Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA |
| pLO3 | Tc ^R , Derivat von pBR322; <i>sacB</i> ; RP4-Origin | Lenz und Friedrich, 1998 |
| pSUP301 | Ap ^R , Km ^R , Derivat von pACYC177, RP4 spezifische "mob-site" | Simon et al. (1983) |
| pHP45Ω | pBR322-Derivat, Tc ^S , Ap ^R , Sm ^R , Sp ^R | Prentki und Krisch (1984) |
| Rekombinante Plasmide mit DNA aus dem Cluster mit dem Gen der Toluat-<i>cis</i>-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (<i>xylL</i>) | | |
| pXYLAG0 | 421-bp-PCR-Produkt der Primer dhf12 und dhr12 in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG1 | 5,2-kb- <i>PstI</i> -Fragment aus <i>P. putida</i> Idaho in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG2 | 2,2-kb- <i>PstI/XbaI</i> -Fragment aus pXYLAG1 in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG3 | 3-kb- <i>XbaI/PstI</i> -Fragment aus pXYLAG1 in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG4 | 4,9-kb- <i>XbaI</i> -Fragment aus <i>P. putida</i> Idaho in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG5 | 4-kb- <i>XhoI</i> -Fragment aus <i>P. putida</i> Idaho in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG21 | pXYLAG2 mit Deletion in <i>xylL</i> , erzeugt durch <i>AccI</i> Verdau und Religation, Ap ^R | diese Arbeit |
| pXYLAG22 | Insert von pXYLAG21 in pLO3, Tc ^R | diese Arbeit |
| Rekombinante Plasmide mit DNA aus dem Cluster mit dem Gen der Benzoat-<i>cis</i>-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (<i>benD</i>) | | |
| pBENAG0 | 423-bp-PCR-Produkt von dhf11 und dhr11 in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pBENAG1 | 3-kb- <i>PstI</i> -Fragment aus <i>P. putida</i> Idaho in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pBENAG2 | 1,7-kb- <i>PstI/DraII</i> -Fragment aus pBENAG1 in pBluescript | diese Arbeit |
| pBENAG3 | 7,5-kb- <i>BamHI</i> -Fragment aus <i>P. putida</i> Idaho in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pBENAG4 | 2046-bp-PCR-Produkt der Primer delfront-pst und delback-sac in pBluescript, Ap ^R | diese Arbeit |
| pBENAG21 | pBENAG2 mit <i>AccI</i> -Deletion in <i>benD</i> , Ap ^R | diese Arbeit |
| pBENAG22 | Insert von pBENAG21 in pLO3, Tc ^R | diese Arbeit |
| pBENAG41 | pBENAG4 mit einer Deletion von 280 bp in <i>benD</i> , Ap ^R | diese Arbeit |
| pBENAG42 | Insert von pBENAG41 in pLO3, Tc ^R | diese Arbeit |

Fortsetzung von Tabelle 2.2 auf folgender Seite

Fortsetzung von Tabelle 2.2:

| Plasmid / Vektor | Beschreibung | Herkunft |
|------------------|--|--------------|
| pBENAG43 | pBENAG4 mit einer Deletion von 684 bp und einer Insertion des Ω -Fragments in <i>benD</i> | diese Arbeit |
| pBENAG44 | Insert von pBENAG43 in pSUP301, Km ^R , Sm ^R | diese Arbeit |

Ap^R: Ampicillinresistenz; Tc^R: Tetracyclinresistenz; Km^R: Kanamycinresistenz; Sm^R: Streptomycinresistenz; Sp^R: Spektinomycinresistenz

2.2. Nährmedien und Medienzusätze

2.2.1. Medien

LB-Medium („Luria-Bertani“-Medium; Sambrook et al., 1989):

| | |
|------------|------------------|
| 10 g | Trypton |
| 5 g | Hefeextrakt |
| 10 g | NaCl |
| ad 1000 ml | H ₂ O |

LB-Medium wurde für die analytische Plasmidpräparation und für die Anzucht für Konjugationsexperimente eingesetzt. Das jeweilige Antibiotikum wurde je nach Resistenz wie unter 2.2.2. beschrieben zugesetzt.

Mineralmedium nach Dorn et al. (1974):

Zunächst wurden Phosphatpuffer und Salzlösung separat hergestellt:

10x-Phosphatpuffer (560 mM):

| | |
|-----------|---|
| 56 g | Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O |
| 16 g | KH ₂ PO ₄ |
| ad 800 ml | H ₂ O |

50x-Salzlösung:

| | |
|-----------|---|
| 0,15 g | Fe(NH) ₄ -Citrat |
| 3,0 g | MgSO ₄ *7H ₂ O |
| 15 g | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| 15 ml | Spurenelementlösung SL6 nach Pfennig und Lippert, 1966, ohne EDTA und FeSO ₄ |
| ad 285 ml | H ₂ O |

Dieser Lösung wurden nach dem Autoklavieren 15 ml einer sterilfiltrierten 0,21 mM Ca(NO₃)₂-Lösung (1,5 g Ca(NO₃)₂*4H₂O in 30 ml H₂O) zugesetzt.

Für das Medium wurden folgende Komponenten eingesetzt:

| | |
|------------|-----------------------|
| 1/10 vol | Phosphatpuffer pH 7,2 |
| 1/50 vol | Salzlösung |
| | C-Quelle |
| ad 1/1 vol | H ₂ O |

Als C-Quelle wurden Toluol, Benzylalkohol, Benzoat, *o*-, *m*-, *p*-Kresol, Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol oder Glucose eingesetzt. Toluol und Benzylalkohol wurden direkt als organische Lösung eingesetzt, von Benzoat und Glucose wurde jeweils eine 1 M, von den Kresolen eine 200 mM, von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol eine 50 mM Stammlösung angesetzt und in der gewünschten Konzentration eingesetzt.

2.2.2. Medienzusätze

Für die Kultivierung von Bakterienstämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde den Medien das jeweilige Antibiotikum in den in Tabelle 2.3 aufgeführten Konzentrationen zugesetzt.

Tab. 2.3: Zusatz von Antibiotika

| Antibiotikum | Stammlösung | Eingesetzte Konzentration [μ g/ml] |
|--------------|------------------------------|---|
| Ampicillin | 10 mg/ml in 50% Ethanol | 100 |
| Tetracyclin | 1 mg/ml in 100% Ethanol | 10 |
| Kanamycin | 10 mg/ml in H ₂ O | 100 |
| Streptomycin | 10 mg/ml in H ₂ O | 100 |

Zur Kontrolle, ob die Klonierung von DNA in pBluescript erfolgreich war, wurde auf den LB-Agarplatten (s. Kap. 2.3.) 40 μ l X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) und 4 μ l 1 M IPTG ausplattiert. Im Fall der Rekombination kann die α -Komplementation nicht mehr erfol-

gen, da der N-Terminus für die β -Galaktosidase durch die Insertion nicht mehr funktionsfähig ist. Somit ist eine „Blau/Weiß-Selektion“ möglich: Im Fall der funktionierenden β -Galaktosidase erscheinen die Kolonien aufgrund des chromogenen Substrates X-Gal blau, funktioniert die β -Galaktosidase nicht mehr, sind die Zellen weiß. IPTG fungiert als Induktor für die *lacZ*-Gene.

Feste Medien enthielten 1,5 % (w/v) Agar.

2.3. Stammerhaltung

Die verwendeten Stämme wurden über kurze Zeit auf LB-Agarplatten (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l mit H₂O, 1,5 % (w/v) Agar) bei 4°C gelagert. Je nach Vorhandensein von Plasmiden mit Antibiotikaresistenzen wurde den Platten das jeweilige Antibiotikum in der unter 2.2.2. genannten Konzentration zugesetzt.

Die Langzeitaufbewahrung erfolgte bei -70 °C. 0,5 ml von wachsenden Kulturen wurden zu diesem Zweck in Kryoröhrchen mit 0,5 ml sterilem Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4. Anzucht von Kulturen

2.4.1 Anzucht von *E. coli*-Stämmen

Die zur Plasmidisolierung angezüchteten *E. coli*-Stämme wurden in Reagenzgläsern über Nacht bei 37 °C in 4 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin auf einer Schüttelmaschine (RFI-125, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert.

Stämme, die als Konjugationsdonoren dienen sollten, wurden in 100-ml-Schikanekolben (10 ml Flüssigphase) in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C kultiviert.

2.4.2. Anzucht von *Pseudomonas*-Stämmen

Die als Konjugationsrezipienten eingesetzten *Pseudomonas*-Stämme wurden im 100-ml-Schikanekolben (10 ml Flüssigphase) bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (RC-406, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei ca. 100 Upm inkubiert. Als Medium diente LB-Medium.

Für die Wachstums- und Umsatzexperimente sowie für die Rohextrakte wurden die Stämme zunächst in Mineralmedium mit 5 mM Glucose als einziger C-Quelle angezchtet. Die Kultivierung erfolgte in 100 ml-Schikanekolben mit Klettansatz. Das Volumen dieser Vorkultur betrug 20 ml.

Zur Induktion wurde die Vorkultur 1:10 in 300-ml-Schikanekolben mit Klettansatz übertragen und zusätzlich zu Glucose das umzusetzende bzw. zu verwertende Substrat 5 mM zugesetzt. Als Volumen für diese Kulturen wurde 50 ml gewählt.

Diese Kultur wurde wiederum als Vorkultur eingesetzt. Im nächsten Ansatz wurde nur das umzusetzende bzw. zu verwertende Substrat ohne Glucose als C-Quelle eingesetzt. Gegebenfalls wurde dieser Ansatz auch mehrfach in frisches Medium übertragen.

2.5. Messung des Bakterienwachstums

Bei Zellsuspensionen, die nicht aufgrund der Flüchtigkeit des Substrates in Schikanekolben mit Klettansatz kultiviert werden mussten, wurde die optische Dichte photometrisch bei 546 bzw. 600 nm und einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Gemessen wurde in einem Kontron-Photometer (Uvikon 941 Plus). Lag die Optische Dichte über 0,3, wurde die Suspension verdünnt. Die Messung erfolgte gegen Phosphatpuffer.

Die optische Dichte von Kulturen im Schikanekolben mit Klettansatz wurde im Klettphotometer (Modell 800-3, Fa. Klett MFG. CO. N.Y., USA) bestimmt.

2.6. Zellernte und Herstellung von Rohextrakten

Exponentiell wachsende Kulturen wurden in einer Kühlzentrifuge (Avanti™ J-25, Fa. Beckman, Palo Alto, Ca.) bei 4 °C, 15 min bei 6000 x g (5800 Upm, Rotor JA 10) abzentrifugiert.

Die Zellen wurden in Puffer resuspendiert, nochmals abzentrifugiert und in minimal erforderlichen Volumen resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer gekühlten French Presse (Fa. Aminco, SLM Instruments, Urbana, USA) aufgeschlossen.

Das Abzentrifugieren von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Optima™ LE-80K, Fa. Beckman) 45 min mit 100000 x g bei 4 °C (35000 Upm, Rotor Ti 50). Der so gewonnene Überstand wurde für nachfolgende Enzymtests eingesetzt.

2.7. Messung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgte photometrisch (Kontron-Photometer, Uvikon 941 Plus). Unterhalb von 340 nm wurde mit Quartz-Küvetten, ab 340 nm mit Einweg-Plastikküvetten bei 30 °C gemessen. Soweit nicht anders bei den jeweiligen Tests angemerkt, wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe des Rohextraktes gestartet. Die Enzymaktivität (EA) errechnet sich folgendermaßen:

$$EA [U/mg_{\text{Protein}}] = \frac{\Delta E / \Delta t \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot m_{\text{Protein}}}$$

dabei gilt:

| | |
|-------------------------|--|
| $\Delta E / \Delta t$: | Extinktionsänderung [min^{-1}] |
| V: | Gesamtvolumen in der Küvette, hier 1 ml |
| ϵ : | molarer Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$] |
| d: | Schichtdicke, hier 1 cm |
| m_{Protein} : | Masse an Protein im Testansatz [mg] |

Eine Enzymeinheit (1 Unit) wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1 μmol Substrat in einer Minute bei 25 °C katalysiert.

2.7.1. Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase

Die Aktivität der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase wurde nach Reiner (1972) bestimmt. Der Ansatz enthielt:

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| 20 mM | Tris-HCl, pH8 |
| 0-1 mM | Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol |
| 0,5 –1 mM | NAD ⁺ |
| 1-70 μl | Rohextrakt |

Es wurde die NADH-Zunahme bei 340 nm bei 30 °C gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für NADH liegt bei $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Mit einem Rohextrakt von dem Stamm *P. putida* Idaho BDH1 und dem Wildtyp wurde eine Kinetik aufgenommen (Abb. 3.6)

2.7.2. Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase

Verändert nach Nozaki (1970) enthielt der Reaktionsansatz für dieses Enzym:

| | |
|---------|---|
| 50 mM | Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7,2 |
| 0,1 mM | Brenzcatechin |
| 1-10 µl | Rohextrakt |

Es wurde die Produktbildung bei 375 nm verfolgt. Es wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sala-Trepat und Evans, 1971) gerechnet.

2.7.3. Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase

Die Enzymaktivität der Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase wurde verändert nach Hegeman (1966) durchgeführt. Die Wellenlänge betrug 260 nm. Um zu verhindern, dass das gebildete Produkt Muconat nicht sofort weiterreagiert und somit das Messergebnis verfälschen könnte, wurde EDTA eingesetzt. Außerdem war es erforderlich, durch Zugabe von H₂O₂ (Nakazawa und Yokota, 1973) die Aktivität der Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase, welche das Substrat ebenfalls angreift, zu hemmen. Aus diesem Grund wurde der Testansatz mit H₂O₂ ohne Substrat 10 min inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet.

| | |
|---------|-------------------------------------|
| 20 mM | Tris-HCl, pH8 |
| 1 mM | EDTA |
| 0,09 % | H ₂ O ₂ (v/v) |
| 0,1 mM | Brenzcatechin |
| 5-20 µl | Rohextrakt |

Ansätze, die mittels HPLC analysiert wurden, enthielten 0,5 mM Brenzcatechin. Der molare Extinktionskoeffizient für das Produkt *cis-cis*-Muconat beträgt $\epsilon = 16,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dorn und Knackmuss, 1978). Gemessen wurde bei 260 nm.

2.7.4. Muconat-Cycloisomerase

Nach Ornston und Stanier (1966) enthielt der Testansatz:

| | |
|---------|--------------------------|
| 20 mM | Tris-HCl, pH8 |
| 1 mM | MnCl ₂ |
| 0,1 mM | <i>cis, cis</i> -Muconat |
| 5-20 µl | Rohextrakt |

Die Substratabnahme wurde bei 260 nm verfolgt. Für die Analyse mittels HPLC wurden 0,2 mM *cis, cis*-Muconat eingesetzt. Gerechnet wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 16,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dorn und Knackmuss, 1978).

2.7.5. Protocatechuat-3,4-Dioxygenase

Nach Stanier und Ingraham (1954) wurde folgender Testansatz gewählt:

| | |
|---------|---|
| 50 mM | Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7,2 |
| 0,1 mM | Protocatechuat |
| 1-50 µl | Rohextrakt |

Gemessen wurde bei 290 nm. Ansätze, die mittels HPLC analysiert wurden, enthielten 1 mM Protocatechuat. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt für Protocatechuat $\epsilon = 3,89 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und für das entstehende Produkt 3-Carboxymuconat $1,59 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Gerechnet wurde daher mit der Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten von $2,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7.6. *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase

Die Enzymaktivität wurde über die NADPH-Abnahme bei 340 nm verfolgt. Verändert nach Teng et al. (1971) enthielt der Ansatz:

| | |
|-----------|---|
| 50 mM | Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7,2 |
| 0,003 mM | FAD |
| 0,045 mM | NADPH |
| 2 mM | <i>p</i> -Hydroxybenzoat |
| 20-100 µl | Rohextrakt |

Der molare Extinktionskoeffizient für NADPH beträgt $\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7.7. Messung des Sauerstoffverbrauchs mit der Sauerstoffelektrode

Die Sauerstoffzehrung toluolinduzierter Zellen des Stammes *P. putida* Idaho BDH2 erfolgte polarographisch mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode (Modell 5300, Yellow Springs Instrument Co., Inc., Ohio, USA). Die Zellen wurden in Mineralmedium mit 5 mM Glucose und 0,02 % Toluol bis zu einer OD₅₄₆ von 1,14 kultiviert und 10 min in einer Sigma-Zentrifuge bei 3000 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach zweimaligem Resuspendieren in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,2 wurde wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 6 ml Puffer resuspendiert. Die OD dieser Zellsuspension betrug 9,3.

Für die Messung des Sauerstoffverbrauchs verschiedener potentieller Substrate wurden 2,7 ml mit Luft gesättigtem Phosphatpuffer vorgelegt, und die Grundatmung der Zellen nach Zugabe von 300 µl Zellsuspension aufgenommen. Es wurde verfolgt, ob nach Zugabe von 60 µl

50 mM Substrat die Sauerstoffzehrung zunahm, was einer Verwertung des Substrates gleichkommt.

2.7.8. Quantifizierung des Proteingehalts im Rohextrakt

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Reagenz wurde abweichend von der Vorschrift nur mit 0,008 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G 250 (Fa. Merck, Darmstadt) angesetzt. Die Kalibriergeraden wurden mit Rinderserumalbumin der Konzentrationen von 0-125 mg/l Protein erstellt. Zu 1 ml Reagenz wurden 100 µl Proteinlösung pipettiert und nach 15 min die Extinktion bei 595 nm gemessen.

2.8. Festphasenextraktion

Zur Bestimmung von Metaboliten, die während des Umsatzes bzw. Wachstums von *P. putida* Idaho BDH2 mit Toluol entstehen, wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen, wie unter 2.4. beschrieben, in einem Flüssigkeitsvolumen von zweimal 200 ml mit Toluol als C-Quelle kultiviert. Parallel wurde der gleiche Ansatz mit Zellen, die nur Glucose als C-Quelle bekamen, durchgeführt. Zu Beginn der exponentiellen Phase wurde die Kultur abzentrifugiert (15000 x g) und der Überstand durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell) filtriert. Durch das Filtrat wurde Luft geleitet, um das noch vorhandene Toluol aus der Lösung zu eliminieren. Anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 3 eingestellt, damit die zu analysierenden Metabolite protoniert vorliegen. Andernfalls würden sie nicht von der Säule zurückgehalten werden. Als Säule wurde eine ISOLUTE ENV⁺-Säule (25 mg / ml, Separtis) mit hochvernetztem, hydroxylierten Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer als Trägermaterial verwendet.

Zum Äquilibrieren der Säule wurde zweimal 1 ml Methanol aufgegeben, bis zum oberen Füllstand des Trägermaterials durchgesaugt, anschließend mit H₂O, das mit HCl auf pH 3 titriert wurde, (3 Volumina der Säule) nachgespült. Nach dem Durchsaugen des Kulturüberstandes wurde mit 1 ml 50 mM Phosphatpuffer und dreimal mit jeweils 1 ml Methanol eluiert. Die fraktionierten Eluate wurden per HPLC analysiert.

2.9. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Trennung der Metabolite erfolgte mittels Reversed-Phase Chromatographie mit einer Grom-Sil C8-Säule (125 mm x 4,6 mm Fa. Grom, Herrenberg) und einer Vorsäule (20 mm x 4 mm, Fa. Grom). Als Anlage diente folgendes System:

| | |
|----------------------------|---|
| Pumpen A und B: | 510 (Fa. Waters, Eschborn) |
| Detektor: | Photodiode Array Detector 996 (Fa. Waters) |
| Handinjektionsventil: | 7125 (Fa. Rheodyne, Rhonert Park, CA, USA) |
| Automatischer Probengeber: | 717 plus (Fa. Waters) |
| Software: | Millenium Software Version 3.05.01 (Fa. Waters) |

Die Fließmittel wurden vor Gebrauch durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm (Fa. Millipore, Eschborn) filtriert und entgast. Zur Analyse wurde ein Gradient aus zwei Fließmitteln (Fließmittel A: 0,425 % H₃PO₄; Fließmittel B: 100 % Methanol, ohne H₃PO₄) gefahren:

| | |
|------------------|----------------|
| 0 – 3,30 min | 15 % A, 85 % B |
| 3,31 – 5,00 min | 30 % A, 70 % B |
| 5,01 – 16,00 min | 50 % A, 50 % B |
| 16,01 – 22 min | 15 % A, 85 % B |

Die Fließmittelzusammensetzung bezieht sich jeweils auf den Beginn des Zeitintervalls. Die Flußrate lag bei 1 ml/min, es wurden 10 µl injiziert und bei 210 und 260 nm gemessen.

Für die zu untersuchenden Verbindungen ergaben sich mit dieser Methode die in Tab 2.4. aufgelisteten Retentionsvolumina. Tabelle 2.4 enthält alle Metabolite, die jeweils mit dieser Methode gemessen wurden. Gleiche oder ähnliche Retentionsvolumina verschiedener Verbindungen waren nicht störend, da es aufgrund unterschiedlicher Abbauwege für Toluol nicht zu erwarten war, dass betreffende Metabolite in der gleichen Probe vorhanden waren. Aufgrund des Ergebnisses der Festphasenextraktion (s. Ergebnisteil) wurde auf eine bessere Auftrennung aller hier aufgeführten Metabolite verzichtet.

Tab. 2.4: Retentionsvolumina der zu analysierenden Metabolite:

| Metabolit | Retentionsvolumen [ml] |
|---|------------------------|
| Benzoessäure- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol | 2,3 |
| Brenzcatechin | 4,0 |
| Protocatechusäure | 4,4 |
| Muconsäure | 5,3 |
| Phenol | 7,8 |
| <i>p</i> -Hydroxy-Benzoessäure | 8,3 |
| Benzylalkohol | 8,6 |
| 4-Methylbrenzcatechin | 8,6 |
| <i>p</i> -Hydroxy-Benzaldehyd | 8,7 |
| 3-Methylbrenzcatechin | 9,3 |
| Benzaldehyd | 11,3 |
| <i>m</i> -Kresol | 11,4 |
| <i>o</i> -Kresol | 11,4 |
| <i>p</i> -Kresol | 11,9 |
| Benzoessäure | 11,9 |
| Salicylsäure | 12,4 |
| Benzol | 13,6 |
| Toluol | 17,0 |

2.10. DNA-Präparationen

Die genomische DNA von *P. putida* Idaho wurde nach Ausubel et al. (1987) isoliert. Die Bakterienstämme wurden in 4 ml LB-Medium bei 30 °C angezchtet. Von der ausgewachsenen Kultur wurden 1,5 ml 2 min in einer Tischzentrifuge (Modell 5417C, Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 567 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert, mit 30 µl 10 % SDS versetzt und nach Zugabe von 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) gemischt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Zelllyse wurden 100 µl einer 5 M NaCl-Lösung zugegeben, und der Ansatz gemischt, dann 80 µl einer CTAB/NaCl -Lösung [5 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl] zugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 65 °C. Zur Trennung der DNA von den ausgefällten CTAB-Zellbestandteilen und Proteinen wurde einmal mit 750 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches [24:1 (v/v)] und einmal mit 500 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches [25:24:1 (v/v/v)] extrahiert. Die Phasen wurden jeweils durch 5 min Zentrifugation bei 14000 Upm getrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäßes überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von Isopropanol (0,6-faches Volumen des Überstandes) und leichtem Schütteln aus der Lösung gefällt. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 14000 Upm) wurde das DNA-Präzipitat mit 70 % igem Ethanol gewaschen

und durch 3 min Zentrifugation in einer Vakuumkonzentrierzentrifuge (Con-1000, Fa. Fröbel) getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 100 µl TE 10.1-Puffer gelöst. Anschließend wurde eine RNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden zu der DNA-Präparation 0,5 U RNaseA (Fa. Roche) gegeben und der Ansatz 10 min bei 37 °C inkubiert. Die RNase wurde vorher gekocht, um DNasen zu entfernen. Zur Reinigung wurde eine DNA-Fällung (Kap. 2.10.4.2.) durchgeführt. Die isolierte DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Für einige PCR-Reaktionen wurde aufgrund der schnellen Durchführung die „GeneReleaser“-Lösung der Firma Bioventures Inc. (Murfreesboro, TN, USA) verwendet. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte mit 8 µl der GeneReleaser-Lösung gemischt und es folgte die DNA-Isolierung nach Herstellervorschrift.

Alternativ wurden Bakterienkolonien auch 5 min in 30 µl H₂O aufgeköcht und 2 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde als PCR-Template eingesetzt.

Plasmide wurden mit Hilfe des „Flexiprep-Kits“ der Firma Amersham-Pharmacia Biotech nach Herstellervorschrift aus den *E. coli* Zellen isoliert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.11. Quantifizierung von DNA und Größenbestimmung von linearisierter DNA

Die Mengen- und Größenabschätzung der isolierten DNA erfolgte durch Vergleich mit einem definierten Längenstandard. Zu diesem Zweck wurden 50 µg DNA des Phagen λ mit 100 U *EcoRI* und 100 U *HindIII* 6 h bei 37 °C in einem Volumen von 250 µl verdaut. Der Ansatz wurde mit 200 µl H₂O und 50 µl 10 x konzentriertem Auftragspuffer (0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 50 ml Glycerin, 50 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0) gemischt. Von diesem Standard wurden jeweils 10 µl für die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Diese Menge entspricht 1 µg DNA.

Es wurde außerdem der „GeneRulerTM DNA Ladder Mix“ und der 100-bp-Ladder-Längenstandard der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt.

2.12. Gelelektrophorese

Zur Konzentrations- bzw. Größenbestimmung von DNA wurde diese auf ein 1-% (w/v) Agarosegel bzw. kleine Fragmente (≤ 500 bp) auf ein 2,5-%-NuSieve-Agarosegel aufgetragen. Die Gele wurden durch Aufkochen von Agarose in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 0,114 % (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA) pH 7,8, hergestellt. Vor dem Gießen wurde der Lösung 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugegeben, um die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit 1/10 Volumen Auftragspuffer (10 x) versetzt. Als Elektrophoresekammern dienten Geräte der Firmen Bio-Rad und Biometra. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm in 1 x TAE-Puffer. Die Banden wurden unter UV-Licht (302 nm) betrachtet. Es wurde das Geldokumentationssystem KS-3000 (ULTRA•LUM, Inc., Carson, Kalifornien, USA) verwendet.

Die Elution von DNA-Banden definierter Größe aus einem Agarosegel erfolgte mittels des „EasyPure Kits“ der Firma Biozym (Oldendorf).

2.13. DNA-Fällung

Die zu reinigende DNA wurde mit 10 % (v/v) einer 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 gefällt und im 2-3fachen Volumen eiskaltem, absoluten Ethanol aufgenommen. Der Ansatz wurde 20 min bei -70 °C inkubiert. Die DNA wurde 15 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (14000 Upm) und das Pellet mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet nach einer weiteren, 5minütigen Zentrifugation wurde in einer Vakuumkonzentrierzentrifuge (Con-1000, Fa. Fröbel) getrocknet und in H_2O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst.

2.14. Enzymatische Behandlung von DNA

2.14.1. Verdau mit Restriktionsenzymen

Das Schneiden von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firmen MBI Fermentas, NEB oder Gibco Life Technologies. Die DNA (20-500 ng) wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease (2-5 U) in einem Gesamtvolumen von 10-15 μl 1 h der für die Restriktionsendonuklease geeigneten Temperatur inkubiert. Es wurde der vom Hersteller empfohlene

Puffer eingesetzt. Bei Verdau mit zwei Enzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme Aktivität zeigen. War kein für beide Enzyme geeigneter Puffer verfügbar, wurde der Verdau sequentiell durchgeführt, wobei die DNA zwischendurch mit dem EasyPure Kit (Kap. 2.12.) aufgereinigt wurde.

Für die Herstellung von Genbanken wurden 2-5 µg DNA eingesetzt. Entsprechend wurden für diese Menge 10 U der Restriktionsendonuklease eingesetzt.

2.14.2. Behandlung mit Klenow-Fragment

Bei der Klonierung des eine Deletion tragenden und zusätzlich durch eine Insertion inaktivierten *benD*-Gens in pSUP301 (Konstruktion von pBENAG44) wurden in Vektor und Insert keine übereinstimmenden Restriktionsschnittstellen gefunden. Daher wurde im Fall des Inserts eine Behandlung mit Klenow-Enzym (large Fragment) durchgeführt, um für eine Ligation mit einem *HincII*-geschnittenen Ende des Vektors „blunt-ends“ zu erzeugen. Das mit *SacI* geschnittene Insert wurde mit den entsprechenden Triphosphatnukleotiden und Klenow-Fragment (1 U) 10 min bei 37 °C inkubiert. An das 3'-Ende wurden Nukleotide angehängt, wobei das überstehende 5'-Ende als Matrize diente. Das Klenow-Fragment wurde anschließend bei 75 °C (10 min) inaktiviert und die modifizierte DNA über ein Agarosegel gereinigt. Auf eine Phosphorylierung mit der T4-Polynukleotidkinase konnte verzichtet werden, da der geschnittene Vektor pSUP301 phosphoryliert vorlag.

2.14.3. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Die Religation eines mit einer Restriktionsendonuklease geschnittenem Vektors, in den DNA kloniert werden sollte, wurde verhindert, indem er einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP, Fa. Roche) unterzogen wurde. Nach dem Verdau mit einem Restriktionsenzym wurde der Ansatz mit der Phosphatase in deren spezifischen mitgelieferten Puffer 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde entweder 15 min bei 65 °C inaktiviert oder durch eine dem 37 °C-Schritt folgende Gelelektrophorese von der DNA abgetrennt.

2.14.4. Behandlung mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation eines DNA-Fragments in den Vektor erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas). Die geschnittene DNA (Vektor und zu inserierendes DNA-Fragment) wurde mit 0,5-1 U Ligase und dem mitgelieferten Puffer versehen und 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei blunt-end-Ligationen wurde außerdem die mitgelieferte PEG4000-Lösung (Polyethylenglycol) eingesetzt.

2.14.5. Herstellung eines T-Vektors

Für die Ligation von PCR-Produkten mit der *Taq*-Polymerase wurde ein T-Vektor nach der Vorschrift von Marchuk et al. (1991) hergestellt. T-Vektoren besitzen einen überstehenden Thymidinrest an den 3'-Enden.

Ein pBluescript-Vektor wurde mit *EcoRV* geschnitten, so dass ein blunt-end-Schnitt vorlag. Der Vektor wurde über ein Agarosegel aufgereinigt, wobei gleichzeitig eine Mengenabschätzung stattfinden konnte. Die aus dem Gel isolierte und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) aufgenommene DNA wurde in einem Reaktionsansatz, der außerdem aus 1 x Reaktionspuffer, 2 mM dTTP und 2 U *Taq*-Polymerase bestand, 2 h bei 72 °C inkubiert. Enthielt der Reaktionspuffer kein Magnesium, wurde eine MgCl₂-Lösung (1,5 mM Endkonzentration) zugegeben. Der T-Vektor wurde über eine Gelelektrophorese und anschließende Gelelution aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

2.15. Herstellung und Einbau eines Linkers mit einer zusätzlichen Schnittstelle in pBENAG21

Die Inaktivierung von *benD* sollte zunächst analog zu der Inaktivierung von *xylL* erfolgen. Das Gen *xylL* wurde mittels einer Deletion von 525 Basen ausgeschaltet, und das die Deletion tragende Fragment wurde durch Ausschneiden aus pXYLAG21 mit *PstI* und *XbaI* in den entsprechend geschnittenen Vektor pLO3 kloniert. So entstand pXYLAG22.

Die Klonierung des analogen Fragments mit dem deletierten *benD* erwies sich als schwieriger, da dieses als *PstI/DraII*-Fragment in pBluescript vorlag (pBENAG21). Da pLO3 keine *DraII*-Schnittstelle in der „multiple cloning site“ besitzt und es auch keine andere Restriktionendonuklease gab, die für die Klonierung geeignet gewesen wäre, wurde in das *DraII*-geschnittene Plasmid pBENAG21 ein Linker mit eingebaut, der mit einer *XbaI*-Schnittstelle versehen war.

Der Linker wurde so konstruiert, dass überhängende Enden vorhanden waren, die der *DraII*-Schnittstelle entsprachen. Zur Herstellung des Linkers wurden die zwei Oligonukleotide Linker-top (5'-Phosphat-GGCAAGAGCTGCTCTAGATAATCC-3') und Linker-bot (5'-Phosphat-GGCGGATTATCTAGACGAGCTCTT-3') bestellt und diese durch Inkubation bei folgender Temperaturabfolge miteinander verbunden, so dass ein Doppelstrang von 21 Basen mit überhängenden Enden von 3 Basen entstand:

5 min → 95°C;
2 min → 90°C, Wiederholung dieses Schrittes mit jeweils um 5°C erniedrigter Temperatur
Endtemperatur 20°C

Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 10 µl: 1 µl Linker-top; 1 µl Linker-bot und 8 µl annealing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂).

Der entstandene Linker sah folgendermaßen aus:

5'-Phosphat-GGCAAGAGCTGCTCTAGATAATCC-3'
3'-TTCTCGAGCAGATCTATTAGGCGG-Phosphat-5'
XbaI

Das Plasmid pBENAG21 wurde mit *DraII* geschnitten und dephosphoryliert. Der frisch synthetisierte Linker wurde in das geschnittene Plasmid ligiert und das Ligationsgemisch in *E. coli* DH5α transformiert. Es wurden Plasmide isoliert, die nun eine *XbaI*-Schnittstelle enthielten. Aus diesen Plasmiden konnte das 1,2 kb große *PstI/XbaI*-Fragment, das die DNA aus *P. putida* Idaho mit einer Deletion in *benD* enthielt, ausgeschnitten und in pLO3 kloniert werden. Dieses Plasmid wurde pBENAG22 genannt und mittels Konjugation in *P. putida* Idaho übertragen.

2.16. Transformation

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA wurde nach Inoue et al. (1990) durchgeführt. Zu einem Ligationsansatz oder zu schon in TE-Puffer vorliegenden Plasmiden (max. 100 ng DNA) wurden 50-100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen pipettiert, gemischt und 15-30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock bei 42 °C (45 sec) durchgeführt. Der Ansatz wurde 2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 200-800 µl SOB-Medium 45-60 min bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Kompetente Zellen für die Transformation wurden nach Inoue et al. (1990) hergestellt. Auf einer Agarplatte gewachsene *E. coli*-Zellen DH5α oder S17-1 wurden in 20 ml SOB-Medium (2 % (w/v) Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂) übertragen. Diese Kultur diente als Inoculum für einen 100-ml-Ansatz, der bei Raumtemperatur und 200 Upm geschüttelt wurde. Als die OD₆₀₀ bei 0,7 lag, wurde der Kolben 10 min auf Eis in-

kubiert und die Zellen anschließend bei 4 °C, 3000 x g und 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eisgekühltem Transformationspuffer (= TB-Puffer, 10 mM Hepes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, vor der Zugabe von MnCl₂ wurde der pH-Wert mit HCl auf 6,7 eingestellt) resuspendiert. Wieder wurde 10 min auf Eis inkubiert und erneut wie im ersten Schritt zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und es wurden langsam unter leichtem Schwenken 1,4 ml DMSO zugetropft, bis eine Endkonzentration von 7 % (v/v) erreicht war. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in 200-µl-Fractionen in Eppendorf-Cups aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.17. Transfer inaktivierter Gene nach *P. putida* durch Konjugation

Zur Herstellung der Stämme *P. putida* Idaho BDH1 bzw. BDH2 wurden die Plasmide, welche die Mutationen in *xylL* bzw. *benD* tragen, in die *Pseudomonas*-Stämme transferiert, welche noch das intakte Gen trugen.

2.17.1. Transfer von pXYLAG22 in *P. putida* Idaho, Selektion von *P. putida* Idaho BDH1-Zellen

Die wachsenden Kulturen von *P. putida* Idaho bzw. *E. coli* S17-1 (pXYLAG22) wurden 15 min bei 4500 Upm (2500 x g) und 4 °C in einer Sigma-Zentrifuge 3K-1 (Osterode) zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml LB-Medium resuspendiert und vorsichtig 1:1 gemischt. 0,5 µl des Gemisches wurde in die Mitte einer dick gegossenen LB-Platte aufgetragen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden am folgenden Tag mit 1,5 ml Phosphatpuffer abgeschwemmt. Es wurde nach *Pseudomonas*-Zellen gescreent, die das Plasmid erhalten haben, indem 100 µl des Konjugationsansatzes (unverdünnt, 1:10 und 1:100 mit Phosphatpuffer verdünnt) auf Mineralmedium-Agarplatten mit 12 µg/ml Tetracyclin ausplattiert wurden. *E. coli*-Zellen werden auf diesem Agar ausselektiert, da sie nicht in der Lage sind, das Vitamin Thiamin herzustellen. *Pseudomonaden*, die das Plasmid nicht erhalten haben, können aufgrund der fehlenden Tetracyclinresistenz nicht überleben. Nach 2 Tagen Bebrütung bei 30 °C wurden auf gleichem Agar Reinigungsausstriche von Einzelkolonien gemacht. Zellen der Reinigungsausstriche wurden in modifiziertem LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl und 10,46 g Morpholinosulfonsäure in 1 l H₂O, pH mit NaOH auf 7

eingestellt) kultiviert und die gewachsene Kultur auf Agarplatten mit modifiziertem LB-Medium und 20 % (w/v) Sucrose ausplattiert. Auf diese Weise sollten Zellen isoliert werden, bei denen ein zweites Crossover stattgefunden hat. Dabei sollte der nach der Konjugation ins Genom integrierte Vektor mitsamt dem intakten *xyLL* wieder aus dem Genom ausgeschnitten worden sein. Die Sucrose dient der „SacB-Selektion“. Für Zellen, die das *sacB*-Gen, also auch den Vektor, noch enthalten, wirkt Sucrose toxisch (Steinmetz et al., 1983; Gay et al., 1985). Die Agarplatten mit der Sucrose wurden 3 Tage bei 30 °C bebrütet. Da die Sucrose-Selektion in *P. putida* Idaho nicht zu funktionieren schien, wurden die gewachsenen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf Agarplatten mit modifiziertem LB-Medium und 20 % Sucrose sowie auf LB-Platten mit 10 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen. Kolonien, die auf der Platte mit Tetracyclin kein Wachstum zeigten, wurden per PCR und Southern Blotting untersucht, ob sie die gewünschte Mutante sind.

2.17.2. Transfer von pBENAG44 in *P. putida* Idaho BDH1, Selektion von *P. putida* Idaho BDH2-Zellen

Da im Gegensatz zu *xyLL*, das lediglich durch eine Deletion inaktiviert wurde, das Gen *benD* zusätzlich zu einer Deletion einen Antibiotikaresistenzmarker trägt, wurde in diesem Fall nicht auf ein Cointegrat selektiert. *Pseudomonas*-Zellen, bei denen nach der Konjugation des Plasmids mit dem inaktivierten *benD* (pBENAG44) eine Streptomycinresistenz festgestellt werden konnte, trugen das inaktivierte *benD*-Gen. Diese Zellen mussten nur noch darauf untersucht werden, ob sie kanamycinsensitiv sind und damit das übertragene Plasmid, das nach einem doppelten Crossover das intakte Gen trägt, nicht mehr trugen.

Die Konjugation von pBENAG44 in *P. putida* Idaho BDH1 erfolgte wie im Fall von pXYLAG22 in den Wildtyp von *P. putida* Idaho. Die Selektion nach Zellen, die das Plasmid erhalten hatten, erfolgte auf Mineralmedium-Agarplatten mit 50 µg/ml Streptomycin in den Verdünnungen 10^0 bis 10^{-3} . Es wurden 200 µl ausplattiert. Von den gewachsenen Kolonien der 10^{-3} -Verdünnung wurden einige gepickt und auf LB-Agar mit Streptomycin bzw. Streptomycin und Kanamycin ausgestrichen. In Zellen, die keine Kanamycinresistenz zeigten, hatte ein Crossover stromauf- und stromabwärts des eine Deletion und die Streptomycinresistenz tragenden *benD*-Genes stattgefunden.

2.18. Markierung und Detektion von DNA durch Hybridisierung

Die Markierung von DNA mit Digoxigenin erfolgte mit Hilfe des „DIG DNA Labeling Kits“ der Firma Roche nach der „Random primed labeling“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). Es wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Die Sonde wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Übertragung von DNA aus Agarosegelen („Southern Blotting“) wurden über eine Agarosegelelektrophorese getrennte DNA-Fragmente zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Dies ermöglicht später eine Größenzuordnung hybridisierter Fragmente. Das Gel wurde vor dem Southern Blotting zweimal 15 min in 0,25 M HCl und nach kurzem Spülen mit H_2O zweimal 15 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) vorbehandelt. Die auf die Größe des Gels zugeschnittene Nylonmembran (Biodyne Plus, Fa. Pall, Dreieich, oder Porablot, Fa. Macherey-Nagel, Düren) wurde vor der DNA-Übertragung jeweils 5 min in H_2O und der Denaturierungslösung inkubiert. Das Gel wurde auf eine Glasplatte gelegt und die Membran luftblasenfrei darauf gelegt. Auf die Membran wurden 15 Lagen Filterpapier (3MM-Papier, Fa. Whatman, Kent, England) und Papiertücher geschichtet. Der Transferaufbau wurde mit einer weiteren Glasplatte abgedeckt und mit etwa 100 g Gewicht beschwert. Nach 0,5-2 h wurde die Membran mit den markierten Geltaschen kurz zweimal in SSC-Puffer (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7) gewaschen und anschließend auf Filterpapier luftgetrocknet. Zur Fixierung der DNA wurde die Membran ca. 5 min unter UV-Licht gelegt und zusätzlich 30 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Wurde nicht sofort weitergearbeitet, wurde die Nylonmembran bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Mit DNA-Präparationen wurden zum Teil „Dot blots“ durchgeführt. 50-100 ng Plasmid-DNA wurden in maximal 10 μl H_2O durch 10 min Inkubation in kochendem Wasser denaturiert. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis wurden verschiedene Mengen der Lösung auf eine vorher markierte Fläche der Membran aufgetropft. Die Auftragung erfolgte in 2 μl -Aliquots, die vor dem nächsten Auftropfen getrocknet wurden. Die Membran wurde 30 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebacken.

Für die Übertragung von DNA aus Bakterienkolonien („Koloniehybridisierung“) wurde auf eine Agarplatte mit über Nacht gewachsenen Kolonien ein zurechtgeschnittenes Stück Nylonmembran gelegt und die Orientierung für die spätere Zuordnung von Kolonien markiert.

Nach 1 min wurde die Membran und die daran haftenden Koloniereste zweimal 5 min in Denaturierungslösung und zweimal in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5) inkubiert. Die noch anhaftenden Zellreste wurden mit Filterpapier abgepresst. Die Membran wurde 2 min in 50 mM NaCl gewaschen, wieder mit Filterpapier abgepresst und luftgetrocknet. Die Fixierung der DNA erfolgte unter UV-Licht und anschließendem Backen.

Die Hybridisierung von DNA mit DIG-markierten Sonden erfolgte nach der Vorschrift des „DIG Nucleic Acid Detection Kit“ der Fa. Roche. Die Membranen mit der fixierten DNA wurden 1-2 h bei 68 °C in einem Polyethylenbeutel mit Hybridisierungspuffer (5 x SSC (0,75 M NaCl, 75 mM Na-Citrat, pH 7), 1 % (w/v) „Blocking“-Reagenz der Fa. Roche, 0,1 % (w/v) Lauroylsarcosinat, 0,02 % (w/v) SDS) prähybridisiert. Vor Hybridisierung mit der markierten Sonde wurde diese 10 min in einem kochendem Wasserbad denaturiert und sofort auf Eis gestellt und in Hybridisierungspuffer überführt. Nach dem Prähybridisieren wurde der Hybridisierungspuffer gegen die Sonde im Puffer ausgetauscht. Es wurde über Nacht bei 68 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Sonde abgegossen und die Membran von nicht gebundener Sonde durch zweimaliges Inkubieren für 5 min in 2 x SSC-Puffer (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7) plus 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur und zweimaliges Inkubieren bei 68 °C in 0,1 x SSC-Puffer (15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat, pH 7) plus 0,1 % (w/v) SDS gereinigt.

Der immunologische Nachweis DIG-markierter Sonden wurde mit dem „DIG Nucleic Acid Detection Kit“ der Fa. Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Positive Farbsignale auf der Membran wurden durch Fotokopien oder Einscannen der Membran dokumentiert.

2.19. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Technik der PCR wurde für die Herstellung von DNA-Sonden, zur Verifizierung nach genetischen Manipulationen und für die Sequenzierung von DNA eingesetzt. Primer für die PCR wurden bei den Firmen MWG Biotech AG, Ebersberg und Life Technologies, Karlsruhe synthetisiert.

Die Reaktionen wurden in den Thermocyclern PTC-100TM (Fa. MJ Research Inc., Watertown, Ma, USA) und TGradient (Fa. Whatman Biometra, England) durchgeführt. Es wurde die *Taq*-Polymerase der Fa. Gibco BRL (Eggenstein) bzw. der Fa. Eppendorf (Hamburg) oder die Vent-Polymerase der Fa. New England Biolabs (Schwalbach, Taunus) mit den mitgelieferten

Puffern eingesetzt. Abgesehen von den Sequenzierungsreaktion erfolgte die Reinigung der PCR-Produkte über ein Agarosegel.

Der PCR-Standardansatz sah folgendermaßen aus:

| | |
|-------------------|-----------|
| Primer 1: | 25 pmol |
| Primer 2: | 25 pmol |
| dNTPs: | je 0,1 mM |
| Template-DNA : | 10 ng |
| DNA-Polymerase: | 0,5 U |
| DMSO: | 0-6 % |
| Reaktionspuffer | |
| H ₂ O: | ad. 25 µl |

Der mit der Polymerase mitgelieferte Reaktionspuffer wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Je nach Hersteller musste zudem noch mitgeliefertes Mg²⁺ zugesetzt werden. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

| | |
|--|---|
| 3 min | 95°C |
| 45 sec | 95°C |
| 30 sec | ca. 5°C unter der annealing-Temperatur der Primer |
| 30 sec – 1 min | 72°C, |
| 25 x Wiederholung der letzten drei Zyklen, | |
| 5 min | 72°C |
| Stop | 4°C. |

In Tabelle 2.5 sind die Oligonukleotide aufgelistet, die für die Gewinnung von Sonden zur Klonierung der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase, zur Herstellung der Deletion in *benD* (pBENAG43) und für Kontrollexperimente bezüglich der Inaktivierung der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase entworfen wurden. Primer des Clusters mit *xyII* wurden anhand der Sequenz des *meta*-Operons aus *P. putida* Idaho mt-2 (M64747, Harayama et al., 1991; Neidle et al., 1992) entworfen, Primer des Clusters mit *benD* anhand der Sequenz aus *P. putida* PRS 2000 (AF 218267, Cowles et al., 2000). Degenerierte Primer wurden mit Hilfe eines Sequenzvergleiches mit ähnlichen Enzymen und einer Codon-Usage-Tabelle für *Pseudomonas putida* entworfen.

In Tabelle 2.6 sind die Oligonukleotide aufgeführt, die zur Auffindung von Genen führen sollten, die ein Wachstum von Toluol in Stamm *P. putida* Idaho BDH2 erklären könnten.

2.20. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit der Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977) mit Fluoreszenzmarkierung. Als Sequenziergerät diente ein ALF*express* der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Es wurden Sequenzierkits der Firma Amersham Pharmacia Biotech („Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit“ oder „Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Kit“) für die Reaktionen mit markierten Didesoxynukleotiden und Kits der Firmen Amersham Pharmacia Biotech und MBI Fermentas („Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ bzw. „CycleReader Auto DNA Sequencing Kit“) für die Reaktionen mit Cy5-markierten Primern verwendet. Die Sequenzierreaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für das Sequenziergel wurde die Fertiglösung „ReproGel Long Read“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech eingesetzt. Die Gele besaßen eine Dicke von 0,3 mm. Die Elektrophorese wurde nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt und die automatisch gespeicherten Daten mit der ALFwin Sequence Analyser Software Version 2.10 ausgewertet.

Zur DNA-Sequenzierung der beiden Gencluster wurden Subklone von pXYLAG1, 2, 3, 4 und 5 sowie pBENAG1, 2 und 3 hergestellt. Die in pBluescript klonierte DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, für die Schnittstellen in der „multiple cloning site“ des Vektors vorhanden waren. Die erhaltenen Fragmente wurden wiederum in den entsprechend verdauten pBluescript-Vektor ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert. Aus den so erhaltenen Subklonen wurden die Plasmide isoliert und mit Hilfe der Cy5-markierten Primer T3 und T7, deren Bindestelle auf dem pBluescript-Vektor liegt, sequenziert. DNA-Regionen, die trotz Subklonierung nicht vollständig und doppelsträngig zu erfassen waren, wurden mit spezifisch für die betreffende Region hergestellten Primern sequenziert. In Tabelle 2.7 sind die für die Sequenzierung benötigten Primer aufgelistet.

2.21. Computerprogramme

Datenbankvergleiche sequenzierter DNA wurden mit BLASTN bzw. BLASTX (Altschul et al., 1990) im Internet durchgeführt. Die Auswertung der DNA-Sequenzierungen erfolgte mit dem Programmpaket DNASTar (Fa. Lasergene) zur Erstellung der Gesamtsequenz der beiden Gencluster; Vergleiche von Protein- bzw Nukleotidsequenzen untereinander wurden mit CLUSTALW durchgeführt. Dendrogramme wurden mit dem von Felsenstein (1993)

Tab 2.5: Oligonukleotide für Sonden, Kontrollen, Klonierungen und Herstellung einer Deletion in der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol- Dehydrogenasen und ihrer Cluster

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenz 5' → 3' | Position* und Zielgen | Beschreibung / Zweck |
|---|---------------------------------|------------------------------|---|
| Primer für eine Sonde für <i>xyiL</i> und <i>benD</i> : | | | |
| dhf11 | GTK GGY GGY RCM ATY TGG | 268-285 (<i>xyiL</i>) bzw. | entsprechend <i>xyiL</i> aus pWW0 entworfen |
| dhf12 | GTT GGC GGC ACC ATT TGG | 253-270 (<i>benD</i>) | |
| dhr11 | TGC TCG TCR ATR CTK CCR TA | 670-689 (<i>xyiL</i>) bzw. | entsprechend <i>xyiL</i> aus pWW0 entworfen |
| dhr12 | TGC TCG TCA ATG CTT CCG TA | 646-674 (<i>benD</i>) | |
| Primer für Sonden oder Kontrolllexperimente für Genabschnitte aus dem Cluster mit <i>xyiL</i> : | | | |
| dhf21 | TTT CC(AGT) RCC CTM TGG TGC TG | 346-365 (<i>xyiL</i>) | mit den Primern dhr11 bzw. dhr12 Sonde für <i>xyiL</i> |
| dhf22 | TTT CCT ACC CTA TGG TGC TG | | |
| Endexyl-3' | CCG ATG CCA TGG TCT ACA ACA | 248-268 (<i>xyiJ</i>) | Sonde zur Auffindung und Klonierung von DNA der Gene <i>xyiGFJQK</i> (pXYLAG5) |
| Endexyl-5' | GCC TGG GCC TAT GAT CGC TAC TTT | 16-39 (<i>xyiQ</i>) | |
| dhfdel | ATA CAT GAG CTG GCC GAC GAA C | 127-148 (<i>xyiL</i>) | Sonde für den deletierten Bereich in <i>xyiL</i> |
| dhrdel | CTC ACT CGG CTC GGC GCT | 589-606 (<i>xyiL</i>) | |
| dhf1 | ATG AAC AAA CGT TTC CAG GA | 1-20 (<i>xyiL</i>) | mit Primer dhr12 Kontrolllexperiment bezüglich der Deletion in <i>xyiL</i> |
| Primer für Sonden oder PCR-Experimente für Genabschnitte aus dem Cluster mit <i>benD</i> : | | | |
| benD-del for | CAT CGG CCG GGG CGT GTG CT | 54-73 (<i>benD</i>) | Kontrolllexperiment bezüglich der Deletion in <i>benD</i> (Stamm <i>P. putida</i> Idaho BDH2) |
| benD-del rev | CGC TTT TCC TGC TCG GTC TGC TCT | 579-602 (<i>benD</i>) | |
| benA-5' | CAC GCC TGT TCG ACC TGG AGA TG | 92-114 (<i>benA</i>) | Sonde zur Auffindung und Klonierung von DNA der Gene <i>benABCDK</i> , <i>catA</i> und <i>benE</i> |
| benA-3' | TGG CCG TGG TCG AAG GAA TAG AAA | 765-788 (<i>benA</i>) | |
| benR-for | GAC CCG GCT GCT GGA CTC G | | Experiment zur Auffindung von <i>benR</i> , PCR-Produkt in <i>P. putida</i> PRS2000 516 bp |
| benR-rev | GGA AAA CCG GCC TAA ATG AAA GAA | | |
| 2. <i>xyiLf</i> | AGT GAT CGC GCA GCC TTT CC | -76(-57) (<i>benD</i>) | mit Primer delback_r Sonde zur Kontrolle des inaktivierten <i>benD</i> in <i>P. putida</i> Idaho BDH2 |

Fortsetzung von Tabelle 2.5 auf folgender Seite

Fortsetzung von Tab. 2.5:

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenz 5' → 3' | Position und Zielgen | Beschreibung / Zweck |
|--|--|---------------------------------------|---|
| delfront_f | CTG CAG AAG GAC GGC GAA GTC AGC TTC CTG | 478-507 (<i>benC</i>) | Herstellung einer Deletion von 280 Basen in <i>benD</i> |
| delfront_r | CGC CGC GGG TAG CGA TGG ACG AGA CAT TGA CGA GTC TAC CGC CAC CAC T | 99-114 und 395-427 (<i>benD</i>) | |
| delback_f | GAA GGC GCG CAA GTG GTG GCG GTA GAC TCG TCA ATG TCT CGT CCA TCG | 88-114 und 395-415 (<i>benD</i>) | |
| delback_r | AAG ATG CCG ACA CCT GCC GAC AGC ATG | 474-500 (<i>benK</i>) | |
| delfront-pst | ATA ACT GCA GAA GGA CGG CGA AGT C | s. delfront_f | Primer delfront_f bzw. delback_r mit Schnittstellen zur Klonierung versehen |
| delback-sac | TTA CGA GCT CAA GAT GCC GAC ACC T | s. delback_r | |
| Abgeleitete Primer aus Vektoren-DNA zur Kontrolle eines Einzel- oder Doppelcrossovers: | | | |
| sacBf | ACC TTT ACT ACC GCA CTG CTG GC | <i>sacB</i> aus pLO3 | Sonde zur Detektion von <i>sacB</i> aus pLO3 in <i>P. putida</i> Idaho BDH1 (703 bp) |
| sacBr | GGA TCT CTC AGC GTA TGG TTG TCG | | |
| Km ^R -for | GAG GCC GCG ATT AAA TTC CAA CAT | Kanamycinresistenz aus pSUP301 | Kontrollexperiment in <i>P. putida</i> Idaho BDH2 zwecks Vorhandensein der Kanamycinre- sistenz aus pSUP301 |
| Km ^R -rev | GAC GAC TGA ATC CGG TGA GAA TGG C | | |

*Position bezieht sich auf die Bindestelle der in dieser Arbeit sequenzierten Gene

Tab. 2.6: Oligonukleotide zur Auffindung von Enzymen, die einen weiteren Abbau von Toluol im Stamm *P. putida* Idaho BDH2 ermöglichen könnten:

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenz 5' → 3' | Herkunft |
|---|---------------------------------|---|
| Test auf eine weitere <i>cis</i> -1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase: | | |
| check-DH-for | GGY MGA CCG TTC YGA DCT RRT HCA | konservierter Bereich von <i>xylL</i> und <i>benD</i> aus <i>P. putida</i> Idaho, <i>xylL</i> aus pWW0, <i>benD</i> aus <i>P. putida</i> PRS2000 und <i>benD</i> aus <i>Acinetobacter sp.</i> ADP1 (Neidle et al., 1992), erwartetes Produkt ca. 650 bp |
| check-DH-rev | CCS WGR TCK CCB CCH SCY ACC GG | |
| Test auf eine Monooxygenase, die den Umsatz von Toluol zu <i>p</i> -Kresol katalysiert: | | |
| tmoA-degen-for | GGC SAT GCA YCC VCG YAA RGA CT | aus der Sequenz von <i>P. mendocina</i> KR1 (Yen et al., 1991) abgeleitet, erwartetes Produkt 629 bp |
| tmoA-degen-rev | CRG CSG CCA AVC CMA GRA ACT G | |
| tmoE-degen-for | CCA CCT GGC CGA RAT GMG MAA GAA | aus der Sequenz von <i>P. mendocina</i> KR1 (Yen et al., 1991) abgeleitet, erwartetes Produkt 344 bp |
| tmoE-degen-rev | GYT AGC GCA YCG GSG AYT AYC AGC | |
| xamoA-for | TSC GCG CCA AGG CCT AYG ARA AGC | aus der Sequenz von <i>Xanthobacter sp.</i> Py2 (Zhou et al., 1998) abgeleitet, erwartetes Produkt 784 bp |
| xamoA-rev | CGC CAG AAC CAG GTG CCG ATS TG | |
| Test auf Enzyme, die auf den Weg einer Dioxygenierung von Toluol hindeuten würden: | | |
| tod-C1-for | ATC GAT CCG CGC ATT TAT ACC G | Monooxygenase aus <i>P. putida</i> F1 (Zylstra und Gibson, 1989), erwartetes Produkt 1757 bp |
| tod-C2-rev | TTC GTA CTC CCC TTC TGC CTC TGC | |
| tod-A-rev | TGA AAG ATC TGC CAG CCG TGC | Monooxygenase aus <i>P. putida</i> F1 (Zylstra und Gibson, 1989), erwartetes Produkt 1463 bp |
| tod-B-for | GAG ATG CAG CGC TAC GAA GGC | |
| todD-for | CTT GGT GAC AGG CGG TGG CG | Toluol-2,3-dihydrodiol-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> F1 (Zylstra und Gibson, 1989), erwartetes Produkt 763 bp |
| todD-rev | GAA CAA GCC ACG CAC GCC CA | |
| 2,3-DHdegen-for | RAR GCS TTY GAS GAR RTG TTY | 2,3-Dihydrodiol-Dehydrogenasen aus <i>P. putida</i> F1 (Zylstra und Gibson, 1989), <i>P. fluorescens</i> IP01 (Aoki et al., 1996), <i>Ralstonia sp.</i> JS705 (van der Meer et al., 1998); <i>N. aromaticivorum</i> F199, pNL1 (Romine et al., 1998). |
| 2,3 DH-for | RTS AAY GTB AAG GGB TAY WTY | |
| 2,3 DH-rev | SAG RCC SAB SAC SGC RTG YTT | |

Tab. 2.7: Oligonukleotide für die Sequenzierung von DNA

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenz 5'→3' | Position/Herkunft |
|--|---------------------------------|--|
| T3 (Cy5-markiert) | CGC GCA ATT AAC CCT CAC TAA AG | Primer für die Sequenzierung aus pBluescript |
| T7 (Cy5-markiert) | GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AG | |
| spezifische Primer für den Cluster mit <i>xylL</i> : | | |
| <i>xylY</i> -for | GCT CGA ACA GTC CGG CGG CT | 291-310 (<i>xylY</i>) |
| <i>xylY</i> -rev | AGC CGC CGG ACT GTT CGA GC | 291-310 (<i>xylY</i>) |
| <i>xylZ</i> -for | CCC AAC TTC AGC TAC ACC GCC | 790-810 (<i>xylZ</i>) |
| <i>xylZ</i> -rev | AAG TGG GGA ATG CGC GCG G | 779-797 (<i>xylZ</i>) |
| <i>xylL</i> -inv | ACC TCG GTT GTG TAG CCC AGA T | -27-(-6) (<i>xylL</i>) |
| <i>xylLT</i> -inter-for | TTT TCG GGG GGG TTA TGC C | -78-(-59) (<i>xylT</i>) |
| <i>xylE</i> -rev | CTG CGG GTA GCT GCT CAA | 264-282 (<i>xylE</i>) |
| <i>xylE</i> -for | GAA AAT GGC ACG CGC GTC G | 537-555 (<i>xylE</i>) |
| <i>xylE</i> -down2 | ATT ACA ACT ACC CGG ACC AC | 802-821 (<i>xylE</i>) |
| <i>xylG</i> -for | TCA AGC CAT CCG AGG AAA CCC C | 520-541 (<i>xylG</i>) |
| <i>xylG</i> -rev | TTT TCA CGG GGC TTA TGG CTG | 983-1003 (<i>xylG</i>) |
| <i>xylF</i> -up | GAT CAG CAG GAC CGG GAA | 88-105 (<i>xylF</i>) |
| <i>xylJ</i> -up | GCA CGT CGG CAT TGG TCA | 365-382 (<i>xylJ</i>) |
| spezifische Primer für den Cluster mit <i>benD</i> : | | |
| BenA-up | TTC TTC TCG GGG ATC TGG CTT TCG | 92-114 (<i>benA</i>) |
| BenA-down | CCT GTG CCT GTA CCC CAA CGT G | 909-931 (<i>benA</i>) |
| BenB-up | ACC TTC TTG GCC TTG ATC A | 416-434 (<i>benB</i>) |
| BenC-down | CGC ACT GAA TTT CGA AGA CG | 15-29 (<i>benC</i>) |
| BenC-up | TGG ATC GGC CGC AGG TAG AAG C | 600-620 (<i>benC</i>) |
| BenD-up | CTT CAG CCG CCA GCA CAC GC | 65-84 (<i>benD</i>) |
| BenD-down | ATG GCT CGA ACG TGG CAG TGG C | 370-390 (<i>benD</i>) |
| <i>benD</i> -inv | GGA AAG GCT GCG CGA TCA CT | -76-(-57) (<i>benD</i>) |
| BenK-down | ACA GAT GCC ATG CGA ACC CT | -9-11 (<i>benK</i>) |
| <i>delback</i> -inv | TGT CGG CAG GTG TCG GCA TCT T | 479-500 (<i>benK</i>) |
| 2462 <i>ben</i> -for | ATC CTC GCC GGC TGG CTG G | 913-931 (<i>benK</i>) |
| 2493 <i>ben</i> -rev | TGG TAG CGG TCA CCC AGC CAG C | 923-944 (<i>benK</i>) |
| Pst-Ende-down | TAT CTC GGC GCC AGG GTA C | 681-699 (<i>catA</i>) |
| Pst-Ende-up | GAC CAA CCC ATC CCG TGT | 766-783 (<i>catA</i>) |

*Position bezieht sich auf die Bindestelle der in dieser Arbeit sequenzierten Gene

entwickelten Programmpaket PHYLIP mit Hilfe der Programme PROTDIST, FITCH und DRAWTREE erstellt. Die Sequenzalignments wurden zu diesem Zweck mit den Programmen CLUSTALX (Version 1.81) bzw. GENEDOC (Nicholas et al., 1997) durchgeführt und bearbeitet.

2.22. Chemikalien und Biochemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien in p.A.-Qualität der Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka AG (Buchs, Schweiz), Roth (Karlsruhe), Riedel-de Haen (Seelze), Merck (Darmstadt), Gerbu (Gaiburg), Sigma (St. Louis, USA), EGA-Chemie (Steinheim) und ICN (Ohio, USA) verwendet. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wurde freundlicherweise von E. Payer (Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, FHG Stuttgart) bereitgestellt. Agar, Trypton und Hefeextrakt wurden von Fa. Difco (Detroit, USA) gekauft. Agarose und NuSieve-Agarose stammten von den Firmen Peqlab (Erlangen) bzw. Biozym (Oldendorf).

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1 Inaktivierung der Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol- Dehydrogenase-Gene

Es sollte eine Mutante von *P. putida* Idaho konstruiert werden, die Toluol nur bis zum Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol degradiert. Zu diesem Zweck mussten die Gene für die Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase, die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu Brenzcatechin umsetzen, inaktiviert werden. In *P. putida* Idaho liegen eine Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase und eine Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase in verschiedenen Genclustern vor. Das erstgenannte Enzym wird von *xylL*, das Bestandteil des *meta*-Operons ist, und auch methylanaloges Dihydrodiol umsetzt, codiert. Die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase ist das Genprodukt von *benD*, welches im β -Ketoacidweg vorliegt, und ausschließlich Benzoatdihydrodiol umsetzt. Zur Inaktivierung wurden die beiden Gene zunächst in einen Vektor kloniert, in welchem die Enden des Fragments aus *P. putida* Idaho sequenziert wurden. Außerdem konnten Restriktionsanalysen durchgeführt werden, was für die anschließende Inaktivierung notwendig war. Nachdem Kenntnisse über diese Eigenschaften gewonnen waren, wurden die Gene inaktiviert. Das genaue Vorgehen dazu ist in den jeweiligen Kapiteln 3.1.1. und 3.1.2. geschildert.

Die inaktivierten Gene wurden in einen mobilisierbaren Suizidvektor kloniert und durch Konjugation in *P. putida* Idaho bzw. *P. putida* Idaho BDH1 übertragen. Durch homologe Rekombination der DNA-Regionen stromauf- und stromabwärts der Mutation konnte ein Austausch des im Wirtstamm noch aktiven Gens gegen das Inaktivierte erzielt werden. Auch dieses Vorgehen ist dem jeweiligen Kapitel zu entnehmen. Da sich der Suizidvektor mit dem aktiven Gen, das gegen das Inaktive ausgetauscht wurde, in Pseudomonaden nicht replizieren kann, ist nach einigen Zellteilungen davon auszugehen, dass bei Zellen, in denen der Austausch erfolgte, nur noch die chromosomale DNA und damit das inaktivierte Gen vorlagen.

3.1.1. Ausschalten von *xytL*

3.1.1.1. Klonierung und Sequenzierung von *xytL*

Um *xytL* zu inaktivieren, musste es zunächst ausfindig gemacht werden. Zu Beginn dieser Arbeit war noch nicht bekannt, dass es tatsächlich in *P. putida* Idaho vorliegt, jedoch lieferten die Untersuchungen von Cruden et al. (1992) einen sehr starken Hinweis darauf. Mittels Southern-Hybridisierungsexperimenten wurden von dieser Arbeitsgruppe homologe Regionen zum upper-Operon des TOL-Plasmids pWW0 gefunden, die auf dem Chromosom des Organismus lagen. Daraus wurde geschlossen, dass Toluol in *P. putida* Idaho analog zum TOL-Plasmid abgebaut wird. Mittels der Enzyme des TOL-Plasmids, die auf dem upper-Operon codiert vorliegen, wird Toluol zu Benzoat degradiert. Benzoat wird weiterhin durch Enzyme, die durch das *meta*-Operon codiert werden, abgebaut und schließlich in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist. Im *meta*-Operon ist die Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase codiert.

In dieser Arbeit wurde der Hinweis der Homologie zum TOL-Plasmid aufgegriffen und deshalb der Versuch unternommen, das Gen für die Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase zu klonieren.

Zu diesem Zweck wurde ein Vergleich verschiedener Dihydrodiol-Dehydrogenasen auf Aminosäureebene durchgeführt (Abb. 3.1). Bei Datenbankvergleichen wurden zwei Sequenzen von Enzyme gefunden, die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umsetzen, nämlich *xytL* aus *P. putida* und *benD* aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (früher *A. calcoaceticus*). In den letzten Jahren wurden die Sequenzen entsprechender Enzyme auch aus anderen Spezies publiziert, beispielsweise aus *Rhodococcus*, *Burkholderia* oder *Novosphingobium* (Haddad et al., 2001; Francisco et al., 2001; Romine et al., 1999; s. auch Dendrogramm Abb. 4.4). Die anderen in Abb. 3.1 berücksichtigten vier Enzyme katalysieren Reaktionen von Benzoaten oder Biphenylen, die in 2,3-Stellung dioxygeniert vorliegen. Die Primer, mit denen die Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen aus *P. putida* Idaho gefunden werden sollten, wurden von Regionen abgeleitet, in denen die Sequenz für die 1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenasen möglichst gut übereinstimmt. Die Sequenz der 2,3-Dihydrodiol-Dehydrogenasen sollte an der entsprechenden Stelle jedoch abweichen. Unter Berücksichtigung der Codons, die in den für den Sequenzvergleich herangezogenen Enzymen vorlagen, und der Codon-Usage Tabelle für *P. putida* wurden die degenerierten Primer dhf11 (Pfeil 1, Abb. 3.1), dhf21 (Pfeil 2) und dhr11 (Pfeil 3) entworfen. Zusätzlich wurden Primer entworfen, deren Sequenz *xytL* aus pWW0 entsprach (dhf12, dhf22 und dhr12, Pfeile 1, 2, 3).

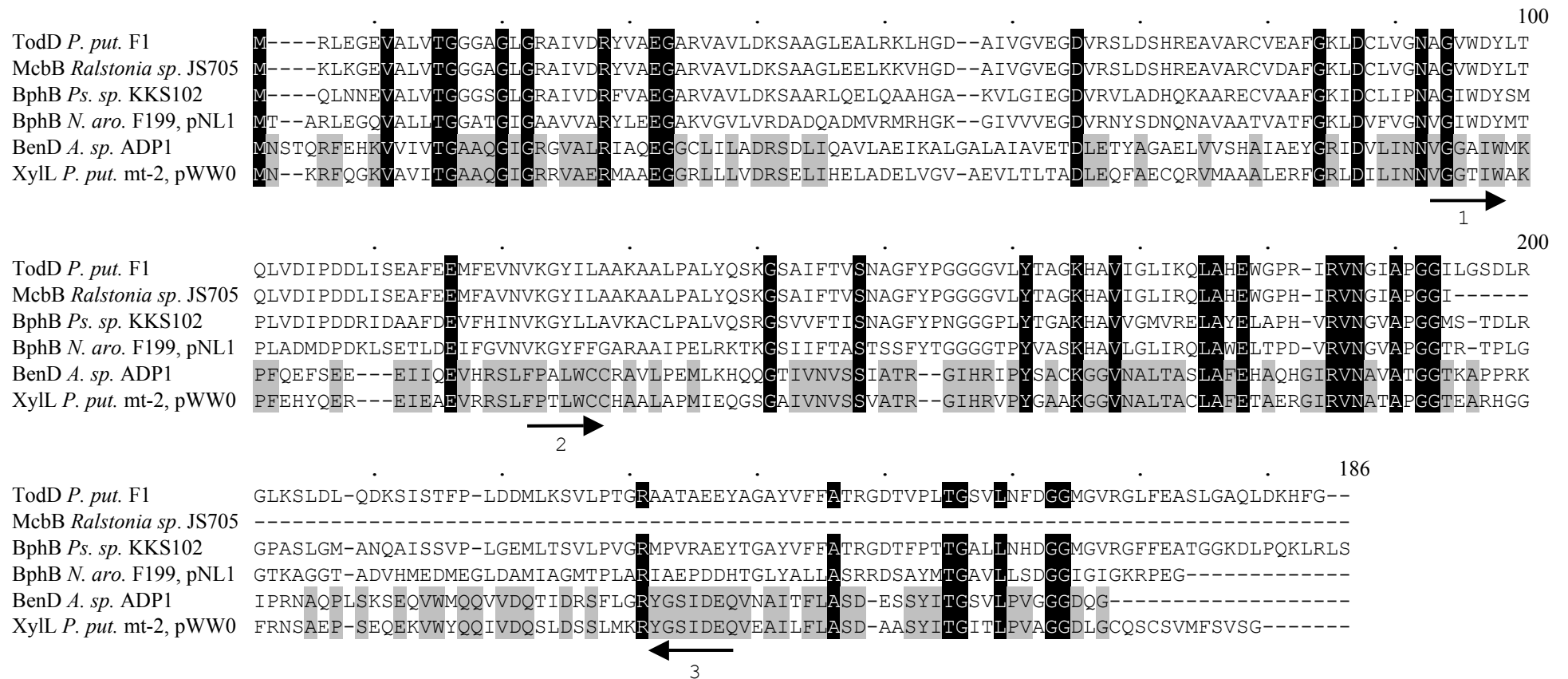


Abb. 3.1: Vergleich einiger Dihydrodiol-Dehydrogenasen auf Proteinebene für den Entwurf von Primern der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase. TodD, McbB, BphB aus *Pseudomonas* und BphB aus *Novosphingobium* sind Enzyme, deren Substrate in 2,3-Stellung dioxygeniert vorliegen, während XylL und BenD Substrate umsetzen, die in 1,2-Dioxygenierung vorliegen. Identische Positionen aller Proteine sind schwarz, identische Positionen von *xylL* und *benD* grau unterlegt. TodD aus *P. putida* F1, P13859, Zylstra und Gibson, (1989); McbB aus *Ralstonia sp.* JS705, AJ006307, van der Meer et al. (1998), BphB aus *Pseudomonas sp.* KKS102, D17319 Kimbara et al. (1989); BphB aus pNL1 von *N. aromaticivorum* F199, NC_002033, Romine et al. (1999), XylL aus pWW0 von *P. putida* mt-2, M64747, BenD aus *Acinetobacter sp.* ADP1, 009224, beide Neidle et al. (1992). Pfeil 1 gibt die Region der Primer dhf11 bzw. dhf12, Pfeil 2 die Region der Primer dhf21 bzw. dhf22 und Pfeil 3 die Region der Primer dhr11 bzw. dhr12 an.

Primer dhf11 und dhf12: (Pfeil 1)

Proteinsequenz: V G G T I W (XylL)
 V G G A I W (BenD)
 Primer dhf12: 5'-GTT GGC GGC ACC ATT TGG -3'
 Primer dhf11: 5'-GTK GGY GGY RCM ATY TGG -3'

Primer dhf11 und dhf12: (Pfeil 2)

Proteinsequenz: F P T L W C C (XylL)
 V G A A W C C (BenD)
 Primer dhf22: 5'-TTT CCT ACC CTA TGG TGC TG -3'
 Primer dhf21: 5'-TTT CCD RCC CTM TGG TGC TG -3'

Primer dhr11 und dhr12: (Pfeil 3)

Proteinsequenz: Y G S I D E Q (XylL und BenD)
 genet. Code (*xyiL*): TAC GGA AGC ATT GAC GAG CA
 Primer dhr12: 5'-TG CTC GTC AAT GCT TCC GTA -3'
 Primer dhr11: 5'-TG CTC GTC RAT RCT KCC RTA -3'

Abb. 3.2: Abgeleitete Primersequenzen aus dem Proteinvergleich aus Abb. 3.1. Dargestellt sind die Proteinsequenzen von XylL und BenD, die zum Entwurf der Primer ausgewählt wurden, und die Sequenzen der Primer. Die jeweils nichtdegenerierte Sequenz entspricht der Sequenz von *xyiL* aus pWW0 von *P. putida* mt-2.

Es wurden PCR-Produkte für beide Vorwärtsregionen sowohl mit den degenerierten als auch den entsprechend *xyiL* gewählten Primern erhalten. Zur Amplifizierung wurde, abweichend von den PCR-Standardbedingungen ein „Touch-down“-Verfahren verwendet. Dabei wurde in den ersten zehn Zyklen die annealing-Temperatur um jeweils 0,5 °C gesenkt.

Das mit dhf12 und dhr12 amplifizierte 421 bp große Produkt wurde zur DIG-Markierung für eine Sonde eingesetzt.

Die Klonierung des PCR-Produkts der Primer dhf12 und dhr12 in einen T-Vektor ergab pXYLAG0. Des Weiteren wurde dieses PCR-Produkt mit Digoxigenin markiert und als Sonde für die geschnittene, chromosomale DNA eingesetzt.

Die DNA von *P. putida* Idaho wurde in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Enzymen aus der „multiple cloning site“ von pBluescript (*Bst*XI, *Not*I, *Xba*I, *Spe*I, *Pst*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Cla*I und *Apa*I) verdaut. Die Fragmente aus jedem Ansatz wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und über ein elektrisches Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Southern Blotting wurde die DNA auf eine Nylonmembran übertragen und nach Hybridisierung mit der Sonde ein 5,2 kb großes Fragment aus dem Restriktionsansatz mit *Pst*I isoliert. *Xba*I-

geschnittene DNA zeigte nach der Hybridisierung ein 4,9 kb großes Fragment, mit *Bst*XI-geschnittene DNA ein 4,6 kb großes Fragment, die restlichen Ansätze lieferten sehr große Fragmente. Das gewonnene DNA-Fragment der Größe 5,2 kb aus einer Verdauung mit *Pst*I wurde in einen *Pst*I-geschnittenen pBluescript-Vektor ligiert und das Ligationsgemisch in *E. coli* DH5 α transformiert. Ein aus einer Kolonie nach Subkultivierung isoliertes Plasmid wurde pXYLAG1 genannt.

Um zu überprüfen, ob auf dem klonierten Fragment aus *P. putida* Idaho auch das gesuchte Gen liegt, wurden die Enden des Inserts von Plasmid pXYLAG1 sequenziert.

Wie aufgrund der Untersuchungen von Cruden et al. (1992) erwartet, wurden Homologien zu *xylZ* und *xylJ* des *meta*-Operons aus pWW0 gefunden. Um eine schnellere Sequenzierung des Fragments mit *xylL* zu erreichen, wurde pXYLAG1 einem *Pst*I/*Xba*I-Doppelverdau unterzogen. Mit *Xba*I war eine Teilung des 5,2 kb großen Fragments zu erwarten, da aus der Restriktionsanalyse des *meta*-Operons aus pWW0 bekannt war, dass *Xba*I stromaufwärts des Startcodons für *xylX*, dem ersten Gen des *meta*-Operons, schneidet. Außerdem zeigte die Hybridisierung mit der Sonde mit *Xba*I-geschnittener DNA ein 4,9 kb großes Fragment. Daraus wurde geschlossen, dass im *meta*-Operon von *P. putida* Idaho, abweichend von der Sequenz aus pWW0, mindestens eine zweite Schnittstelle für *Xba*I existiert. Die zweite Schnittstelle lag in dem 5,2 kb großen Fragment, das durch Schneiden der genomischen DNA mit *Pst*I isoliert und kloniert wurde (Abb. 3.24). Auch das 4,9 kb große Fragment mit *Xba*I-geschnittener DNA wurde kloniert und ergab das Plasmid pXYLAG4 (Kap. 3.3).

Aus dem 5,2 kb-Fragment entstanden nach Schneiden mit *Xba*I zwei neue Fragmente, 2,2 bzw. 3 kb groß. Diese wurden erneut in einen entsprechend verdauten pBluescript Vektor ligiert. Die Plasmide wurden pXYLAG2 bzw. pXYLAG3 genannt. Das Sequenzieren der Enden der Inserts dieser Plasmide zeigte, dass das interessierende Gen *xylL* auf pXYLAG2 lag. Die Sequenzierung von pXYLAG2 zeigte in *xylL* geeignete Schnittstellen für eine Deletion. Im Abstand von 525 Basen treten zwei *Acc*I-Schnittstellen innerhalb des Gens auf, gleichzeitig waren dieses die einzigen Schnittstellen für diese Restriktionsendonuklease in der klonierten DNA.

3.1.1.2. Einfügen einer Deletion in *xylL*

Da eine weitere Schnittstelle für *Acc*I in der „multiple cloning site“ im pBluescript-Anteil von pXYLAG2 vorhanden war, wurde die klonierte DNA aus *P. putida* Idaho durch einen *Pst*I/*Xba*I-Doppelverdau aus dem Vektor ausgeschnitten und anschließend mit *Acc*I verdaut. Es entstanden erwartungsgemäß Fragmente der Größen 925, 675 und 525 bp. Das Fragment

der Größe 525 bp stellt das zu deletierende *AccI*-Fragment aus *xyII* dar, die anderen beiden Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und religiert (Abb. 3.3). Das erhaltene 1600 bp große Fragment wurde wiederum in einen *PstI/XbaI*-verdauten pBluescript-Vektor kloniert. Eine Sequenzierung erwies, dass das neu entstandene Plasmid pXYLAG21 die Deletion in *xyII* trägt.

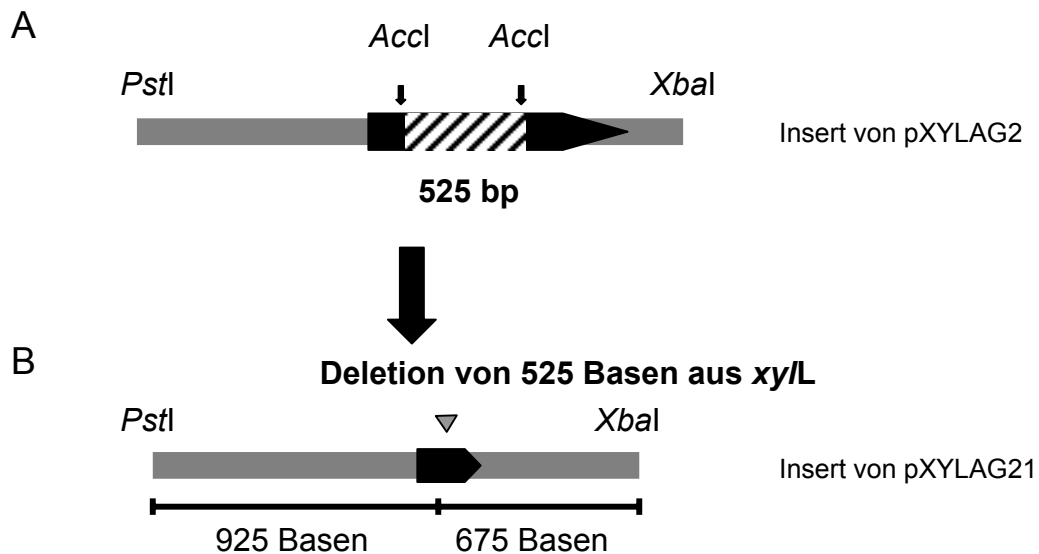


Abb 3.3: Einfügen einer Deletion in *xyII*. In A ist die aus pXYLAG2 ausgeschnittene *P. putida* Idaho-DNA dargestellt. Nach Verdau mit *AccI* wurden das 925 bp große *PstI/AccI*-Fragment und das 675 bp große *AccI/XbaI*-Fragment ligiert. Das entstandene *PstI/XbaI*-Fragment wurde wieder in pBluescript kloniert und ergab pXYLAG21. B zeigt das entstandene Insert von pXYLAG21.

3.1.1.3. Einbringen des ausgeschalteten *xyII* in den Wildtyp *P. putida* Idaho

Da pBluescript kein mobilisierbarer Vektor ist und das inaktivierte Gen mittels homologer Rekombination in das Genom von *P. putida* Idaho gelangen sollte, wurde die 1,6 kb große klonierte DNA von pXYLAG21 durch einen *PstI/XbaI*-Verdau aus pBluescript ausgeschnitten und in den Suizidvektor pLO3 (Lenz und Friedrich, 1998) kloniert. Das neue Plasmid wurde pXYLAG22 genannt und in *E. coli* S17-1 transformiert.

Der Vektor pLO3 trägt neben einer Tetracyclinresistenz das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, das die toxisch wirkende Levansucrase codiert. Das Ersetzen des aktiven gegen das inaktivierete Gen in *P. putida* Idaho impliziert in diesem System ein zweistufiges Verfahren (Abb. 3.4). Zunächst wurden Transkonjuganten isoliert, die pXYLAG22 erhalten und durch homologe Rekombination in einer an die Deletion angrenzenden DNA-Region in ihr Genom eingebaut haben (erstes Crossover, Abb. 3.4B und 3.4C). Damit besaßen die Transkonjuganten eine

Tetracyclinresistenz. Die Selektion erfolgte auf Mineralmedium mit Tetracyclin. In der zweiten Stufe wurde eine Transkonjugante in Flüssigmedium kultiviert, wobei das zweite Crossover, diesmal in der anderen an die Deletion angrenzenden Region, wie in Abb. 3.4C angedeutet, stattfinden sollte. Ist das zweite Crossover in dieser Weise erfolgt, bleibt die chromosomale DNA mit dem inaktivierten *xyiL* zurück, das aktive Gen befindet sich im nicht replikativen Suizidvektor (3.4D). Die Flüssigkulturen mit den gewachsenen Zellen wurden auf Agarplatten, die mit Sucrose supplementiert waren, ausplattiert. Hier kommt die *sacB*-Selektion zum Tragen. In Zellen, in denen kein zweites Crossover stattgefunden hat wird Sucrose durch die von *sacB* codierte Levansucrase gespalten und aufgrund eines toxisch wirkenden Produktes sollten diese Zellen auf den Platten keine Kolonien bilden. Bei den Kolonien, die auf dem Sucrosemedium aufgrund des verlorenen *sacB*-Gens wachsen können, müsste nur noch getestet werden, ob durch das zweite Crossover nicht wieder der ursprüngliche Stamm mit dem intakten Gen entstanden ist. Das wäre der Fall, wenn beide Crossover in der gleichen die Deletion flankierenden Region stattgefunden hätten.

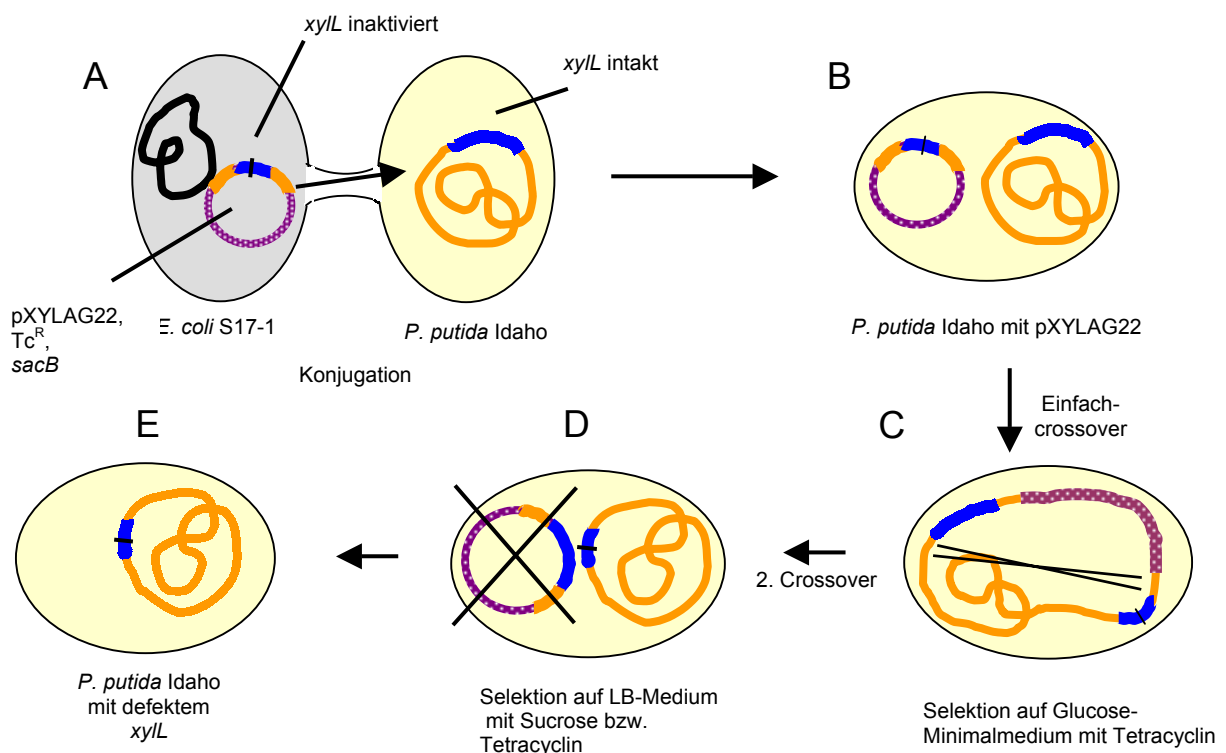


Abb. 3.4: Einbringen der Deletion in den Wildtyp von *P. putida* Idaho. Durch Konjugation gelangt pXYLAG22 in *P. putida* Idaho (A und B). Dort integriert sich der Vektor ins Genom (C). Das gewünschte Crossover ist durch ein Kreuz angedeutet. In einer Flüssigkultur mit den tetracyclinresistenten Zellen kann das zweite Crossover erfolgen. Gewünscht ist das Zurückbleiben des mutierten Gens im Chromosom, während das intakte Gen mit dem Vektor aus dem Chromosom verloren geht (D). Da sich der Vektor in Pseudomonaden nicht replizieren kann, bleibt nur das Chromosom mit dem mutierten *xyiL* zurück (E). Diese können durch Test auf Tetracyclinresistenz und durch Hybridisierung mit einer Sonde, die spezifisch für den deletierten Bereich ist, selektiert werden.

Die Transkonjuganten von *P. putida* Idaho, welche pXYLAG22 in ihr Genom integriert hatten, zeigte jedoch keine Empfindlichkeit gegen das Levansucrase-System. Daher wurde die Selektion durch Ausplattieren auf sucrosehaltigen Platten durch Screenen nach wieder verlorengangener Tetracyclinresistenz ersetzt.

Mögliche Gründe für die mangelnde Sensitivität gegenüber der Levansucrase sind fehlerhafte Sekretion, ein inaktives oder fehlendes Genprodukt oder ein unbekannter Resistenzmechanismus gegen Fructosylreste, die durch Spaltung von Sucrose durch die Levansucrase entstehen. Der Toxizitätsmechanismus der Levansucrase beruht auf der Übertragung von Fructosylresten auf unbekannte Akzeptormoleküle im Periplasma bei gramnegativen Zellen (Gay et al., 1983, 1985; Steinmetz et al., 1983, 1985). Dies führt zu sterischen Behinderungen und zu „Verstopfungen“ im Periplasma (Jäger et al., 1992).

Es konnten Mutanten isoliert werden, die *xyiL* mit der Deletion erhalten haben. Zunächst wurden nur 20 isolierte Stämme, von denen 18 tetracyclinsensitiv waren, durch ein PCR-Experiment mit Primern, die spezifisch für *sacB* (*sacBf* und *sacBr*) sind, überprüft. Davon zeigten die tetracyclinsensitiven Stämme kein amplifiziertes Fragment, mit den beiden tetracyclinresistenten Stämmen wurde ein Fragment der Größe 703 bp, amplifiziert, das auch in der Positivkontrolle mit dem Plasmid pXYLAG22 als Template-DNA entstand. Damit war gezeigt, dass in den 18 tetracyclinsensitiven Stämmen das zweite Crossover erfolgt war.

Durch Hybridisierung mit einer Sonde, die an die deletierte DNA bindet (Primerpaar für die Herstellung der Sonde: *dhf-del* und *dhr-del*) sollte nun geklärt werden, ob wieder der Ausgangsstamm von *P. putida* Idaho entstanden war, oder das mit der Deletion versehene Gen erfolgreich in den Stamm eingebracht wurde. Mit diesem Experiment wurden noch weitere 20 Stämme analysiert, die aus einem weiteren Selektionsexperiment entstammten, und von denen 7 Stämme keine Tetracyclinresistenz mehr zeigten. Die Hybridisierung zeigte, dass in der DNA aller tetracyclinsensitiven Stämme keine Bindung mit der Sonde erfolgte und somit war in allen Stämmen das intakte *xyiL* gegen das Inaktivierte ausgetauscht worden. Die DNA der tetracyclinresistenten Stämme zeigte eine Hybridisierung mit der Sonde.

Eine PCR mit den Primern *dhf1* und *dhr12* lieferte bei den tetracyclinsensitiven Stämmen ein Produkt von 163 bp. Mit dem Wildtyp wurde ein Produkt der Länge 688 Basen amplifiziert. Dieses Ergebnis stimmt mit der Hybridisierung mit der Sonde für den deletierten Bereich überein. Eine Sequenzierung mit den Primern *dhf1* und *dhr12* zeigte, dass tatsächlich eine Deletion in *xyiL* vorlag. Die Mutante von *P. putida* Idaho mit der Deletion in *xyiL* wurde *P. putida* Idaho BDH1 genannt.

3.1.1.4. Physiologisches Verhalten von *P. putida* Idaho BDH1

Die Auswirkung der Deletion in *xylL* wurde in einer Flüssigkultur mit Benzoat als Substrat getestet. Da zu diesem Zeitpunkt die Existenz von *benD* unbekannt war, wurde erwartet, dass *P. putida* Idaho BDH1 Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umsetzt und Benzoat allein nicht als C-Quelle dienen kann. Abb. 3.5 zeigt jedoch, dass sich *P. putida* Idaho BDH1 nicht vom Wildtyp unterschied, das heißt, wider Erwarten Benzoat verwertete.

Für das in Abb. 3.5 gezeigte Wachstum wurden die Zellen des Wildtyps und der Mutante von einer mit Benzoat exponentiell wachsenden Kultur in frisches Mineralmedium übertragen, das mit 10 mM Benzoat supplementiert war.

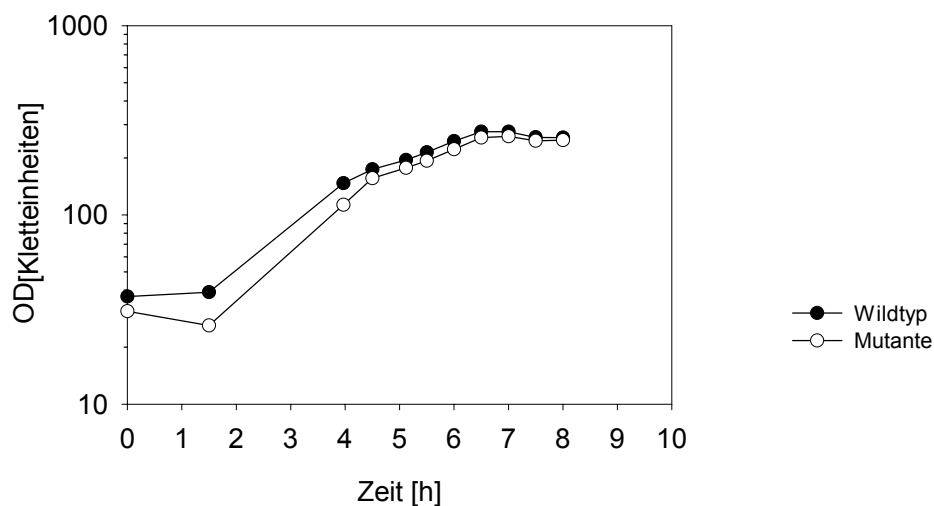


Abb. 3.5: Wachstum von *P. putida* Idaho Wildtyp und BDH1 mit 10 mM Benzoat. Die Vorkulturen für das gezeigte Experiment wurden wie in Kap. 2.4.2. beschrieben angezchtet und befanden sich zum Zeitpunkt des Animpfens in der exponentiellen Phase. Dabei handelte es sich um Kulturen, die keine Glucose mehr, sondern nur Benzoat als C-Quelle erhielten.

Aufgrund des beobachteten Wachstums von *P. putida* Idaho BDH1 mit Benzoat wurde mit diesem Stamm die Enzymaktivität der Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase bestimmt. Für den Rohextrakt, der zur Bestimmung der Enzymaktivitäten eingesetzt wurde, wurden die Zellen analog zu den in Abb. 3.5 gezeigten Kulturen angezchtet und in der späten exponentiellen Phase geerntet. In Abb. 3.6 ist die gemessene Enzymaktivität für Wildtyp und Mutante dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Inaktivierung von XylL auf den Umsatz von Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol keinen Einfluss hatte. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, dass noch

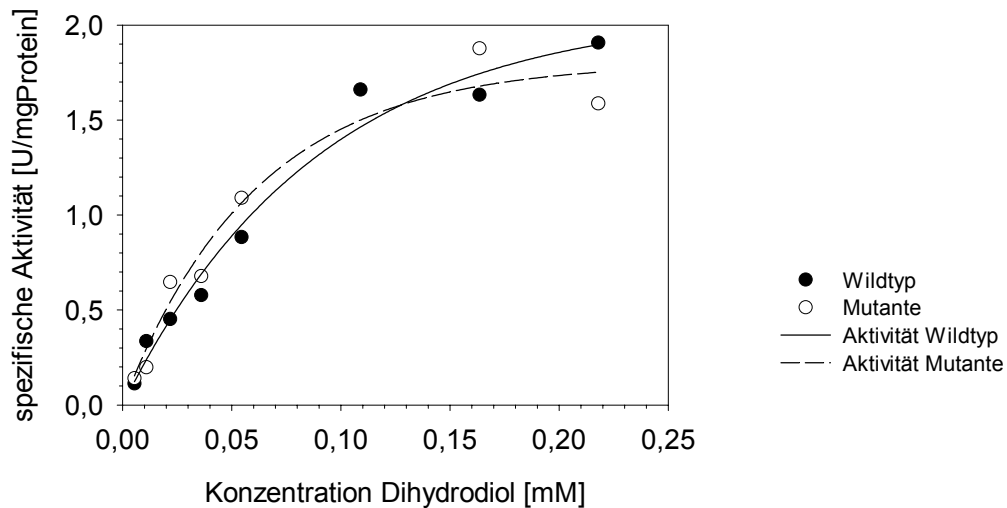


Abb. 3.6: Aktivität der Dihydrodiol-Dehydrogenase von *P. putida* Idaho Wildtyp und BDH1. Die Zellen für den Rohextrakt, der für die Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt wurde, wurden analog zu den Zellen für das in Abb. 3.5 gezeigte Wachstum kultiviert und in der späten exponentiellen Phase geerntet. Die spezifische Aktivität für die Dihydrodiol-Dehydrogenase liegt für beide Stämme im gleichen Bereich.

eine zweite 1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase in *P. putida* Idaho vorhanden sein muss. Dies zeigte sich im weiteren Verlauf der Arbeit durch die Identifikation von *benD*.

3.1.2. Ausschalten von *benD*

3.1.2.1. Klonierung und Sequenzierung von *benD*

Das Gen für die zweite 1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase, *benD*, konnte durch eine PCR mit den Primern dhf11 und dhr11 (degenerierte Primer) sowie dhf12 und dhr12 (Primer entsprechend *xyiL*) nachgewiesen werden. Die PCR-Bedingungen wurden wie bei der Herstellung der Sonde für *xyiL* gewählt. Mit den Primerpaaren dhf21 und dhr11 (degeneriert) und dhf22 und dhr12 (entsprechend *xyiL*) konnte dagegen kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass es sich um ein anderes Gen als *xyiL* handelte. Das PCR-Produkt der Primer dhf11 und dhr11 wurde sequenziert. Das Ergebnis bestätigte, dass ein Gen für ein Isoenzym von *xyiL* vorlag. Da es für das Ziel der Arbeit, die Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Gene zu inaktivieren, auch dieses Gen ausgeschaltet werden

musste, wurde es zunächst kloniert. Hierzu wurde ein Teil des PCR-Produktes mit Digoxigenin markiert und der andere Teil in einen T-Vektor kloniert, woraus pBENAG0 entstand.

Die chromosomale DNA von *P. putida* BDH1 wurde mit verschiedenen Enzymen verdaut und wie schon zur Auffindung des Fragments mit *xyLL* auf ein Gel aufgetragen, die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit der neuen Sonde hybridisiert. Nach dem immunologischen Nachweis konnte beim Verdau der chromosomalen DNA mit *PstI* ein 3 kb großes Fragment, das mit der Sonde hybridisierte, nachgewiesen werden. Das Fragment wurde in pBluescript ligiert und das Ligationsgemisch in *E. coli* DH5 α transformiert. Aus den Transformanten wurde mittels Koloniehybridisierung mit der oben genannten Sonde der Stamm ausgewählt, der ein positives Signal gab und das Plasmid, das pBENAG1 genannt wurde, isoliert.

Von pBENAG1 wurden Subklone zur Sequenzierung hergestellt. Der Datenbankvergleich zeigte, dass ein zweites Gen, das für die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase codiert, kloniert wurde. Dieses wies eine Homologie zu dem von Cowles et al. (2000) publizierten Clusters des β -Ketoacidweges aus *P. putida* PRS 2000 auf. Es handelte sich also um *benD*.

3.1.2.2. Einfügen einer Deletion und Insertion eines Antibiotikaresistenzmarkers in *benD*

Zur Inaktivierung von *benD* wurden verschiedene Strategien verfolgt. Eine davon führte zum gewünschten Ergebnis.

Eine Inaktivierung wie bei *xyLL*, das durch eine Deletion ohne Insertion eines Markers ausgeschaltet wurde, führte hier zu Schwierigkeiten. Da in der klonierten DNA von pBENAG1 die Schnittstellen für *AccI*, die sich, wie auch in *xyLL*, für eine Deletion anboten, ebenfalls vorhanden waren, wurde ein Subklon von pBENAG1 hergestellt. Durch einen *PstI/DraII*-Doppelverdau entstand ein 1,7 kb großes Fragment, auf dem *benD* lag (pBENAG2, Abb. 3.25).

Analog wie bei der Inaktivierung von *xyLL* wurde pBENAG2 mit *AccI* geschnitten und die Vektor-DNA religiert (Abb. 3.7). Dadurch wurden 510 Basen deletiert. In diesem Fall war es, abweichend von der Inaktivierung von *xyLL*, nicht notwendig, das Insert zuerst aus dem Vektor auszuschneiden, da durch die Klonierung des *PstI/DraII*-Fragments in pBluescript die in der „multiple cloning site“ vorhandene *AccI*-Schnittstelle des Vektors schon entfernt wurde.

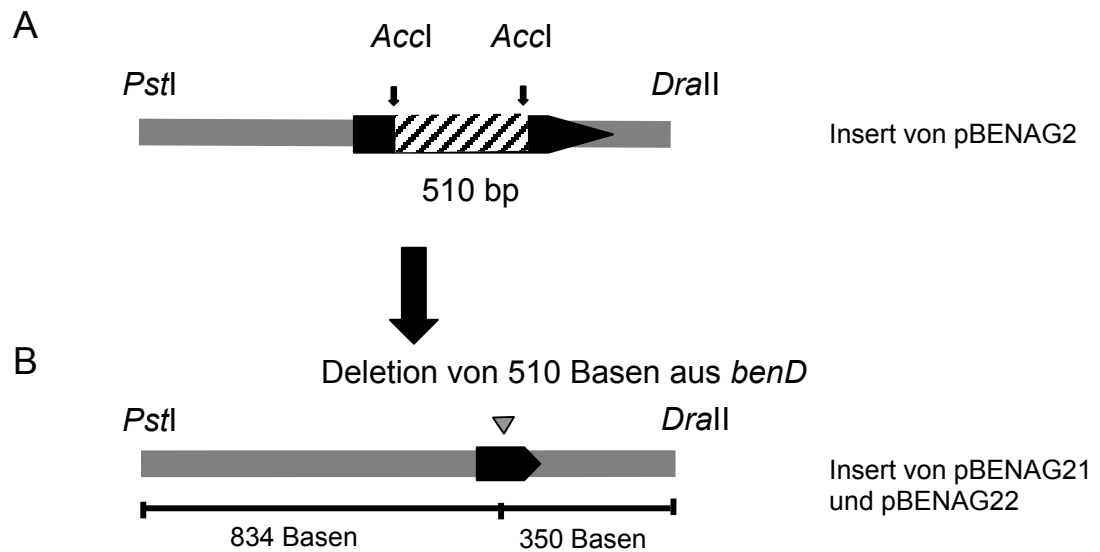


Abb. 3.7: Einfügen einer Deletion in *benD*. Dargestellt sind das Insert von pBENAG2 (A), das mit *Accl* geschnitten wurde. Dadurch wurde ein 510 bp großes Fragment aus dem Plasmid herausgeschnitten. Die Enden des restlichen Plasmids wurden religiert und somit war pBENAG21 entstanden. Das Insert von pBENAG21 (B) wurde in pLO3 kloniert (pBENAG22).

Die Plasmide, die die *Accl*-Deletion in *benD* trugen, wurden pBENAG21 (DNA in pBluescript) bzw. pBENAG22 (DNA in pLO3) genannt. Da pLO3 keine *DraII*-Schnittstelle in der „multiple cloning site“ besitzt, erfolgte die Klonierung des Inserts von pBENAG21 in pLO3 mit Hilfe eines 21 bp großen Linkers (Kap. 2.16.), der eine *XbaI*-Schnittstelle enthielt und überhängende Enden besaß, die eine Klonierung in die *DraII*-Schnittstelle von pBENAG21 ermöglichten. Durch einen *PstI/XbaI*-Doppelverdau konnte das Insert in pLO3 kloniert werden. Die Selektion nach Zellen, die die gewünschte Mutation in *benD* enthalten und das intakte Gen verloren haben, blieb erfolglos.

Das Problem bei dieser Strategie bestand darin, dass stromabwärts des *Accl*-deletierten Fragments nur 350 bp vorhanden waren, die zur homologen Rekombination zwecks des Austausches des mutierten gegen das intakte *benD* aus *P. putida* Idaho BDH1 bereit standen. Mit dieser Strategie konnten keine Stämme isoliert werden, die den ins Chromosom integrierten Vektor nach dem erfolgten ersten Crossover wieder aus dem Genom geschnitten hatten und somit entweder den Ausgangsstamm oder die gewünschte Mutante darstellten (vgl. Abb. 3.4). Daher wurden andere Strategien zur Inaktivierung von *benD* verfolgt.

Eine weitere Strategie bestand darin, eine Deletion über PCR zu erzeugen (Higuchi, 1990, Abb. 3.8). In diesem Fall wurden Primer gewählt, die in *benD* liegen, jedoch in ihrer Sequenz

eine Deletion von 280 Basen bezüglich *benD* tragen und zueinander komplementär sind (Primer *delfront_r* und *delback_f*). Die Gegenprimer zu den soeben Genannten wurden soweit stromauf- bzw. stromabwärts von *benD* gewählt, dass genug Basen für eine homologe Rekombination vorhanden waren (Primer *delfront_f* und *delback_r*). Zwei PCR-Ansätze mit den Primerpaaren *delfront_f* und *delfront_r* bzw. *delback_f* und *delback_r* lieferten zwei Produkte der Größen 872 bzw. 962 bp, die den Regionen stromauf- und stromabwärts der Deletion entsprachen.

Die PCR wurde mit einer Vent-Polymerase durchgeführt, daher betrug die Temperatur für den Elongationsschritt nicht 72 °C wie mit der *Taq*-Polymerase, sondern 75 °C. Als Annealingtemperatur wurden 67 °C gewählt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Produkte eluiert. Die PCR wurde für das Primerpaar *delfront-pst* und *delback-sac* analog durchgeführt. Es wurde ein Produkt der Größe 1774 bp erhalten.

Durch einen Doppelverdau des 1774 bp großen Fragments mit *PstI* und *SacI* und entsprechendem Verdau der Vektoren pBluescript bzw. pLO3 sowie anschließender Ligation entstanden die Plasmide pBENAG41 bzw. pBENAG42. Auch nach Konjugation von pBENAG42 in *P. putida* Idaho BDH1 lieferte die anschließende Selektion nach Mutanten, die das inaktivierte *benD* anstatt des intakten Gens enthielten, nicht den erwarteten Stamm. Deshalb wurde eine dritte Strategie verfolgt, die schliesslich zum Erfolg führte und den Stamm *P. putida* Idaho BDH2 hervorbrachte.

Das Problem der bisherigen Versuche, *benD* auszuschalten, lag in der Selektion des Stammes, in welchem das zweite Crossover stattgefunden haben sollte. Daher wurde bei der dritten Strategie nicht nur DNA aus *benD* deletiert, sondern zusätzlich ein Resistenzmarker eingefügt, der ein weiteres Selektionsmerkmal darstellte. Gewählt wurde zu diesem Zweck das sogenannte Ω -Fragment (Prentki und Krisch, 1984), das die Resistenzen gegen Streptomycin und Spectinomycin trägt. Zunächst wurde das Plasmid pBENAG4, das verglichen mit pBENAG1 ein verkürztes Insert trägt, konstruiert, da in pBENAG1 (3kb-*PstI*-Fragment in pBluescript) stromabwärts von *benD* eine für die geplante Inaktivierung störende Schnittstelle für *SgrAI* vorhanden war. Das Produkt der Primer *delfront-pst* und *delback-sac*, das durch eine PCR mit chromosomaler DNA von *P. putida* Idaho als Template entstand, trug *benD* und seine angrenzenden Regionen (Abb. 3.9). Nach einem *PstI* und *SacI*-Verdau wurde es in pBluescript kloniert. pBENAG4 wurde mit *SgrAI* verdaut, dessen beide Schnittstellen in diesem Plasmid in *benD* im Abstand von 684 bp liegen. Das Ω -Fragment wurde mit *XmaIII* verdaut, das die gleichen überhängenden Enden wie *SgrAI* erzeugt. Das geschnittene Ω -Fragment wurde in das *SgrAI*-geschnittene Plasmid pBENAG4 ligiert, wobei pBENAG43

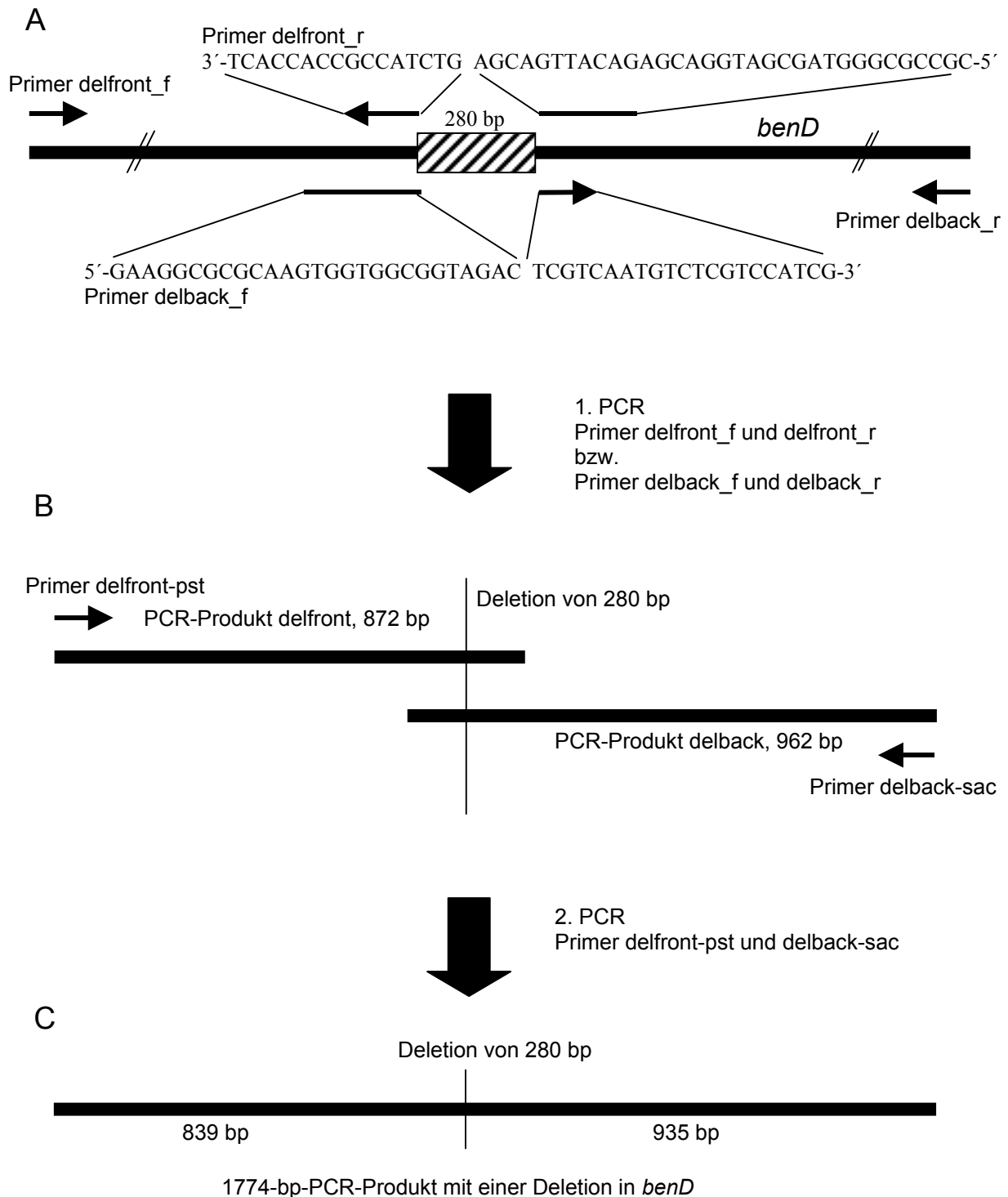


Abb. 3.8: Erzeugung einer Deletion in *benD* über PCR. Es wurden Primer konstruiert, deren Sequenz zu zwei Regionen aus *benD* homolog ist, zwischen welchen 280 Basenpaare liegen (delfront_r und delback_f) und die zueinander komplementär sind (A). Mit jedem dieser Primer wurde mit dem jeweiligen zugehörigen Gegenprimer (delfront_f bzw. delback_r) ein PCR-Experiment durchgeführt, das zwei Produkte lieferte, die beide in *benD* mit einer Deletion versehen waren (B). In einer zweiten PCR, in der die beiden Produkte als Template-DNA eingesetzt wurden, wurde mit den Primern delfront-pst und delback-sac ein PCR-Produkt gewonnen, das eine Deletion in *benD* trägt (C). Die Primer delfront-pst und delback-sac entsprechen in ihrer Sequenz delfront_f und delback_r sind jedoch mit Restriktionsschnittstellen für *PstI* bzw. *SacI* versehen, was das anschließende Klonieren in einen Vektor vereinfacht.

entstand. Die in pBluescript inserierte DNA wurde in den mobilisierbaren Suizidvektor pSUP301 kloniert. Da dieser Vektor keine verfügbare *SacI*-Schnittstelle besitzt, wurde er für die Klonierung mit *PstI* und *HincII*, das blunt-ends verursacht, geschnitten. pBENAG43 wurde zunächst mit *SacI* verdaut und durch eine Behandlung mit Klenow-Enzym wurden blunt-ends hergestellt. Nach einem anschließendem Verdau mit *PstI* konnte die DNA aus pBENAG43 in den vorbereiteten pSUP301-Vektor ligiert werden. Es entstand der zur Konjugation eingesetzte Vektor pBENAG44.

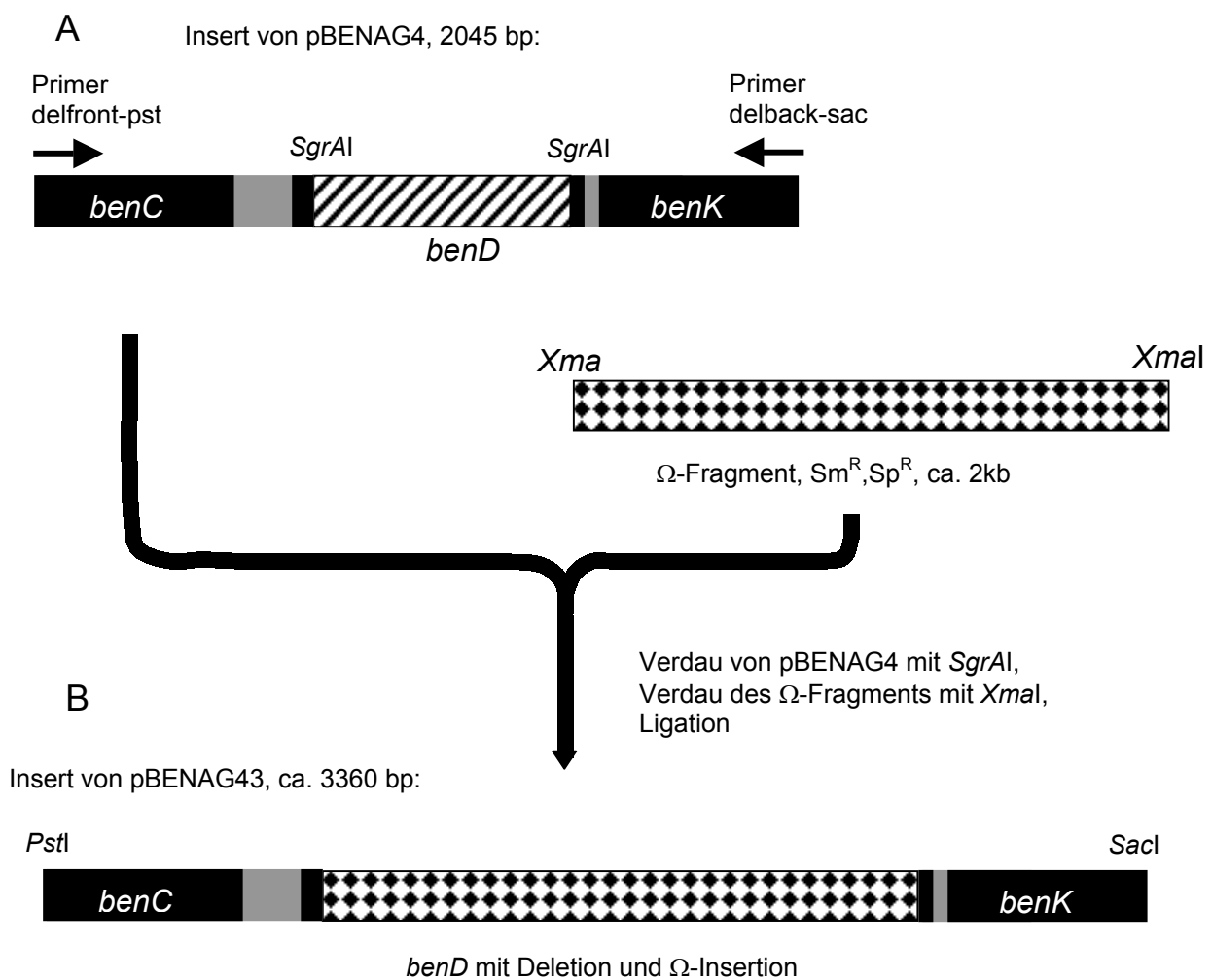


Abb. 3.9: Inaktivierung von *benD* durch eine Deletion und Insertion eines Antibiotikaresistenzmarkers. Das 2045 bp PCR-Produkt mit dem intakten *benD* wurde in pBluescript kloniert (pBENAG4). A: Die Sequenz stromauf- und stromabwärts von *benD* wurde als *benC* bzw. als *benK* identifiziert (schwarz dargestellt). Das *XmaIII*-verdaute Ω-Fragment wurde in den *SgrAI*-geschnittenen pBENAG4-Vektor ligiert, was in pBENAG43 resultierte (B). Das Fragment aus pBENAG43 wurde in pSUP301 kloniert (nicht gezeigt, da die Zeichnung identisch mit B wäre). Das somit entstandene Plasmid pBENAG44 wurde zur Konjugation in *P. putida* Idaho BDH1 eingesetzt.

3.1.2.3. Einbringen des ausgeschalteten *benD* in *P. putida* Idaho BDH1

Das Plasmid pBENAG44 wurde in *E. coli* S17-1 transformiert. Durch Konjugation gelangte es in *P. putida* Idaho BDH1. Abweichend von der Strategie bei der Inaktivierung von *xyII*, bei welcher zuerst die Transkonjugante isoliert wurde, bei der sich der gesamte Vektor ins Chromosom integriert hatte, konnte hier direkt nach dem Stamm selektiert werden, der nur das mutierte Gen von *benD* enthielt. Die Transkonjuganten, die sich durch die eingebaute Streptomycinresistenz in *benD* selektieren ließen, wurden gepickt und auf Agar mit Kanamycin ausgestrichen. Auf diese Weise wurde überprüft, ob ein einfaches (pBENAG44 im Chromosom) oder das gewünschte doppelte Crossover (Austausch des intakten gegen das inaktivierte *benD*) erfolgt war (Abb. 3.10). Die Stämme, welche nicht in Gegenwart von Kanamycin wachsen konnten, hatten pBENAG44 nicht in ihrem Chromosom integriert und waren somit die erwartete Mutante von *P. putida* Idaho mit einer Deletion in *xyII* und *benD*, das zusätzlich mit einer Deletion versehen war.

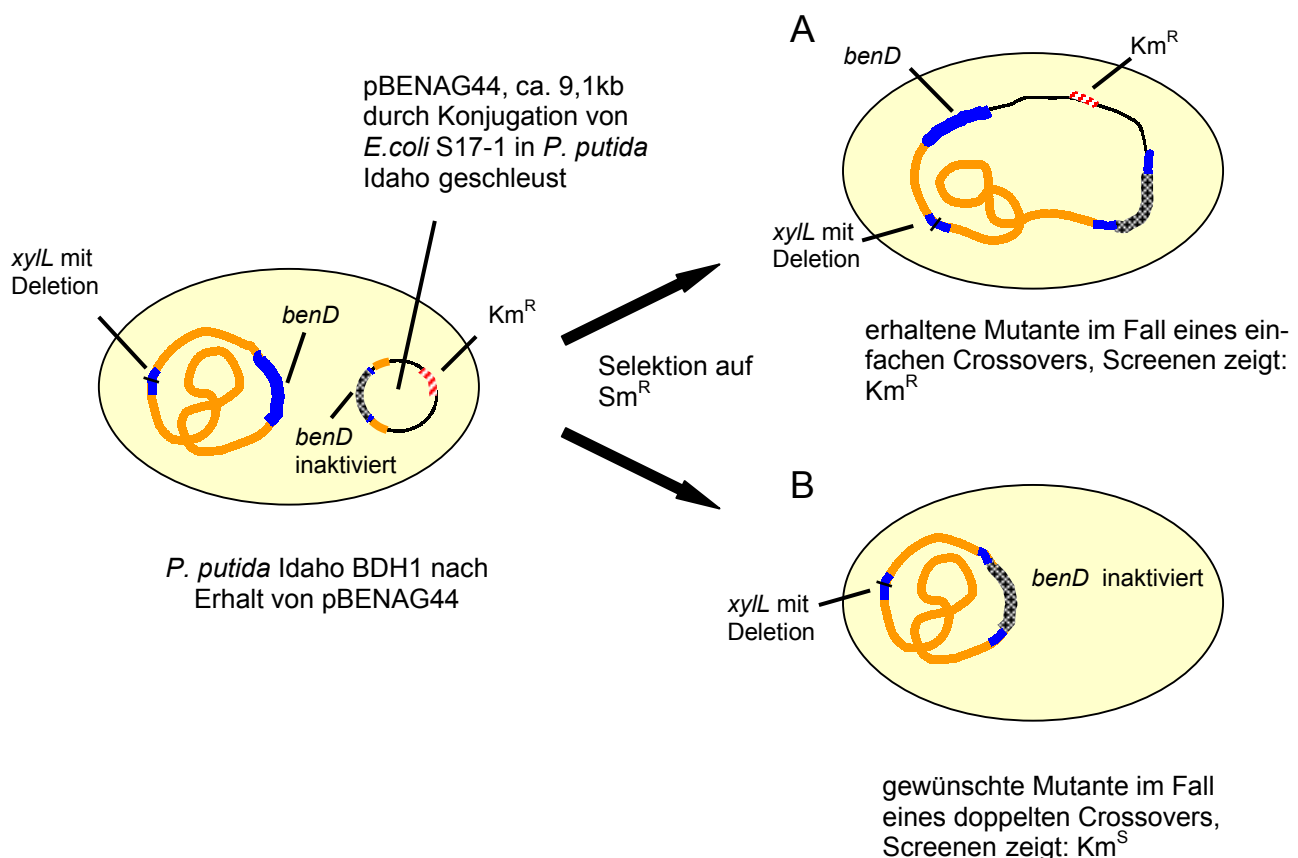


Abb. 3.10: Austausch des inaktivierten gegen das intakte *benD* in *P. putida*. Ein einfaches Crossover würde zu einem Cointegrat führen, das pBENAG44 mit der Kanamycinresistenz trägt (A). Durch ein doppeltes Crossover wird das intakte *benD* gegen das die Deletion und die Insertion des Ω -Fragments tragende ausgetauscht (B). Selektiert wurde auf Streptomycinresistenz und Kanamycinsensitivität.

Mit molekularbiologischen Methoden wurde überprüft, ob der erhaltene Stamm *P. putida* Idaho BDH2 die gewünschte Mutante ist. PCR-Experimente mit den Primerpaaren Km^R-for und Km^R-rev lieferten kein Produkt der erwarteten Größe, während die Positivkontrolle mit pBENAG44 als Template das Fragment der erwarteten Größe (559 bp) zeigte. Daraus wurde geschlossen, dass die Resistenz für Kanamycin und somit das Plasmid pBENAG44 nicht mehr in der genomischen DNA von *P. putida* Idaho BDH2 enthalten war. Eine weitere PCR mit den Primern delfront-pst und delback-sac lieferte ein PCR-Produkt von ca. 3,3 kb (vgl. Abb. 3.9B). Das entspricht den Erwartungen, wenn *benD* eine Deletion trägt und das Ω -Fragment inseriert ist. Auch dieses Ergebnis wurde als eine erfolgreiche Inaktivierung von *benD* gewertet. Eine PCR mit Primern, die spezifisch für den deletierten Bereich in *benD* gewählt wurden (benD-del-for und benD-del-rev), lieferte mit der DNA von *P. putida* Idaho BDH2 kein Produkt. Dagegen wurde mit DNA von *P. putida* Idaho BDH1 und dem Wildtyp als Kontrolle das erwartete Fragment erhalten. Auch dieses Ergebnis zeigte, dass ein Bereich von *benD* deletiert ist.

Ein Hybridisierungsexperiment mit einer Sonde, die so gewählt wurde, dass sie trotz der Mutation in *benD* an die genomische DNA bindet, sollte die erfolgreiche Inaktivierung von *benD* zusätzlich belegen (Abb. 3.11). Zu diesem Zweck wurde die DNA von *P. putida* Idaho BDH2 mit *Pst*I geschnitten, auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung mit der Sonde, die mit dem Primerpaar dhf12 und delback_r hergestellt wurde, zeigte ein Fragment, das die erwartete Größe 4,3 kb hatte (Abb. 3.11B). Das Fehlen einer Bande bei 3 kb, wie es beim Wildtyp zu erwarten wäre (Abb. 3.11A), zeigte, dass das intakte *benD* durch das inaktivierte ersetzt wurde.

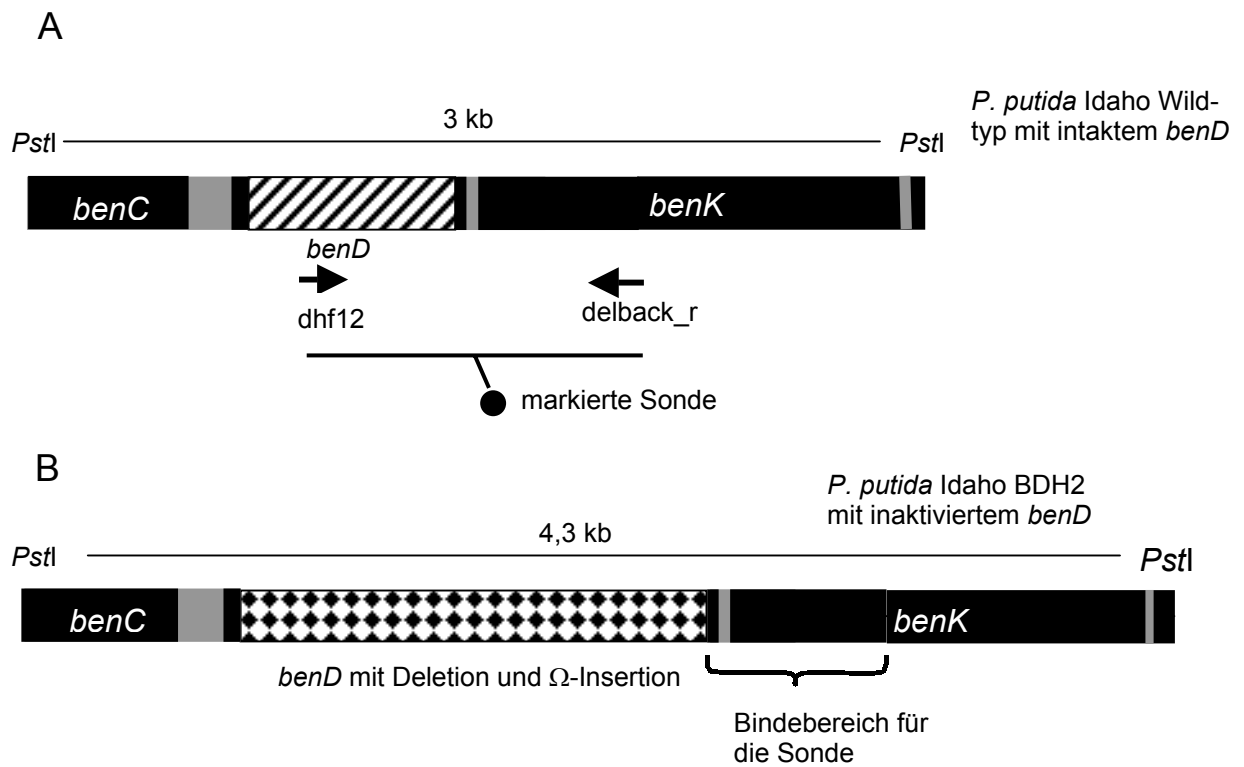


Abb. 3.11: Die beiden erwarteten Fragmente nach *Pst*I-Verdau der chromosomalen DNA wenn das intakte *benD*-Gen (A) oder das Inaktivierte (B) vorliegen. Mit den Primern *dhf12* und *delback_r* wurde ein Sonde konstruiert, die nach einer Hybridisierung an einen an die Deletion und Insertion angrenzenden Bereich bindet, und somit beide *Pst*I-Fragmente, das mit dem intakten (3 kb) und das mit dem inaktivierten *benD* (4,3 kb), aufzeigt. Läge ein Cointegrat vor, würde die Hybridisierung mit der Sonde beide Signale liefern.

3.2. Physiologische Eigenschaften der Doppelmutante von *P. putida* Idaho

3.2.1. Umsatzexperimente mit *P. putida* Idaho BDH2

In Kap. 3.1. wurde die Konstruktion einer Doppelmutante von *P. putida* Idaho beschrieben, welche in der Toluat- und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase defekt ist. Umsatzexperimente zur Synthese von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wurden mit Toluol, Benzylalkohol oder Benzoat als Edukte durchgeführt. Der Stamm wurde zunächst in Mineralmedium mit Glucose und in der folgenden Generation in Glucose und in Gegenwart des umzusetzenden Substrates kultiviert. Die Zellen, die bis zu einer OD von etwa 200-250 Kletteinheiten herangewachsen waren, wurden 1:10 in neues Mineralmedium übertragen, in das nur das umzusetzende Edukt zugegeben wurde. In Abb. 3.12 sind die Beobachtungen graphisch dargestellt.

Im Fall von Toluol als Edukt wurde dieses nicht stöchiometrisch zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umgesetzt. Aus etwa 5 mM Toluol entstanden lediglich 2 mM (40 %) Produkt. Benzylalkohol und Benzoat wurden dagegen nahezu vollständig zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umgesetzt. In allen drei Experimenten ist jedoch zu beobachten, dass die Konzentration des gebildeten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiols etwa 4 Tage konstant bleibt, dann aber entgegen den Erwartungen weiter abgebaut wird.

Benzoat wurde wesentlich später als Toluol oder Benzylalkohol vollständig abgebaut. Möglicherweise liegt die Ursache in der Transkriptionsregulation des Abbaus. Toluol und Benzylalkohol sind Effektoren von XylR, dem Regulator des upper-Operons, und des Regulators des *meta*-Operons XylS. XylR erhöht das Niveau der *xyIS*-mRNA um das 25fache (Marqués und Ramos, 1993).

Der Umsatz von Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol erfolgte zweistufig. Wie in Abb. 3.12C gezeigt, konnte zunächst ein unvollständiger, stöchiometrischer Umsatz innerhalb von zwei Tagen beobachtet werden. In den darauffolgenden 6 Tagen verlangsamte sich der Umsatz. In der Zeit zwischen 8 und 10 Tagen fand schließlich ein schneller, quantitativer Umsatz des restlichen Benzoats statt. Auffällig ist zudem, dass zum Zeitpunkt des Übertragens in frisches Medium in der Vorkultur bereits große Mengen an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gebildet waren, was sich auch im vorhandenen Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu Beginn des in Abb. 3.12C gezeigten Umsatzexperiment darlegt. Dagegen kann in der Vorkultur des Umsatzes von Toluol und Benzylalkohol nur wenig oder gar kein Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gebildet worden sein.

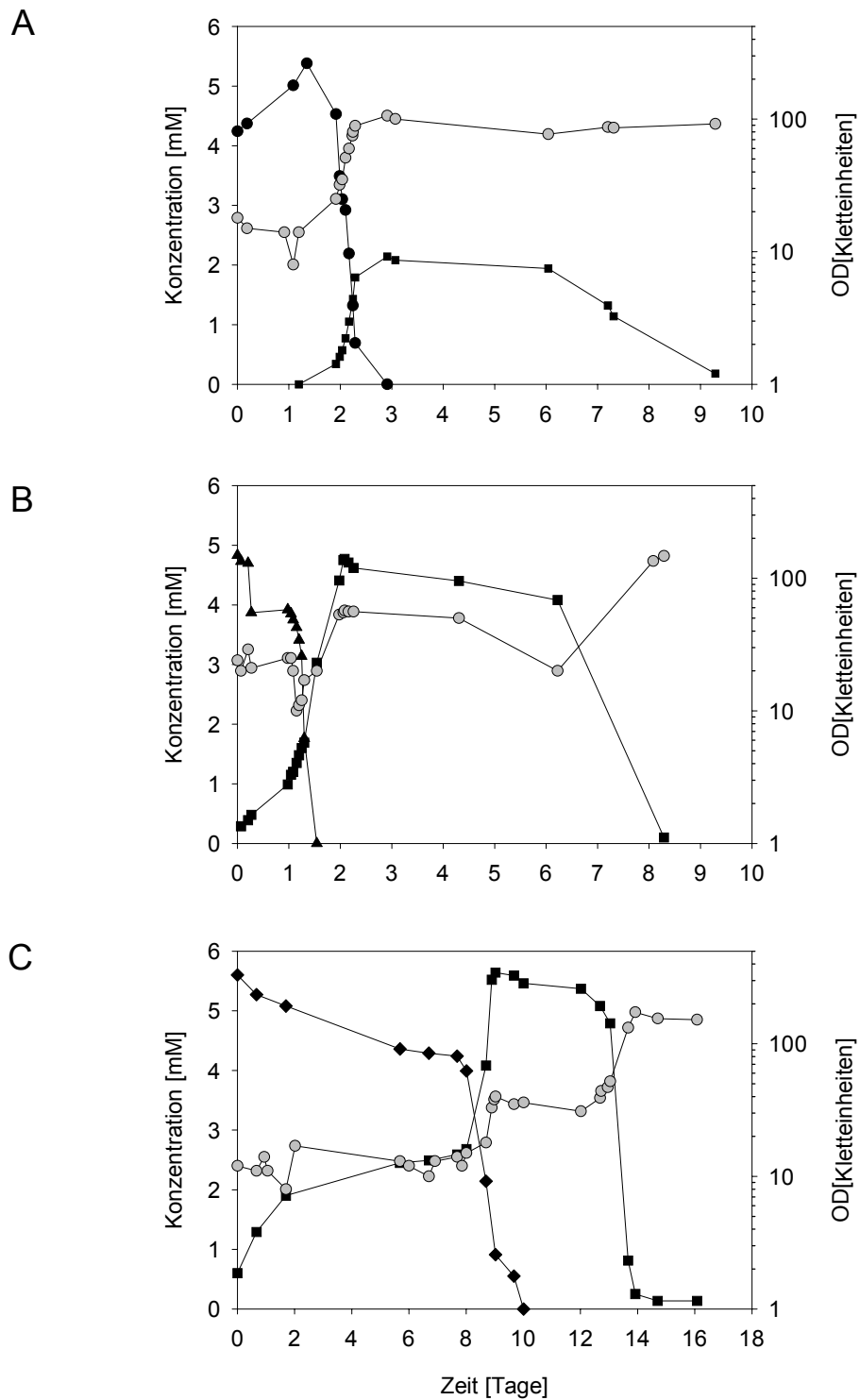


Abb. 3.12: Umsatz von Toluol (A), Benzylalkohol (B) und Benzoat (C) zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mit Zellen von *P. putida* Idaho BDH2. Die Zellen wurden mit Glucose als Wachstums substrat in Anwesenheit des umzusetzenden Eduktes kultiviert. Nach der Wachstumsphase wurde 1:10 in frisches Mineralmedium ohne Glucose übertragen, in dem der gezeigte Umsatz des eingesetzten Eduktes stattfand.

—●— Toluol, —▲— Benzylalkohol, —◆— Benzoat, —■— Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol, —●— OD

Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist eine längere lag-Phase mit Benzoat als mit Toluol und Benzylalkohol. Die erste Umsatzphase (bis 2 Tage) beruht möglicherweise auf dem noch induzierten Zustand der Zellen aus der Vorkultur. Diese unterschied sich von der Hauptkultur nur darin, dass zusätzlich Glucose als Wachstumssubstrat angeboten wurde. Zum Zeitpunkt des Übertragens der Zellen in frisches Medium sollte die angebotene Glucose aus der Vorkultur verbraucht sein. Ob Glucose jedoch einen beschleunigenden Effekt auf den Umsatz von Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol ausübt, wurde nicht verfolgt.

In allen drei Umsatzexperimenten war eine Zunahme der optischen Dichte während des weiteren Umsatzes zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu beobachten, die im Fall des Ansatzes von Toluol als Substrat beträchtlich größer war als mit Benzylalkohol oder Benzoat (Tab. 3.1). Mit Toluol entsprach die Biomassezunahme etwa 90 Kletteinheiten, mit Benzylalkohol und Benzoat nur etwa 20 bis 30 Kletteinheiten (Ursache s. Kap.3.2.3.). Die größere OD-Zunahme mit Toluol deutete darauf hin, dass neben der Oxidation der Methylgruppe noch ein zweiter produktiver Abbauweg für Toluol in *P. putida* Idaho existiert, oder Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gleichzeitig zu seiner Bildung weiter umgesetzt wird. Untermauert wird diese Annahme durch die Betrachtung der exponentiellen Phase des Wachstums. Bei rechnerischer Betrachtung der Umsatzphase von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol kann festgestellt werden, dass Toluol schneller verbraucht als Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gebildet wurde. Es zeigte sich, dass nur 0,22 mmol Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol pro Stunde entstehen, während in der gleichen Zeit 0,49 mmol Toluol verbraucht werden (s. auch Tab. 3.1). Mit diesem Verhältnis liegt die rechnerische Endausbeute an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol bei etwa 45 %. Das stimmt mit dem Umsatz aus Abb. 3.12A überein. Mehr als 50 % des erwarteten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiols werden entweder gar nicht erst gebildet oder können weiter umgesetzt werden. Mit den beiden anderen Substraten, Benzylalkohol und Benzoat, wurde nicht mehr Substrat verbraucht als Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gebildet wird (Tab. 3.1).

Mit Toluol als Substrat betrug die Wachstumsrate $0,15 \text{ h}^{-1}$ (Wildtyp: $0,6 \text{ h}^{-1}$). Aufgrund der geringen Zunahme der optischen Dichte und des Fehlers, der durch die Messung mit dem Klettphotometer zu erwarten war, konnte für die beiden anderen Substrate die Wachstumsrate nur grob abgeschätzt werden. Die Abschätzung zeigt jedoch, dass die Zellen aus diesen Kulturen langsamer wuchsen, als Zellen, die Toluol verstoffwechselten. Das zeigt, dass ein weiterer, produktiver Abbauweg für das Substrat Toluol nahe liegt.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Daten, die aus der Umsatzphase zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol durch die Doppelmutante von *P. putida* Idaho gewonnen wurden

| Substrat | Wachstumsrate μ [h ⁻¹] | Verdopplungs- zeit t_d [h] | Abnahme des Substrates [mmol/h] | Bildung von Benzoat- <i>cis</i> -1,2- dihydrodiol [mmol/h] | OD-Zunahme [Kletteinheiten] |
|---------------|--|------------------------------------|--|--|--------------------------------|
| Toluol | 0,15 | 4,6 | 0,49 | 0,22 | 90 |
| Benzylalkohol | ca. 0,1 | ca. 6,9 | 0,23 | 0,22 | 30 |
| Benzoat | ca. 0,1 | ca. 6,9 | 0,20 | 0,20 | 20 |

Den ermittelten Daten liegen die Schaubilder aus Abb. 3.12 zugrunde. Betrachtet wurde bei Toluol der Zeitraum von 2-3 Tage, bei Benzylalkohol der Zeitraum von 1-2 Tage und bei Benzoat der Zeitraum von 9-10 Tage.

Die Tatsache, dass auch in den Umsätzen mit Benzylalkohol und Benzoat eine, wenn auch deutlich geringere, OD-Zunahme während des Umsatzes zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol registriert wurde, deutet darauf hin, dass die Bilanzlücke nicht allein einem zweiten Abbauweg von Toluol anzulasten ist. Da Benzylalkohol und Benzoat Metabolite eines gemeinsamen katabolen Weges sind und das Wachstum mit beiden Substraten beobachtet wird, muss die Ursache für dieses auf einer teilweisen Verwertung von Benzoat oder Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol beruhen. Denkbar ist eine Enzymaktivität, die die Funktion der inaktivierten Enzyme übernimmt. Gestützt wird dieser Verdacht durch die Tatsache, dass bei Betrachtung der Phase nach dem Umsatz zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol dieses vier Tage nach seiner Entstehung wieder verschwindet. In den folgenden Abschnitten werden die Untersuchungen, die Aufschluss über den zweiten produktiven Abbauweg von Toluol und einer dritten Aktivität einer Toluol- oder Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase geben sollen, behandelt.

3.2.2. Untersuchungen zu alternativen mikrobiellen Abbauwegen von Toluol

Die Umsatzexperimente aus Kapitel 3.2.1. zeigten, dass *P. putida* Idaho Toluol möglicherweise über einen weiteren Abbauweg als zu der initialen Methylgruppenoxidation abbauen kann. Abb. 3.13 soll einen Überblick über in der Literatur beschriebene Wege geben. Toluol kann neben der Methylgruppenoxidation durch Mono- oder Dioxygenasen am aromatischen Ring angegriffen werden. Ein solcher Angriff durch eine Dioxygenase ist für den Stamm *P. putida* F1 beschrieben. Toluol wird dabei direkt unter Bildung eines *cis*-2,3-Dihydrodiols dioxygeniert. Der Angriff der Monooxygenasen der Stämme *B. cepacia* G4, *B. pickettii* PKO1 oder *P. mendocina* KR1 in *o*-, *m*- oder *p*-Stellung zur Methylgruppe führt zu den entsprechenden Kresolen.

Um zu überprüfen, ob im Medium einer mit Toluol wachsenden Kultur von *P. putida* Idaho BDH2 Metabolite auftreten, die einen Hinweis auf einen zweiten Toluolabbauweg geben könnten, wurde mit dem Überstand einer solchen Kultur eine Festphasenextraktion durchgeführt (Kap. 2.8.). Nachdem das im Überstand vorhandene Toluol mittels Begasung aus der Lösung getrieben wurde, wurde das angesäuerte Medium durch eine ISOLUTE ENV⁺-Säule gesaugt, wobei die ungeladenen Metabolite zurückgehalten werden. Mit einem geringen Volumen Methanol konnten diese eluiert und gleichzeitig aufkonzentriert werden. Die Analyse mittels HPLC ergab, dass sich im Kulturüberstand nur Toluol, Benzylalkohol, Benzaldehyd, und Benzoat befanden, die den für diesen Organismus beschriebenen Weg der Methylgruppenoxidation bestätigten. Des Weiteren konnte Phenol detektiert werden, was aber auf den spontanen Umsatz von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol unter sauren Bedingungen zurückzuführen ist.

Das Nichtauftreten anderer Metabolite beweist jedoch nicht, dass sie nicht vorhanden sind. Durch die Blockierung der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase ist zu erwarten, dass sich die Metabolite des Weges über die Methylgruppenoxidation akkumulieren. Sie sind also in höheren Konzentrationen zu erwarten, als etwaige Abbauprodukte eines uneingeschränkten Weges. Möglicherweise lagen solche Metabolite in nicht nachweisbaren Konzentrationen vor. Aus diesem Grund wurden Abbauwege von Toluol, die den aromatischen Kern durch eine Mono- oder Dioxygenase angreifen, näher untersucht.

3.2.2.1. Überprüfen von Abbauwegen mit *o*- und *m*-Kresol als Intermediate

Wie aus Abb. 3.13 ersichtlich, wird Toluol von *B. cepacia* über *o*-Kresol (Shields et al., 1989) und von *B. pickettii* PK01 über *m*-Kresol (Kaphammer et al., 1991) abgebaut. Es wurde überprüft, ob diese beiden Metabolite auch für *P. putida* Idaho als Substrate in Frage kommen.

Zellen von *P. putida* Idaho BDH2 wurden mit 5 mM Glucose angezüchtet, in Mineralmedium mit 5 mM Glucose und 2 mM *o*- bzw. *m*-Kresol übertragen (1:10), und nach dem Wachstum in 2 mM *o*- bzw. *m*-Kresol als alleiniges Substrat überimpft (1:10). Innerhalb von 4 Tagen Inkubation auf einem Rotationsschüttler bei 30 °C konnte keine Zunahme der optischen Dichte beobachtet werden. Die Zellen neigten zudem zu Flockenbildung, was auf eine toxische Wirkung der Kresole hindeutete.

Untersuchungen von Cruden et al. (1992) zeigten ebenfalls, dass *P. putida* Idaho *o*-Kresol nicht verwerten kann, jedoch konnte der Stamm mit *m*-Kresol wachsen. Das Wachstum mit *m*-Kresol konnte in vorliegender Arbeit nicht bestätigt werden. Übereinstimmend damit

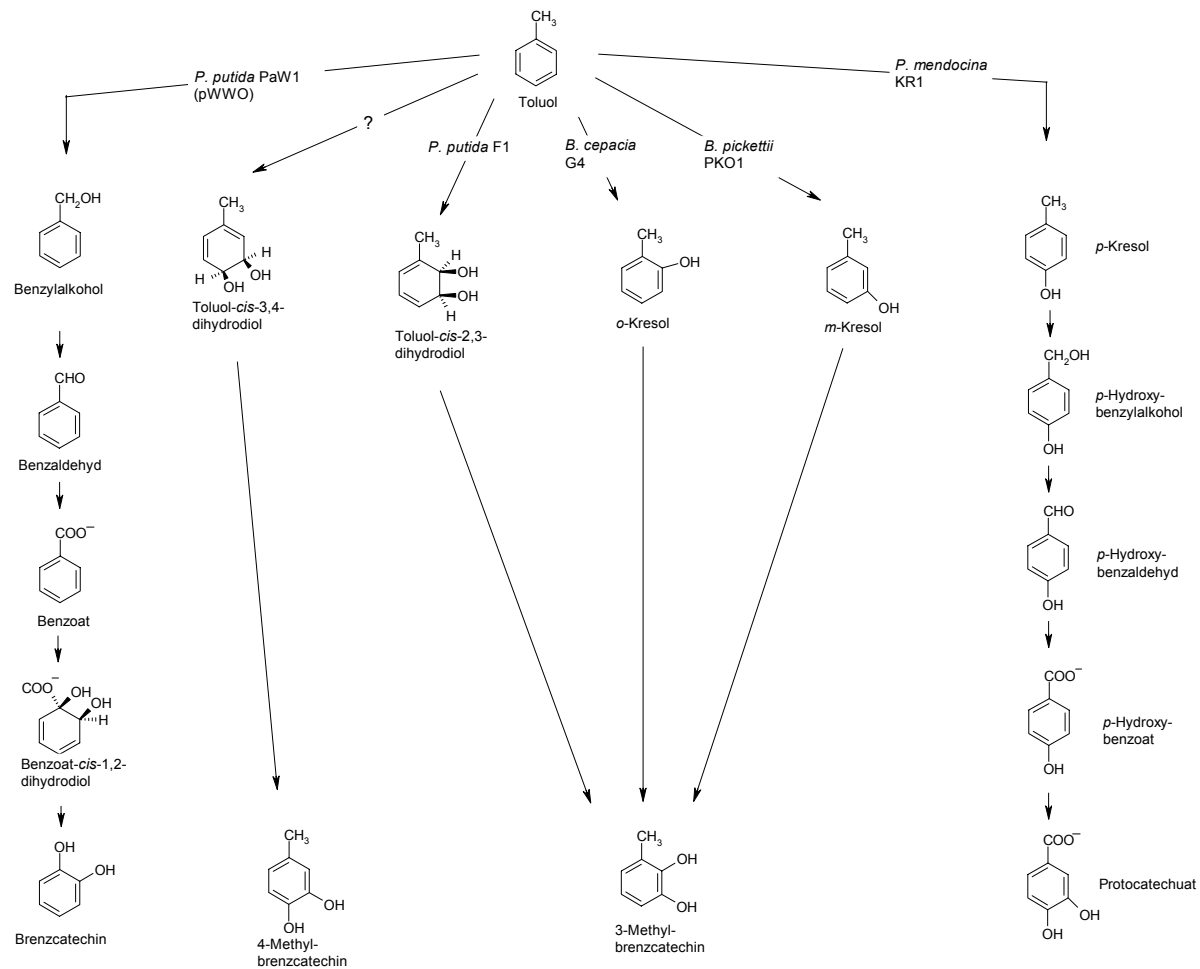


Abb. 3.13: Übersicht über beschriebene und denkbare Abbauwege für Toluol. Verändert nach Mikesell et al. (1993). Für den mit Fragezeichen versehenen Weg gibt es keine Referenzen.

zeigten polarographische Untersuchungen von Cruden et al. (1992), dass Zellen, die mit Toluol gewachsen waren, Kresole und Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol nicht oxidierten.

Es wurde polarographisch überprüft, ob Zellen von *P. putida* Idaho BDH2, die mit Toluol induziert waren, in Anwesenheit von 1 mM *o*- und *m*-Kresol einen erhöhten Sauerstoffverbrauch zeigen. Dies war nicht zu beobachten. Die Aussagekraft dieses Befundes wird jedoch eingeschränkt, da die Positivkontrolle mit Toluol ebenfalls keine Sauerstoffzehrung zeigte.

3.2.2.2. Überprüfung von Abbauwegen mit *p*-Kresol als Schlüsselmetabolit

P. mendocina KR1 baut Toluol über *p*-Kresol ab (Whited und Gibson, 1991). Von Cruden et al. (1992) wurde erkannt, dass *P. putida* Idaho prinzipiell *p*-Kresol verwerten kann. Wenn die Zellen mit Toluol induziert wurden, war keine Verwertung von *p*-Kresol möglich bzw. es wurde kein Umsatz beobachtet. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Doppelmutante von *P. putida* Idaho aufgrund des blockierten Weges der Methylgruppen-Oxidation eine im Wild-

stamm nicht aktive Monooxygenase induziert, die dann Toluol zu *p*-Kresol umsetzen und dieses als Wachstumssubstrat erschließen könnte.

Für die Bestimmung des Wachstums mit den Substraten *p*-Kresol, *p*-Hydroxybenzoat und Protocatechuat wurde wie mit *o*- und *m*-Kresol verfahren. Alle drei Kulturen zeigten mit *p*-Kresol, *p*-Hydroxybenzoat oder Protocatechuat als einziger C-Quelle eine Zunahme der optischen Dichte. Im Fall von *p*-Kresol als Substrat wurde während der OD-Zunahme die Konzentration des Substrats mit Hilfe der HPLC bestimmt. Abb. 3.14 zeigt, dass die Zunahme der optischen Dichte nicht mit der *p*-Kresolabnahme korrelierte. Eine Erklärung für das Wachstum der Zellen ist die Verwertung von Ethanol, da die Stammlösung von *p*-Kresol (200 mM) 16 % Ethanol als Lösungsvermittler enthielt. In der Kultur mit 2 mM *p*-Kresol waren also zusätzlich 0,16 % (v/v) Ethanol (27 mM) enthalten, das offenbar als C-Quelle genutzt wurde. In einer Kontrolle konnte der Stamm mit einer entsprechenden Ethanollösung ohne *p*-Kresol kultiviert werden.

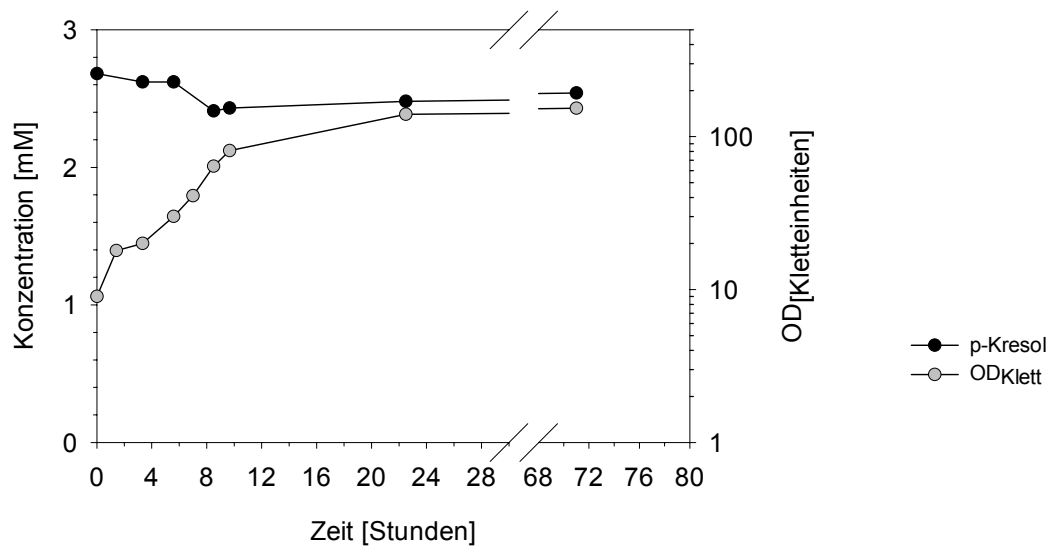


Abb. 3.14: OD-Zunahme beim Wachstum von *P. putida* Idaho BDH2 in Mineralmedium mit in Ethanol gelöstem *p*-Kresol. Die Zellen wurden 1:10 aus einer Vorkultur angeimpft, in welcher wie im abgebildeten Ansatz das in Ethanol gelöste *p*-Kresol als Substrat angeboten wurde.

Mit der Sauerstoffelektrode konnte kein erhöhter Sauerstoffverbrauch von toluolinduzierten *P. putida* Idaho BDH2-Zellen festgestellt werden, wenn *p*-Kresol oder *p*-Hydroxybenzoat zugegeben wurde. Das ist ein Hinweis darauf, dass der zweite Abbauweg von Toluol in *P. putida* Idaho nicht über *p*-Kresol erfolgt, was auch mit den Untersuchungen von Cruden et

al. (1992) übereinstimmt. Der Verbrauch von Sauerstoff nach der Zugabe von Protocatechuat wurde nicht getestet.

Zur Auffindung einer Toluol-4-Monooxygenase wurden PCR-Experimente durchgeführt. Anhand der Sequenz bekannter Monooxygenasen aus *P. mendocina* KR1 und *Xanthobacter* sp. Py2, die die Reaktion von Toluol zu *p*-Kresol durchführen können, wurden Primer entworfen. In *P. mendocina* handelt es sich um ein Protein, das aus fünf Komponenten besteht (TmoABCDE, Yen et al., 1991). Die Primer wurden von *tmoA* und *tmoE* aus *P. mendocina* KR1 unter Berücksichtigung der Codon-Usage Tabelle für *P. putida* abgeleitet und degeneriert (*tmoA*-degen-for, *tmoA*-degen-rev, *tmoE*-degen-for und *tmoE*-degen-rev; Abb. 3.15).

Primer *tmoA*-degen-for:

Proteinsequenz: M A M H P R K D W (TmoA)
 genet. Code (*tmoA*): 5'- G GCG ATG CAC CCA CGT AAA GAC T -3' 25
tmoA-degen-for: 5'- G GCS ATG CAY CCV CGY AAR GAC T -3'

Primer *tmoA*-degen-rev:

Proteinsequenz: Q F L G L A A (TmoA)
 genet. Code (*tmoA*): 5'- CAG TTT CTT GGG TTG GCG GCA G -3' 631
tmoA-degen-rev: 5'- C RGC SGC CAA VCC MAG RAA CTG G -3'

Primer *tmoE*-degen-for:

Proteinsequenz: S H L A E M R K K (TmoE)
 genet. Code (*tmoE*): 5'- C CAC CTG GCC GAA ATG AGA AAG AA -3' 62
tmoE-degen-for: 5'- C CAC CTG GCC GAR ATG MGM AAG AA -3'

Primer *tmoE*-degen-rev:

Proteinsequenz: R C Y S P L R Y L (TmoE)
 genet. Code (*tmoE*): 5'- GC TGT TAT TCC CCG TTG CGC TAT C -3' 382
tmoE-degen-rev: 5'- G YTA GCG CAY CGG SGA YTA YCA GC -3'

Abb. 3.15: Abgeleitete Primersequenzen aus der Sequenz der Toluol-4-Monooxygenase aus *P. mendocina* KR1 (M65106). Die Nummerierung bezieht sich auf das Startcodon des betreffenden Gens. Dargestellt sind die Protein- und Nukleotidsequenzen von TmoA und TmoE und die Sequenzen der abgeleiteten Primer. Das erwartete Genprodukt des Primerpaares *tmoA*-degen-for und *tmoA*-degen-rev ist 629 bp, das des Primerpaares *tmoE*-degen-for und *tmoE*-degen-rev 344 bp groß.

Von der Alken-Monooxygenase aus *Xanthobacter sp.* Py2, für welche beschrieben ist, dass sie eng mit der Toluol-4-Monooxygenase verwandt ist, ist das Gen *xamoA* bekannt (Zhou et al., 1998). Auch aus dieser Sequenz wurden degenerierte Primer abgeleitet, bei deren Sequenz die bevorzugten Codons in *P. putida* berücksichtigt wurden (*xamoA*-for und *xamoA*-rev, Abb. 3.16).

Das PCR-Produkt des Primerpaars *tmoA*-degen-for und *tmoA*-degen-rev sollte in *P. mendocina* 629 bp, das von *tmoE*-degen-for und *tmoE*-degen-rev 344 bp und das von *xamoA*-for und *xamoA*-rev in *Xanthobacter* 784 bp groß sein. Eine PCR mit dem Primerpaar *tmoA*-degen-for und *tmoA*-degen-rev lieferte mit Template-DNA aus *P. putida* Idaho ein Fragment entsprechender Größe. Für das Primerpaar für *tmoE* konnte kein Produkt mit der DNA aus *P. putida* Idaho amplifiziert werden. Die Kontrolle mit DNA aus *P. mendocina* KR1 zeigte das erwartete Fragment. Für das aus *xamoA* entworfene Primerpaar konnte in *P. putida* Idaho ebenfalls kein PCR-Produkt der erwarteten Größe amplifiziert werden.

Primer *xamoA*-for:

Proteinsequenz: V R A K A Y E K L (XamoA)
 genet. Code (*xamoA*): 5'- TC CGC GCC AAG GCC TAT GAG AAG C -3' 253

xamoA-for: 5'- TS CGC GCC AAG GCC TAY GAR AAG C -3'

Primer *xamoA*-rev:

Proteinsequenz: H I G T W F W R (XamoA)
 genet. Code (*xamoA*): 5'- CAC ATC GGC ACC TGG TTC TGG CG -3' 1013

xamoA-rev: 5'- CGC CAG AAC CAG GTG CCG ATS TG -3'

Abb. 3.16: Abgeleitete Primersequenzen aus der Sequenz der Alken-Monooxygenase aus *Xanthobacter sp.* Py2 (AJ006979). Die Nummerierung bezieht sich auf das Startcodon von *xamoA*. Dargestellt sind die Regionen von XamoA, die zum Entwurf der Primer ausgewählt wurden, und die Sequenzen der Primer. Das erwartete Genprodukt des Primerpaares ist 784 bp groß.

Das PCR-Produkt mit den Primern für *tmoA* wurde aus dem Gel eluiert, in einen T-Vektor kloniert und sequenziert. Das nicht klonierte Fragment wurde ebenfalls sequenziert. Es stellte sich heraus, dass es sich bei dem PCR-Produkt aus *P. putida* Idaho nicht um ein Genfragment einer Monooxygenase handelte. Der Datenbankvergleich erbrachte für 75 Aminosäuren eine Homologie zu einem hypothetischen Protein aus *P. aeruginosa* PA01 (Gen *PA4066*). Dabei traten 66 % identische Positionen auf.

Da *P. putida* Idaho BDH2 offensichtlich in der Lage ist, *p*-Hydroxybenzoat und Protocatechuat als Wachstumssubstrat zu verwerten, wurde mit Hilfe photometrischer Tests (Kap. 2.7.5. und 2.7.6.) überprüft, ob diese beiden Substrate auch von toluolinduzierten Zellen umgesetzt werden.

Es konnte mit einem Rohextrakt aus Zellen, die mit Toluol kultiviert wurden, für die *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase eine Aktivität von 10×10^{-3} U/mg Protein bestimmt werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich jedoch auch mit einem Rohextrakt aus Zellen, die nur mit Glucose gewachsen waren. Für die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase lieferte die Analyse mittels HPLC ein klareres Ergebnis als der Test im Photometer (Nachweisgrenze 0,4 U/mg Protein). Testansätze, deren Reaktion mit Salzsäure abgestoppt und bei denen die Metabolitkonzentration mittels HPLC verfolgt wurde, zeigten keine Abnahme des eingesetzten Protocatechuats, während mit dem Rohextrakt von Zellen, die mit *p*-Hydroxybenzoat gewachsen waren, eine Abnahme des Protocatechuat-Peaks zu beobachten war.

Ein weiteres Experiment bestätigte, dass *P. putida* Idaho BDH2 keinen Abbauweg mit *p*-Kresol als Metaboliten induziert. Es wurden Umsätze mit Ruhezellen verglichen, die einerseits mit Toluol andererseits mit einem *p*-Kresol/Ethanol-Gemisch kultiviert wurden.

Kulturen, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden durch Zentrifugation geerntet und in frischem Phosphatpuffer mit Toluol bzw. *p*-Kresol versetzt. In Abb. 3.17 ist zu sehen, dass Zellen, die mit Toluol kultiviert wurden, dieses innerhalb von weniger als zwei Stunden vollständig abbauten und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol akkumulierten. Das zum Vergleich angebotene *p*-Kresol wurde jedoch nicht umgesetzt. Zellen, die mit dem *p*-Kresol/Ethanol-Gemisch angezüchtet wurden, verwerteten im betrachteten Zeitraum weder Toluol noch *p*-Kresol. Dass *p*-Kresol nicht verwertet wird, passt nicht zu den Ergebnissen von Cruden et al. (1992), die eine Mineralisierbarkeit von *p*-Kresol durch *P. putida* Idaho feststellten.

p-Kresol wurde von Zellen, die mit einem *p*-Kresol/Ethanol-Gemisch kultiviert wurden, nicht verwertet. Trotzdem liefert die Nichtverwertung von *p*-Kresol durch die toluolinduzierten Zellen einen Hinweis, dass das Wachstum der Zellen mit Toluol nicht durch eine Monooxygenierung von Toluol zu *p*-Kresol initiiert wird. Möglicherweise findet der Abbau von *p*-Kresol nur sehr langsam statt.

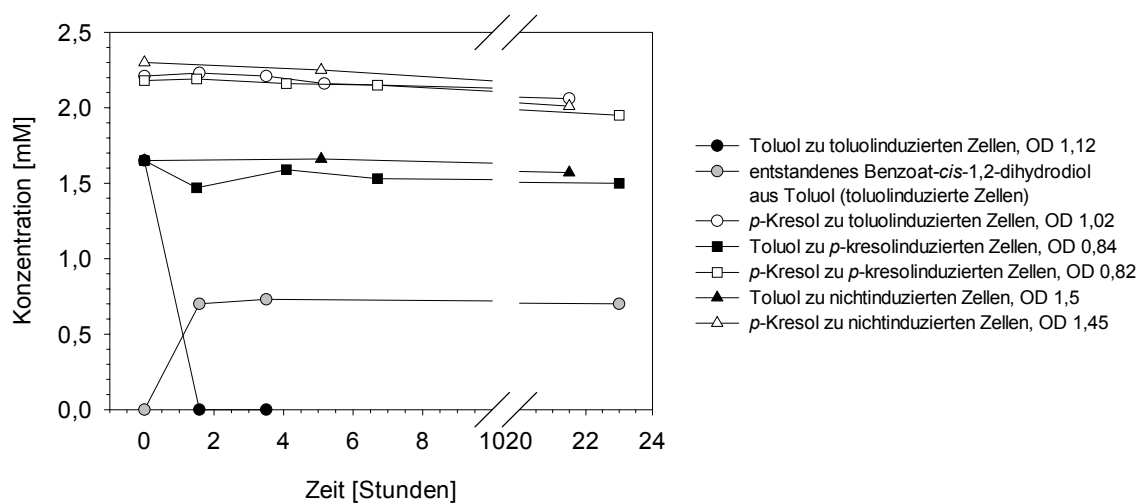


Abb. 3.17: Umsatz von Toluol bzw. *p*-Kresol mit Zellen, die zum Zeitpunkt der Verwendung für die gezeigten Umsatzexperimente gerade mit Toluol, dem *p*-Kresol/Ethanolgemisch bzw. mit Glucose ohne zusätzliche C-Quelle wuchsen. Die optischen Dichten wurden bei 546 nm bestimmt.

3.2.2.3. Dioxygenierung von Toluol

Im Schema von Abb. 3.13 sind als weitere mögliche Abbauege von Toluol direkte Dioxygenierungen von Toluol aufgeführt. Während Toluol von *P. putida* F1 bekanntlich in 2,3-Stellung dioxygeniert wird, gibt es in der Literatur keine Hinweise auf die theoretisch denkbare Dioxygenierung in 3,4-Stellung. Das durch *P. putida* F1 entstandene Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol wird durch eine Dehydrogenase zu dem Metaboliten 3-Methylbrenzcatechin rearomatisiert.

Mit der Sauerstoffelektrode wurde eine hohe Sauerstoffzehrung mit den beiden Metaboliten 3- und 4-Methylbrenzcatechin festgestellt. Das ist allerdings noch kein Beweis auf einen Abbaueg, der mit einer direkten Dioxygenierung von Toluol eingeleitet wird. Bekanntlich dioxygeniert auch die gewöhnliche Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase methylysubstituierte Brenzcatechine (Williams und Murray, 1974; Assinder und Williams, 1990; Harayama und Rekik, 1990 und 1993; Polissi und Harayama, 1993).

Auf genetischer Ebene wurde nach Genen, die für eine Toluol-*cis*-2,3-Dioxygenase und eine Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol-Dehydrogenase codieren könnten, gesucht. Für die Toluol-2,3-Dioxygenase wurden die Primerpaare todC1-for und todC2-rev, todA-rev und todB-for ent-

sprechend der Sequenz von *P. putida* F1 entworfen (Abb. 3.18). Das Enzym besteht aus den vier Untereinheiten TodABC1C2, die in der Reihenfolge *todC1C2BA* codiert vorliegen (Zylstra und Gibson, 1989). Für das Primerpaar *todC1-for* und *todC2-rev* wurde ein 1757 bp großes Fragment und für das Paar *todA-rev* und *todB-for* ein 1463 bp großes Fragment erwartet. Für beide Primerpaare konnte in *P. putida* Idaho kein entsprechendes Fragment amplifiziert werden. Mit dem ersten Primerpaar entstand kein PCR-Produkt, mit dem zweiten ein etwa 950 bp großes Fragment. Dies entsprach damit nicht der erwarteten Größe von 1463 bp. Die positive Kontrolle mit DNA aus dem Stamm *P. putida* F1 lieferte Fragmente der erwarteten Größe.

Primer *todC1-for*:

Proteinsequenz: I D P R I Y T (TodC1)
todC1-for: 5'- ATC GAT CCG CGC ATT TAT ACC G -3' 111

Primer *todC2-rev*:

Proteinsequenz: A E A E G E Y E (TodC2)
 genet. Code (*todC2*): 5'- GCA GAG GCA GAA GGG GAG TAC GAA -3' 384

todC2-rev: 5'- TTC GTA CTC CCC TTC TGC CTC TGC -3'

Primer *todB-for*:

Proteinsequenz: E M Q R Y E G (TodB)
todB-for: 5'- GAG ATG CAG CGC TAC GAA GGC -3' 66

Primer *todA-rev*:

Proteinsequenz: A R L A D L S (TodA)
 genet. Code (*tmoA*): 5'- GCA CGG CTG GCA GAT CTT TCA -3' 1185

todA-rev: 5'- TGA AAG ATC TGC CAG CCG TGC -3'

Abb. 3.18: Darstellung der Primer *todC1-for*, *todC2-rev*, *todB-for* und *todA-rev*. Gezeigt ist die zugehörige Proteinsequenz aus dem entsprechenden Protein von *P. putida* F1 und im Fall der reversed- Primer die der Proteinsequenz entsprechende Nukleinsäuresequenz. Die Nummerierung bezieht sich auf das Startcodon des betreffenden Gens. Das erwartete Genprodukt des Primerpaares *todC1-for* und *todC2-rev* ist 1757 bp, das des Primerpaares *todB-for* und *todA-rev* 1463 bp groß.

Für die Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol-Dehydrogenase wurden ebenfalls Primer entworfen. Die Primer *todD-for* und *todD-rev* wurden entsprechend der Sequenz von *todD* aus *P. putida* F1 gewählt, die Primer 2,3-DHdegen-for, 2,3 DH-for und 2,3 DH-rev wurden entsprechend kon-

servierter Bereiche der 2,3-Dihydrodiol-Dehydrogenasen aus *P. putida* F1, *Ralstonia sp.* JS705, *P. fluorescens* IP01 und dem Plasmid pNL1 aus *N. aromaticivorum* F199 unter Berücksichtigung der Codon-Usage Tabelle für *P. putida* entworfen (Abb. 3.19). Das Primerpaar todD-for und todD-rev liefert in *P. putida* F1 ein 763 bp großes Produkt, mit dem degenerierten Primerpaar 2,3-DHdegen-for und 2,3-DH-rev wurde ein 179 bp großes Produkt, und mit dem ebenfalls degenerierten Primerpaar 2,3 DH-for und 2,3-DH-rev wurde ein 155 bp großes Produkt erwartet. Nur mit den entsprechend *todD* gewählten Primern konnte ein etwas kürzeres Fragment als in *todD* erwartet amplifiziert werden. Dieses wurde aus dem Gel eluiert und sequenziert. 82 Aminosäuren wiesen eine Ähnlichkeit (bis zu 82 % identische Positionen) mit Riboflavinbiosynthese-Proteinen auf.

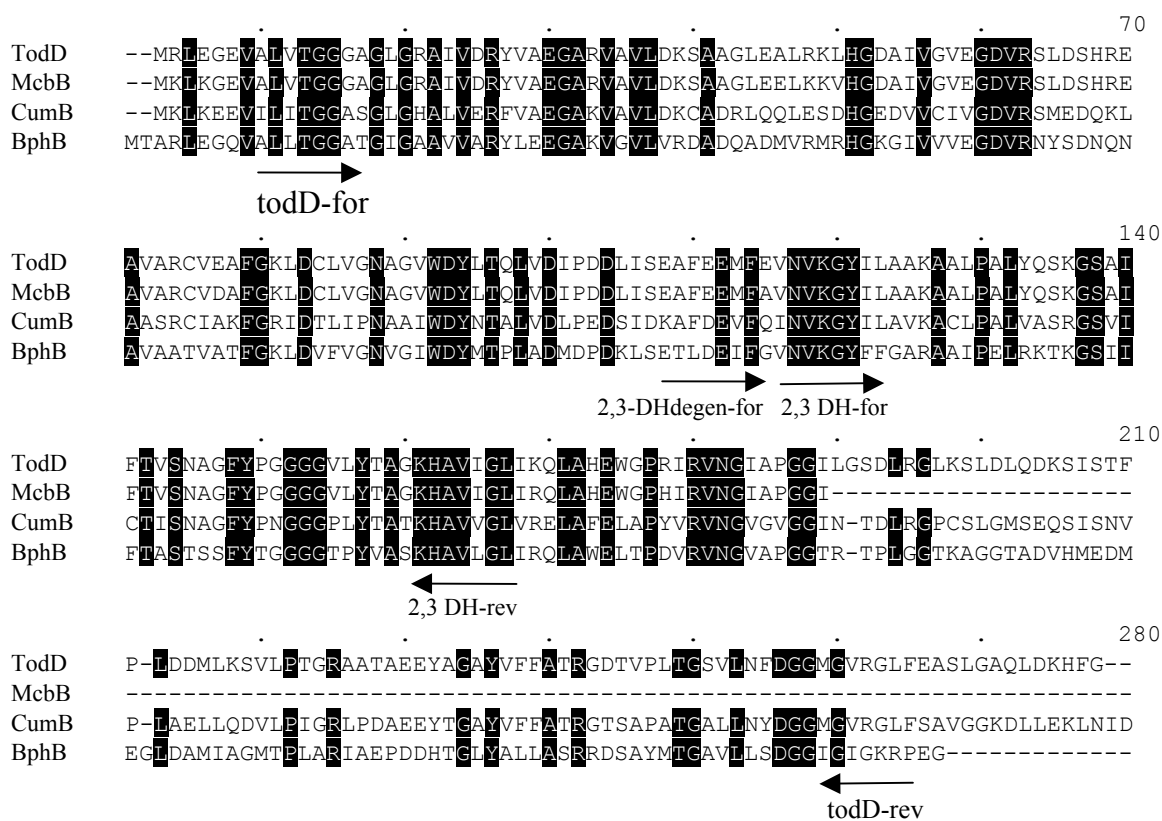


Abb. 3.19: Sequenzen von Dihydrodiol-2,3-Dehydrogenasen, die zum Entwurf von Primern herangezogen wurden. Identische Aminosäuren sind unterlegt. Die Pfeile stellen die Region dar, aus der die Primer abgeleitet wurden. TodD: *P. putida* F1, P13859, Zylstra und Gibson, (1988); McbB: *Ralstonia sp.* JS705, AJ006307, van der Meer et al. (1998); CumB: *P. fluorescens* IP01, D37828, Aoki et al. (1996); BphB: *N. aromaticivorum* F199, pNL1 NC_002033, Romine et al. (1998).

Die abgeleiteten Primersequenzen sind in Abb. 3.20 dargestellt.

Primer todD-for:

Proteinsequenz: A L V T G G G A (TodD)
 todD-for: 5'- C TTG GTG ACA GGC GGT GGC G -3' 43

Primer todD-rev:

Proteinsequenz: M G V R G L F (TodD)
 genet. Code (*todD*): 5'- TG GGC GTG CGT GGC TTG TTC -3' 786
 todD-rev: 5'- GAA CAA GCC ACG CAC GCC CA -3'

Primer 2,3-DHdegen-for:

Proteinsequenz: E A F E E M F (TodD und McbB)
 K A F D E V F (CumB)
 Primer: 5'-RAR GCS TTY GAS GAR RTG TTY -3'

Primer 2,3 DH-for:

Proteinsequenz: V N V K G Y I (TodD und McbB)
 I N V K G Y I (CumB)
 V N V K G Y F (BphB)
 Primer: 5'-RTS AAY GTB AAG GGB TAY WTY -3'

Primer 2,3 DH-rev:

Proteinsequenz: K H A V I G L (TodD und McbB)
 K H A V V G L (CumB)
 K H A V L G L (BphB)
 genet. Code (*todD*): 5'-AAA CAT GCC GTG ATT GGA TTG -3' 495
 Primer: 5'-SAG RCC AAB SAC SGC RTG YTT -3'

Abb. 3.20: Abgeleitete Primersequenzen aus dem Proteinvergleich aus Abb. 3.19. Dargestellt sind die Proteinsequenzen, die zum Entwurf der Primer ausgewählt wurden, und die Sequenzen der Primer. Bei Nukleotidsequenzen, die sich auf *todD* beziehen, wurde die Position bezüglich des Startcodons angegeben. Mit dem Primerpaar todD-for und todD-rev wurde ein 763 bp großes Fragment, mit den Primerpaaren 2,3-DHdegen-for bzw. 2,3 DH-for und 2,3 DH-rev ein 179 bzw. 155 bp großes Produkt erwartet.

Der Stamm *P. putida* F1 baut Toluol durch direkte Dioxygenierung ab (Zylstra und Gibson, 1989). Dieser Weg wird auch für das Substrat Benzol eingeschlagen, dagegen kann *P. putida* Idaho Benzol nicht als Substrat nutzen (Cruden et al., 1992). Falls der zweite Abbauweg von Toluol in *P. putida* Idaho BDH2 tatsächlich durch direkte Dioxygenierung stattfinden würde, könnte möglicherweise eine entsprechende Dioxygenierung von Benzol erwartet werden.

Es wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase mit Toluol als Substrat geerntet, abzentrifugiert, das Pellet gewaschen und die Zellen resuspendiert. Der Umsatz wurde in 50 ml Zellsuspension mit jeweils 0,05 Volumenprozent Toluol (4,67 mM) bzw. 0,05 % (v/v) Benzol (4,48 mM) durchgeführt. Die optischen Dichten bei 546 nm betragen im Ansatz mit Toluol 2,45 und im Ansatz mit Benzol 3,0. Aus den Kolben wurden über ein Septum Proben genommen und die Konzentration der Metabolite mittels HPLC bestimmt. Schon nach 10 min war im Ansatz mit Toluol als Substrat eine deutliche „Gelbfärbung“ des Mediums sichtbar, was auf den Metaboliten Hydroxymuconatsemialdehyd hindeutet, der durch *meta*-Spaltung von Brenzcatechin entsteht. Im Ansatz mit Benzol war keine Verfärbung des Mediums auszumachen. Es zeigte sich, dass das umzusetzende Toluol nach etwa 3 Stunden abgebaut war und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol entstand. Dagegen nahm die Konzentration von Benzol auch nach längerer Inkubation (23 Stunden bzw. 1380 min) nicht ab (Abb. 3.21).

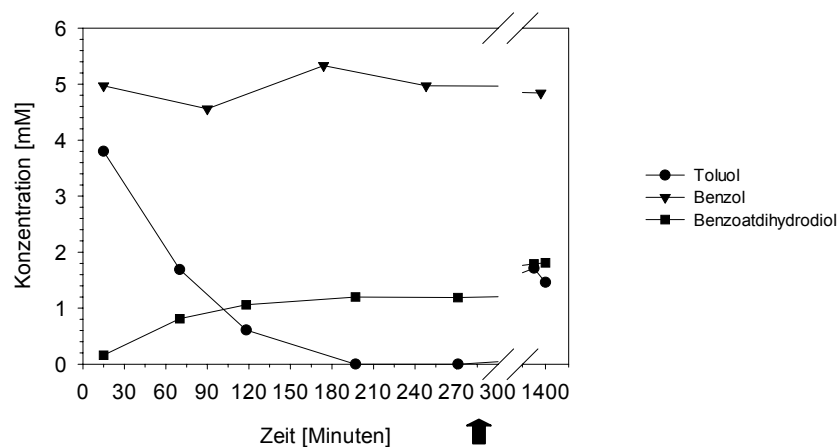


Abb. 3.21: Umsatzexperiment von Toluol und Benzol mit *P. putida* Idaho BDH2. Nach 285 min wurde im Ansatz mit Toluol mit 0,05 Volumenprozent Toluol nachgefüttert (Pfeil).

Offensichtlich wird Benzol von toluolinduzierten Zellen von *P. putida* Idaho BDH2 nicht umgesetzt. Dieser Befund schließt eine direkte Ringdioxygenierung von Toluol in *P. putida* Idaho BDH2 zwar nicht aus, jedoch zusammen mit den Ergebnissen der PCR-Experimente liefert dieses Ergebnis einen weiteren Hinweis dafür, dass Toluol nicht von einer Dioxygenase am aromatischen Ring angegriffen wird.

3.2.3. Restaktivität einer Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase trotz ausgeschalteter Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Gene

Wie in Kap. 3.2.1. gezeigt wurde, beruht das Wachstum von *P. putida* Idaho BDH2 mit Toluol als Substrat möglicherweise auf einer weiteren Aktivität der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase. Der Stamm bildet offensichtlich auch mit Benzylalkohol und Benzoat als Substrat während des Umsatzes zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol (Abb. 3.12) Biomasse. Desweiteren wird bei längerer Kultivierung das gebildete Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wieder abgebaut. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der Stamm *P. putida* Idaho BDH2 auf eine weitere Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Aktivität hin untersucht. Auf genetischer Ebene wurde mit Hilfe von Primern nach einer dritten 1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase gesucht. Physiologisch wurde das Verhalten von *P. putida* Idaho BDH2 mit Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol als Substrat untersucht und Messungen mit Rohextrakten bezüglich der Enzymaktivität der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase durchgeführt.

Ogleich in den Kontrollexperimenten zur erfolgreichen Inaktivierung von *xylL* und *benD* Primer für den deletierten Bereich aus beiden Enzymen entworfen wurden und mit diesen keine PCR-Produkte amplifiziert werden konnten, wurde ein weiteres Primerpaar entworfen, mit Hilfe dessen möglicherweise eine weitere 1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase aus dem Chromosom von *P. putida* Idaho BDH2 aufgefunden werden kann. Das Primerpaar check-DH-for und check-DH-rev wurde aus einem Sequenzalignment auf DNA-Ebene mit den Genen *xylL* und *benD* aus *P. putida* Idaho, *xylL* aus pWW0, *benD* aus *P. putida* PRS2000 und *benD* aus *Acinetobacter* ADP1 abgeleitet (Abb. 3.22). Die Region in *xylL* und *benD* aus *P. putida* Idaho, an welche der Primer check-DH-for bindet, ist in der Doppelmutanten aus beiden Genen infolge der Inaktivierung ausgeschnitten. Somit kann mit dem Primerpaar check-DH-for und check-DH-rev in *P. putida* Idaho BDH2 ein weiteres Gen für eine *cis*-1,2-Dihydrodiol-Dehydrogenase amplifiziert werden, nicht aber die bereits inaktivierten Gene *xylL* und *benD*. Im Wildtyp *P. putida* Idaho konnte ein Fragment der erwarteten Größe von etwa 650 bp amplifiziert werden. Mit der DNA von *P. putida* Idaho BDH2 konnte ein etwas kleineres Fragment mit einer schwächeren Bande ausgemacht werden. Die Sequenzierung dieses Fragments zeigte die größte Ähnlichkeit zu einer Amidase aus *P. chlororaphis* B23 (73 % identische Positionen von 159 Aminosäuren). Damit handelte es sich nicht um eine Dihydrodiol-Dehydrogenase.

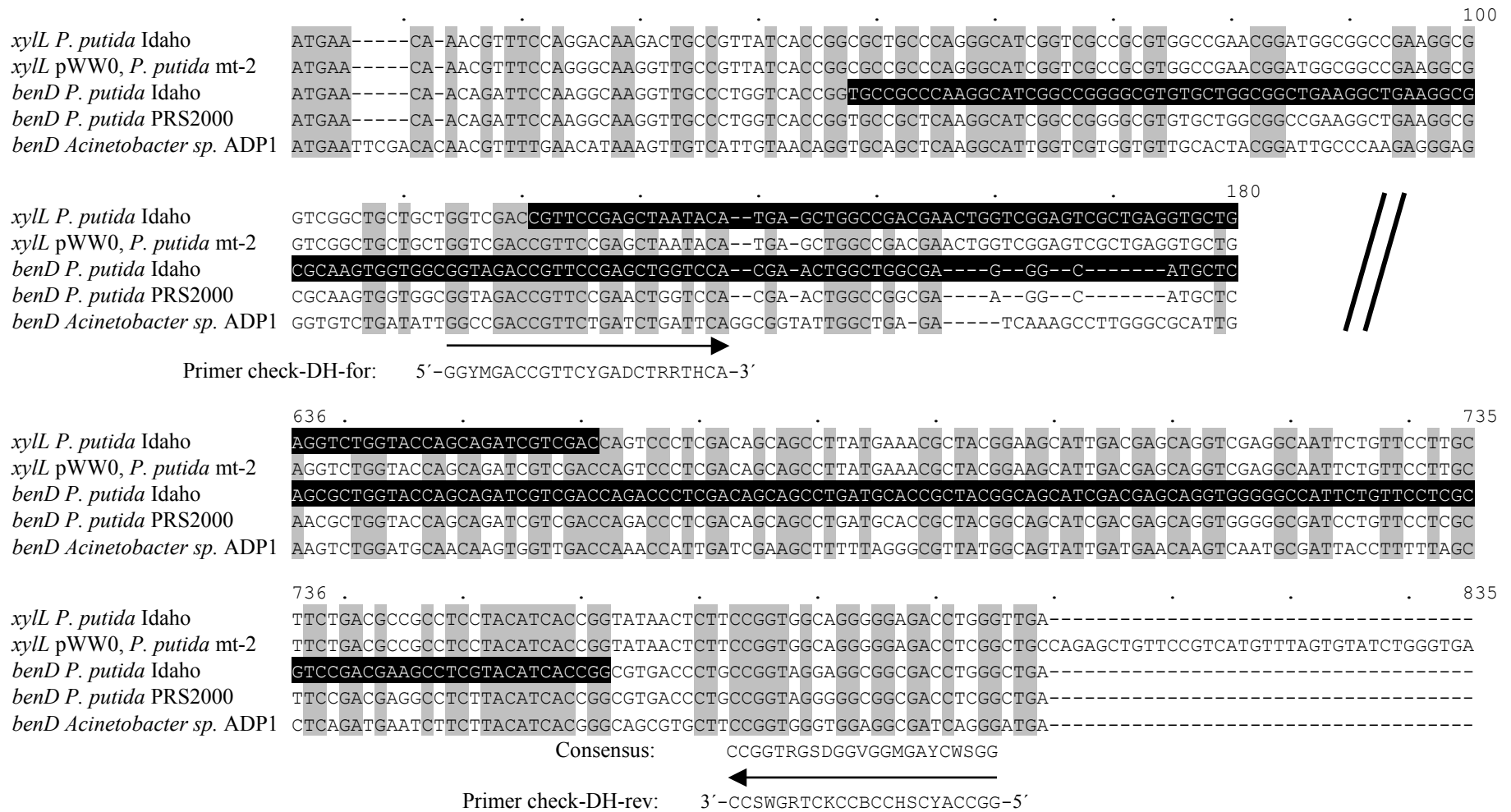


Abb. 3.22: Entwurf der Primer check-DH-for und check-DH-rev. Identische Positionen aller Sequenzen sind grau unterlegt. In *xytL* und *benD* aus *P. putida Idaho* sind die Regionen schwarz unterlegt, die in der Doppelmutanten *P. putida Idaho* BDH2 aus dem Gen zwecks der Inaktivierung ausgeschnitten wurden. Das Primerpaar wurde so entworfen, dass es in *P. putida Idaho* BDH2 kein PCR-Produkt von *xytL* oder *benD* liefern kann. *xytL* pWW0, *P. putida mt-2*: M64747, Neidle et al. (1992); BenD *P. putida* PRS2000: AF218267, Cowles et al. (2000); BenD *Acinetobacter sp. ADP1*: AF009224, Collier et al. (1997 und 1998).

Auf physiologischer Ebene wurde getestet, ob die Doppelmutante von *P. putida* Idaho mit Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol als einziger C-Quelle wachsen kann. Zu diesem Zweck wurden Zellen, die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol abbauten, in frisches Medium übertragen und die Zunahme der optischen Dichte sowie die Abnahme an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol verfolgt (Abb. 3.23).

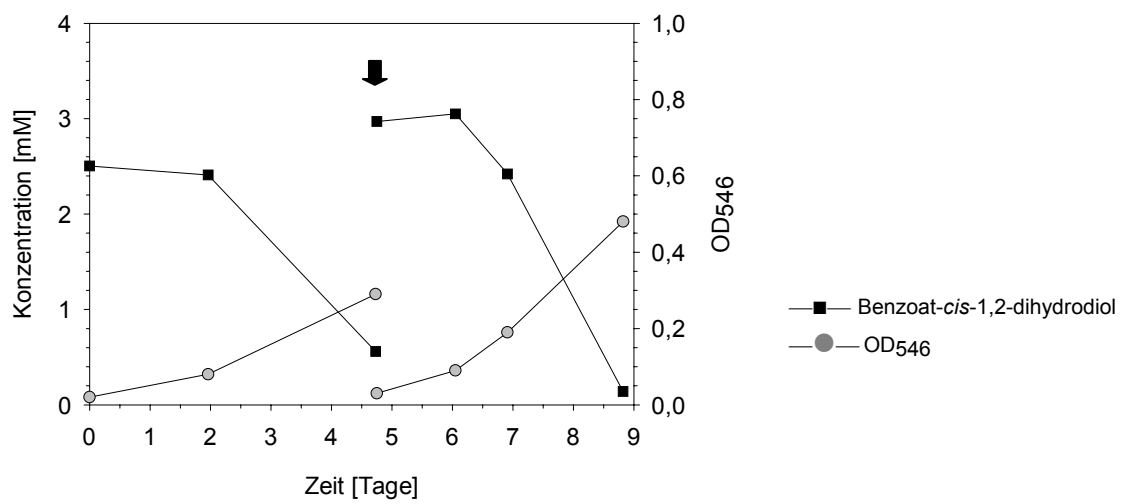


Abb. 3.23: Subkultivierung von *P. putida* Idaho BDH2 auf Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt des Übertragens von Zellen (1:10) in frisches Medium an. Die Kultivierung erfolgte in 25-ml-Schikanekolben mit 5 ml Flüssigphase bei 30 °C. Es wurden jeweils 2,5 mM Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol hinzugefügt. Als Inoculum dienten auf Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol wachsende Zellen. Diese wurden aus der Abbauphase von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus einem Umsatzexperiment von Benzylalkohol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol entnommen (vgl. Abb. 3.12B).

Die Kultivierung, die in Abb. 3.23 dargestellt ist, erfolgte in einem Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen unter Verwendung von Wattestopfen was eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleistete. Damit ist ein potentieller anaerober Abbau nicht zu erwarten. Diese Überlegung wurde angestellt, da die Kultivierung, wie sie in Abb. 3.12 gezeigt ist, über lange Zeiträume erfolgte, und aufgrund des abgeschlossenen Systems ein Sauerstoffmangel eintreten könnte. Weitere Subkultivierungen der Doppelmutanten erfolgten in 100-ml-Schikanekolben mit Klettansatz (20 ml Flüssigphase), hier wurden wie in den Ansätzen aus Abb. 3.12 Teflondichtungen verwendet.

Auffällig war, dass im Lauf der Subkultivierung nicht mehr der *meta*- sondern der *ortho*-Weg induziert wurde. Das war am Ausbleiben der Gelbfärbung durch den Metaboliten Hydroxymuconatsemialdehyd während der exponentiellen Phase sichtbar.

Es wurden Rohextrakte aus Zellen hergestellt, die mit Toluol und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol als Substrat wuchsen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 20 mM Tris/HCl-Puffer resuspendiert und mit der French-Press aufgeschlossen. Neben der Überprüfung, ob noch eine Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Aktivität vorhanden war, wurde die Aktivität der Enzyme bestimmt, die den *ortho*- bzw. *meta*-Weg einleiten. Für die Aktivitätsmessung der Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase und der Muconat-Cycloisomerase wurden 4-140 µg Protein, zur Bestimmung der Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase 5-18 µg Protein eingesetzt.

Enzymtests mit dem Rohextrakt aus Zellen, die mit Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol subkultiviert wurden und sich zum Zeitpunkt der Ernte in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, zeigten Aktivität für Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase (0,75 U/mg Protein, nicht induzierte Zellen $3,8 \times 10^{-3}$ U/mg Protein, s. auch Tab. 3.2) und für Muconat-Cycloisomerase (5 U/mg Protein, mit nicht induzierten Zellen konnte keine Aktivität gemessen werden), welche für den *ortho*-Weg charakteristisch sind. Dagegen wurde nur eine schwache für den *meta*-Weg typische Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase beobachtet (0,17 U/mg Protein, mit nicht induzierten Zellen 0,016 U/mg Protein). Der Testansatz für letztgenanntes Enzym zeigte bei der Analyse mittels HPLC entstehendes Muconat. Dies zeigt, dass der *ortho*-Weg induziert ist. Im Küvettentest für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase musste eventuell vorliegende Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase durch Inkubation des Rohextraktes mit H₂O₂ unterdrückt werden. Das entstehende Muconat im Testansatz für die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase beweist, dass der *meta*-Weg bei subkultivierten Zellen mit dem Substrat Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol nur sehr schwach induziert ist.

Auch mit Zellen von *P. putida* Idaho BDH2, die mit Toluol subkultiviert wurden, konnte eine Induktion des *ortho*-Weges gemessen werden. Für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase wurde eine Aktivität von 0,016 U/mg Protein, für die Muconat-Cycloisomerase eine Aktivität von 0,011 U/mg Protein gemessen, während die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase eine Aktivität von 3 U/mg Protein zeigte. Das ist ein Hinweis dafür, dass mit Zellen, die mit Toluol wachsen, verstärkt der *meta*-Weg induziert ist. Dies ist deutlich an der Ausscheidung von Hydroxymuconatsemialdehyd während des Wachstums festzustellen.

Zur Bestimmung einer noch in *P. putida* Idaho BDH2 vorhandenen Aktivität der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase wurden ebenfalls Enzymtests mit Zellen, die mit Toluol und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol angezüchtet wurden, durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 20 mM Tris/HCl-Puffer resuspendiert und mit der French-Press aufgeschlossen. Für den unter 2.7.1. beschriebenen Enzymtest wurden 20–75 µg Protein ein-

gesetzt. Die Ansätze, die mittels HPLC analysiert wurden, enthielten 50 µg Protein. Es wurden in dieser Versuchsreihe immer je 1 mM NAD⁺ und 1 mM Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol eingesetzt.

Mit beiden Rohextrakten wurden Aktivitäten einer Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase gemessen (Tab. 3.2). Für die Zellen, die mit Toluol- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gewachsen waren, lag diese bei 5×10^{-3} U/mg Protein. Beim Wildtyp von *P. putida* Idaho lag die entsprechende Aktivität bei 1,8 U/mg Protein. Mit nichtinduzierten Zellen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die hier nachgewiesene Aktivität der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase liefert eine Erklärung für den späteren Abbau des zunächst durch *P. putida* Idaho gebildeten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiols (Abb. 3.12).

Tab. 3.2: Aktivitäten, die in Rohextrakten aus *P. putida* Idaho BDH2 mit den Wachstumssubstraten Toluol oder Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol bestimmt wurden.

| Getestetes Enzym | Aktivität im Rohextrakt aus Zellen, die mit Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol wuchsen [U/mg Protein] | Aktivität im Rohextrakt aus Zellen, die mit Toluol wuchsen [U/mg Protein] |
|---|---|---|
| Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase | 0,75 | 0,016 |
| Muconat-Cycloisomerase | 5 | 0,011 |
| Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase | 0,17 | 3 |
| Toluat- bzw. Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 5×10^{-3} | 5×10^{-3} |

3.3. Die Gencluster mit Genen der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase

Teile der Gencluster mit Genen der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung wurde aus verschiedenen Gründen durchgeführt. Zunächst war es erforderlich, die Sequenzen in der Umgebung der zu inaktivierenden Gene zu kennen, damit geeignete Restriktionsendonukleasen zur Inaktivierung gewählt werden konnten. Desweiteren sollte die aus *P. putida* Idaho isolierte DNA auf Unterschiede zu den bereits beschriebenen Clustern aus dem TOL-Plasmid pWW0 (Harayama et al., 1991; Neidle et al., 1992) bzw. dem β -Ketoacidweg (Cowles et al., 2000) hin untersucht werden. Es interessierte dabei besonders, ob alle Gene vorhanden sind, insbesondere *xylXYZ* und *benABC*, die für die Benzoat-Dioxygenasen codieren.

3.3.1. Das Gencluster mit *xylL*

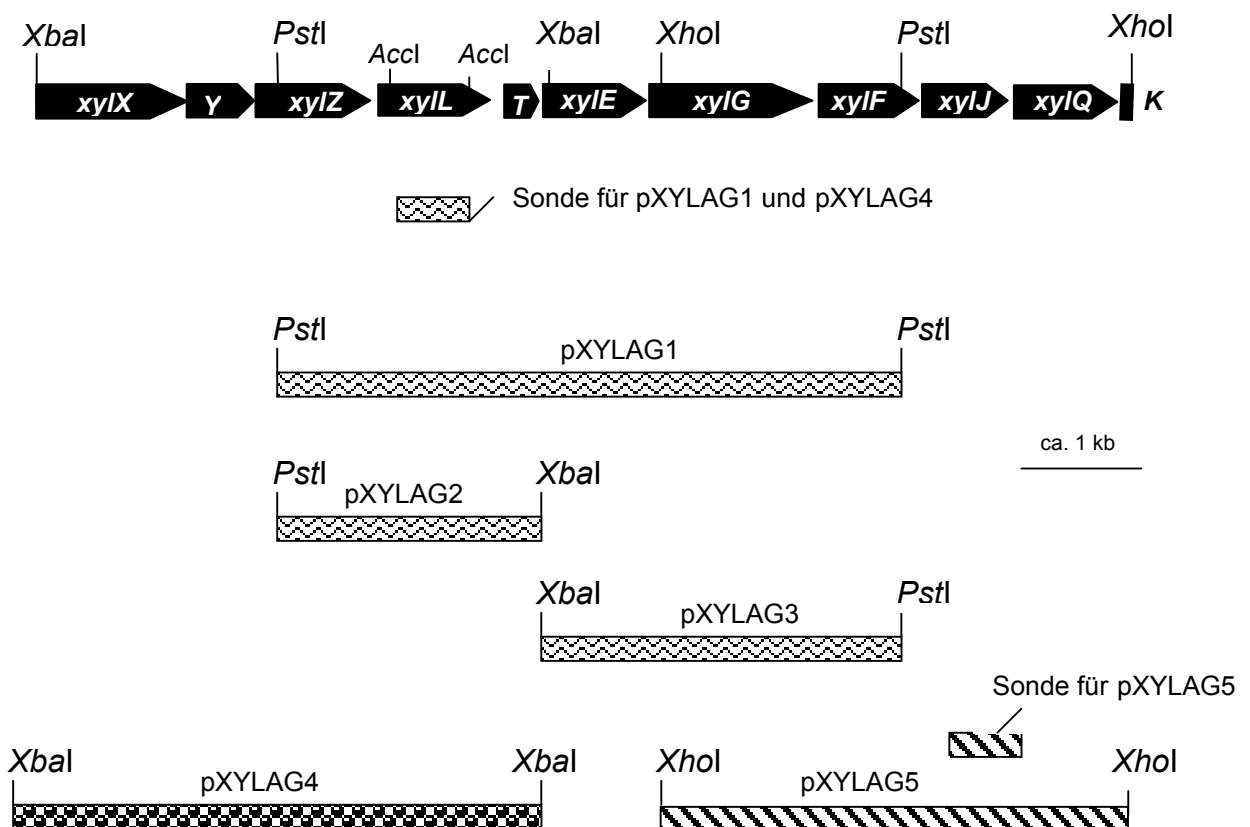


Abb. 3.24: Klonierung des Clusters um *xylL*. Dargestellt sind die Strukturgene *xyI*XYZLTEGFJQ und die klonierten Fragmente aus den Plasmiden pXYLAG1, 2, 3, 4 und 5 mit den zugehörigen Sonden. Das Gen *xyI*K, das teilweise auf pXYLAG5 liegt, ist angedeutet.

Das Gencluster mit dem die Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase codierenden *xyiL* wurde auf insgesamt 3 Plasmiden kloniert. Neben der in pXYLAG1 und pXYLAG4 klonierten DNA aus *P. putida* Idaho wurde noch ein weiteres Fragment aus der Umgebung von *xyiL* kloniert (Abb. 3.24).

Zur Gewinnung von pXYLAG5 wurde mit den Primern Endexyl-3' und Endexyl-5', die anhand der Sequenz aus pWW0 abgeleitet wurden, eine PCR durchgeführt um eine Sonde zu erhalten. Der PCR-Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und es konnte ein 592 bp großes Fragment isoliert werden, das mit Digoxigenin markiert und als Sonde eingesetzt wurde. Nach einem Verdau der genomischen DNA mit *XhoI* konnte ein ca. 4 kb großes Fragment isoliert werden, das mit der Sonde hybridisierte. Die drei klonierten Sequenzen zeigten Überlappungen, so dass insgesamt ein Fragment der Länge 9417 bp sequenziert wurde. Die vollständige Sequenz ist im Anhang angefügt.

Der Vergleich mit der Datenbank zeigte Homologien zu Genen des Abbaus von Benzoat bzw. Toluat über den *meta*-Weg aus pWW0. Auf die Ähnlichkeit zu diesen Genen wird in Kap. 4.2 eingegangen. Es wurden ausschließlich Strukturgene gefunden.

Teilweise wurde die Hydroxyoxovalerat-Aldolase (*xyiK*) sequenziert. In Tabelle 3.3 sind die Eigenschaften der identifizierten Gene und deren Produkte aufgelistet.

Tab. 3.3: Eigenschaften der identifizierten Gene- und Genprodukte des Clusters um *xyiL*:

| Gen | Genprodukt | Länge | | GC-Gehalt* | Molekulargewicht* des Proteins |
|-------------|---|-------|-----|------------|-----------------------------------|
| | | bp | AS | | |
| <i>xyiX</i> | α -Untereinheit der Toluat-Dioxygenase | 1368 | 455 | 59,14 | 51,83 |
| <i>xyiY</i> | β -Untereinheit der Toluat-Dioxygenase | 489 | 162 | 56,85 | 19,23 |
| <i>xyiZ</i> | γ -Untereinheit der Toluat-Dioxygenase | 1011 | 336 | 60,83 | 36,34 |
| <i>xyiL</i> | Toluat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 777 | 258 | 63,06 | 27,91 |
| <i>xyiT</i> | Ferredoxin-ähnliches Protein | 318 | 105 | 61,01 | 11,50 |
| <i>xyiE</i> | Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase | 924 | 307 | 58,01 | 35,08 |
| <i>xyiG</i> | Hydroxyomuconatsemialdehyd-Dehydrogenase | 1461 | 486 | 66,67 | 51,41 |
| <i>xyiF</i> | Hydroxyomuconatsemialdehyd-Hydrolase | 849 | 282 | 67,14 | 31,04 |
| <i>xyiJ</i> | Oxopentenoat-Hydratase | 669 | 222 | 64,42 | 23,87 |
| <i>xyiQ</i> | Acetaldehyd-Dehydrogenase | 924 | 307 | 65,26 | 32,88 |

*GC-Gehalt und Molekulargewicht wurden mit Hilfe des Programms DNASTar ermittelt.

3.3.2. Das Gencluster mit *benD*

3.3.2.1. Klonierung und Gene des *benD*-enthaltenden Clusters

Für die Klonierung weiterer DNA-Fragmente aus dem Cluster um *benD* wurde eine Sonde hergestellt, deren Primer (*benA*-5' und *benA*-3') anhand der Sequenz von *benA* aus dem β -Ketoacidat-Weg von *P. putida* PRS2000 (Cowles et al., 2000) abgeleitet wurden.

Das PCR-Produkt wurde mit Digoxigenin markiert. Die genomische DNA von *P. putida* Idaho wurde mit verschiedenen Enzymen verdaut. Zur Klonierung eines ca. 7,5 kb großen *Bam*HI-Fragments wurde analog verfahren wie zur Gewinnung des 3 kb großen *Pst*I-Fragments, das in pBENAG1 kloniert ist. Das Plasmid wurde pBENAG3 genannt.

Es zeigte sich, dass die DNA aus pBENAG1 vollständig in pBENAG3 enthalten war (Abb. 3.25). Insgesamt wurden 7337 Basenpaare sequenziert. Die vollständige Sequenz ist im Anhang angefügt.

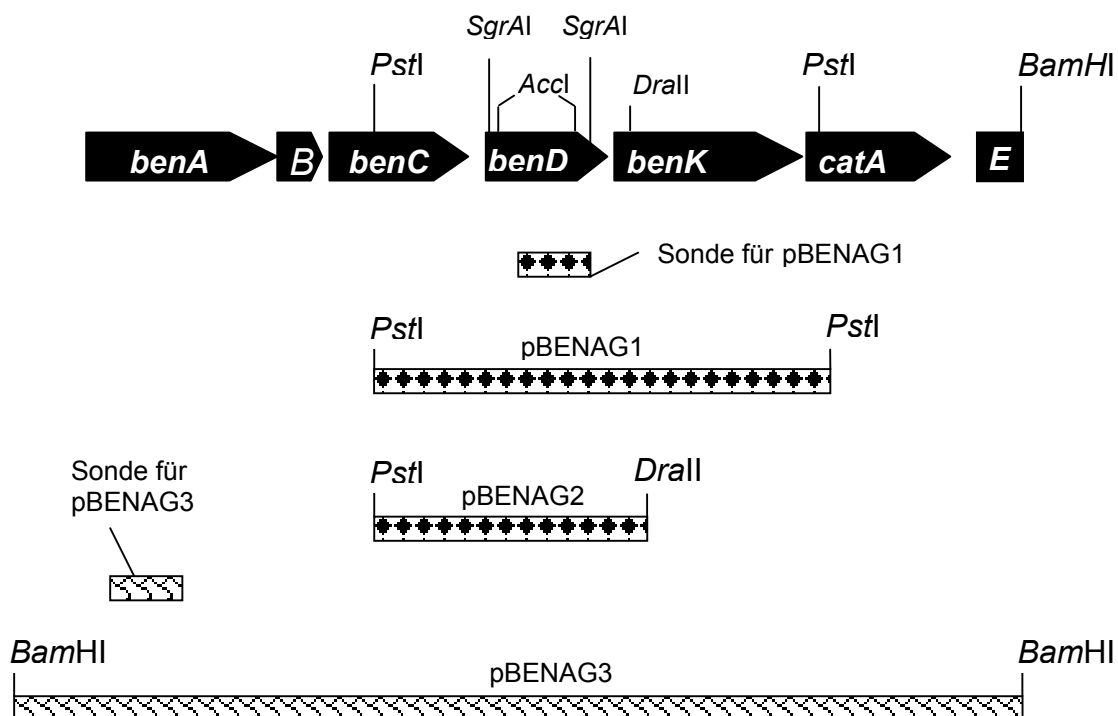


Abb. 3.25: Klonierung des Clusters um *benD*. Dargestellt sind die Strukturgene *benABCDK*, *catA* und *benE* sowie die klonierten Fragmente in den Plasmiden pBENAG1, 2, 3 mit den zugehörigen Sonden.

Das Cluster weist sehr große Ähnlichkeit mit dem von Cowles et al. (2000), publizierten Cluster des β -Ketoacidweges auf. Zwischen *benK* und *benE* ist jedoch abweichend von dem publizierten Cluster ein Gen für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase zu finden. In Tabelle 3.4 sind die Eigenschaften der Gene und ihrer Produkte aufgelistet. BenE ist nicht berücksichtigt, da es nicht vollständig sequenziert wurde. Die Funktion dieses Proteins ist unbekannt.

Tab 3.4: Eigenschaften der identifizierten Gene- und Genprodukte des Clusters um *benD*

| Gen | Genprodukt | Länge | | GC-Gehalt* | Molekulargewicht* des Proteins |
|-------------|--|-------|-----|------------|-----------------------------------|
| | | bp | AS | | |
| <i>benA</i> | α -Untereinheit der Benzoat-Dioxygenase | 1360 | 452 | 61,88 | 51,45 |
| <i>benB</i> | β -Untereinheit der Benzoat-Dioxygenase | 486 | 161 | 60,91 | 19,07 |
| <i>benC</i> | γ -Untereinheit der Benzoat-Dioxygenase | 1011 | 336 | 63,11 | 36,53 |
| <i>benD</i> | Benzoat- <i>cis</i> -1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase | 762 | 253 | 67,06 | 27,09 |
| <i>benK</i> | Benzoat-Transportprotein | 1329 | 442 | 62,90 | 47,07 |
| <i>catA</i> | Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase | 915 | 304 | 65,25 | 33,53 |

*GC-Gehalt und Molekulargewicht wurden mit Hilfe des Programms DNASTar ermittelt.

3.3.2.2. PCR-Experiment zur Auffindung von *benR*

Im von Cowles et al. (2000) beschriebenen Cluster liegt das Stopcodon des Regulators *benR* 185 bp stromaufwärts des Startcodons für *benA*. In *P. putida* Idaho wurden 582 Basen stromaufwärts von *benA* sequenziert, jedoch konnte in dieser Region im Vergleich mit der Datenbank kein codierendes Gen gefunden werden. Daher wurde mit Hilfe einer PCR überprüft, ob in *P. putida* Idaho *benR* überhaupt vorhanden ist. Mit den Primern *benR*-for und *benR*-rev, deren Sequenz aus *P. putida* PRS2000 an entsprechender Stelle übernommen wurde, sollte ein 517 bp großes Fragment amplifiziert werden. Aufgrund der Homologie der beiden Cluster wurde davon ausgegangen, dass auch *benR* in beiden Stämmen nahezu identisch ist. Mit der DNA aus *P. putida* Idaho konnte kein Fragment in entsprechender Größe amplifiziert werden, während im Parallelansatz mit der DNA aus *P. putida* PRS2000 das erwartete Fragment aufzufinden war. Daraus wurde geschlossen, dass *benR* in *P. putida* Idaho nicht existiert und dessen Funktion von einem anderen Regulator, denkbar wäre *xyIS*, übernommen wird.

4. DISKUSSION

4.1. Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mit *P. putida* Idaho BDH2

Ziel dieser Arbeit war es, eine Mutante von *P. putida* Idaho zur Produktion von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol zu konstruieren. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Lösungsmitteln aus. *P. putida* Idaho kann Toluol, selbst wenn dieses in mehr als 50 % (v/v) im Kulturmedium vorliegt, als einzige C-Quelle nutzen (Cruden et al., 1992). Der Wildtyp verwertet Toluol, indem das Substrat über eine Methylgruppenoxidation zu Benzylalkohol umgesetzt und dieses weiter über Brenzcatechin mineralisiert wird. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol ist ein Metabolit dieses Abbauweges und somit wurde dieses natürlich existierende System zu dessen Produktion gewählt. Aufgrund der hohen Toleranz des Stammes gegenüber dem toxischen Substrat Toluol wurde hier die Biotransformation direkt mit dem mutierten Stamm von *Pseudomonas putida* Idaho durchgeführt.

Der Stamm wurde so verändert, dass die Enzyme, die den Umsatz von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu Brenzcatechin katalysieren, inaktiviert vorliegen. Zu diesem Zweck wurde in *xylL* und *benD* je eine Deletion und in *benD* zusätzlich eine Insertion eines Antibiotikaresistenzmarkers eingefügt (Kap. 3.1.). Mit dem so entstandenen Stamm wurden Umsatzexperimente von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol durchgeführt.

Anders als erwartet wurde bei der Produktion von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mindestens eine Aktivität gefunden, welche die Produktausbeute einschränkte (Abb. 4.1). Mit der Mutante konnte auch nach der Inaktivierung der Toluol- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase ein Wachstum mit dem Substrat Toluol festgestellt werden. Als Ursache konnte in dieser Arbeit eine Enzymaktivität nachgewiesen werden, welche unter den Bedingungen der Stoffproduktion die Funktion der inaktivierten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen übernimmt. Zusätzlich könnte ein alternativer Abbauweg von Toluol induziert werden, der allerdings bei Fütterung der Substrate Benzylalkohol und Benzoat nicht aktiv ist.

Mit der Mutante *P. putida* Idaho BDH2 kann aus Toluol 25-40 % (Abb. 3.12A und 3.21) Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gewonnen werden. Mit den Substraten Benzylalkohol und Benzoat liegt die Ausbeute bei nahezu 100 % (Abb. 3.12B und C). Die Aktivität des unbekannt

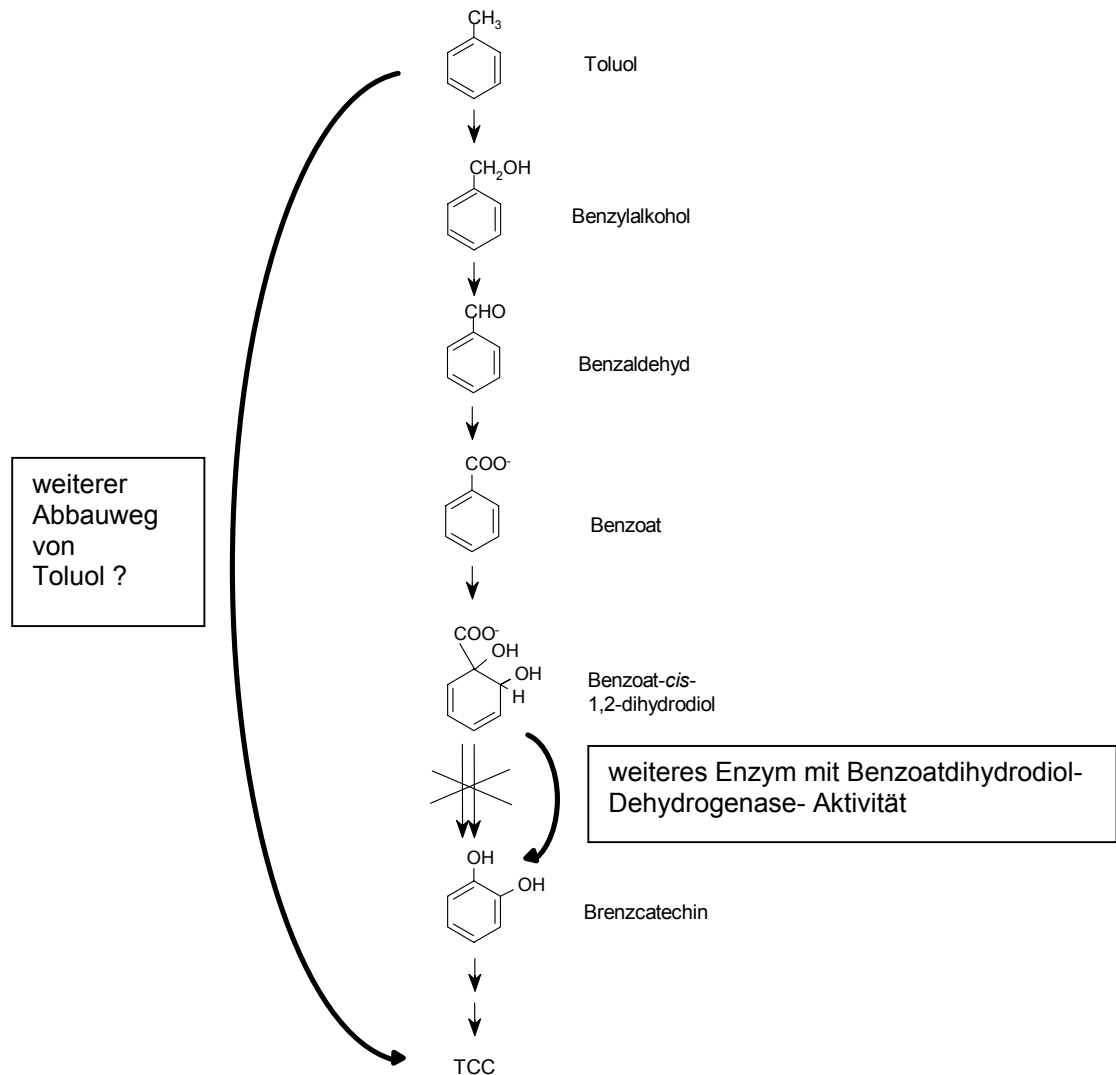


Abb. 4.1: Darstellung der Faktoren, welche bei *P. putida* Idaho BDH2 die Ausbeute des aus Toluol gebildeten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol begrenzen können (dicke Pfeile, Textrahmen). Der weitere Abbauweg für Toluol ist mit Fragezeichen versehen, da er in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte.

Enzyms, das die Rolle der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen übernimmt, ist jedoch beim Umsatz von Benzylalkohol und Benzoat so gering, dass die Menge an entstehendem Dihydrodiol zunächst nur wenig beeinträchtigt wird. Die Rolle des unbekanntes Enzyms gewinnt im weiteren Verlauf der Kultivierung an Bedeutung. Nach etwa 4 Tagen im Schüttelkolben wird das bei allen Umsätzen entstandene Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol unter Bildung von Biomasse wieder abgebaut. Auch in dieser Phase konnte eine Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Ob zusätzlich zu dieser Enzym-aktivität noch ein zweiter Toluolabbauweg induziert wird, oder ob die Bilanzlücke beim Umsatz von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mit der Regulation des Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umsetzenden Enzyms erklärt werden kann, bedarf weiterer Untersuchung.

4.1.1. Ein alternativer Abbauweg von Toluol?

In Abbildung 3.12. sind drei verschiedene Umsatzexperimente mit *P. putida* Idaho BDH2 dargestellt. Als Edukte wurden Toluol, Benzylalkohol und Benzoat gewählt. Der Umsatz fand im Fall der beiden erstgenannten Substrate innerhalb von 2 Tagen statt, wobei mit Toluol die Ausbeute an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol nur etwa 40 % betrug.

Toluol kann bekanntlich über verschiedene Wege abgebaut werden. Von den in Abb. 3.13 dargestellten Wegen, in denen Toluol von Mono- oder Dioxygenasen angegriffen wird, konnte keiner nachgewiesen werden. Bei der Fütterung mit *o*- und *m*-Kresol verklumpten die Zellen von *P. putida* Idaho, was für eine Vergiftung spricht. Abweichend davon wurde für *m*- und *p*-Kresol von Cruden et al. (1992) beschrieben, dass sie als Wachstumssubstrate für *P. putida* Idaho dienen können. Nach den Untersuchungen in dieser Arbeit erscheint ein alternativer Abbauweg von Toluol über *p*-Kresol als unwahrscheinlich. Es wurde gezeigt, dass das Wachstum des Stammes vorwiegend auf dem Ethanol beruht, das in dieser Arbeit als Lösungsvermittler der Stammlösung von *p*-Kresol zugesetzt war. Auch mit Primern, die für das Auffinden einer Toluol-4-Monooxygenase, die den Umsatz von Toluol zu *p*-Kresol katalysiert, entworfen wurden, konnte kein entsprechendes PCR-Produkt amplifiziert werden. Ein weiterer Hinweis auf die Nicht- oder nur langsame Verwertung von *p*-Kresol durch *P. putida* Idaho zeigte sich in einem Umsatzexperiment mit ganzen Zellen: Selbst Biomasse, die mit einem *p*-Kresol/Ethanol-Gemisch angezüchtet wurde, zeigten keine Mineralisation des angebotenen *p*-Kresols. Dagegen konnte mit Zellen, die mit Toluol wuchsen, ein sofortiger Verbrauch des angebotenen Toluols und die Bildung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mittels HPLC beobachtet werden. Das diesen Zellen angebotene *p*-Kresol blieb dagegen liegen.

Die Untersuchungen in Bezug auf eine direkte Dioxygenierung des Toluols zu Toluol-2,3- oder Toluol-3,4-dihydrodiol konnten nur indirekt erfolgen. Die Ergebnisse der PCR-Experimente zur Auffindung der Gene dieses Weges und die Tatsache, dass Benzol von diesem Stamm nicht angegriffen wird, lassen eine Induktion dieses Weges unwahrscheinlich erscheinen (Kap. 3.2.2.3.). Dies würde den von Cruden et al. (1992) mit dem Wildtyp dieses Stammes gemachten Beobachtungen entsprechen.

Es ist jedoch davon auszugehen, dass in Abb. 3.13 lange nicht alle Abbauwege von Toluol berücksichtigt sind. Beispielsweise liegt im Stamm *P. putida* F1, der Toluol über eine direkte Dioxygenierung abbauen kann, zusätzlich ein Abbauweg für *p*-Cumol vor, das sich von Toluol durch einen zusätzlichen Isopropylrest in *para*-Stellung unterscheidet. Für diesen

Abbauweg ist beschrieben, dass auch *p*-Xylol und Toluol als Substrate möglich sind (Eaton, 1996 und 1997). Der Abbau von *p*-Cumol erfolgt über eine Methylgruppenoxydation, also analog dem Abbau von Toluol in *P. putida* mt-2 (upper-Operon). Die Gene für den Weg in *P. putida* F1, deren Produkte zwar die gleichen Reaktionen wie die Enzyme des upper-Operons des TOL-Plasmids durchführen, sind jenen des upper-Operons jedoch nicht besonders ähnlich (ca. 40 % identische Positionen), wobei das der Benzylalkohol-Dehydrogenase entsprechende Enzym zu ersterer überhaupt keine Homologie aufweist. Was dagegen spricht, dass ein solcher, dem upper-Operon ähnlicher Weg in *P. putida* Idaho existiert, ist die Tatsache, dass in beiden Wegen bis zum Benzoat die gleichen Metabolite vorliegen. Bei Existenz eines solchen Weges sollte bei Umsatzexperimenten mit der Mutante *P. putida* Idaho BDH2 wie beim Toluol auch für Benzylalkohol und Benzoat keine einem stöchiometrischen Umsatz entsprechende Ausbeute an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol beobachtet werden.

Ein Argument für die Existenz eines zweiten produktiven Abbauweges von Toluol in *P. putida* Idaho BDH2 besteht jedoch darin, dass gleichzeitig mit der Bildung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol Biomasse entsteht (Abb. 3.12). Außerdem wurde Toluol mehr als doppelt so schnell verbraucht wie Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol gebildet. Dagegen stimmte mit den Substraten Benzylalkohol oder Benzoat die Verbrauchsrate von Toluol mit der Bildungsrate von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol überein (Tab. 3.1). Toluol und Benzylalkohol regulieren ihren Abbau durch die Enzyme des upper-Operons auf identische Weise (Assinder und Williams, 1990; Holtel, et al., 1994; Marqués und Ramos, 1993). Beide sind Effektoren für den konstitutiv gebildeten Regulator XylR, der in seiner aktiven Form die Transkription der Gene des upper-Operons sowie das Ablesen des Regulatorgenes für das *meta*-Operon, *xyIS*, verstärkt. Eine Erklärung für die unterschiedliche Ausbeute an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol bzw. Benzylalkohol, muss somit an anderer Stelle als in der Regulation des upper-Operons gesucht werden, wenn kein zweiter Abbauweg für Toluol in Erwägung gezogen werden soll. Denkbar wäre, dass Toluol, jedoch nicht Benzylalkohol oder Benzoat, einen positiven Effekt direkt auf das Enzym ausüben könnte, welches die Rolle der Toluol- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase übernimmt.

4.1.2. Die Restaktivität einer Toluol- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase

Enzymtests mit Rohextrakten von Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase mit dem Substrat Toluol oder Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol befanden, zeigten eine signifikante,

aber geringe Aktivität für die Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (5×10^{-3} U/mg Protein). Die Aktivität im Wildtyp betrug 1,8 U/mg Protein.

Bemerkbar macht sich diese Aktivität während des Umsatzes von Benzylalkohol bzw. Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol in Form einer geringen Zunahme der Optischen Dichte. Da der Umsatz praktisch quantitativ war, kann diese Restaktivität für die Stofftransformation vernachlässigt werden. Gravierender dagegen ist der Fakt, dass dasselbe oder ein gleichartiges Enzym in der Lage ist, das gebildete Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol nach einigen Tagen weiter umzusetzen.

Die Umsatzexperimente von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol durch *P. putida* Idaho zeigten nur 40 bzw. 25 % Ausbeute am gewünschten Produkt (Abb. 3.12A und 3.21). Es erscheint zunächst unwahrscheinlich, dass mit 5×10^{-3} U/mg Protein die soeben erwähnte Aktivität des Enzyms, das die Aufgabe der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase in der Mutanten *P. putida* Idaho BDH2 übernimmt, die alleinige Ursache für eine Umsatzeinbuße an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol von 60 bzw. 75 % ist.

Dennoch gibt es Gründe dafür, dass dieses Enzym doch eine größere Rolle spielen könnte. Erstens wurde die Restaktivität quantitativ nur in Rohextrakten ermittelt. Die geringe nachgewiesene Aktivität könnte darauf beruhen, dass das unbekannte Enzym im zellfreien Extrakt nicht stabil ist. Zweitens ist nicht bewiesen, dass die Regulation des toluoldegradierenden Genclusters in *P. putida* Idaho auf gleiche Weise erfolgt wie im TOL-Plasmid aus *P. putida* mt-2. Die Regulatorgene *xylS* und *xylR*, die im TOL-Plasmid stromabwärts der Strukturgene des *meta*-Operons liegen, wurden in *P. putida* Idaho nicht sequenziert. Eine Regulation wie in *P. putida* mt-2 wird somit nur aufgrund der Homologie in den Strukturgenen angenommen. Es stellte sich jedoch bei der Betrachtung des *meta*-Operons in *P. putida* Idaho im Rahmen dieser Arbeit heraus, dass es sich um ein mosaikartiges Gencluster handelt. Gerade im letzten sequenzierten Gen, *xylQ*, bricht die Homologie zum *meta*-Operon aus pWW0 ab und stattdessen tritt eine große Ähnlichkeit zu den Genen des Naphthalinabbaus aus *P. stutzeri* AN10 auf (Kap. 4.2.2.). Der Gedanke, dass auch die Regulatorgene nicht jenen des TOL-Plasmids entsprechen, gewinnt somit an Gewicht. Für das *tfd*-Operon des Plasmids pJP4 aus *R. eutropha* JMP134, das die Abbaugene für 2,4-Dichlorphenoxyacetat codiert, ist beschrieben, dass das mutmaßliche Regulatorgen *tfdT*, das im Übrigen anderen Regulatoren des Chlorbrenzcatechinabbaus homolog ist, aufgrund des ISJP4-Insertionselementes das Gencluster nicht aktivieren kann (Leveau und van der Meer, 1997; Leveau et al., 1999). Stattdessen wurden die zwei identischen Regulatorgene *tfdS* und *tfdR* identifiziert, welche die Rolle der Regulation übernehmen. Wie auch in *P. putida* Idaho liegt im *tfd*-Cluster eine mosaikartige Struktur vor. Ein

weiteres Beispiel für eine nicht bekannte Regulation liefert der Stamm *P. putida* Idaho selbst: Für das Cluster des β -Ketoacidweges konnte das Regulatorgen *benR*, das im homologen Cluster aus *P. putida* PRS2000 stromaufwärts von *benA* liegt (Cowles et al. 2000), nicht nachgewiesen werden. Trotzdem wurde mit dem Stamm *P. putida* Idaho BDH1, in welchem nur das Gen *xylL* inaktiviert vorliegt, *benD* aus dem β -Ketoacidweg aber noch intakt ist, eine Aktivität der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase wie im Wildtyp gefunden (Abb. 3.6). Die Regulation des β -Ketoacidweges aus *P. putida* Idaho unterliegt somit einem anderen Regulator als BenR. Die Funktion von BenR könnte möglicherweise durch XylS übernommen werden (vgl. Kap. 4.2.4.).

Experimente von E. Payer (Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, FHG Stuttgart) mit dem Stamm *P. putida* Idaho BDH2 zeigten auch beim Umsatz von Benzylalkohol bzw. Benzoat im Gegensatz zu den Beobachtungen in dieser Arbeit nur 70 bzw. 60 % Ausbeute an Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol. Es handelte sich hierbei um Umsatzexperimente mit ruhenden Zellen, die einer Vorkultur mit dem Wachstumssubstrat Glucose und, abweichend von den Experimenten in dieser Arbeit, dem Induktor Toluol entstammten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Restaktivität des unbekanntes Enzyms – eventuell aufgrund der Induktion mit Toluol – gesteigert werden kann.

Welches Enzym nun die Rolle der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase übernimmt, bedarf weiterer Untersuchung.

4.1.3. Ergebnisse und Projektziele

Das Ziel, mit einer Mutante von *P. putida* Idaho aus Toluol Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol herzustellen ist prinzipiell gelungen. Bisher war noch kein System bekannt, mit Hilfe dessen dieses Produkt aus Toluol hergestellt werden konnte. Es existieren allerdings von den Stämmen *P. putida* F1, *Ralstonia eutropha* 335 und *P. putida* U Mutanten, mit welchen Dihydrodiole hergestellt werden können (Gibson et al., 1970; Reiner und Hegemann, 1971; Morawski et al., 1997). Mit *P. putida* F/39D wird Toluol in 2,3-Stellung dioxygeniert, wobei als Produkt Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol angehäuft wird. Mit der Mutante *Ralstonia eutropha* B9 und *P. putida* U-JT103 kann statt aus Toluol aus Benzoat Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol erzeugt werden.

Mit der Inaktivierung der Toluat- bzw. Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenase ist die Akkumulation von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol mit dem Stamm *P. putida* Idaho BDH2 grundsätzlich möglich. Der Vorteil, die Biotransformation von Toluol ausgehend mit diesem Stamm durchzuführen, liegt in der ausgesprochen hohen Toleranz desselben gegenüber dem Lösungsmittel. Durch weitere genetische Eingriffe in den Organismus, beispielsweise durch die Erhöhung der Kopienzahl der am Umsatz beteiligten Gene, war geplant, eine Produktionssteigerung zu erzielen, bei welcher der Organismus höheren Toluolkonzentrationen ausgesetzt werden könnte.

Bei der hier angestrebten Herstellung von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol aus Toluol traten in dem aus dieser Arbeit hervorgegangenem System jedoch nicht vorhersehbare Schwierigkeiten auf. Im Verlauf der Arbeiten mit der Doppelmutante von *P. putida* Idaho musste festgestellt werden, dass dieses System weniger geeignet ist, als theoretisch zu erwarten war. Für Pseudomonaden sind häufig diverse Abbauwege für die gleiche aromatische Verbindung beschrieben. Entsprechend wurde in *P. putida* Idaho festgestellt, dass neben dem schon bekannten Abbauweg für Toluol über die Methylgruppenoxydation, codiert von den Genen des upper-Operons, noch ein weiterer, bisher unbekannter Weg existieren könnte, der die Ausbeute am Zielprodukt Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol unter Bildung von Biomasse reduziert. Desweiteren konnte eine Aktivität für eine Dihydrodiol-Dehydrogenase nachgewiesen werden, von der bislang nicht bekannt ist, welches Enzym dafür verantwortlich ist und wie es reguliert wird.

Im Hinblick auf einen Technikumsprozess wurde die Biomasse von *P. putida* Idaho BDH2 mit dem Substrat Glucose produziert. Die wachsenden Zellen wurden mit Toluol induziert. Umsatzversuche von Toluol mit wachsenden Zellen lieferten jedoch nur 4 % Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol nach 24 Stunden (E. Payer, persönliche Mitteilung). Umsatzversuche mit ruhenden Zellen, die auf gleiche Weise wie die wachsenden Zellen induziert waren, zeigten innerhalb von 24 Stunden keinen Umsatz von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol. Wie in Abb. 3.21 gezeigt, konnte in vorliegender Arbeit jedoch innerhalb von 3 Stunden aus Toluol Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol hergestellt werden. Die Vorkultur zu diesem Umsatz wurde allerdings mit Toluol als alleinigem Substrat angezchtet, was nur aufgrund des potentiellen zweiten Abbauweges von Toluol und der erwiesenen Enzymaktivität einer Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase möglich war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der Mutante *P. putida* Idaho BDH2 die technische Produktion von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol nach wie vor problematisch ist.

4.2. Die beiden Gencluster mit der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase

In dieser Arbeit wurden zwei Gene, die für die Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase codieren, inaktiviert. Beide Enzyme sind Bestandteile degradierender Gencluster, welche kloniert wurden (Kap. 3.3).

Die Sequenzierung diente zum einen der Auffindung von geeigneten Schnittstellen zur Deletion eines Fragments aus *xyll* und im Fall von *benD* zusätzlich zur Insertion eines Antibiotikaresistenzmarkers und damit der Inaktivierung der Gene. Zum zweiten interessierte die Gendosis der stromaufwärts der beiden Zielgene gelegenen Dioxygenasen, welche Benzoat zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol umsetzen. Die dort gefundene Toluat- und Benzoat-Dioxygenase deuten auf zwei funktionelle Gencluster hin. Während das sequenzierte Cluster um das Gen *xyll* dem *meta*-Weg aus dem TOL-Plasmid pWW0 sehr ähnlich ist, zeigt das Cluster mit *benD* zwei bemerkenswerte Abweichungen von dem Cluster aus *P. putida* PRS2000, das in den Proteinen BenABCDKE über 93 % Ähnlichkeit zeigt. Zwischen *benK* und *benE* ist in *P. putida* Idaho das Gen *catA* für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase zu finden, welches nur 75 % Ähnlichkeit zu dem Protein aus *P. putida* PRS2000 aufweist. Desweiteren ist stromaufwärts von *benA* nicht wie im homologen Cluster das Regulatorgen *benR* zu finden. Auch in der gesamten genomischen DNA von *P. putida* Idaho konnte *benR* nicht nachgewiesen werden. Die Fragestellungen, die sich einerseits aus der Positionierung von *catA* und andererseits aus der Regulation durch das mögliche Fehlen von *benR* ergeben, werden in Kap. 4.2.3. und 4.2.4. behandelt.

Das Cluster mit *xyll* codiert den sogenannten *meta*-Weg des Toluatabbaus. Nach Angaben von Cruden et al. (1992), sind diese Gene nicht wie in *P. putida* mt-2 auf einem Plasmid codiert (Nakazawa und Yokota, 1973; Williams und Murray, 1974; Wong und Dunn, 1974), sondern liegen chromosomal vor. Der Begriff des *meta*-Weges gilt streng genommen erst ab der Stufe des Brenzcatechins, da erst hier die Spaltung des Substrates erfolgt. Da aber *xyll-XYZL* normalerweise mit einer *meta*-Spaltung des Brenzcatechins gekoppelt vorliegen, wird von einem *meta*-Operon gesprochen.

Das Cluster mit *benD* erwies sich als ein Cluster des β -Ketoacidweges. β -Ketoacid ist ein Metabolit des *ortho*-Weges, bei welchem im Gegensatz zum *meta*-Weg die Ringspaltung des Metaboliten Brenzcatechin in *ortho*-Stellung durchgeführt wird. Die Bezeichnung *ortho*- oder β -Ketoacidweg gilt, wie auch beim *meta*-Operon, erst ab der Stufe des Brenzcatechins. Die Gene *benABCD* wurden bisher immer in Verbindung mit dem β -Ketoacidweg beobachtet

(vgl. Abb. 4.23). Cluster, die den *ortho*-Weg codieren, sind in der Regel chromosomal lokalisiert (Williams und Murray, 1974).

Die Produkte der Gene *xylXYZL* des *meta*-Operons sind in der Lage, auch substituierte Benzozate wie *m*- und *p*-Toluat zu den entsprechenden Brenzcatechinen umzusetzen, während die Gene *benABCD* spezifisch für Benzoat sind (Nakazawa und Yokota, 1973; Williams und Murray, 1974; Worsey und Williams, 1975).

Es ist nicht ungewöhnlich, dass zwei Gencluster für den Abbau von Benzoat in einem Stamm vorliegen. *P. putida* mt-2 trägt neben dem *meta*-Weg auf dem TOL-Plasmid ebenfalls einen *ortho*-Weg, der chromosomal verankert ist (Nakazawa und Yokota, 1973; Williams und Murray, 1974; Jeffrey et al., 1992). Bei mehrzyklischen Substraten wie beispielsweise dem Biphenyl liegen zu *xylXYZL* homologe Gene vor, die via Dihydroxybiphenyl ein bicyclisches Brenzcatechin erzeugen, das durch eine *meta*-Spaltung weiter umgesetzt wird. Das Spaltprodukt unterliegt einer weiteren C-C-Spaltung, wobei neben einem Folgeprodukt des *meta*-Weges Benzoat entsteht. Für den Abbau dieses entstandenen Benzoates stehen die Gene des *ortho*-Weges zur Verfügung (Kitagawa et al., 2001). Aus der Literatur ist, anders als in *P. putida* mt-2, ebenso bekannt, dass der *meta*-Weg des TOL-Plasmids auch chromosomal vorliegen kann (Sinclair et al., 1986). Bosch et al. (2000) zeigten, dass der untere Weg des Naphthalinabbaus, der homolog zum *meta*-Weg von pWW0 ist, chromosomal codiert ist.

4.2.1. Vergleich der Toluat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase mit der Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase aus *P. putida* Idaho

Die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol- bzw. Toluatdihydrodiol-Dehydrogenase aus *P. putida* Idaho weisen Homologie zueinander auf. Auf Proteinebene treten 79 % und auf DNA-Ebene 80 % identische Positionen auf.

Auf Proteinebene treten zwischen XylL aus *P. putida* Idaho und XylL aus pWW0 95 % identische Positionen auf. Trotz der großen Ähnlichkeit gibt es zwei auffällige Unterschiede zwischen den beiden Sequenzen: Zum einen tritt in der veröffentlichten Nukleotidsequenz von *xylL* aus pWW0 eine Leserahmenverschiebung auf (Abb. 4.2), die zur Folge hat, dass an dieser Position das Genprodukt XylL aus pWW0 von anderen Proteinen aus Pseudomonaden abweicht (Pos. 194-199, Abb. 4.3). In diesem Bereich zeigen die Nukleotidsequenzen von XylL und BenD nur wenige Abweichungen voneinander. Diese geben aber einen Hinweis darauf, dass entsprechend dem Gesamtbild und abgesehen von zwei Lücken, *xylL* aus

P. putida Idaho zu *xylL* aus pWW0 ähnlich ist. Die Basen in *xylL* aus *P. putida* Idaho, die im Gen aus pWW0 nicht auftreten, stimmen jedoch mit *benD* aus *P. putida* PRS2000 überein. Diese Abweichung legte die Vermutung nahe, dass die in der Datenbank hinterlegte Sequenz von pWW0 Fehler aufweist. Die Sequenzierung von pWW0 aus *P. putida* mt-2 im Rahmen dieser Arbeit bestätigte dies. Somit trägt XylL aus *P. putida* Idaho 97 % identische Positionen zu XylL aus dem TOL-Plasmid pWW0.

| | |
|-------------------|--|
| <i>xylL</i> pWW0 | ACCGAGGCGC-GCCACGGCGGATTCCGC--AATAGCGCCGAG |
| XylL pWW0 | T E A N S A E 204 |
| Leserahmen+1: | R H G G F R |
| | |
| <i>xylL</i> Idaho | ACCGAGGCGCCGCCACGGCGGATTCCGCGCAATAGCGCCGAG |
| XylL Idaho | T E A P P R R I P R N S A E 204 |
| | |
| <i>benD</i> Idaho | ACCGAGGCGCCGCCCCGGCGGTACCGCGCAACAGTGCAGAG |
| BenD Idaho | T E A P P R R V P R N S A E 204 |

Abb. 4.2: Darstellung des Bereichs mit einer Leserahmenverschiebung beim Vergleich der beiden Gene *xylL*. Für *xylL* aus dem TOL-Plasmid ist die fehlerhafte Sequenz aus der Datenbank (M64747) gezeigt. Die Nummerierung bezieht sich auf den Vergleich der Enzyme in Abb. 4.3. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen *xylL* und *benD* sind unterlegt. In der fehlerhaften Sequenz von pWW0 aus *P. putida* mt-2 fehlt zunächst eine Base, wodurch die Aminosäure Arginin codiert wird, während in den beiden anderen gezeigten Sequenzen Prolin steht. Sechs darauffolgende Aminosäuren unterliegen somit einer Leserahmenverschiebung. Durch ein weiteres Fehlen von zwei Basen nach dem Codon für Arginin wird die Leserahmenverschiebung wieder aufgehoben und die Aminosäuresequenz der beiden Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen stimmt ab hier wieder überein.

Der zweite auffällige Unterschied zwischen XylL aus *P. putida* Idaho und XylL aus pWW0 liegt im C-Terminus. XylL aus pWW0 trägt hier 12 Aminosäuren mehr als alle anderen Proteine, die in dieser Arbeit zu einem Sequenzvergleich herangezogen wurden (Abb. 4.3). Diese beiden Unterschiede, die Leserahmenverschiebung und die Länge des Proteins, sind jedoch spezifisch für das Protein aus pWW0, es sind keine Sequenzen bekannt, die diese oben genannten Eigenschaften mit XylL aus pWW0 teilen.

Desweiteren sind in den Sequenzen von XylL aus *P. putida* Idaho und XylL aus pWW0 nur Abweichungen vereinzelter Aminosäuren festzustellen. Davon führen zwei zu Übereinstimmung mit BenD. Bezogen auf das Alignment in Abb. 4.3 befindet sich an Position 132 in XylL aus *P. putida* Idaho Prolin, an Position 135 Leucin. Diese Aminosäuren stimmen mit den Sequenzen von BenD überein und weichen von den beiden gezeigten Sequenzen für XylL ab, die an diesen Positionen Alanin und Isoleucin tragen. Drei weitere Aminosäuren in XylL aus *P. putida* Idaho weichen von XylL aus pWW0 ab: An Position 10 tritt Asparaginsäure statt Glycin, an Position 12 Threonin statt Valin, an Position 110 Histidin statt Alanin auf.

Das Auftreten von Asparaginsäure an Position 10 stimmt mit den Proteinen aus *P. aeruginosa* PAO1 und *P. putida* P111 überein, während die Proteine der anderen in Abb. 4.3 aufgeführten Pseudomonaden an dieser Stelle Glycin tragen. An Position 12 tritt in allen anderen Pseudomonaden und in den gezeigten Sequenzen von *Rhodococcus*, *Burkholderia* und *Acinetobacter* Valin auf, während in XylL aus *P. putida* Idaho Threonin trägt. Die Aminosäure Histidin (Position 110) aus *P. putida* Idaho steht Glutaminsäure, Arginin bzw. Asparaginsäure aus den anderen Pseudomonaden gegenüber.

BenD aus *P. putida* Idaho ist zu 98 % ähnlich zu BenD aus *P. putida* PRS2000. Es treten auf DNA-Ebene nur vereinzelt Austausche von Nukleotiden auf, die in drei Fällen zu anderen Aminosäuren führen. Im ersten Fall (Position 72) tritt in *P. putida* Idaho übereinstimmend mit den anderen gezeigten Pseudomonaden, *Rhodococcus* und *Acinetobacter* Alanin auf, während in *P. putida* PRS2000 Threonin steht. Die beiden anderen Abweichungen von BenD aus *P. putida* PRS2000 befinden sich an Position 86 (Histidin statt Phenylalanin), wobei BenD aus *P. putida* Idaho von allen anderen gezeigten Pseudomonaden abweicht und an Position 206 (Threonin statt Serin), an welcher sich die Abweichung auch auf alle anderen gezeigten Sequenzen erstreckt.

Unterschiede zwischen einerseits XylL aus *P. putida* Idaho und pWW0 und andererseits BenD aus *P. putida* Idaho und *P. putida* PRS2000 zeigen sich besonders an Position 54 auf Proteinebene. XylL trägt an dieser Position 5 Aminosäuren (VGVAE) mehr als BenD. Die Sequenz des Proteins aus *P. aeruginosa* PAO1 stimmt an dieser Position mit dem Sequenzen von BenD überein, was auch an anderen Positionen auftritt (132 und 135), daher wird diese von den Autoren „XylL“ benannte Sequenz für die Auswertung als BenD gewertet (vgl. auch umgebende Gene, Kap. 4.2.4.).

Der Sequenzvergleich in Abb. 4.3 zeigt außerdem, dass bei *P. putida* drei verschiedene Größen der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase vorliegen. BenD ist mit 253 Aminosäuren das Enzym mit der kürzesten Peptidkette, gefolgt von XylL aus *P. putida* Idaho mit 258 und XylL aus pWW0 mit 269 Aminosäuren. Für den Vergleich wurde die für XylL aus pWW0 unter M64747 hinterlegte Sequenz als Grundlage genommen.

120

BenD *P. putida* PRS2000 MN---NRFQGKVALVTGAAQGI GRGVCWR LKAE GAQVVAV DRSE-LVHELAGEG-----MLTLTADLE QHTDCARVMASAVETFGRLD ILVNNVGGTIWAKP FEHYEVEQTEAEVRRSL

BenD *P. putida* Idaho MN---NRFQGKVALVTGAAQGI GRGVCWR LKAE GAQVVAV DRSE-LVHELAGEG-----MLTLTADLE QHADCARVMASAVETHGRLD ILVNNVGGTIWAKP FEHYEVEQTEAEVRRSL

XylL *P. putida* mt-2, pWW0 MN---KRFQGKVAVITGAAQGI GRVVAERMAAEGGRLLLV DRSE-LIHELADLVGV-AEVLTLTADLE QFAECQRMMAALERFGRLD ILINNVGGTIWAKP FEHYQERE TEAEVRRSL

XylL *P. putida* Idaho MN---KRFQDKTAVITGAAQGI GRVVAERMAAEGGRLLLV DRSE-LIHELADLVGV-AEVLTLTADLE QFAECQRMMAALERFGRLD ILINNVGGTIWAKP FEHYQERE TEAEVRRSL

XylL *Pseudomonas* S-47 MN---KRFQGKVAVITGAAQGI GRVVAERMAAEGGRLLLV DRSE-LIHELADLVGV-AEVLTLTADLE QFAECQRMMAALERFGRLD ILINNVGGTIWAKP FEHYQERE TEAEVRRSL

„XylL“ *P. aeruginosa* PAO1 MN---DRFRDKVALVSGAAQGI GLGVARLLEEGARVVAV DRSE-LVHELAGDA-----CLCLTADLE RYAEQCQRVLERLTLERFGRLD ILVNNVGGTIWAKP YQHYAEDE TEAELRRSL

BenD *P. putida* P111 MN---DRFRDKVALVSGAAQGI GLGVARLLEEGARVVAV DRSE-LVHELAGDA-----CLCLTADLE RYAEQCQRALERTLERFGRLD ILVNNVGGTIWAKP YQHYAEDE TEAELRRSL

BopL *Rhodococcus* sp. 19070 MYP--GRFDGRVVTVTGAAQGI GLVVASRTAAEGGSVILV DRSE-LVHEVAKELREKGFQAHSVTADLE TFAGAQSASIDEARQHGRI DVLVNNVGGTIWAKP YEHYTPQIQAEVQRSL

BenD *Acinetobacter* sp. ADP1 MNST-QRFEHKVVIVTGAQGI GRGVALRRAAE GARVLLV DRAD-LIQAVLAEIKALGALAI AVETDLE TYAGAE LVVSHAI AEYGRID VLVNNVGGAIWMP YQEFSEEEI IQEVHRSLS

CbeD *Burkholderia* sp. NK8 MST--QRFAGKVMVVTGAAQGI GRGVALRRAAE GARVLLV DRAD-LIQAVLAEIKALGALAI AVETDLE TYAGAE LVVSHAI AEYGRID VLVNNVGGAIWMP YQEFSEEEI IQEVHRSLS

XylL *N. arom.* F199, pNL1 MTDANGRFADKIAVVTGAAQGI GFATAORLREGATVVVA DRAEQATLDAVARLMAESVDAHPAIDLE QQTGAAALYNAVSKDFGRID VAVHNVGGTIWAKP YWEYTTETVAEINRSL

240

BenD *P. putida* PRS2000 FPPTLWCCHAALPYMLERGS GAI VNVSSIATRGNRVVPY GAAKGGVNAL TACLAFETAGRG IRVNATAPGGTEA PPRRVPRNSAEQSEQEKRWYQQIVD QTLDSSLMHRYGSI DEQVGAAIL

BenD *P. putida* Idaho FPPTLWCCHAALPYMLERGS GAI VNVSSIATRGNRVVPY GAAKGGVNAL TACLAFETAGRG IRVNATAPGGTEA PPRRVPRNSAEQTEQEKRWYQQIVD QTLDSSLMHRYGSI DEQVGAAIL

XylL *P. putida* mt-2, pWW0 FPPTLWCCHAALAPMIEQSGS GAI VNVSSVATRGIHRVPY GAAKGGVNAL TACLAFETAERG IRVNATAPGGTEA PRHGGFPRNSAEPSEQEKVWYQQIVD QSLDSSLMKRYGSI DEQVEAAIL

XylL *P. putida* Idaho FPPTLWCCHAALPLMLEQSGS GAI VNVSSVATRGIHRVPY GAAKGGVNAL TACLAFETAERG IRVNATAPGGTEA PPRRIPRNSAEPSEQEKVWYQQIVD QSLDSSLMKRYGSI DEQVEAAIL

XylL *Pseudomonas* sp. S-47 FPPTLWCCHAALAPMIEQSGS GAI VNVSSVATRGIHRVPY GAAKGGVNAL TACLAFETAERG IRVNATAPGGTEA PPRRIPRNSAEPSEQEKVWYQQIVD QSLDSSLMKRYGSI DEQVEAAIL

„XylL“ *P. aeruginosa* PAO1 LPPTLWCCRAALPAMLGQSGS GAI VNVSSVATRGNRVVPY GAAKGGVNAL TACLAFETADQG IRVNAVAPGGTDA PPRRIPRNSAQAQSEEEERRWYRQIVE QTLDSSLMKRYGSI DEQVAAIL

BenD *P. putida* P111 LPPTLWCCRAALPAMLGQSGS GAI VNVSSVATRGNRVVPY GAAKGGVNAL TACLAFETADQG IRVNAVAPGGTDA PPRRIPRNSAQAQSEEEERRWYRQIVE QTLDSSLMKRYGSI DEQVAAIL

BopL *Rhodococcus* sp. 19070 FPPTLWTCRAVLPYLIEQRS GTI VNVSSVATRGNRVVPY GAAKGGVNAL TAAALAEAPYGR IRVNAVAPGGTDA PVRRVARGPAAQSEQEKGWYQQIVD QTVDSLLKRYGTLDEQAAAIT

BenD *Acinetobacter* sp. ADP1 FPPTLWCCRAVLPPEMLKHQGTI VNVSSIATRGIHRIPY SACKGGVNAL TASLAFEAHQG IRVNAVAPGGTTPRKA PPRKPRNAQPLSKSEQVWMMQQVVD QTI DRSFLGRYGSIDEQVNAIT

CbeD *Burkholderia* sp. NK8 MPPTLYACHAVLPHLLERGRGTI VNVSSVATRGIHRVPY GAAKGGVNAL THALAMEYGEHN IRVVAAPGGTEA PPRRVPRNSAAGDSEQEKLWMEAVKQTESTYLRKRYGTLDEQIAPAIL

XylL *N. arom.* F199, pNL1 WPPTLWCCHAVLPHMRAAGRC AIVNIGSVATRGNRVVPY GAAKGGVAAL TAAALSLELED CGIRVNCVAPGGVNV T-RVTPRNTAPHS DADRKGFGEVME QTLRDTPLGRFGPEPELAAATC

275

BenD *P. putida* PRS2000 FLASDEASYITGVTLPVGGGDLG-----

BenD *P. putida* Idaho FLASDEASYITGVTLPVGGGDLG-----

XylL *P. putida* mt-2, pWW0 FLASDAASYITGITLPVAGGDLGCQSCSVMFVS VG

XylL *P. putida* Idaho FLASDAASYITGITLPVAGGDLG-----

XylL *Pseudomonas* sp. S-47 FLASDAASYITGITLPVAGGDLG-----

„XylL“ *P. aeruginosa* PAO1 FLASDEASYITGVTLPVAGGDLG-----

BenD *P. putida* P111 FLASDEASYITGVTLPVAGGDLG-----

BopL *Rhodococcus* sp. 19070 FLASEEASYITGVTLPVAGGDLG-----

BenD *Acinetobacter* sp. ADP1 FLASDESSYITGSVLPVGGGDLG-----

CbeD *Burkholderia* sp. NK8 FLASDEASYITGAVLPVAGGDLG-----

XylL *N. arom.* F199, pNL1 FLAASDEASYITGQTLVYVAGGDLG-----

Abb. 4.3: Vergleich einiger Toluat- und Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenasen. Die Zugangsnummern und Literaturhinweise sind der Legende zu Abb. 4.4 zu entnehmen. Das Protein aus *P. aeruginosa* PAO1 wurde für die Auswertung als BenD betrachtet. In allen verglichenen Sequenzen sind identische Positionen schwarz unterlegt. Der aufgrund eines Sequenzierfehlers abweichende Bereich in XylL aus dem TOL-Plasmid pWW0 (Abb. 4.2) ist eingerahmt. Aminosäuren von XylL aus *P. putida* Idaho, welche von XylL aus anderen *Pseudomonaden* abweichen und mit BenD übereinstimmen (Pos. 132 und 135), sowie Aminosäuren, die an entsprechender Position von den anderen Proteinen aus der Gruppe der *Pseudomonaden* abweichen (Pos. 10, 12, 86, 110 und 206), sind grau unterlegt.

Die Ähnlichkeiten der in Abb. 4.3 verglichenen Toluat- und Benzoatdihydrodiol-Dehydrogenasen sind in einem Dendrogramm dargestellt (Abb. 4.4).

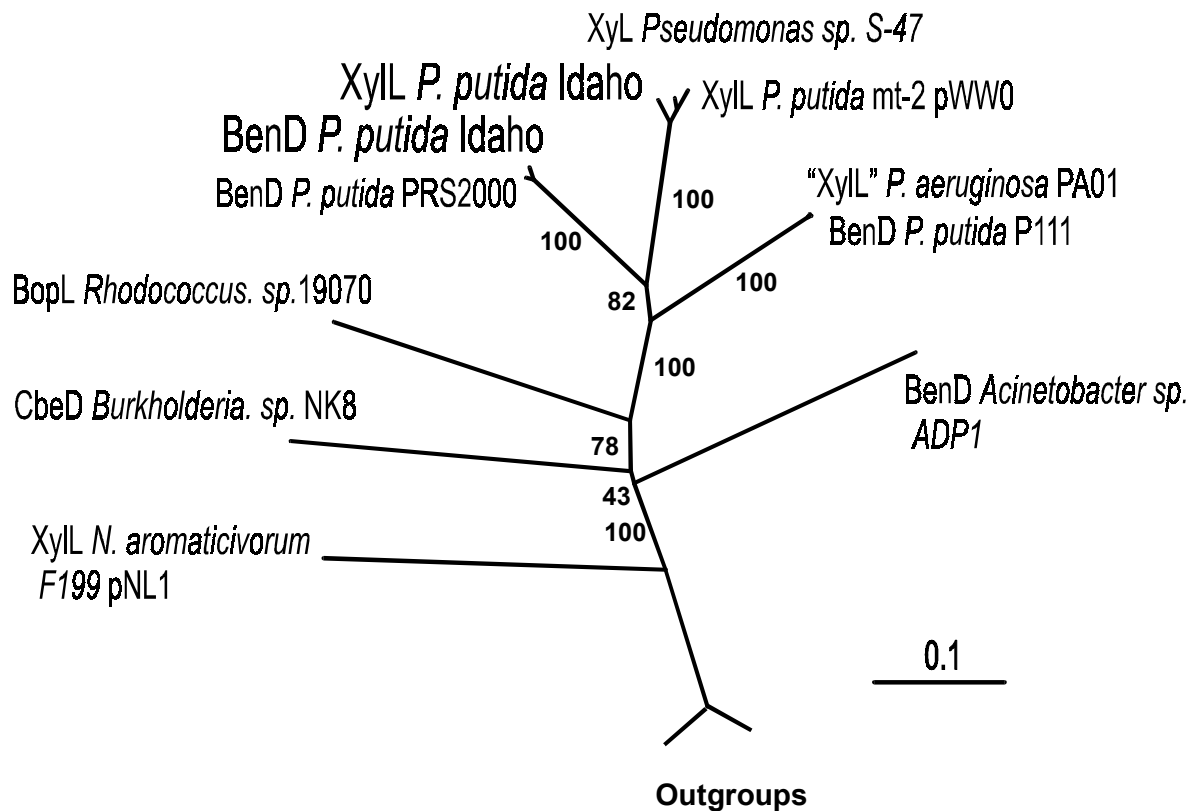


Abb. 4.4: Dendrogramm mit verschiedenen Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen und den Enzymen, die in dieser Arbeit aus *P. putida* Idaho kloniert wurden. XylL *Pseudomonas* sp. S-47: AF320981, Park und Kim, nicht publiziert; XylL pWW0: M64747, Neidle et al. (1992); BenD *P. putida* PRS2000: AF218267, Cowles et al. (2000); XylL *P. aeruginosa* PA01: AE004678, Stover et al. (2000); BenD *P. putida* P111: AY026914, Totova et al., nicht publiziert; BopL *Rhodococcus* sp. 19070: AF279141, Haddad et al. (2001); CbeD *Burkholderia* sp. NK8: AB024746, Francisco et al. (2001); BenD *Acinetobacter* sp. ADP1: AF009224, Collier et al. (1997 und 1998); XylL *N. aromaticivorum* F199 pNL1: NC_002033, Romine et al. (1999).

In den Outgroups sind 17 weitere Vertreter der kurzketigen Alkohol-Dehydrogenasen enthalten, von denen nur die Zugangsnummern genannt sind: BH0932 aus *Bacillus halodurans* C-125, AP001510; TM1724 aus *Thermotoga maritima*, AE001811; DR1943 aus *Deinicoccus radiodurans* R1, AE002033; Lvr aus *Leifsonia aquatica*, M-13, AB042262; SC7A8.29 aus *Streptomyces coelicolor* A3 (2), AL137187; BadH aus *Rhodopseudomonas palustris*, U75363; TM0297 aus *Thermotoga maritima*, AE001711; FabG aus *Bacillus halodurans*, AP001515; FabG2 aus *Mycobacterium tuberculosis*, NC_000962; FabG aus *Halobacterium* sp. NRC-1, AE005055; Yhg aus *Agrobacterium tumefaciens*, NC_002377; Sma0339 aus pSymA aus *Sinorhizobium meliloti*, AE007211; HdhA aus *Bacteriodes fragilis*, AF173833; XF0913 aus *Xylella fastidiosa*, AE003849; TodD aus *P. putida* F1, P13859; BphB aus *Novospingobium aromaticivorans* F199, NC_002033; McbB aus *Ralstonia* sp. JS705, AJ006307.

Beim Vergleich mit Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen aus anderen Stämmen fällt auf, dass die Enzyme aus *Pseudomonas* eng miteinander verwandt sind. Dabei sind sich Toluat und Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenasen innerhalb dieser Art ähnlicher, als gleichbenannte Enzyme aus einer anderen Spezies. BenD aus *Acinetobacter* sp.

ADP1 ist nur zu 58 % ähnlich zu BenD aus *P. putida* Idaho, wohingegen XylL aus pWW0 aus der Pseudomonadengruppe 77 % identische Positionen zu BenD aus *P. putida* Idaho aufweist. XylL aus *Novosphingobium* zeigt nur 49 % identische Positionen zu XylL aus *P. putida* Idaho. Allerdings ist in diesem Fall nicht klar, ob wirklich von „*xylL*“ gesprochen werden kann, denn in pNL1 treten die Gene des *meta*-Operons nicht in einem zusammenhängenden Cluster auf. Aus der konservierten Ähnlichkeit der Gene in den Pseudomonaden ist zu schließen, dass beide Enzyme aus einem gemeinsamen Vorfahren stammen und später sich zu XylL und BenD entwickelten. Da sich diese beiden Enzyme bis zu fast 80 % ähneln können, liegt der Unterschied für die verschiedenen Substratspezifitäten in maximal 20 % der Proteinsequenz.

Wie bereits erwähnt ergibt sich aus der im Dendrogramm abzulesenen Ähnlichkeit zu BenD aus *P. putida* P111, dass das Enzym aus *P. aeruginosa* PAO1 fälschlicherweise als XylL bezeichnet wurde und BenD heißen muss.

4.2.2. Charakterisierung des Genclusters mit *xylL*

Bei der Betrachtung der einzelnen Proteine des *meta*-Weges aus *P. putida* Idaho zeigt sich, dass es sich um ein mosaikartiges Cluster handelt. Es treten beispielsweise Verwandtschaften zu Proteinen des Naphthalinabbaus aus *P. stutzeri* auf (Abb. 4.21). XylQ ist hierfür das prägnanteste Beispiel. Auch Bereiche mit größter Ähnlichkeit zu *Achromobacter* (XylG) oder zu anderen TOL-Plasmiden (XylE, XylQ) sind in *P. putida* Idaho wiederzufinden. Aemprapa und Williams (1998) stellten derartige Mosaikstrukturen auch für das TOL-Plasmid pWW102 fest. Für die Wege wurden jeweils Enzyme mit gleichen Ursprung rekrutiert, aber je nach Weg unterschiedlich kombiniert.

Beim Vergleich mit dem *meta*-Operon aus pWW0 treten auf Nukleotidebene in verschiedenen Genen Leserahmenverschiebungen auf, wie es schon für *xylL* gezeigt wurde (Abb. 4.2). Analysiert man diese genauer, kommen auf Proteinebene Ähnlichkeiten des Gens/Proteins aus *P. putida* Idaho zu Genen/Proteinen aus anderen Stämmen und Abbauwegen zum Vorschein. Hier kann es sich allerdings auch um Sequenzierfehler in pWW0 handeln, da dieses dem Cluster aus *P. putida* Idaho und Genen aus anderen Clustern extrem ähnlich ist. Daher sind die häufig auftretenden Leserahmenverschiebungen in der Gensequenz von pWW0 unwahrscheinlich. In der Datenbank konnten zudem keine Sequenzen gefunden werden, die diese Leserahmenverschiebungen teilen. Im Fall von *xylL*

konnte dieser Verdacht durch nochmaliges Sequenzieren bestätigt werden. In einer erst vor kurzem publizierten Sequenz des gesamten TOL-Plasmids wurde in den hier interessierenden Bereichen jedoch keine Änderung der früher publizierten Gene des *meta*-Operons vorgenommen (NC_003350, Greated et al., nicht publiziert). In den folgenden Betrachtungen der Gene aus dem *meta*-Operon aus *P. putida* Idaho sind die Leserahmenverschiebungen gegenüber den jeweiligen Genen aus pWW0 aufgeführt.

Die Toluat-Dioxygenase aus *P. putida* Idaho und das Enzym aus dem TOL-Plasmid pWW0 tragen über 90 % identische Positionen. Von den drei Polypeptidketten ist die von *xylX* codierte mit 98 % die Ähnlichste zu pWW0 (Abb. 4.21). Falls in *xylX* aus pWW0 kein Sequenzierfehler vorliegt, tritt analog zu *xylL* auch in *xylX* eine Leserahmenverschiebung auf, die durch das Fehlen einer Base in *xylX* aus dem TOL-Plasmid verursacht wurde. Auch in diesem Fall wird die Sequenzabweichung durch eine Deletion zweier weiterer Basen wieder aufgehoben. Wie im Fall von XylL erinnern die Aminosäuren in diesem Bereich von XylX aus *P. putida* Idaho an jene aus der Benzoat-Dioxygenase BenA (Abb. 4.5).

| | | |
|--------------------|--------------------|------|
| <i>xylX</i> pWW0: | GAAA-CGCCGAGG--CGT | 1053 |
| XylX pWW0: | E R | |
| Leserahmen +1: | T P R | |
| <i>xylX</i> Idaho: | GAAAGCGCCGAGGCA | 1056 |
| XylX Idaho: | E S A E A R | |
| <i>benA</i> Idaho: | GAGAGCGCCGATGCC | 1044 |
| BenA Idaho: | E S A D A R | |

Abb. 4.5: Darstellung des Bereichs mit einer Leserahmenverschiebung beim Vergleich der beiden Gene *xylX*. Die Nummerierung bezieht sich auf das jeweilige Startcodon. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen *xylX* und *benA* sind unterlegt. Fehlende Basen in *xylL* aus pWW0 führen zu einer Leserahmenverschiebung. Das Polypeptid aus *P. putida* Idaho gleicht an dieser Position BenA.

Die von *xylY* codierte Untereinheit der Toluat-Dioxygenase zeigt keine Leserahmenverschiebungen bezüglich des Polypeptids aus pWW0. In der Reduktasekomponenten des Enzyms, codiert von *xylZ*, weicht die Aminosäuresequenz beider Enzyme aufgrund einer weiteren Leserahmenverschiebung voneinander ab. Es handelt sich bei *xylZ* aus pWW0 um eine Insertion einer Base, die durch eine spätere Deletion wieder aufgehoben wird. Das Polypeptid aus *P. putida* Idaho ist an dieser Position zu BenC, das dem *ortho*-Weg angehört, ähnlich (Abb. 4.6), während die Basenabfolge in den *xylZ*-Genen abgesehen von der Leserahmenverschiebung identisch ist.

```

xylZ pWW0:   GTTGCCACTG-ACTTC 27
XylZ pWW0:   V  A          F
Leserahmen -1:          T  D

xylZ Idaho:  GTTGC-ACTGAACTTC 27
XylZ Idaho:  V  A  L  N  F

benC Idaho:  ATCGC-ACTGAATTTC 27
BenC Idaho:  I  A  L  N  F

```

Abb. 4.6: Darstellung des Bereichs mit einer Leserahmenverschiebung beim Vergleich der beiden Gene *xylZ*. Die Nummerierung bezieht auf das jeweilige Startcodon. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen *xylZ* und *benC* sind unterlegt. Die Insertion von einem Nukleotid in *xylZ* aus pWW0 führt zu einer Leserahmenverschiebung, die durch eine Deletion wieder aufgehoben wird.

Die Funktion von XylT liegt in der Stabilisierung bzw. Reaktivierung der Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase, XylE (Polissi und Harayama, 1993; Hugo et al., 1998). Dieses Protein tritt in verschiedenen Clustern auf: auch im Kresol- und Naphthalinabbau spielt es eine Rolle (Hugo et al., 2000).

Charakteristisch für diese Proteinklasse ist ein [2Fe-2S]-Cluster, in dem vier feststehende Cysteinreste zwei Eisenatome binden. Es wurden neben isofunktionellen Enzymen Sequenzähnlichkeiten zu Elektronentransferkomponenten einiger Oxygenasen wie beispielsweise der γ -Untereinheit der Toluat-Dioxygenasen (XylZ bzw. BenC) gefunden, die jedoch andere Ferredoxine als Vorfahren besitzen (Harayama et al., 1991).

Das 105 Aminosäuren große Protein aus *P. putida* Idaho zeigt nur 80 % identische Positionen zu XylT aus pWW0. Auch zu XylT-Proteinen aus anderen Clustern ist die Ähnlichkeit geringer als zwischen den angrenzenden XylL- oder XylE-Proteinen (Abb. 4.21). Dabei liegt die größte Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich (vgl. Abb. 4.7 und 4.8). Beim Vergleich mit der Datenbank auf Nukleotidebene bricht die gezeigte Ähnlichkeit zu *xylT* aus pWW0 nach 140 Basen ab, auf Proteinebene nach 95 Aminosäuren. Der Vergleich auf Aminosäureebene mit DmpQ aus *P. putida* CF600 zeigt keinen Homologieabbruch. In Abb. 4.7 ist die Reduktion der Ähnlichkeit, die zuerst auf Nukleotidebene und dann auch auf Aminosäureebene erfolgt, veranschaulicht. Es fällt auf, dass bei Übereinstimmung der Aminosäure häufig die dritte Base variiert. In einigen Fällen stimmt die Abweichung der Nukleotidsequenz von *xylT* aus *P. putida* Idaho mit der Sequenz von *dmpQ* überein, die auch in manchen Fällen eine Übereinstimmung von Aminosäuren nach sich zieht. Da dies jedoch nur in einigen Fällen auftritt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass der C-Terminus des Proteins aus *P. putida* Idaho DmpQ entspricht. Es liegt, wie aus dem Proteinvergleich in Abb. 4.8 für alle Proteine ersichtlich, bei XylT aus *P. putida* Idaho ein eigener Charakter vor.

| | | |
|------------------------------------|---|-----|
| | | 60 |
| <i>xylT</i> pWW0 | ATGAACAGTGCCGGCTACGAGGTGTTCGAAGTGCTAAGCGGCCAGTCATTCCGCTGTGCG | |
| <i>XylT</i> | M N S A G Y E V F E V L S G Q S F R C A | |
| <i>xylT</i> <i>P. putida</i> Idaho | ATGAACAGTGCCGGCTACGAGGTGTTCGAAGTGCTAAGCGGCCAGTCATTCCGCTGTGCG | |
| <i>XylT</i> | M N S A G Y E V F E V L S G Q S F R C A | |
| <i>dmpQ</i> <i>P. putida</i> CF600 | ATGAACCGTGCCGGTTATGAGATTTCGCAAACGGTCAGCGGCCAGACGTTCCGTTGCCTG | |
| <i>DmpQ</i> | M N R A G Y E I R E T V S G Q T F R C L | |
| | | 120 |
| <i>xylT</i> pWW0 | GAGGGCCAGTCGGTACTGCGCGCCATGGAAGCCCAGGGCAAGCGCTGCATACCGGTGGGC | |
| <i>XylT</i> | E G Q S V L R A M E A Q G K R C I P V G | |
| <i>xylT</i> <i>P. putida</i> Idaho | GAGGGCCAGTCGGTACTGCGCGCCATGGAAGCCCAGGCAAAAACGCTGCATTCGCGTGGGC | |
| <i>XylT</i> | E G Q S V L R A M E A Q H K R C I P V G | |
| <i>dmpQ</i> <i>P. putida</i> CF600 | CCCAGCAGTCGGTGCTCAGTGCATGGAGCAACAGGGCAAGCGCTGCGTGCAGTCGGT | |
| <i>DmpQ</i> | P D Q S V L S A M E Q Q G K R C V P V G | |
| | ↓ | |
| | | 180 |
| <i>xylT</i> pWW0 | TGTCGCGGTGGCGGTTGCGGCCTTTGTAGAGTGCGGGTGCTCAGCGGAGCCTACCGGAGC | |
| <i>XylT</i> | C R G G G C G L C R V R V L S G A Y R S | |
| <i>xylT</i> <i>P. putida</i> Idaho | TGTCGCGGCGGCGGTTGCGGCTGTGCAAGGTCATGTGCTGCATGGCAATTACCGTCCG | |
| <i>XylT</i> | C R G G G C G L C K V H V L H G N Y R R | |
| <i>dmpQ</i> <i>P. putida</i> CF600 | TGCCGCGCGGCGGCTGCGGCCTGTGCAAGGTGCGCGTGCTGAGCGGCACCTACCAGTGC | |
| <i>DmpQ</i> | C R G G G C G L C K V R V L S G T Y Q C | |
| | | 240 |
| <i>xylT</i> pWW0 | GGACGCATGAGCCGCGGTACAGTGCCGCGCAAGGCCCGCCGAAGCGCTGGCCCTGGCC | |
| <i>XylT</i> | G R M S R G H V P A K A A A E A L A L A | |
| <i>xylT</i> <i>P. putida</i> Idaho | GGTCGCATGAGCTGCCATCACGTGCCGCGCCGAGTTGGAGAGCCAGGGCTGGCGCTGGCA | |
| <i>XylT</i> | G R M S C H H V P P E L E S Q G L A L A | |
| <i>dmpQ</i> <i>P. putida</i> CF600 | CACAAGATGAGTTGCAACCATGTGCCGCGGAGGCGGCCAAGCAGGGCTGGCCCTGGCC | |
| <i>DmpQ</i> | H K M S C N H V P P E A A K Q G L A L A | |
| | ↓ | |
| | | 300 |
| <i>xylT</i> pWW0 | TGTC AAGTGT TCCGCAAACCGACTTGACCATCGAGTACTTTCGCCACGTTGGCGGAAAC | |
| <i>XylT</i> | C Q V F P Q T D L T I E Y F R H V G G N | |
| <i>xylT</i> <i>P. putida</i> Idaho | TGCCAGGTATTTCCGCACTCCGATCTGAGCATCGAATGCCTTCGCCCTAATAGCGAAGGC | |
| <i>XylT</i> | C Q V F P Q S D L S I E C L R P N S E G | |
| <i>dmpQ</i> <i>P. putida</i> CF600 | TGCCAACTGTTTCCCAAGACTGACCTGAACATCGAATGCCTGCGCCGCCAAGGCCCGGGC | |
| <i>DmpQ</i> | C Q L F P Q T D L N I E C L R R Q G P G | |
| | | 339 |
| <i>xylT</i> pWW0 | AAACCTGACAACATGAACATGAAGAGGTGACGTCATGA | |
| <i>XylT</i> | K P D N M N Y E E V T S Stop | |
| <i>xylT</i> <i>P. putida</i> Idaho | GACAAAAACAACA-GATGAAACAAGAGGTGCCGTCATGA | |
| <i>XylT</i> | D K N N R Stop | |
| <i>dmpQ</i> <i>P. putida</i> CF600 | GACCACAACAACAAGAACCAGCAAGAGGTGTCGTCATGA | |
| <i>DmpQ</i> | D H N N K N Q Q E V S S Stop | |

Abb. 4.7: Vergleich von *xylT*/*XylT* und *dmpQ*/*DmpQ* von pWW0 aus *P. putida* mt-2, *P. putida* Idaho und *P. putida* CF600. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Der Ähnlichkeitsabbruch der Nukleotidsequenz aus *P. putida* Idaho zu *xylT* aus pWW0 ist mit einem grauen Pfeil, der Abbruch auf Aminosäureebene mit einem schwarzen Pfeil dargestellt. Abweichende Basen in *P. putida* Idaho von der Sequenz aus pWW0 sind grau unterlegt, wobei im Fall der Übereinstimmung mit der Sequenz von *dmpQ* aus *P. putida* CF600 die Base aus dieser Sequenz ebenfalls unterlegt ist. Analog wurde mit schwarzen Unterlegungen auf Aminosäureebene verfahren.

Das Protein aus *P. putida* Idaho ist mit nur 105 Aminosäuren um 7 Bausteine kürzer als das Homologe aus pWW0. Dies liegt einer Leserahmenverschiebung zugrunde, die durch eine Deletion einer Base (Base 315 Abb. 4.7) in *xylT* aus *P. putida* Idaho entstand, worauf zwei Codons später ein Stoppsignal gelesen wird.

Eine große Ähnlichkeit bis zum Stoppcodon und damit im C-terminalen Bereich, ist nur beim Vergleich mit DmpQ, dem homologen Protein aus dem Phenolabbau, zu finden. Allerdings treten hier nur 68 % identische Positionen zwischen beiden Proteinen auf (Abb. 4.7, 4.8, 4.9). *XylT* aus *P. putida* Idaho zeigt mit insgesamt 80 % die größte Ähnlichkeit zu *XylT* aus pWW0 (Abb. 4.9). Von den in dieser Arbeit sequenzierten Genen weicht es jedoch am stärksten von der Sequenz des TOL-Plasmids pWW0 ab. Die Ähnlichkeiten verschiedener Ferredoxine sind in Abb. 4.8 und 4.9 dargestellt.

| | |
|------------------------------------|--|
| | 60 |
| <i>XylT P. putida</i> Idaho | MNSAGYEVFEVLSGQSFRCAEQSVLRAMEAQHKRCIPVGCRRGGGCGLCKVHVLHGNYYRR |
| <i>XylT pWW0</i> | MNSAGYEVFEVLSGQSFRCAEQSVLRAMEAQGKRCIPVGCRRGGGCGLCRVRVLSGAYRS |
| <i>XylT Pseudomonas sp. 47</i> | MNSAGYEVFEVLSGQSFRCAEQSVLRAMEAQGKRCIPVGCRRGGGCGLCRVRVLSGAYRS |
| <i>DmpQ P. putida</i> CF600 | MNRAGYEIRETVSGQTFRCLPDQSVLSAMEQQGKRCVPVGCRRGGGCGLCKVRVLSCTYQC |
| <i>PhlG P. putida</i> H | MSSPPFQVHETNSGQSFTCRPDQSVLRAMEEQGKRCVPVGCRRGGGCGLCKVRVLSGDIYQC |
| <i>NahT P. stutzeri</i> AN10 | MPTV-FEITVRPDGESFVCQPQQSVLRAMEAQNKHCLPVGCRRGGGCGLCKVRVLTGDYEC |
| <i>AtdS Acinetobacter sp. ADP1</i> | MGES-YQITEQCSQRFPCKAGQSVLKAMEQQGLECAPVGCRRGGGCGLCKVTVREGDYEC |
| | 113 |
| <i>XylT P. putida</i> Idaho | GRMSCHHVPPPELESQGLALACQVFPQSDLSIECL-RPNSEGDKNNR----- |
| <i>XylT pWW0</i> | GRMSRGHVPKAAAAEALALACQVFPQTDLTIEYF-RHVGGNKPDNMNYYEETS |
| <i>XylT Pseudomonas sp. 47</i> | GRMSRGHVPKAAAAEGWPWPVKCFRKPT----- |
| <i>DmpQ P. putida</i> CF600 | HKMSCNHVPPPEAAKQGLALACQLFPQTDLNIECL-RRQPGDHNNKNQOEVSS |
| <i>PhlG P. putida</i> H | GRMSCSQVPPPEAAQQGLALACQLYPRADLYIESL-RQVRSNP----- |
| <i>NahT P. stutzeri</i> AN10 | GRMSCKHVPPVEAREQGYALACRLFARSDLCIERYSKPCYENTVDPQQREKVTS |
| <i>AtdS Acinetobacter sp. ADP1</i> | GKMSRVHAPPPEALAQGEVLACRIYPLSDLIIECRPRQSAAGLANEYTTTKAMR |

Abb. 4.8: Vergleich von *XylT* aus *P. putida* Idaho mit homologen Proteinen. In allen Sequenzen sind identische Positionen schwarz unterlegt. *XylT P. putida* pWW0: M64747, Neidle et al. (1992); *XylT Pseudomonas sp. S-47*: AF320981, Park und Kim, nicht publiziert; *DmpQ P. putida* CF600: X60657, Shingler et al. (1992); *AtdS Acinetobacter sp. YAA*: AB008831, Takeo et al. (1998), Fujii et al. (1997); *PhlG P. putida* H: X80756, Herrmann et al. (1995); *NahT P. stutzeri* AN10: AF039534, Bosch et al. (1999 und 2000).

Aus dem Alignment aus Abb. 4.8 wurde folgendes Dendrogramm abgeleitet:

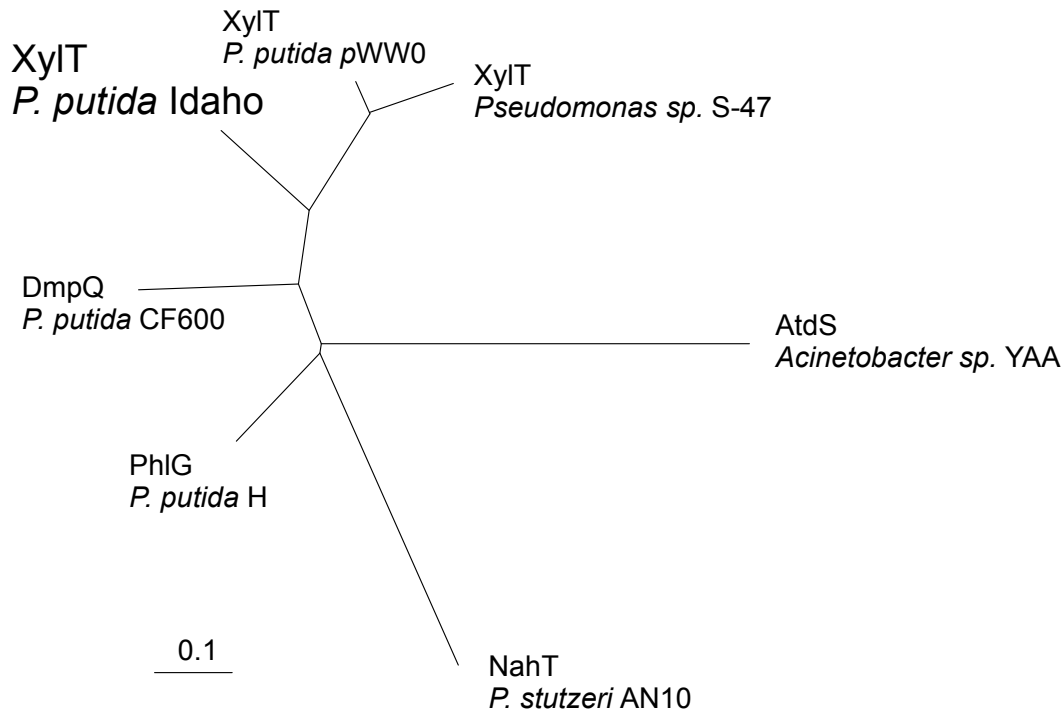


Abb. 4.9: Dendrogramm verschiedener Ferredoxin-ähnlicher Proteine. Die Referenzen zu den einzelnen Proteinen sind der Legende von Abb. 4.8 zu entnehmen.

Die Abweichung der Nukleotidsequenz zwischen pWW0 und *P. putida* Idaho am 3'-Ende von *xylT* (Abb. 4.7) setzt sich bis in das 5'-Ende von *xyle* fort. Xyle ist mit 95 % identischen Positionen sehr ähnlich zu dem Protein aus pWW0, es gibt jedoch ein Protein, das vom TOL-Plasmid pWW53 aus *P. putida* MT53 (AF102891, Kok et al., 1999) codiert wird, das auf Protein- und Nukleotidebene 100 % Ähnlichkeit zu dem aus *P. putida* Idaho sequenzierten Protein zeigt. Zusätzlich zu der Sequenzabweichung in der DNA bezüglich *xyle* aus pWW0 tritt in *xyle* aus *P. putida* Idaho eine Leserahmenverschiebung durch die Insertion einer Base auf, die 7 Positionen später durch eine Deletion wieder aufgehoben wird (Abb. 4.10). An dieser Stelle liegt eine Schnittstelle für *Xba*I, welche in pWW0 nach der publizierten Sequenz nicht auftritt.

```

xylE pWW0:      GTACTGGA-CATGAGCAAGGCC 63
XylE pWW0:      V  L          K  A
Leserahmen +1:      D  M  S

                XbaI
xylE Idaho:     GTACTCAATCTAGAG-AGTGCC 63
XylE Idaho:     V  L  N  L  E  S  A

xylE pWW53:    GTACTCAATCTAGAG-AGTGCC 63
XylE pWW53:    V  L  N  L  E  S  A

```

Abb. 4.10: Darstellung des Bereichs mit einer Leserahmenverschiebung beim Vergleich der Gene *xylE* aus pWW0 und *P. putida* Idaho. Die Nummerierung bezieht auf das jeweilige Startcodon. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen *xylE* aus pWW0 und *P. putida* Idaho sind unterlegt. Die Sequenz von *P. putida* Idaho stimmt mit derjenigen des TOL-Plasmids pWW53 aus *P. putida* MT53 überein. In diesen beiden Stämmen ist im gezeigten Sequenzabschnitt eine Schnittstelle für *XbaI* vorhanden, die an entsprechender Stelle nach der publizierten Sequenz im TOL-Plasmid pWW0 nicht existiert.

Das Enzym XylG scheint aus verschiedenen Regionen isofunktionaler Enzyme zusammengesetzt zu sein. Die größte Ähnlichkeit wird – abweichend von anderen Proteinen des Clusters - mit einem Protein aus dem Biphenylabbau von *Achromobacter* gefunden (98 %), dicht gefolgt von Proteinen aus zwei verschiedenen Stämmen von *P. stutzeri* (beide 96 %). Die Ähnlichkeit zu diesen drei Proteinen besteht auch in einem Bereich, in dem XylG aus *P. putida* Idaho infolge einer Leserahmenverschiebung von XylG aus pWW0 abweicht (Aminosäure 88-108). In Abb. 4.11 ist ein Vergleich der Hydroxymuconatsemialdehyd-Dehydrogenasen dargestellt, bei welchem Identitäten und Abweichungen von XylG aus *P. putida* Idaho bezüglich anderer Proteine gezeigt sind.

XylF, die Hydroxymuconatsemialdehyd-Hydrogenase, zeigt die höchste Ähnlichkeit zu dem Homologen aus *P. stutzeri* AN10. Es treten 6 vereinzelte Aminosäuren auf, die von dem Protein aus *P. stutzeri* abweichen, aber identisch zu den Aminosäuren an entsprechender Position des Proteins aus pWW0 sind. Umgekehrt treten 4 Aminosäuren auf, die eine Abweichung zu dem von pWW0 codierten Protein zeigen. Diese sind aber identisch im Protein aus *P. stutzeri* (Abb. 4.12).

Was die höhere Ähnlichkeit zu NahN aus *P. stutzeri* ausmacht, liegt in der DNA-Ebene: Es treten zusätzlich Basen verglichen mit der Sequenz aus pWW0 (insgesamt 3) auf, zunächst eine Base, die zu einer Leserahmenverschiebung führt (s. auch Abb. 4.12), welche durch eine weiter stromabwärts liegende Insertion von zwei weiteren Basen aufgehoben wird (Abb. 4.13). Insgesamt sind sich die Sequenzen aus *nahN* und *xylF* jedoch sehr ähnlich.

| | | |
|-------------------------|---|-----|
| | | 100 |
| <i>P. putida</i> Idaho | MKEIKHFISGAFVGSASGKLEDNVSPANGQVIGRVHEAGRAEVDAAVKAARAALKGPWGKMTVAERAEILHRVADGITARFDEFLEAECLDTGKPKSLAS | |
| <i>Achromobacter</i> |N.AF.G...KL.DNVS.A.....K.....I...D....ECLDTGKPKSLAS | |
| <i>P. putida</i> pWW0 |S.EL.G...KL.DNVS.A.....R.....I...G....RMPGHRQAEVAGQ | |
| <i>P. stutzeri</i> OM1 |N.AF.D...RT.EDIN.V.....R.....V...D....ECLDTGKPKSLAS | |
| <i>P. stutzeri</i> AN10 |N.AF.D...RT.EDIN.V.....R.....V...D....ECLDTGKPKSLAS | |
| | | 200 |
| <i>P. putida</i> Idaho | HIDI PRGAANFKVFADLLKNVANDAFEMATPDGAGALNYGVRPCKGVIGVISPWNLPLLLMTWKVGPALACGNCVVVKPSEETPLTATLLGEVMQAAGVP | |
| <i>Achromobacter</i> | HIDI PRGA.....L...ANET..... | |
| <i>P. putida</i> pWW0 | PHRHSARR.....L...ANEA..... | |
| <i>P. stutzeri</i> OM1 | HIDI PRGA.....I...PTEA..... | |
| <i>P. stutzeri</i> AN10 | HIDI PRGA.....I...PTEA..... | |
| | | 300 |
| <i>P. putida</i> Idaho | AGVYNVHGFGGDSAGAFLETPDVEDAYTFTGETGTGETIMRAAAKQVRSLELGGKNAGIVFADCDLDKAIEGTLRSFAFANCGQVCLGTERVYVERPI | |
| <i>Achromobacter</i> |M..... | |
| <i>P. putida</i> pWW0 |M..... | |
| <i>P. stutzeri</i> OM1 |L..... | |
| <i>P. stutzeri</i> AN10 |L..... | |
| | | 400 |
| <i>P. putida</i> Idaho | FDAFVARLKAGAEALKIGEPNDPEANFGPLISHKHREKVLISYYQQAVDDGATVVVTGGGVPEMPAHLAGGAWVQPTIWTGLADDSAVVTTEEIFGPCCHIRP | |
| <i>Achromobacter</i> |H...L.....A..... | |
| <i>P. putida</i> pWW0 |P...P.....A..... | |
| <i>P. stutzeri</i> OM1 |H...L.....T..... | |
| <i>P. stutzeri</i> AN10 |H...L.....T..... | |
| | | 486 |
| <i>P. putida</i> Idaho | FDTEAEAEIELANSLPYGLASAIWTENASRAHRVAGQIEAGIVVWNSWFLRDLRTAFGGAKQSGIGREGGVHSLEFYTELKNICVKL | |
| <i>Achromobacter</i> | ..S.E.....AS.....S.....- | |
| <i>P. putida</i> pWW0 | ..S.E.....VR.....S.....L | |
| <i>P. stutzeri</i> OM1 | ..T.A.....AS.....S.....L | |
| <i>P. stutzeri</i> AN10 | ..S.E.....AS.....S.....L | |

Abb. 4.11: Vergleich der zu der Hydroxymuconatsemialdehyd-Dehydrogenase XylG aus *P. putida* Idaho ähnlichsten Proteine. An Positionen, an welchen nicht alle fünf Sequenzen übereinstimmen, sind die Aminosäuren von XylG aus *P. putida* Idaho und ggf. die identischen Aminosäuren aus anderen Stämmen unterlegt. BphG aus *Achromobacter xylosoxidans* KF701: Proteinzugangsnummer JW0056 Kang et al. (1998); XylG aus *P. putida* pWW0: M64747, Harayama et al. (1991), Neidle et al. (1992); XylG aus *P. stutzeri* OM1: AB001722, Ouchiyama et al. (1998); XylG aus *P. stutzeri* AN10: AF039534, Bosch et al. (1999 und 2000).

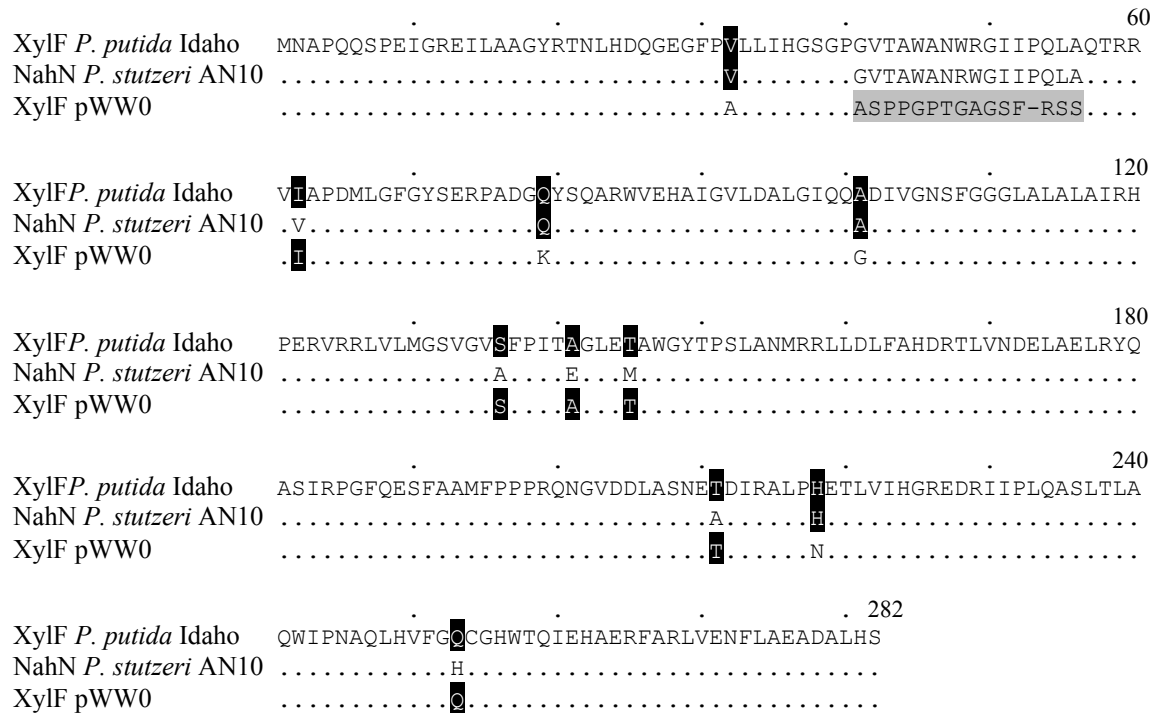


Abb. 4.12: Vergleich der Proteinsequenzen der Hydroxymuconatsemialdehyd-Hydrogenasen (XylF aus *P. putida* Idaho und pWW0 aus *P. putida* mt-2 bzw. NahN aus *P. stutzeri* AN10). In XylF aus *P. putida* Idaho treten einzeln Aminosäuren auf, die von NahN bzw. XylF aus pWW0 abweichen, dann aber mit dem jeweils anderen homologen Protein übereinstimmen (schwarz unterlegt). Eine durch eine Leserahmenverschiebung verursachte Abweichung von XylF aus pWW0 von den beiden anderen Proteinen ist grau unterlegt.



Abb. 4.13: Darstellung des Bereichs mit einer Leserahmenverschiebung beim Vergleich der beiden Gene *xylF*. Die Nummerierung bezieht sich auf das jeweilige Startcodon. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Der einzige Unterschied in der hier gezeigten Nukleotidsequenz zwischen *nahN* und *xylF* ist grau, der Unterschied in der Nukleotidsequenz von *xylF* aus *P. putida* Idaho zu *xylF* aus pWW0 schwarz unterlegt. Eine Deletion einer Base in *xylF* aus pWW0 führt zu einer abweichenden Proteinsequenz von *xylF* aus *P. putida* Idaho und *nahN* aus *P. stutzeri* AN10. Durch eine Deletion von zwei weiteren Basen wird der Leserahmen und die Homologie zu den Proteinen aus den beiden anderen Stämmen wieder hergestellt. Möglicherweise handelt es sich wie im Fall von *xylL* um einen Sequenzierfehler in *xylF* aus pWW0.

Die Hydroxypentadienoat-Hydratase (XylJ) aus *P. putida* Idaho ist nahezu identisch mit dem Protein, das von pWW0 codiert wird (99 % identische Positionen). Von 222 Aminosäuren sind nur zwei unterschiedlich (Abb. 4.14), wovon eine (Valin statt Leucin in Position 185) zu einer Identität zu den Proteinen aus dem Phenol- und Anilinabbau führt (DmpE aus *P. putida*

CF600 bzw. AtdE aus *Acinetobacter sp.* YAA). Da für diese Mutation jedoch nur ein Basenaustausch notwendig ist, kann die Übereinstimmung an dieser Stelle auch zufällig entstanden sein.

Zu NahL aus *P. stutzeri* AN10 konnten 97 % identische Positionen gefunden werden. Ein Hinweis, dass XylJ aus *P. putida* Idaho mit dem Protein von pWW0 besonders eng verwandt ist und nicht mit dem Protein aus *P. stutzeri*, ist die Länge des Proteins. Analog zum Protein aus pWW0 hat XylF aus *P. putida* Idaho eine Kettenlänge von 222 Aminosäuren. Das Protein aus *P. stutzeri* AN10 besteht nach der publizierten Sequenz aus 261 Aminosäuren (Abb. 4.14).

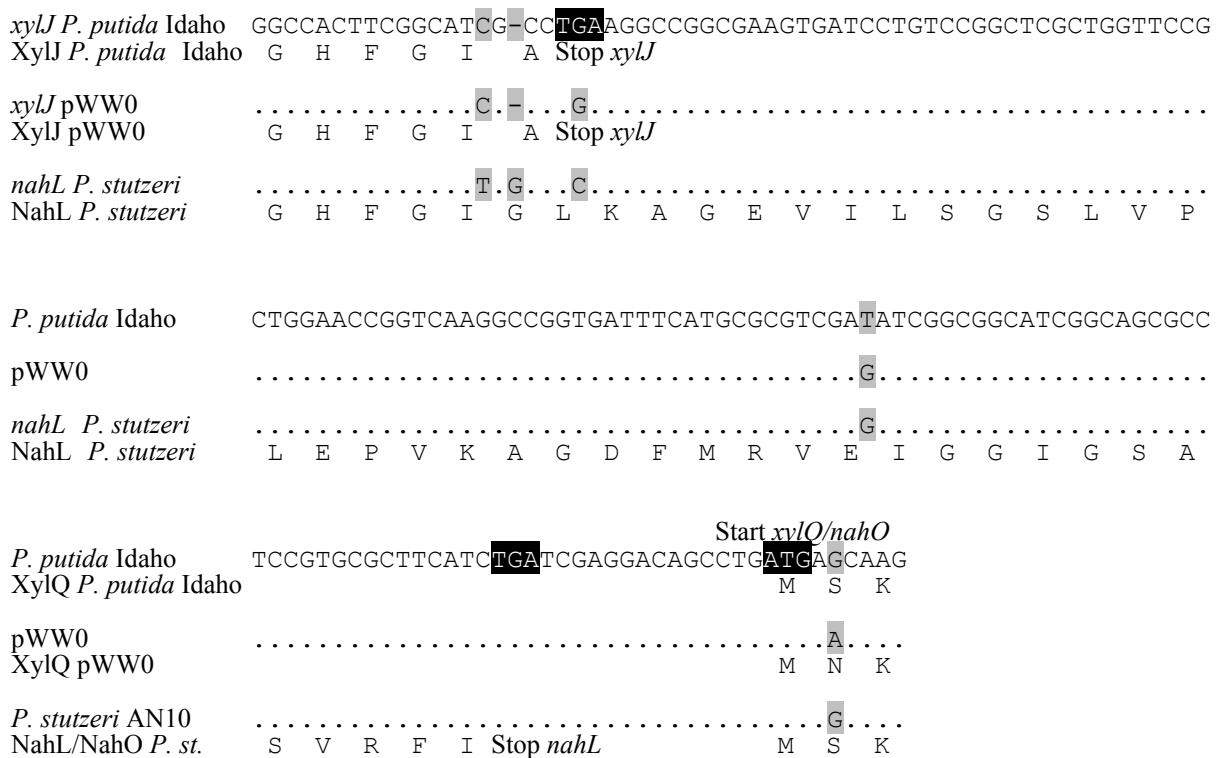


Abb. 4.14: Homologievergleich von den Hydroxypentadienoat-Hydratasen *xylJ*/XylJ und *nahL*/NahL im Bereich des Stopcodons und der intergenischen Region bis zum Start von *xylQ*/XylQ bzw. *nahO*/NahO der Stämme *P. putida* Idaho, *P. putida* mt-2 (pWW0) und *P. stutzeri* AN10. Die Aminosäuren sind in der Mitte unter dem Codon angegeben. Identische Positionen auf Nukleotidebene sind durch Punkte gekennzeichnet, abweichende Positionen sind grau unterlegt. Start- und Stopcodons sind schwarz unterlegt. In den *xylJ*-Genen ist im Codon vor dem Stopsignal eine Base weniger vorhanden als in *nahL*. Die Proteine sind somit kürzer als das Homologe aus *P. stutzeri*. Auffällig ist die gezeigte Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz in allen drei Stämmen.

Aus dem Brenzcatechinabbau entstehen über den *meta*-Weges letztendlich Pyruvat und Acetaldehyd. Acetaldehyd wird von dem von XylQ codierten Enzym, der Acetaldehyd-Dehydrogenase, zu Acetyl-CoA oxidiert und steht damit weiteren Synthesen bzw. dem Tricarbonsäurezyklus zur Verfügung.

Die Acetaldehyd-Dehydrogenase von *P. putida* Idaho ist in 98 % der Positionen mit NahO aus *P. stutzeri* AN10 und in 94 % der Positionen mit XylQ des TOL-Plasmids pWW102 aus *P. putida* O₂C₂ (AF043925) identisch. XylQ aus pWW0 zeigt zu dem Protein aus *P. putida* Idaho nur eine Sequenzähnlichkeit von 57 % identischen Positionen (Abb. 4.15).

| | |
|------------------------------|--|
| | 60 |
| XylQ <i>P. putida</i> Idaho | MSKKLKAAIIGPGNIGTDLV MKIVR-SEWIEPVWVMVGIDPNSDGLKRAREFGLKTTAEGV |
| NahO <i>P. stutzeri</i> AN10 |ML.....E..... |
| XylQ pWW102 |ML.....M..... |
| XylQ pWW0 | .N...V.....MI.VM.NAQYL.MGA.....A...A..QRM.VA..H... |
| | 120 |
| XylQ <i>P. putida</i> Idaho | DGLVPHVLDDDIRIAFDATSAYVHAENSRKLN--ELGVLMVDLTPAAIGPYCVPPVNLKQ |
| NahO <i>P. stutzeri</i> AN10 | ...L...E..... |
| XylQ pWW102 | ...L.....A..... |
| XylQ pWW0 | E.FINLPEFA..DFVF.....SAHVQNDALLRRAKP.IRLI.....EE |
| | 180 |
| XylQ <i>P. putida</i> Idaho | HVGTLEMNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVQPVAYGEIVATVSSRSIGPGTRKNIDEFTRT |
| NahO <i>P. stutzeri</i> AN10 | |
| XylQ pWW102 | ...R.....V..... |
| XylQ pWW0 | .LA-KL.....AK.H.A...SIA.K.A...A.....E. |
| | 240 |
| XylQ <i>P. putida</i> Idaho | TAGAIEQVGGAKEGKAIIVVNPAEPPLMRDTIHCLTETEPDQDAITASVHAMIAEVQKY |
| NahO <i>P. stutzeri</i> AN10 | |
| XylQ pWW102 |R.....I.....DS...A...V..... |
| XylQ pWW0 | .SK...VI...AK.....M.....I...VFV.S...-V..AQVE...EE.TSA..A. |
| | 300 |
| XylQ <i>P. putida</i> Idaho | VPGYRLKNGPVFD-----GNRVSI FMEVEGLGDYLPKYAGNLDIMTAA |
| NahO <i>P. stutzeri</i> AN10 | |
| XylQ pWW102 | |
| XylQ pWW0 |QKVQ..VIPESAPLHIPGLGTFS.LKT..YL...AAH...A..SS.....S. |
| | 327 |
| XylQ <i>P. putida</i> Idaho | ALRTGEMFAEETASGTIQLPRREAALA |
| NahO <i>P. stutzeri</i> AN10 | |
| XylQ pWW102 |A.....DI.F. |
| XylQ pWW0 | ..A.A.RM.QSLLNA----- |

Abb 4.15: Vergleich der Acetaldehyd-Dehydrogenase XylQ aus *P. putida* Idaho mit den homologen Proteinen aus *P. stutzeri* AN10 und aus den TOL-Plasmiden pWW102 und pWW0. Auffällig ist die hohe Sequenzähnlichkeit zu NahO aus *P. stutzeri*, während die Sequenz aus pWW0 stark von den anderen gezeigten Sequenzen abweicht. XylQ aus pWW102 weist ebenso wie das Protein aus *P. putida* Idaho den Charakter des Proteins aus dem Naphthalinabbau auf.

Platt et al. (1995) sowie Aemprapa und Williams, (1998) begründeten die Homologie zwischen NahO des Naphthalinabbaus und XylQ mit dem Genaustausch zwischen den beiden *meta*-Operons im Lauf der Evolution. Betrachtet man die intergenische Region zwischen *xylJ* und *xylQ* in Abb. 4.14, so ist die Nukleotidsequenz von *P. putida* Idaho, *P. putida* mt-2 und *P. stutzeri* AN10 nahezu identisch. Diese Region würde sich für einen Genaustausch anbieten. Für *xylQ* aus *P. putida* Idaho, wie auch für pWW102 (Aemprapa und Williams, 1998), zeigt der Vergleich auf Nukleotid- und Aminosäureebene Ähnlichkeiten zu dem Protein NahO aus

dem Naphthalinabbau auf. Die Ähnlichkeit zwischen *xylQ* aus *P. putida* Idaho und *nahO* ist allerdings größer als zwischen den *xylQ*-Genen aus *P. putida* Idaho und pWW102. Am 3'-Ende im Bereich des Stopcodons treten 4 aufeinanderfolgende Basenaustausche auf. Zur Folge sind statt den Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin in den Sequenzen von *P. putida* Idaho und *P. stutzeri* AN10 in der Sequenz aus pWW102 Asparaginsäure und Isoleucin zu finden. Auch im Stopcodon gleicht *xylQ* aus *P. putida* Idaho der Sequenz von *nahO* aus *P. stutzeri* AN10. Das Gen aus pWW102 trägt an dieser Position eine Base mehr, was jedoch wie in den beiden anderen Genen in einem Stopcodon resultiert.

```

xylQ pWW102:   CGCGACATCGCGTTCGCGTGAGAGGAGT 931
XylQ pWW102:   R  D  I  A  F  A  Stop

xylQ Idaho:    CGTGAAGCGGCCACTGGCCT-AAAGGAGT 930
XylQ Idaho:    R  E  A  A  L  A  Stop

nahO P. stutzeri: CGTGAAGCGGCCACTGGCCT-AAAGGAGT 930
NahO P. stutzeri: R  E  A  A  L  A  Stop

```

Abb. 4.16: 3'-Ende der Acetaldehyd-Dehydrogenase XylQ von *P. putida* Idaho verglichen mit dem Ende von XylQ aus dem Plasmid pWW102 und NahO aus *P. stutzeri* AN10. Die Nummerierung bezieht sich auf das jeweilige Startcodon. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon. Unterschiede in der Nukleotidsequenz sind grau unterlegt. Dargestellt ist der Bereich, in welchem XylQ/*xylQ* aus pWW102 von den beiden anderen Sequenzen abweicht. Ein Austausch von 4 Basen hat eine Abweichung von zwei Aminosäuren zur Folge und im Stopcodon trägt die Sequenz aus pWW102 eine Base mehr. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *P. putida* Idaho ist in diesem Bereich identisch mit jener aus *P. stutzeri*.

Die Sequenzierung des Clusters mit dem *meta*-Weg zeigte, dass die Gene für die Toluatdioxygenase *xylXYZ*, die für den Umsatz von Benzoat zu dem in dieser Arbeit produzierten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol erforderlich sind, tatsächlich vorhanden waren. Desweiteren konnte durch den Vergleich mit dem sehr ähnlichen TOL-Plasmid aus pWW0 festgestellt werden, dass dieses in manchen Bereichen trotz der hohen Ähnlichkeit von der Sequenz aus *P. putida* Idaho und auch von anderen Genen des *meta*-Weges abweicht. Die zeitweiligen Abweichungen der Ähnlichkeit von pWW0, die Leserahmenverschiebungen zugrunde lagen, fielen zuerst bei der Betrachtung von XylL/BenD mit homologen Proteinen auf. Dort konnte nachgewiesen werden, dass es sich in der publizierten Sequenz um Sequenzierfehler handelte. Die Abweichungen fanden sich in fast jedem anderen hier betrachteten Gen/Protein wieder.

4.2.3. Charakterisierung des Genclusters mit *benD*

Dieser Abbauweg zeigt eine Homologie zu dem von Cowles et al. (2000) beschriebenen Cluster aus *P. putida* PRS2000. Es ist im Stamm *P. putida* Idaho jedoch zwischen BenK und BenE das Gen *catA* für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase inseriert, die bei *P. putida* PRS2000 an dieser Stelle nicht auftritt.

Wie aus Abb. 4.23 ersichtlich ist, sind die Polypeptide von BenABC aus *P. putida* Idaho zu 97-99 % identisch zu den entsprechenden Aminosäureketten aus *P. putida* PRS2000. Leserahmenverschiebungen, die wie im *meta*-Operon, das möglicherweise im Fall von pWW0 Sequenzierfehler trägt und die zu Abweichungen der homologen Gene führen, treten hier nicht auf.

Das zu BenK aus *P. putida* Idaho homologe Protein, welches man in *Acinetobacter* findet, wurde von Collier et al. (1997) als ein Benzoat-Transportprotein identifiziert. Es gibt kein anderes Protein in der Datenbank, das eine so hohe Ähnlichkeit zu BenK aus *P. putida* Idaho aufweist wie das Protein aus *P. putida* PRS2000 (96 %). Die nächstähnlichen Proteine stammen aus *P. aeruginosa* (AE004903, 48 %) und *Acinetobacter* (AF009224, 47 %). Das Protein in *P. putida* Idaho ist um eine Aminosäure kürzer als sein Homologes aus *P. putida* PRS2000 (Abb. 4.17).

| | | |
|----------------------|--------------------|-----|
| <i>benK</i> Idaho: | CGCAAAG-GCA-G-CGGC | 717 |
| BenK Idaho: | R K G S G | |
| <i>benK</i> PRS2000: | CGTAAAGCGGGTGGCGGG | 720 |
| BenK PRS2000: | R K A G G G | |

Abb. 4.17: Darstellung des Bereichs von *benK* aus *P. putida* Idaho, in dem drei Basen weniger auftreten als in dem homologen Protein aus *P. putida* PRS2000. Die Nummerierung bezieht sich auf das jeweilige Startcodon. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter dem Codon.

Die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase tritt in dem homologen Cluster aus *P. putida* PRS2000 nicht auf. In *P. putida* Idaho ist dieses Protein zwischen BenK und BenE codiert. Das einzige andere Gencluster, in dem alle in *P. putida* Idaho gefundenen Gene, wenn auch in einer anderen Abfolge, ebenfalls auftreten, ist das aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (Abb. 4.23). Im nachstehenden Dendrogramm (Abb. 4.19) ist eine Homologie der Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase von *P. putida* Idaho zu anderen Brenzcatechin-1,2-Dioxygenasen aus *Pseudomonas*-Stämmen dargestellt. Darunter ist auch das Enzym aus *P. putida* PRS2000 (U12557, Houghton et al., 1995), das 75 % identische Positionen zu dem Protein aus *P. putida* Idaho aufweist. Von

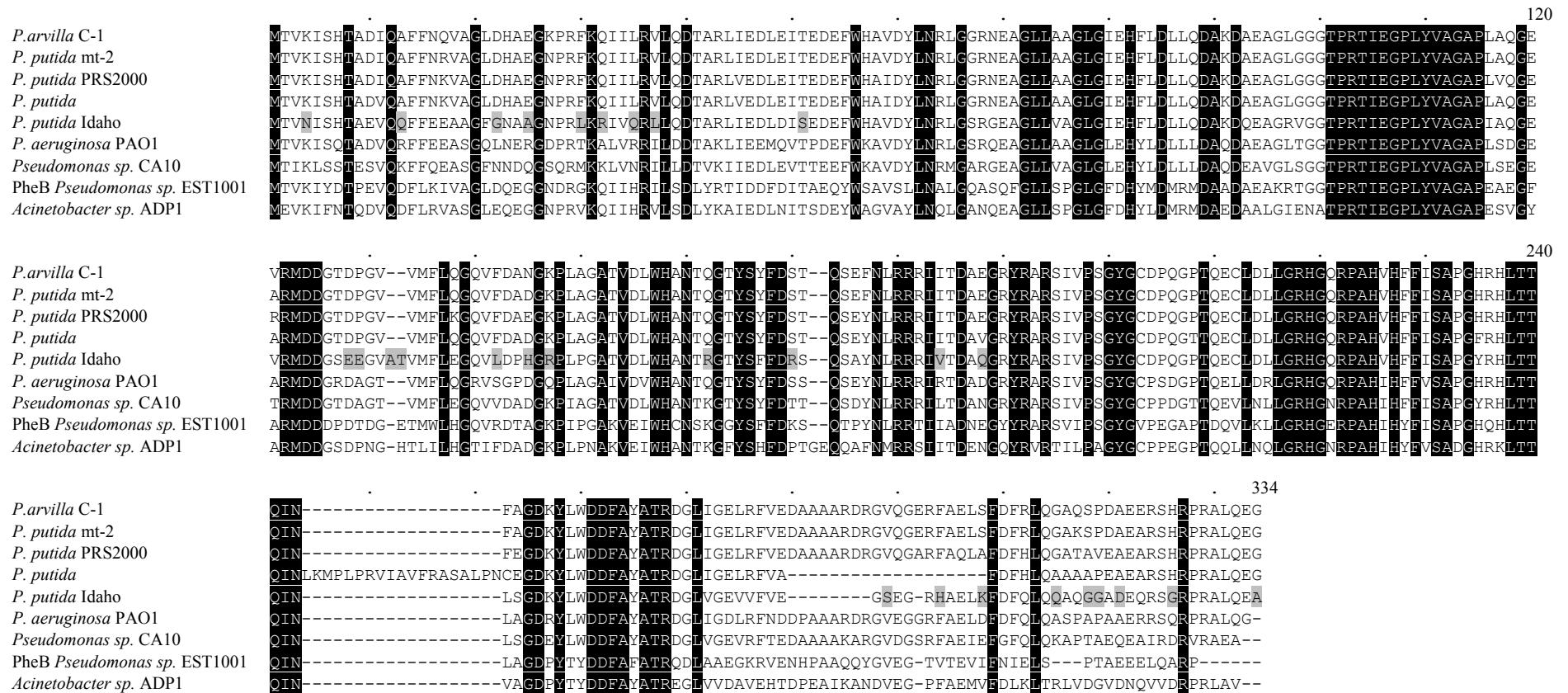


Abb. 4.18: Sequenzvergleich einiger Brenzocatechin-1,2-Dioxygenasen. Das Alignment liegt dem Dendrogramm in Abb. 4.19 zugrunde. In allen Sequenzen sind identische Positionen schwarz unterlegt. Positionen, an welchen sich die Sequenz aus *P. putida* Idaho von allen anderen Sequenzen unterscheidet, sind grau unterlegt. *P. arvilla* C1: D37783, Nakai et al. (1995); *P. putida* mt-2: D37782, Nakai et al. (1995); *P. putida* PRS2000: U12557, Houghton et al. (1995); *P. putida*: AF363241, Jung und Min, nicht publiziert, kein Stamm angegeben; *P. aeruginosa* PAO1: AE004678, Stover et al. (2000); *Pseudomonas* sp. CA10: AB047272, Nojiri et al. nicht publiziert; PheB *Pseudomonas* sp. EST1001 Plasmid pEST1226: M57500, Kivisaar, et al. (1991); *Acinetobacter* sp. ADP1: AF009224; Neidle et al. (1988), Collier et al. (1997 und 1998).

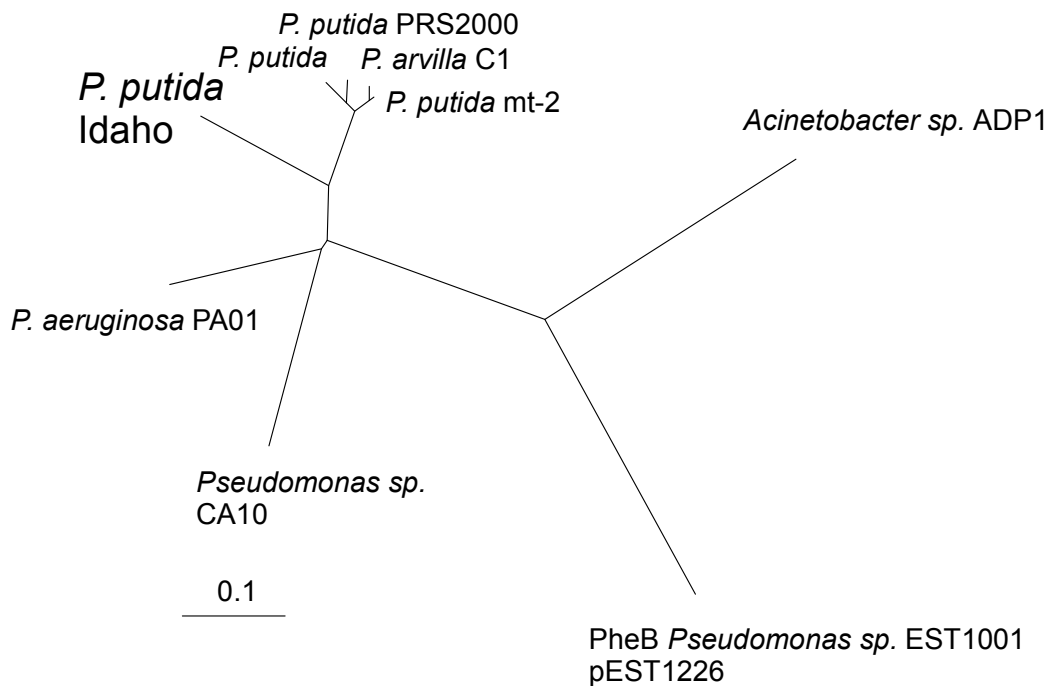


Abb. 4.19: Dendrogramm zur Verwandtschaft einiger Brenzcatechin-1,2-Dioxygenasen und Einordnung von CatA aus *P. putida* Idaho. Die Baumabschnittsenden sind mit den Namen der betreffenden Stämme bezeichnet, aus denen das homologe Protein stammt. Mit Ausnahme der Dioxygenase PheB aus *Pseudomonas* sp. EST 1001 sind alle zum Vergleich herangezogenen Proteine mit CatA bezeichnet. Zugangsnummern und Literaturhinweise sind Abb. 4.18 zu entnehmen.

der Gruppe der Proteine aus *P. putida* nimmt das Protein aus *P. putida* Idaho jedoch eine entfernte Stellung ein (Abb. 4.18 und 4.19).

Insgesamt ist CatA aus *P. putida* Idaho 7 Aminosäuren kürzer als das Homologe aus *P. putida* PRS2000. An Position 438-443 (bezogen auf Abb. 4.20) treten in *catA* aus *P. putida* Idaho zunächst sechs Basen mehr auf als in den homologen Proteinen, was zu zwei zusätzlichen Aminosäuren führt. Im C-Terminus des Proteins dagegen fehlen im Vergleich zu CatA aus *P. putida* PRS2000 9 Aminosäuren (Pos. 859-882 und 895-897, Abb. 4.20). Da die Positionierung von *catA* aufgrund der großen Ähnlichkeit des Clusters aus *P. putida* Idaho zu dem Cluster aus *P. putida* PRS2000 überraschend ist, wurden die Bereiche der Homologiewechsel genauer betrachtet (Abb. 4.20). Die intergenische Region zwischen *benK* und *catA* beinhaltet 29 Basen. Für die Regulation von *catA* ist beschrieben, dass dieses Gen unabhängig von *catBC* durch den Regulator CatR exprimiert werden kann (Houghton et al., 1995). Es wird weiterhin vermutet, dass im stromaufwärts von *catA* gelegenen Gen *catC* eine Regulatorbindestelle existiert, die die Expression ermöglicht. Diese Vermutung kann durch die Positionierung von *catA* direkt stromabwärts von *catC* in *P. putida* PRS2000 unterstützt

werden, da in den verwandten Stämmen *Acinetobacter sp.* ADP1 und laut Kukor et al. (1988) auch in *P. aeruginosa* PAO1c, *catA* etwa 3 kb von *catBC* entfernt liegt. Ob in *P. putida* Idaho dagegen im *catA* vorangehenden Gen *benK* eine solche Regulatorbindestelle existiert, ist nicht bekannt. In der DNA des Clusters des β -Ketoacidweges konnte die von Aldrich et al. (1988 und 1989) publizierte Promotorsequenz des *catBC*-Operons nicht gefunden werden. Möglicherweise wird *catA* in *P. putida* Idaho zusammen mit den *ben*-Genen transkribiert. Was jedoch in der Sequenz von *P. putida* Idaho analog der Sequenzen aus *P. putida* PRS2000 und *P. aeruginosa* PAO1 existiert, ist die ribosomale Bindestelle GAGG. In der intergenischen Region von *benK* und *benE* dagegen steht statt dem ersten G ein C (Base 42 Abb. 4.20).

Der Vergleich der Nukleotidsequenzen stromaufwärts von *catA* aus *P. putida* Idaho, *P. putida* PRS2000, *P. aeruginosa* PAO1 und der stromabwärts von *benK* aus *P. putida* PRS2000 gelegenen Region (Pos. 26-55, Abb. 4.20) zeigt Übereinstimmungen aller vier Sequenzen. Diese Homologie könnte für ein Rekombinationsereignis in Frage kommen, was die Positionierung von *catA* in *P. putida* Idaho erklären könnte. Ein zweiter möglicher Bereich für eine homologe Rekombination liegt unmittelbar hinter *catA* von *P. putida* Idaho (Pos. 1001-1013, Abb. 4.20). Hier ist bemerkenswert, dass der Bereich stromabwärts von *catA* aus *P. putida* PRS2000 der *benK* folgenden Region von *P. putida* PRS2000 ähnlicher ist als dem Bereich stromabwärts von *catA* aus *P. aeruginosa* PAO1. Die Ähnlichkeiten der *ben*- und *cat*-Regionen stromauf - und stromabwärts von *catA* geben einen Hinweis auf die Lokalisierung von *catA* in *P. putida* Idaho.

Die Stämme *P. putida* PRS2000 und *P. aeruginosa* PAO1 sind entfernter miteinander verwandt als die beiden Stämme von *P. putida*. Daher deutet die Ähnlichkeit der beiden in Abb. 4.20 gezeigten Sequenzen von *P. putida* PRS2000 und *P. aeruginosa* PAO1, darauf hin, dass diese beiden Sequenzen die ursprünglicheren sind, und die Positionierung von *catA* in *P. putida* Idaho erst später stattfand.

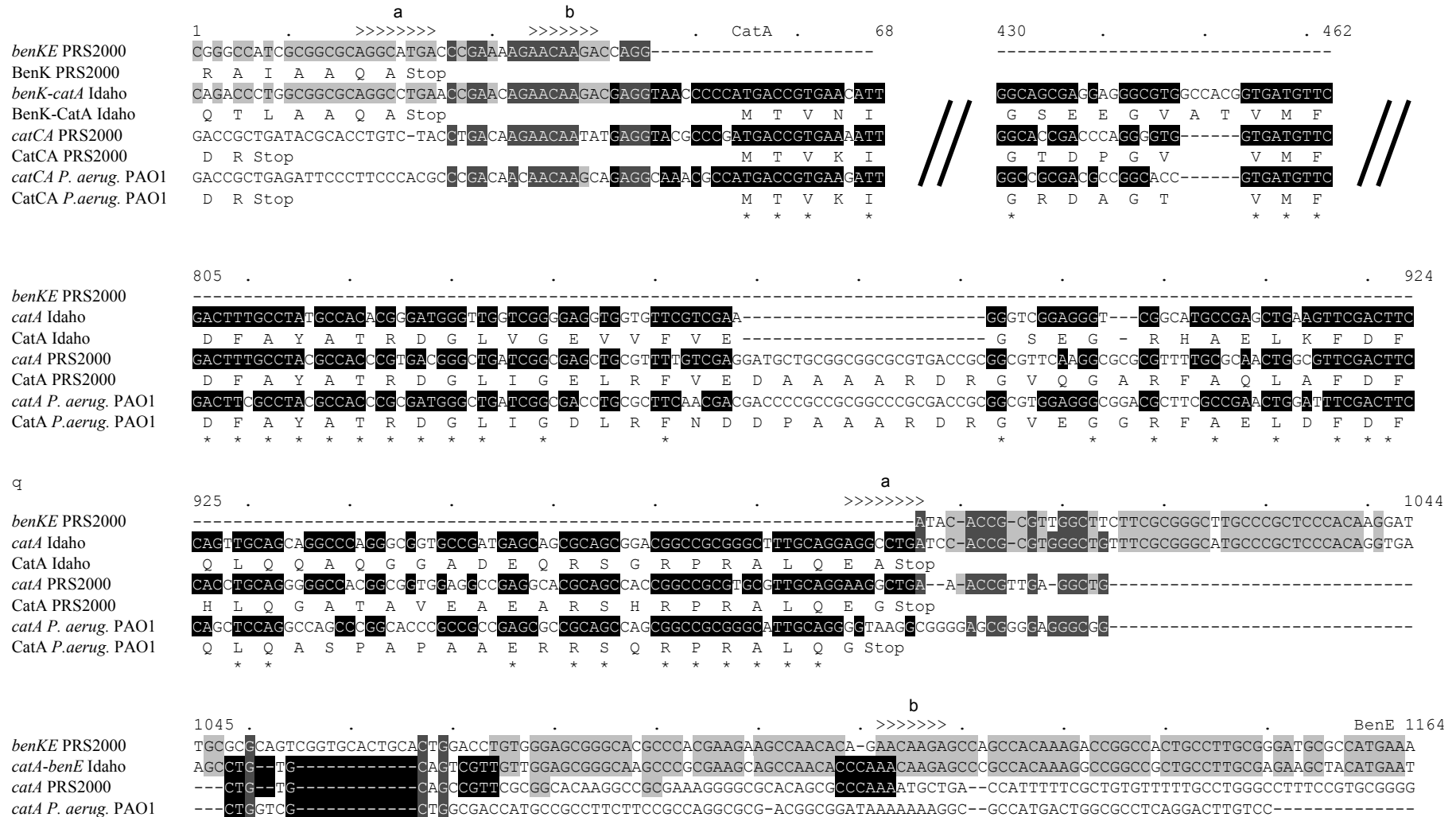


Abb. 4.20: Vergleich der Regionen um das Start- und Stopcodon von *catA* aus *P. putida* Idaho mit Sequenzen aus *P. putida* PRS2000 und *P. aeruginosa* PAO1. Die Symbole für die Aminosäuren in CatA stehen in der Mitte unter dem Codon. Identische Aminosäuren von CatA sind mit * gekennzeichnet. Identische Nukleotide in den relevanten Bereichen aller Sequenzen oder die Übereinstimmungen der drei Sequenzen von *P. putida* Idaho und *P. putida* PRS2000 sind dunkelgrau unterlegt. Identische Positionen der Sequenz aus *P. putida* Idaho mit *benK* und *benE* bzw. deren intergenischer Region sind hellgrau, identische Positionen mit den abgebildeten Sequenzen von *catA* schwarz unterlegt. Repetitive Elemente aus der Sequenz von *P. putida* Idaho sind mit > über den Sequenzen gekennzeichnet. In den nicht abgebildeten Regionen von *catA* (Querbalken) besteht Homologie in allen drei Genen (Pos. 69-429 und 463-804).

4.2.4. Homologien zu anderen Clustern

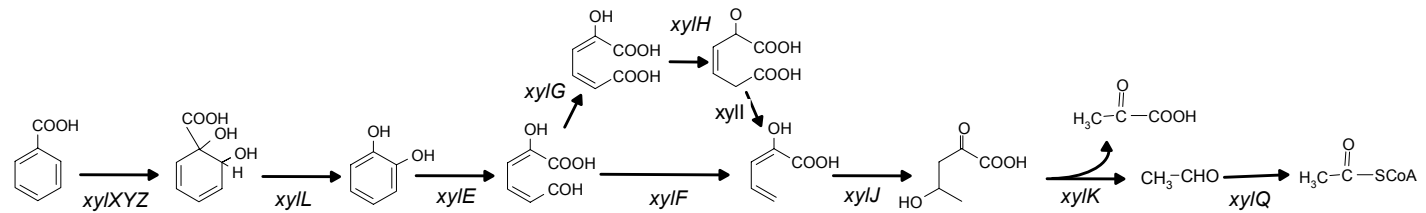
Die in *P. putida* Idaho gefundenen Cluster wurden mit anderen Clustern aus der Datenbank verglichen. Das Cluster um *xylL* zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den Genen des *meta*-Operons aus dem Plasmid pWW0. Auf Proteinebene beträgt der Anteil identischer Positionen zwischen 80 und 98 %. Bei diesen Zahlen ist nicht berücksichtigt, dass in den Nukleotidsequenzen des TOL-Plasmids pWW0 möglicherweise Sequenzierfehler auftreten, und somit zu Abweichungen zwischen den Sequenzen aus *P. putida* Idaho und *P. putida* mt-2 führen (vgl. Kapitel 4.2.1. und 4.2.2.). Die große Ähnlichkeit zwischen beiden Clustern zeigt sich darin, dass das *meta*-Operon aus pWW0 das einzige ist, das sowohl für die Toluat-Dioxygenase (XylXYZ) und die Toluatdihydrodiol-Dehydrogenase (XylL) sowie die Enzyme codiert, die für den Abbau von Brenzcatechin (XylEGFJ) verantwortlich sind.

Abb. 4.21 zeigt einige Gencluster, die Homologien zu dem aus *P. putida* Idaho sequenzierten aufweisen.

Eine sehr hohe Ähnlichkeit zu *xylL* aus *P. putida* Idaho zeigte ein Protein aus dem 4-Chlorbenzoatabbau (97 %) von *Pseudomonas* sp. S-47. Aus diesem Cluster (AF320981) sind bisher nur zwei weitere Enzyme in der Datenbank zu finden, es handelt sich um Homologe zu *xylT* und *xylE*.

Bei den weiteren in Abb. 4.21 dargestellten Genclustern sind nur noch Homologien entweder zu den Genen, die die Benzoat-Dioxygenase und die Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase codieren, oder zu den Genen, die Homologien zum *meta*-Weg aus *P. putida* Idaho zeigen, nachzuweisen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das gesamte *meta*-Operon ein zusammengesetztes Gencluster ist. Harayama und Rekik stellten diese Vermutung schon 1990 an, als sie eine Ähnlichkeit zwischen *xylXYZL* und *benABCD*, also dem Benzoatabbau, aus pWW0 bzw. *Acinetobacter* sp ADP1 (Neidle et al., 1987) beobachteten. Dagegen traten Homologien zu den Genen aus anderen Abbauwegen, wie dem Naphthalin- oder Phenolabbau, erst ab der Stufe des Brenzcatechins auf (Harayama und Timmis, 1989). Für beide Teile des Benzoatabbaus, also der Transformation von Benzoat zu Brenzcatechin und der *meta*-Spaltung mit den Folgereaktionen, wird jeweils ein unabhängiger horizontaler Gentransfer und eine anschließende Fusion beider DNA-Abschnitte im Fall des TOL-Plasmids zugrunde gelegt.

Auch für das Cluster des Anilinabbaus ist beschrieben, dass es sich um ein hybrides Cluster handelt. Im Anilinabbau von *Acinetobacter* weisen die Gene, die für den *meta*-Weg codieren, einen GC-Gehalt zwischen 51,1 und 59,5 % auf. Gegenüber anderen DNA-Regionen aus



***P. putida* Idaho**

Pseudomonas sp. S-47,
4-Chlorobenzoat

P. stutzeri AN10,
Naphthalin

pWW0 aus *P. putida* mt-2,
Toluat

P. putida PRS2000,
Benzoat

P. aeruginosa PA01,
Anthranilat

Acinetobacter sp. YAA,
Anilin

P. putida CF600,
Phenol

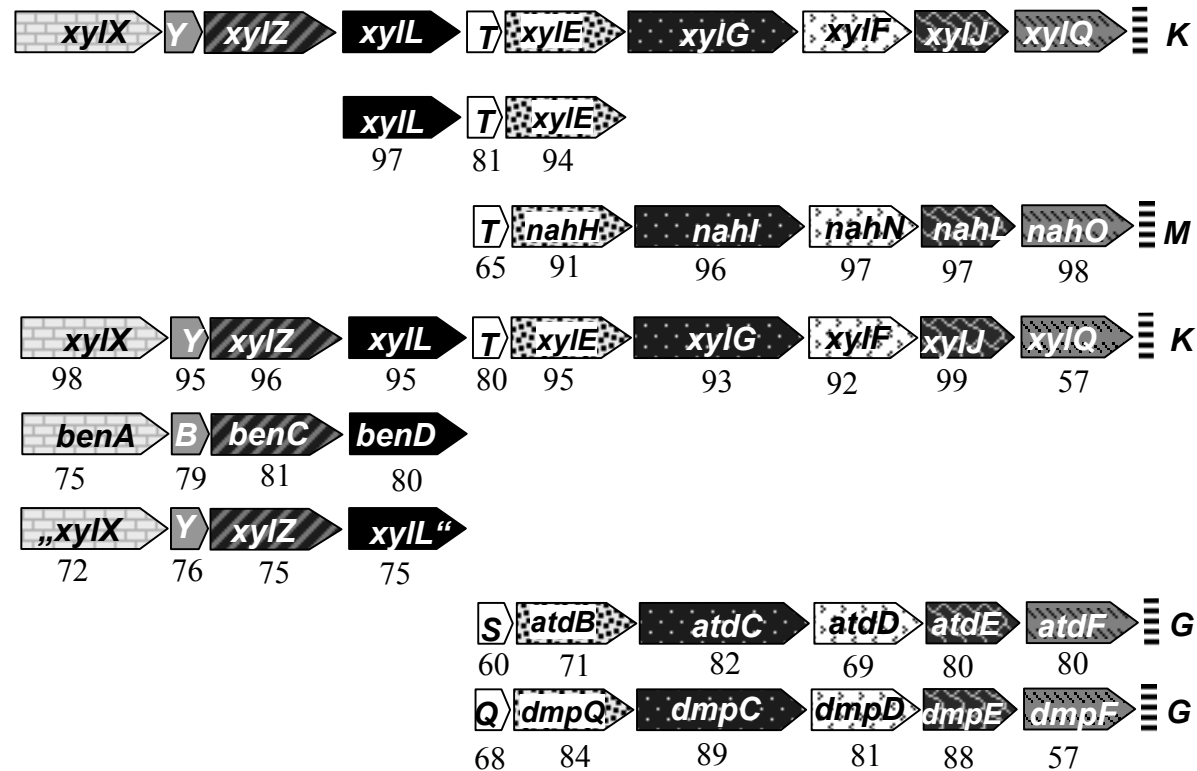


Abb. 4.21: Homologe Gencluster zu dem in *P. putida* Idaho gefundenen Cluster mit *xylL*. Die Ähnlichkeit der Genprodukte aus anderen Clustern zu denen aus *P. putida* Idaho sind in % unter den betreffenden Pfeilen angegeben. Unter den Stämmen ist das betreffende Abbausubstrat angegeben. *Pseudomonas* sp. S-47: AF320981, Park und Kim (2001); *P. stutzeri* AN10: AF039534, Bosch et al. (1999 und 2000); pWW0 aus *P. putida* mt-2: M64747 (*Gene xylXYZLTEGFJ*) Harayama et al. (1991), Neidle et al. (1992) und M94186 (*Gene xylQKIH*) Harayama und Rekik (1993), AF218267: *P. putida* PRS2000: AF218267, Cowles et al. (2000); *P. aeruginosa* PA01: AE004678, Stover et al. (2000), *xylXYZL* stehen in Anführungszeichen, da es sich vermutlich um *benABCD* handelt; *Acinetobacter* sp. YAA: AB008831, Takeo et al. (1998), Fujii et al. (1997); *P. putida* CF600: X60835 und X60836, Shingler et al. (1989).

Acinetobacter (40,1-47,7 %) ist das auffällig viel und lässt den Schluss zu, dass der *meta*-Weg in einem anderen Stamm seinen Ursprung hat (Takeo et al., 1998).

Die Proteine des *meta*-Weges aus *P. putida* Idaho zeigen sehr hohe Ähnlichkeiten zu denen des Naphthalinabbaus aus *P. stutzeri* AN10. Im Fall von XylG, XylF und XylQ (Kap. 4.2.2.) ist die Ähnlichkeit sogar größer als zu den Proteinen, die auf dem TOL-Plasmid codiert sind. Interessanterweise liegt das Cluster des Naphthalinabbaus, wie auch das aus *P. putida* Idaho, chromosomal codiert vor.

Nach den Enzymen des Clusters von pWW0 waren große Ähnlichkeiten zu XylXYZL aus *P. putida* Idaho auch von Proteinen erkennbar, die von einem Cluster des β -Ketoacidweges codiert werden. Das Cluster aus dem Stamm *P. putida* PRS2000 (AF218267) zeigt auch die größte Ähnlichkeit zu dem ebenfalls aus *P. putida* Idaho kloniertem Cluster, das die zweite Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (BenD) beherbergt. Mit 75-81 % ist die Ähnlichkeit von XylXYZL zu diesen Proteinen eines β -Ketoacidweges größer, als die zu Genprodukten des Clusters aus *P. aeruginosa* (AE004678, Ähnlichkeit 72-76 %). Bei genauerer Betrachtung des Clusters aus *P. aeruginosa* ist festzustellen, dass dieses nicht die Gene der *meta*-Spaltung in sich trägt, stattdessen aber *catA* und *catB*, welche für die Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase bzw. die Muconat-Cycloisomerase des *ortho*-Weges codieren. Es ist also nahe liegend, dass in *P. aeruginosa* nicht *xylXYZL* sondern *benABCD* codiert sind (vgl. Kap. 4.2.1. und 4.2.2.). Das Cluster aus *P. aeruginosa* zeigt zudem eine hohe Ähnlichkeit zu dem aus *P. putida* Idaho sequenzierten Cluster mit der zweiten Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase (Abb. 4.23).

Das zweite Gencluster aus *P. putida* Idaho mit den Genen des β -Ketoacidweges zeigt die größte Ähnlichkeit zu einem von Cowles et al. (2000), beschriebenem Gencluster aus *P. putida* PRS2000 (AF218267). Das Cluster aus *P. putida* Idaho unterscheidet sich von der unter AF218267 hinterlegten Sequenz durch das Fehlen eines Regulatorgens *benR* stromaufwärts von *benA* und durch die zusätzlich vorhandene Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase *CatA*.

Bei dem Cluster von Cowles et al. liegt das Stopcodon des Regulators *benR* 202 Basen stromaufwärts von *benA* (Abb. 4.22). Beim Vergleich der beiden Cluster auf Nukleotidebene ist eine fast vollständige Identität bei der Sequenz erst 90 Basen stromaufwärts des Startcodons für *benA* zu finden.

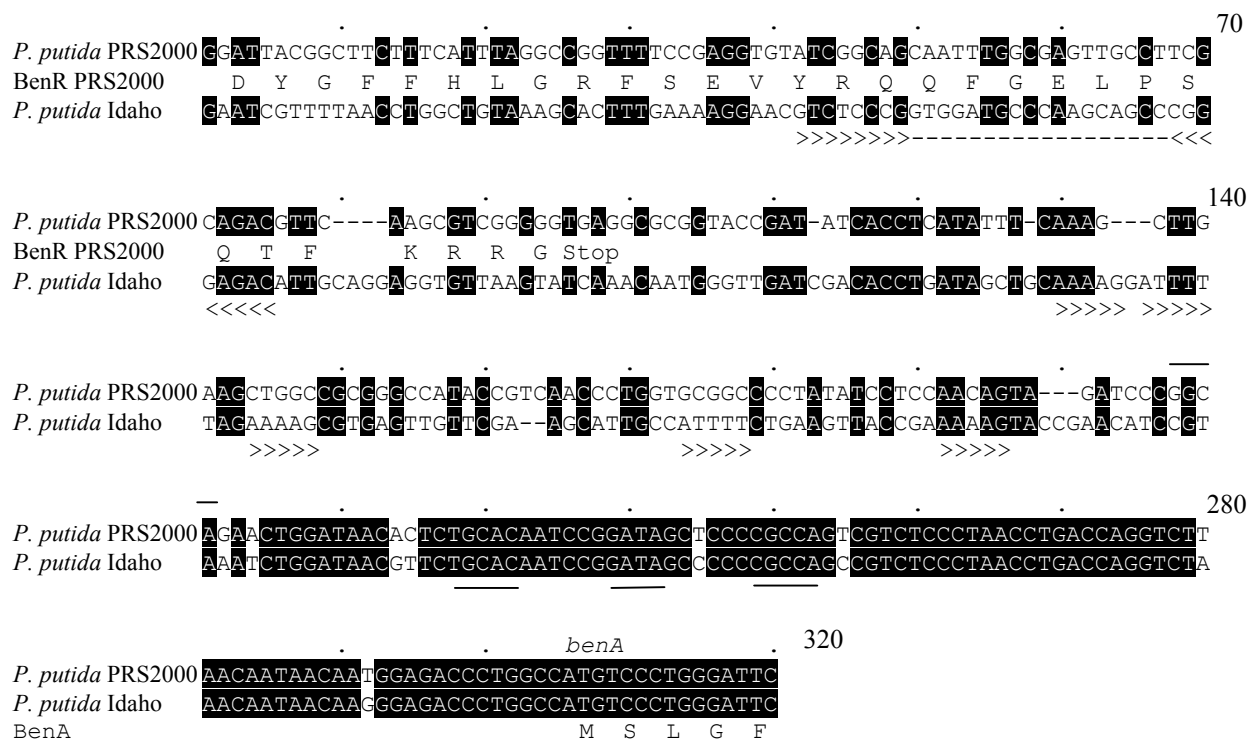


Abb. 4.22: Vergleich der stromaufwärts gelegenen Regionen von *benA* in *P. putida* Idaho und *P. putida* PRS2000. Identische Positionen sind unterlegt. Die Symbole für die Aminosäuren befinden sich in der Mitte unter den Codons. Die mutmaßlichen Bindestellen für BenR (laut Cowles et al., 2000) aus *P. putida* PRS2000 sind unterstrichen, wobei diejenige im nichthomologen Bereich über der Sequenz von *P. putida* PRS2000 markiert ist. Die direct repeats AAAAG und ATTTT aus *P. putida* Idaho sind durch > gekennzeichnet, ein inverted repeat durch Striche verbunden dargestellt. Die Nummerierung bezieht sich auf den gezeigten Sequenzabschnitt.

Es wurden weitere 500 Basen stromaufwärts von *benA* sequenziert, die beim Vergleich mit der Datenbank jedoch keinen Treffer erzielten. Auch der Versuch, *benR* mit Hilfe von Primern, die anhand von *benR* aus *P. putida* PRS2000 entworfen wurden, aufzufinden, schlug fehl (Kap. 3.3.2.2.). Daraus wurde geschlossen, dass in *P. putida* Idaho BenR nicht vorhanden ist. Bei Cowles et al. (2000) und Jeffrey et al. (1992) ist beschrieben, dass XylS aus dem TOL-Plasmid pWW0 die Funktion von BenR übernehmen kann. BenR aus *P. putida* PRS2000 trägt 59 % identische Positionen mit XylS aus dem TOL-Plasmid pWW0 (Cowles et al., 2000). Die Ähnlichkeit zwischen diesen Proteinen liegt sogar bei 73 %. Daher ist denkbar, dass in *P. putida* Idaho die Rolle des Regulators BenR von XylS übernommen wird. Stromaufwärts des zu *P. putida* PRS2000 besonders ähnlichen Bereichs kann in *P. putida* Idaho das sich dreimal wiederholende Segment AAAAG und zweimal die Sequenz ATTTT ausgemacht werden (Abb. 4.22). Diese könnten eine Rolle in der Abweichung der beiden Sequenzen spielen, da Divergenzen von zwei Sequenzen oft durch Akkumulation von Repeats zustande kommen (Harayama et al., 1991; Hartnett und Ornston, 1994).

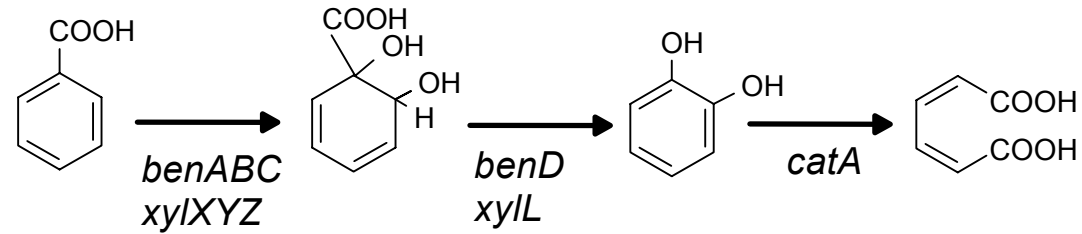
Die Insertion von *catA* zwischen *benK* und *benE* wurde bisher nicht beschrieben. Bei *Acinetobacter* wurden zwar alle Gene des β -Ketoacidabbaupfades, die in *P. putida* Idaho sequenziert wurden, in einem Cluster gefunden, jedoch mit unterschiedlicher Anordnung und mit einem anderen Regulator, BenM. Die höchste Ähnlichkeit, die zu Proteinen aus diesem Cluster vorliegt, liegt bei 68 %. Die Benzoat-Dioxygenase und deren Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen wurde in Kap. 4.2.3. ausführlicher behandelt.

In *P. aeruginosa* PAO1 sind die Gene des Benzoatabbaus in den Cluster des Anthranilatabbaus integriert (Stover et al., 2000). Es handelt sich also um ein kataboles Cluster, was das Nichtauftreten von *benK*, das ein Benzoat-Transportprotein codiert, erklären könnte, während *catA* und *catB* vorhanden sind. Dagegen handelt es sich bei dem Cluster aus *Rhodococcus* mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen für Benzoat spezifischen Abbauweg, der mittels dem Genprodukt BenK das Substrat aktiv in die Zelle einschleust. Für *Rhodococcus sp.* RHA1 sind auch polychlorierte Biphenyle Substrate (Kitagawa et al., 2001). Die Abbaugene für diese liegen jedoch nicht im in dieser Arbeit beschriebenen Cluster.

Das *ben*-Cluster aus *P. putida* Idaho zeigt in seiner Struktur Ähnlichkeiten zu Clustern aus anderen, weniger verwandten Stämmen (*Acinetobacter* und *Rhodococcus*). Die Ähnlichkeit der einzeln betrachteten Proteine aus *P. putida* Idaho ist aber zu denjenigen des Toluatabbaus aus pWW0 aus *P. putida* größer. Es zeigt sich somit eine große Sequenzkonservierung innerhalb der Gruppe der Pseudomonaden, die bis zu 80 % erhalten bleibt, auch wenn es sich um zwei funktionell unterschiedliche Cluster handelt.

Die Vergleiche der beiden Cluster mit der Toluat- bzw. Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase aus *P. putida* Idaho mit verwandten Clustern, die am Aromatenabbau beteiligt sind, zeigen, dass in *P. putida* Idaho zwei funktionelle Gencluster vorliegen. Gerade die Existenz zweier Benzoat-Dioxygenasen, codiert von *xylXYZ* bzw. *benABC* weist darauf hin, dass die Genomorganisation ausreicht, um den in dieser Arbeit angestrebten Umsatz von Toluol zu Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol durchzuführen.

In beiden sequenzierten Clustern wurden jedoch Abweichungen einzelner Gene von den zu *P. putida* Idaho ähnlichsten Clustern gefunden. Die Ähnlichkeit von XylQ zu NahO aus dem Naphthalinabbau von *P. stutzeri* AN10 und damit die Reduktion der Ähnlichkeit zu dem sonst fast identischen Cluster aus pWW0, ist schon im TOL-Plasmid pWW102 beschrieben. Die Positionierung von CatA in den Cluster des β -Ketoacidabbaupfades in *P. putida* Idaho weicht von dem Cluster aus *P. putida* PRS2000 ab, tritt aber auch bei *Acinetobacter* auf. Zudem wurde in *P. putida* Idaho das Regulatorgen *benR* nicht nachgewiesen.



P. putida Idaho



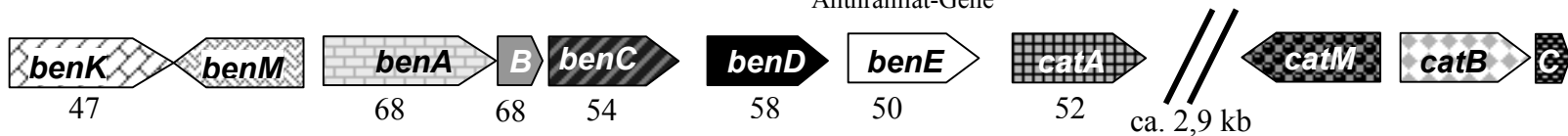
P. putida PRS2000,
Benzoat



P. aeruginosa PA01,
Anthranilat



Acinetobacter
sp. ADP1,
Benzoat



pWW0 aus *P. putida* mt-2,
Toluat



Rhodococcus sp. RHA1,
Biphenyl



Abb. 4.23: Homologe Gencluster zu dem in *P. putida* Idaho gefundenen Cluster mit *benD*. Die Ähnlichkeit der Genprodukte aus anderen Clustern zu jenen von *P. putida* Idaho sind in % unter den betreffenden Pfeilen angegeben. Unter den Namen der Stämme ist das betreffende Abbausubstrat angegeben. *P. putida* PRS2000: AF218267 (*benA-E*), Cowles et al. (2000), U12557 (*catR-A*), Houghton et al. (1995); *P. aeruginosa* PA01: Sektion 239 des Genoms, AE004678 (Stover et al., 2000), *xylXYZL* stehen in Anführungszeichen, da es sich vermutlich um *benABCD* handelt; *Acinetobacter sp.* ADP1: AF009224, Neidle et al. 1988, 1989, 1991 und 1992), Shanley et al. (1994), Romero-Arroyo et al. (1995), Collier et al. (1997 und 1998); pWW0 aus *P. putida* mt-2: M64747, Harayama et al., (1991), Neidle et al. (1992); *Rhodococcus sp.* RHA1, AB055705, Kitagawa et al. (2001).

Mit diesen Besonderheiten einzelner Gene stellt sich die Frage nach der genetischen Grundlage der in dieser Arbeit nachgewiesenen Aktivität einer Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol-Dehydrogenase trotz der beiden ausgeschalteten Gene *xylL* und *benD*. Im Plasmid pNL1 von *Novospingobium aromaticivorans* F199 (Romine et al., 1999) wurde ein Enzym mit XylL bezeichnet, das nur 49 % identische Positionen zu XylL aus *P. putida* Idaho trägt (Kap. 4.2.1.). Neben der geringen Ähnlichkeit zu dem Protein aus *P. putida* Idaho liegt das Gen auch nicht benachbart zu den anderen Genen des *xyl*-Clusters vor. Im Plasmid pNL1 treten Gene auf, die analog der Gene aus dem *meta*-Operon aus pWW0 benannt wurden, allerdings ist ihre Anordnung diffuser und durch andere offene Leserahmen des öfteren durchbrochen.

Mit Primern konnte nach Inaktivierung der beiden Dihydrodiol-Dehydrogenasen in *P. putida* Idaho kein drittes Gen gefunden werden, das den weiteren Umsatz von Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol in *P. putida* Idaho BDH2 erklären könnte (Kap. 3.2.3.). Mit Kenntnis der Positionierung von CatA ist denkbar, dass einzelne Gene rekrutiert werden können. Möglicherweise ist auch in *P. putida* Idaho, wie in pNL1 aus *Novospingobium aromaticivorans* F199 ein nicht in einem Cluster organisiertes und zudem nicht besonders ähnliches Gen codiert, dessen Produkt Benzoat-*cis*-1,2-dihydrodiol zu Brenzcatechin umsetzen kann.

Das Fehlen des Regulatorgens *benR* und der Ähnlichkeitswechsel in *xylQ* zu dem Cluster des Naphthalinabbaus zeigen, dass die Regulation des β -Ketoacidweges und des upper- und *meta*-Operons aus *P. putida* Idaho andersartig als in ihren homologen Clustern aus *P. putida* PRS2000 bzw. pWW0 sein könnte. Die beiden Regulatorgene *xylR* und *xylS* für das upper- und *meta*-Operon des TOL-Plasmids pWW0 sind in diesem stromabwärts des *meta*-Operons und damit auch stromabwärts von *xylQ* lokalisiert. Somit ist ihre Existenz in *P. putida* Idaho nicht erwiesen.

Durch die Homologievergleiche mit ähnlichen Clustern zu den in dieser Arbeit aus *P. putida* Idaho sequenzierten konnten keine zwingenden Zusammenhänge, aber Hinweise zwischen den genetischen Grundlagen und des physiologischen Verhaltens der Mutante *P. putida* BDH2 aufgedeckt werden.

5. LITERATUR

Aemprapa, S. und P. A. Williams. 1998. Implications of the XylQ gene of TOL-plasmid pWW102 for the evolution of aromatic catabolic pathways. *Microbiology*, 144, 1387-1396.

Aldrich, T. L. und A. M. Chakrabarty. 1988. Transcriptional regulation, nucleotide sequence and localization of the promoter of the *catBC* operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 170, 1297-1304.

Aldrich, T. L., R. K. Rothmel und A. M. Chakrabarty. 1989. Identification of nucleotides critical for activity of the *Pseudomonas putida catBC* promoter. *Mol. Gen. Genet.*, 218, 266-271.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Aoki, H., T. Kimura, H. Habe, H. Yamane, T. Kodama and T. Omori. 1996. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of the genes encoding enzymes involved in the degradation of cumene to 2-Hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2, 4-dienoic acid in *Pseudomonas fluorescens* IPO1. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 187-196.

Assinder, S. J. und P. A. Williams. 1990. The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* 31, 1-69.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (Herausgeber). 1987. Current protocols in molecular biology. Band 1, Kapitel 2.4. John Wiley & Sons Verlag, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

Bosch, R., E. R. Moore, E. Garcia-Valdez und D. H. Pieper. 1999. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181, 2315-2322.

Bosch, R., E. Garcia-Valdez und E. R. Moore. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 245, 65-74.

Boyd, D. R. und G. N. Sheldrake. 1998. The dioxygenase-catalysed formation of vicinal *cis*-diols. *Nat. Prod. Rep.* 15, 309-324.

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

Collier, L. S., N. N. Nichols und E. L. Neidle. 1997. *benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter sp.* strain ADP1. *J. Bacteriol.* 179, 5943-5946.

Collier, L. S., G. L. Gaines III und E. L. Neidle. 1998. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter sp.* strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* 180, 2493-2501.

Cowles, C. E., N. N. Nichols, und C. S. Harwood. 2000. BenR, a XylS homolog, plays a key role in the coordination of the *Pseudomonas putida* β -ketoadipate pathway. *J. Bacteriol.* 182, 6339-6346.

Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers und D. T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2723-2729.

Dorn E. und H. J. Knackmuss. 1978. Chemical structure and biodegradation of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochem. J.* 174, 85-94.

Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke und H. J. Knackmuss. 1974. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *pseudomonad*. *Arch. Microbiol.* 99, 61-70.

- Eaton, R.** 1996. *p*-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon. J. Bacteriol. 178, 1351-1362.
- Eaton, R.** 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-Cymene to *p*-Cumate. J. Bacteriol. 179, 3171-3180.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13.
- Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. Verbreitung durch den Autor unter Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Francisco, P. Jr., N. Ogawa, K. Suzuki und K. Miyashita.** 2001. The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia sp.* strain NK8 involved in the catabolism of chlorobenzoates. Microbiology 147, 121-133.
- Fujii, T., M. Takeo und Y. Maeda.** 1997. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter sp.* strain YAA. Microbiology, 143, 93-99.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari und J. A. Hoch.** 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: Expression of the gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 153, 1424-1431.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman und C. I. Kado.** 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 164, 918-921.
- Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioka und T. J. Mabry.** 1970. Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. Biochemistry 9, 1626-1630.
- Greated, A., L. Lambertson, P. A. Williams und C. M. Thomas.** Complete nucleotide sequence of IncP-9 plasmid pWW0. Nicht publiziert.

- Haddad, S., D. M. Eby und E. L. Neidle.** 2001. Cloning and expression of the benzoate dioxygenase genes from *Rhodococcus sp.* strain 19070. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2507-2514.
- Harayama, S. und M. Rekik.** 1990. The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. *Mol. Gen. Genet.* 221, 113-120.
- Harayama, S. und M. Rekik.** 1993. Comparison of the nucleotide sequences of the *meta*-cleavage pathway genes of TOL-Plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other *meta*-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution. *Mol. Gen. Genet.* 239, 81-89.
- Harayama, S. und K. N. Timmis.** 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In: Hopwood, D. A. und Chater K. F. (ed) *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press, New York. 151-174.
- Harayama, S., M. Rekik, A. Bairoch, E. L. Neidle, L. N. Ornston.** 1991. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid *xyWXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases. *J. Bacteriol.* 173, 7540-7548.
- Harayama, S., A. Polissi und M. Rekik.** 1991. Divergent evolution of chloroplast-type ferredoxins. *FEBS*, 285, 85-88.
- Hartnett, G. B. und L. N. Ornston.** 1994. Acquisition of apparent DNA slippage structures during extensive evolutionary divergence of *pcaD* and *catD* genes encoding identical catalytic activities in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Gene*, 142, 23-79.
- Hegeman, G. D.** 1966. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by wild type. *J. Bacteriol.* 91, 1140-1154.
- Herrmann, H., C. Muller, I. Schmidt, J. Mahnke, L. Petruschka und K. Hahnke.** 1995. Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol. Gen. Genet.* 247, 240-246.

Higuchi, R. Recombinant PCR. In: Innis M. A. (Ed.) PCR Protocols: A guide to methods and applications. 177-183, Academic Press, San Diego.

Holtel, A., Marqués, S., I. Möhler, U. Jakubzik und K. N. Timmis. 1994. Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL Plasmid. J. Bacteriol., 176, 1773-1776.

Houghton, J. E., T. M. Brown, A. J. Appel, E. J. Hughes und L. N. Ornston. 1995. Discontinuities in the evolution of *Pseudomonas putida cat* genes. J. Bacteriol. 177, 401-412.

Hudlicky T. und A. J. Thorpe. 1996. Current status and future perspectives of cyclohexadiene-*cis*-diols in organic synthesis: versatile intermediates in the concise design of natural products. Chem. Commun. 1993-2000.

Hugo, N., J. Armengaud, J. Gaillard, K. N. Timmis und Y. Jouanneau. 1998. A novel [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida* mt-2 promotes the reductive reactivation of catechol 2,3-dioxygenase. J. Biol. Chem. 273, 9622-9629.

Hugo, N., C. Meyer, J. Armengaud, J. Gaillard, K. N. Timmis und Y. Jouanneau. 2000. Characterization of three XylIT-like [2Fe-2S] Ferredoxins associated with catabolism of cresols or naphthalene: Evidence for their involvement in catechol dioxygenase reactivation. J. Bacteriol., 182, 5580-5585.

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

Jäger, W., A. Schäfer, A. Pühler, G. Labes und W. Wohlleben. 1992. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 174. 5462-5465.

Jeffrey, W. H., S. M. Cuskey, P. J. Chapman, S. Resnick und R. H. Olsen. 1992. Characterization of *Pseudomonas putida* mutants unable to catabolize benzoate: Cloning and characterization of *Pseudomonas* genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal DNA fragment able to substitute for *xyIS* in activation of the TOL lower-pathway promoter. *J. Bacteriol.* 174, 4986-4996.

Jung, Y.-H. und K.-H. Min. nicht publiziert.

Kang, E., J. M. Oh, J. Lee, Y. C. Kim, K. H. Min, K. R. Min, und Y. Kim. 1998. Genetic structure of the *bphG* gene encoding 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase of *Achromobacter xylosoxidans* KF701. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 20-25.

Kaphammer, B. J., J. J. Kukor und R. H. Olsen. 1991. Cloning and characterization of a novel toluene degradative pathway from *Pseudomonas pickettii* PKO1. In: Rossmore H. W. (Ed.) *Biodeterioration and Biodegradation* 8, 571-572, Elsevier Applied Science, London.

Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi und K. Yano. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 171, 2740-2747.

Kitagawa, W., K. Miyauchi, E. Masai und M. Fukuda. 2001. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Bacteriol.* 183, 6598-6606.

Kivisaar, M., L. Kasak und A. Nurk. 1991. Sequence of the plasmid encoded catechol 1,2-dioxygenase-expressing gene, *pheB*, of phenol-degrading *Pseudomonas* sp. strain EST1001. *Gene*, 98, 15-20.

Kok, R. G., D. M. Young und L. N. Ornston. 1999. Phenotypic expression of PCR-generated random mutations in a *Pseudomonas putida* gene after its introduction into an *Acinetobacter* chromosome by natural transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1675-1680.

- Kukor, J. J., R. H. Olsen und D. P. Ballou.** Cloning and expression of the *catA* and *catBC* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* 170, 4458-4465.
- Lenz, O. und B. Friedrich.** 1998. A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12474-12479.
- Leveau, J. H. J. und J. R. van der Meer.** 1997. Genetic characterization of insertion sequence ISJP4 on plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134. *Gene*, 202, 103-114.
- Leveau, J. H. J., F. König, H. Fuchsli, C. Werlen und J. R. van der Meer.** 1999. Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Mol. Microbiol.* 33, 396-406.
- Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino und F. S. Collins.** 1991. Konstruktion of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19, 1154.
- Marqués, S. und J. L. Ramos.** 1993. Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol. Microbiol.* 9, 923-929.
- Meulien, P. und P. Broda.** 1982. Identification of chromosomally integrated TOL DNA in cured derivatives of *Pseudomonas putida* PAW1. *J. Bacteriol.* 152, 911-914.
- Mikesell, M. D., J. J. Kukor und R. H. Olsen.** 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation*, 4, 249-259.
- Morawski, B., G. Casy, C. Illaszewicz, H. Griengl und D. W. Ribbons.** 1997. Stereochemical course of two arene-cis-diol dehydrogenases specifically induced in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 179, 4023-4029.

Nakai, C., H. Uyeyama, H. Kagamiyama, T. Nakazawa, S. Inouye, F. Kishi, A. Nakazawa und M. Nozaki. 1995. Cloning, DNA sequencing, and amino acid sequencing of catechol 1,2-dioxygenases (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 and *Pseudomonas arvilla* C-1. Arch. Biochem. Biophys. 321, 353-362.

Nakazawa, T. und T. Yokota. 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. J. Bacteriol. 115, 262-267.

Neidle, E. L., M. K. Shapiro und L. N. Ornston. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. J. Bacteriol. 169, 5496-5503.

Neidle, E. L., C. Hartnett, S. Bonitz und L. N. Ornston. 1988. DNA sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase I structural gene *catA*: evidence for evolutionary divergence of intradiol dioxygenases by acquisition of DNA sequence repetitions. J. Bacteriol. 170, 4874-4880.

Neidle, E. L., C. Hartnett und L. N. Ornston. 1989. Characterization of *Acinetobacter calcoaceticus catM*, a repressor gene homologous in sequence to transcriptional activator genes. J. Bacteriol. 171, 5410-5421.

Neidle, E. L., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik und S. Harayama. 1991. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. J. Bacteriol. 173, 5385-5395.

Neidle, E., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik und S. Harayama. 1992. *Cis*-diol dehydrogenases encoded by the TOL pWW0 plasmid *xyiL* gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the short chain alcohol dehydrogenase superfamily. Eur. J. Biochem. 204, 113-120.

Nicholas, K. B., H. B. Nicholas Jr. und D. W. II Deerfield. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEW.NEWS 4:14

- Nojiri, H., K. Maeda, H. Sekiguchi, S. Nakai, T. Yoshida, H. Hiroshi und T. Omori.** Analysis of carbazole degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain CA10. Nicht publiziert.
- Nozaki, M.** 1970. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*), S. 522-525 in H. Tabor und C. W. Tabor (Hrsg.), Methods in Enzymology, Bd. 17A. Academic Press, Inc., New York.
- Ornston, L. N. und R. Y. Stanier.** 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to β -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. J. Biol. Chem. 241, 3776-3786.
- Ouchiyama, N., S. Miyachi und T. Omori.** 1998. Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge. J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 57-63.
- Park, D.-W. und C.-K. Kim.** 2001. Cloning and sequence analysis of *xylL* gene responsible for 4CBA-dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. S-47. Nicht publiziert.
- Pfennig, N. und K. D. Lippert.** 1966. Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55, 245-256.
- Platt, A., V. Shingler, S. C. Taylor und P. A. Williams.** 1995. The 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase and acetaldehyde dehydrogenase (acylating) encoded by the *nahM* and *nahO* genes of the naphthalene catabolic plasmid pWW60-22 provide further evidence of conservation of *meta*-cleavage pathway gene sequences. Microbiology, 141, 2223-2233.
- Polissi, A. und S. Harayama.** 1993. In vivo reactivation of catechol 2,3-dioxygenase mediated by a chloroplast-type ferredoxin: a bacterial strategy to expand the substrate specificity of aromatic degradative pathways. EMBO Journal, 12, 3339-3347.
- Prentki, P. und H. M. Krisch.** 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene, 29, 303-313.
- Reiner, A. M.** 1972. Metabolism of aromatic compounds in bacteria. J. Biol. Chem. 247, 4960-4965.

- Reiner, A. M. und G. D. Hegemann.** 1971. Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry*, 10, 2530-2536.
- Romero-Arroyo, C. E., M. A. Schell, G. L. Gaines III und E. L. Neidle.** 1995. *catM* encodes a LysR-type transcriptional activator regulating catechol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* 177, 5891-5898.
- Romine, M. F., L. C. Stillwell, K.-K. Wong, S. J. Thurston, E. C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J. K. Fredrickson and J. D. Saffer.** 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181, 1585-1602.
- Sala-Trepat, J. M. und W. C. Evans.** 1971. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species. *Eur. J. Biochem.* 20, 400-413.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Shanley, M. S., A. Harrison, R. E. Parales, G. Kowalchuk, D. J. Mitchell und L. N. Ornston.** 1994. Unusual G + C content and codon usage in *catIJF*, a segment of the *ben-cat* supra-operonic cluster in the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosome. *Gene*, 138, 59-65.
- Shields, M. S., S. O. Montgomery, P. J. Chapman, S. M. Cuskey und P. H. Prichard.** 1989. Novel pathway for toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1624-1629.
- Shingler, V., J. Powlowski und U. Marklund.** 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas sp.* strain CF600. *J. Bacteriol.* 174, 711-724.

Simon, R., U. Priefer und A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1, 784-791.

Sinclair, M. I., P. C. Maxwell, B. R. Lyon und B. W. Holloway. 1986. Chromosomal location of TOL Plasmid DNA in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 168, 1302-1308.

Stanier, R.Y. and J. L. Ingraham. 1954. Protocatechuic acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 210, 125-134.

Steinmetz, M., D. Le Coq, H.B. Djemia und P. Gay. 1983. Analyse génétique de *sacB*, gène de structure d'une enzyme secrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 191, 138-144.

Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Tréboul and P. Gay. 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* 200, 220-228.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F.S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory and M. V. Olsen. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 959-964.

Takeo, M., T. Fujii, K. Takenaka und Y. Maeda. 1998. Cloning and sequencing of a gene cluster for the *meta*-cleavage pathway of aniline degradation in *Acinetobacter sp.* strain YAA. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 514-517.

Teng, N., G. Kotowycz und M. Calvin. 1971. Mechanism of action of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 246, 5448-5453.

Totevova, S., J. Armengaud, T. Cajthaml, K. Demnerova, V. Brenner und D. H. Pieper. Cloning, isolation and expression of benzoate 1,2-dioxygenase originated from the strain *Pseudomonas putida* P111. Nicht publiziert.

van der Meer, J. R., C. Werlen, S. F. Nishino und J. C. Spain. 1998. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4185-4193.

Whited G. und D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* 173: 3010-3016.

Williams P. und K. Murray. 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 120, 416-423.

Wong, C. L. und N. W. Dunn. 1974. Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate and *m*-toluate in *Pseudomonas arvilla* mt-2. *Genet. Res.*, 23, 227-232.

Worsey, M. J. und P. A. Williams. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124, 7-13.

Yen, K. M., M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset, H. S. Lu, A. A. Harcourt und K. K. Chen. 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* 173, 5315-5327.

Zhou, N. Y., A. Jenkins, C. K. Chan Kwo Chion und D. J. Leak. 1998. The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* Py2 is a binuclear non-haem iron protein closely related to toluene 4-monooxygenase. *FEBS Lett.* 430, 181-185.

Zylstra, G. J., W. R. McCombie, D. T. Gibson und B. A. Finette. 1988. Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1498-1503.

Zylstra, G. J. und D. T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. J. Biol. Chem. 264, 14940-14949.

6. ANHANG

6.1. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Clusters um *xyiL* aus *P. putida* Idaho

*Xba*I
TCTAGAAAGGCCTAGCTCTTAGGCTCTTATGCAACAGAAACAATAATAATGGAGGCATGACCATGACAATGCACCTGGGG 80
M T M T M H L G

CTCGACTATATAGATAGTCTCGTTGAAGAAGATGAGAACGAGGGCATCTACCGCTGCAAGCGCGAGATGTTCCACGACCC 160
L D Y I D S L V E E D E N E G I Y R C K R E M F T D P

TCGGCTGTTTCGATTTAGAGATGAAACACATCTTTGAGGGCAACTGGATTTATCTCGCCCACGAGAGCCAGATTCAGAGA 240
R L F D L E M K H I F E G N W I Y L A H E S Q I P E

AGAACGACTATTACACCACGCAGATGGGCCGCGAGCCGATATTCATCACACGCAACAAAGATGGTGAGCTCAATGCCTTC 320
K N D Y Y T T Q M G R Q P I F I T R N K D G E L N A F

*Pst*I
ATCAATGCC**CTGCAG**TCACCGCGGCGCCACGCTCTGTGCTTTAGGAGTGAAACAAGGCCACCCATACCTGCTCGTTCCA 400
I N A C S H R G A T L C R F R S G N K A T H T C S F H

CGGCTGGACCTTCAGCAATTCGGGCAAGCTGCTCAAGGTCAAAGACCCCAAGGGCGCCGGCTATCCGGACAGCTTCGACT 480
G W T F S N S G K L L K V K D P K G A G Y P D S F D

GTGACGGCTCGCACGACCTGAAGAAAGTTGCGCGCTTTGCTTCCTACCGCGGATTTCTATTTCGGCAGCCTGCGCGAGGAC 560
C D G S H D L K K V A R F A S Y R G F L F G S L R E D

GTCGCCCCGTTGGAAGAGTTCCCTCGGCGAGTCGAGGAAGGTCAATCGACATGGTCGTCGACCAGTCGCCCCAAGGTCTGGA 640
V A P L E E F L G E S R K V I D M V V D Q S P E G L E

AGTGCTGCGCGGTTCCAGTACCTATGTTTACGAAGGCAACTGGAAAGTGACGGTCGAGAACGGTGCCGACGGCTACCATG 720
V L R G S S T Y V Y E G N W K V Q V E N G A D G Y H

TCAGTACTGTTCACTGGAACCTACGCCGCCACCCAGCAGCAGCGCAAGCTGAGAGAAGCGGGCGATGATATTCGCGCCATG 800
V S T V H W N Y A A T Q Q Q R K L R E A G D D I R A M

AGGCCAGTAGCTGGGGCGGGGATGGCGGGCGGTTTCTACTCCTTTGAAAATGGCCACCAGATGGTCTGGGCACGCTGGGG 880
S A S S W G G D G G G F Y S F E N G H Q M V W A R W G

CGACCCGAAAAACCGCCCGCTGTTTCGCCGAGCGAGATCGCTTAGCCAGCGAGTTTGGTGAAGCCCGTGCCGACTGGATGA 960
D P K N R P L F A E R D R L A S E F G E A R A D W M

TCGGCGTCTCCCGCAACCTCTGCCTCTACCCGAACCTCTACCTGATGGACCAGTTTCGGCTCGCAGTTGCGTATCACCCGT 1040
I G V S R N L C L Y P N L Y L M D Q F G S Q L R I T R

CCGCTGTTCGGTGGATAGAACCAGAAATCACCATCTACTGCATCGCGCCGAAAGGCGAAAGCGCCGAGGCACGTGCCCGCG 1120
P L S V D R T E I T I Y C I A P K G E S A E A R A R R

TGTCCGTACGACGAGGACTTCTTCAATGTACGCGGCATGGCCACCCCGACGACCTGGAG**GAATTC**CGCGCCTGCCAGG 1200
V R Q Y E D F F N V S G M A T P D D L E E F R A C Q

*Eco*RI
AGGGCTTCGCCGCGGGGGGATGAACGACATGTCCCGTGGCGCCAAACACTGGATCGAGGGGCGGACGAGGGCGCGAAG 1280
E G F A G G G M N D M S R G A K H W I E G P D E G A K

GAGATCGATCTGTATCCGAAGCTGAGCGGTGTCCGCTCGGAAGACGAAGGCCTGTTTCGTCATGCAGCACAAGTACTGGCA 1360
E I D L Y P K L S G V R S E D E G L F V M Q H K Y W Q

ACAGCAGATGATCAAGGCCGTCAAGGCAGAACAGGATCGGCTGATCCACGCGGAGGGCGCGTAAATGACAATCTCTACG 1440
Q Q M I K A V K A E Q D R L I H A E G A Stop M T I S Y

*xyi*Y
AAGCTGTGCGGATTTCTTTACCGGAAGCACGCTACCTCGACGACAAGCAGTGGGATAGTTGGCTGGAAATGTACGCG 1520
E A V R D F L Y R E A R Y L D D K Q W D S W L E M Y A

CCGACGCCACTTTCTGGATGCCGGCTGGGACGACCGCGACCAATTGACCGAAGACCCGAGAGCCAGATCTCGCTGAT 1600
P D A T F W M P A W D D R D Q L T E D P Q S Q I S L I

TTGGTACGGCAATCGCGGTGGCTAGAGGATCGGGTGTTCGCATCAAGACCGAGCGCTCCAGTGCCACCATTCGGACA 1680
W Y G N R G G L E D R V F R I K T E R S S A T I P D

CCCGAACCAGCCACAACATCAGCAATGTGGAGCTGCTCGAACAGTCCGGCGGCTTCTGTAAGCTGCGCTACAACCTGGCAC 1760
T R T S H N I S N V E L L E Q S G G F C K L R Y N W H

ACCATGAGTTATCGGTACAAGACGGTGGACCCTTCTTTGGCACCAGCTTCTGCACCTCGACACATGTGGCGAGACCC 1840
T M S Y R Y K T V D H F F G T S F C T L D T C G E T P

GCTGATTAAGGCCAAGAAGGTCGTGCTGAAGAACGACTACATCCGCCAAGTTATCGATGTATAACCACGTCTGAGGTGCCG 1920
 L I K A K K V V L K N D Y I R Q V I D V Y H V Stop

xy1Z
 CCATGACACACAAGGTTGCACTGAACCTTCCAAGACGGCGTCACTCGTTTTTCATCGATGCTAATACTGGCGAGACTGTTGCT 2000
 M T H K V A L N F E D G V T R F I D A N T G E T V A

GATGCTGCCTACCGCCAAGGCATCAATTTACCCCTGGACTGCCGAGACGGTGCATGCGGGCCTGCAAATGCTTCGCCGA 2080
 D A A Y R Q G I N L P L D C R D G A C G A C K C F A E

GAGCGGCCGTACGGCCTCGGCGAGGAGTACATCGAGGATGCACTTAGCGAAGCCGAGCCGAGCGGGCTACGTGCTGA 2160
 S G R Y G L G E E Y I E D A L S E A E A E Q G Y V L

CCTGCCAGATGCGCGCCGAAAGCGACTGCGTGATTCGCGTTCGGGCCATCGGACGTCTGCAAGACC**CTGCAG**GCCAGC 2240
 T C Q M R A E S D C V I R V P A A S D V C K T L Q A S *PstI*

TATCAGGCAGGATCAGCAACGTGCGTCAGCTGCCGAGAGCACCATCTCGCTGTCGATCAAAAGCGCATCGCTGAACCA 2320
 Y Q A A I S N V R Q L S E S T I S L S I K S A S L N Q

GTTGGCGTTCCTGCGGGCCAGTACGTCAATCTGCAAGTGCCGGGCGAGCACCAGACCCGCGCTATTCTTCAGCTCGC 2400
 L A F L P G Q Y V N L Q V P G S D Q T R A Y S F S S

TGCAAAAGGATGGTGAGGTCAGCTTCTGATCCGCAACGTGCCGGGCGGGCTGATGAGCAGCTTCTGACCAGCCTCGCC 2480
 L Q K D G E V S F L I R N V P G G L M S S F L T S L A

AAGGTCGGCGATAGCGTCAGTCTGGCTGGTCCGCTGGGCGGTTCTATCTGCGGAGATCAAGCGCCGCTGCTGTTGCT 2560
 K V G D S V S L A G P L G A F Y L R E I K R P L L L L

GGCGGGCGGTACCGCCTAGCACCGTTCACCGCATGCTGGAGAAGATCGCCGAGCAGGGCAGCGAGCACCCGCTCCATC 2640
 A G G T G L A P F T A M L E K I A E Q G S E H P L H

TGATCTACGGGTCACCCATGACTACGATCTGGTTGAAATGGACAAGCTAGAGGCATTGCGCGCGCATTCCTCAACTTC 2720
 L I Y G V T H D Y D L V E M D K L E A F A A R I P N F

AGCTACACCGCTGCGTCGCCAGCCAGACAGCGCTATCCGCAAAGGGCTATGTGACCCAGTACATCGAGCCAAACA 2800
 S Y T A C V A S P D S A Y P Q K G Y V T Q Y I E P K H

CCTCAACGACGGTGAGGTAGATATCTACCTTTGTGGTCCGCCACCGATGGTTCGAGGCGGTGAGTACATCGGGCAC 2880
 L N D G E V D I Y L C G P P P M V E A V S Q Y I R A

AGGCATCCAGCCGCCAATTCTTATTATGAGAAGTTCCGCGCAGCGCCTAGAGGCTTCTTTGGTCCGCTTACTAGGTG 2960
 Q G I Q P A N F Y Y E K F A A S A Stop

AGCGGGCCTGTTTTATTCTGTCAGTAGGCCCCAGGTTCTCTGCGAACTTTCCAAAATTGCATCTGGGCTACACAACCGA 3040
xy1L

GGTGGTTTCATGAACAAACGTTTCAGGACAAGACTGCCGTTATCACCGGCGTGCCAGGGCATCGGTGCGCCGCTGGCC 3120
 M N K R F Q D K T A V I T G A A Q G I G R R V A

GAACGGATGGCGCCGAAGGCGGTGCGGCTGCTGCTG**GTCGAC**CGTTCCGAGCTAATACATGAGCTGGCCGACGAACTGGT 3200
 E R M A A E G G R L L L V D R S E L I H E L A D E L V *Sall/AclI*

CGGAGTTCGCTGAGGTGCTGACCCTGACCGCCGACCTTGAGCAGTTCCGCGAGTGCCAACGGGTGATGGCAGCGCGCTCG 3280
 G V A E V L T L T A D L E Q F A E C Q R V M A A A L

AGCGCTTCGGTCTGACATTTCTGATCAACAACGTTGGCGGCACCATTTGGGCTAAGCCATTTCGAGCATTACCAGGAA 3360
 E R F G R L D I L I N N V G G T I W A K P F E H Y Q E

CACGAGATCGAGGCCGAAGTGGCGGTTCACTGTTCCCTACCTATGGTGTGCCACGCCGCGCTGCCGCTAATGCTCGA 3440
 H E I E A E V R R S L F P T L W C C H A A L P L M L E

GCAGGGCAGTGGCGCCATCGTAAATGTTTCTCCGTTGCCACGCGGGATCCATCGCGTGCCTTACGGCGCGCGAAGG 3520
 Q G S G A I V N V S S V A T R G I H R V P Y G A A K

GTGGCGTCAACGCCCTGACCGCTGTCTGGCCTTTGAAACCGCCGAGCGCGGCATCCGCGTCAACGCCACCGCACCGGGT 3600
 G G V N A L T A C L A F E T A E R G I R V N A T A P G

GGCACCGAGGCGCGCCACGGCGGATTCCGCGCAATAGCGCCGAGCCGAGTGAAGGAGGAGGTTCTGGTACCAGCAGAT 3680
 G T E A P P R R I P R N S A E P S E Q E K V W Y Q Q I

Sall/AclI
GTCGACCGTCCCTCGACAGCAGCCTTATGAAACGCTACGGAAGCATTGACGAGCAGGTGAGGCAATTCTGTTCCTTG 3760
 V D Q S L D S S L M K R Y G S I D E Q V E A I L F L

CTTCTGACGCCCTCCTACATCACCGGTATAACTCTTCCGGTGGCAGGGGGAGACCTGGGTTGACCCTTATGTCTGGTT 3840
 A S D A A S Y I T G I T L P V A G G D L G Stop

AAGAAGAGAAATCGACATGCGAAGAAGCAACGTACATAAGATCCCTGACGCTCATTTTCGGGGGGGTTATGCCGGCATCA 3920

CGCAGAGCTGTTGGGGATACTTCCGTCATGTTTAGTGTATCTGGGATGAATATGAACAGTGCCGGCTACGAGGTGTTTCG 4000
 M N S A G Y E V F *xy1T*

AAGTGCTAAGCGGCCAGTCATTCCGCTGTGCGGAGGGCCAGTCCGTTACTGCGGCCATGGAAGCCCAGCACAAACGCTGC 4080
 E V L S G Q S F R C A E G G S V L R A M E A Q H K R C

ATTCCGGTGGGCTGTGCGGGCGGGTTCGGGCTGTGCAAGGTCCATGTGCTGCATGGCAATTACCGTTCGGGTCGCAT 4160
 I P V G C R G G G C G L C K V H V L H G N Y R R G R M

GAGCTGCCATCACGTGCCGCCGAGTTGGAGAGCCAGGGCTTGGCGCTGGCATGCCAGGTATTTCGCGAGTCCGATCTGA 4240
 S C H H V P P E L E S Q G L A L A C Q V F P Q S D L

GCATCGAATGCCTTCGCCCTAATAGCGAAGGCGACAAAAACAACAGATGAAACAAGAGGTGCCGTCATGAAAAAGGCGT 4320
 S I E C L R P N S E G D K N N R Stop M K K G V *xylE*

TATGCGACCCGGCCACATCCAGCTGCGCGTACTCAATCTAGAGAGTGCCTGGCCCACTACCGCGACCTGCTCGGCCTGA 4400
 M R P G H I Q L R V L N L E S A L A H Y R D L L G L *XbaI*

TCGAAGTGGACCGTGATGACTTCGGGCGCGCCTATTTGAAGGCATGGACCGAAGTGGATAAGTTTCCCTGGTGTGCGT 4480
 I E V D R D D F G R A Y L K A W T E V D K F S L V L R

GAAGCGGATGAGCCGGGCATGGATTTTCATGGGTTTCAAGGTTGTGGATGAGGATGCTCTCCGGCAACTGGAGCGGGATCT 4560
 E A D E P G M D F M G F K V V D E D A L R Q L E R D L

GACGGCATATGGCTGTGCCGTTGAGCAGCTACCCGACGGTGAAGTGAACAGTTGTGGCCGGCGGTGCGCTTCCAGGCC 4640
 T A Y G C A V E Q L P A G E L N S C G R R V R F Q A

CCTCCGGGCATCACTTCGAGTTGTATGCAGACAAGGAATATACTGGAAAGTGGGGTGTGAATGAGGTCAATCCCGAGGCA 4720
 P S G H H F E L Y A D K E Y T G K W G V N E V N P E A

TGGCCGCGCATTTTGAAGGTATGGCGGCTGTGCGTTTCGACCACGCCCTCATGTATGGCGACGAATTGCCGGCGACCTA 4800
 W P R D L K G M A A V R F D H A L M Y G D E L P A T Y

TGACCTGTTACCAAGGTGCTCGGCTTCTATCTGGCCGAACAGGTGCTGGACGAAAATGGCACGCGCGTCCGCCAGTTCC 4880
 D L F T K V L G F Y L A E Q V L D E N G T R V A Q F

TCAGTCTGTGACCAAGGCCACGACGTGGCCTTCATTCACCATCCGGAAAAAGGCCGCTCCATCATGTGTCTTCCAC 4960
 L S L S T K A H D V A F I H H P E K G R L H H V S F H

CTCGAAACCTGGGAAGACTTGCTTCGCGCCGCGGACCTGATCTCCATGACCGACACATCTATCGACATCGGCCCAACCCG 5040
 L E T W E D L L R A A D L I S M T D T S I D I G P T R

CCACGGCCTCACTCACGGCAAGACCATCTACTTCTTCGACCCGTCGGTAACCGCAACGAAGTGTCTGCGGGGAGATT 5120
 H G L T H G K T I Y F F D P S G N R N E V F C G G D

ACAACCTACCCGGACCACAAACCGGTGACCTGGACCACTGACAGCTGGGCAAGGCGATCTTTTACCACGACCGCATTCTC 5200
 Y N Y P D H K P V T W T T D Q L G K A I F Y H D R I L

AACGAACGATTCATGACCGTGTGACCTGATGGTCCGGTTCGACTTATTGCAGAGACTGCGCAGATGAAAGAAATCAAGC 5280
 N E R F M T V L T Stop M K E I K *xylG*

ATTTTCATTAGCGGTGCCTTCGTCGGTTCGGCCAGCGGCAAGCTGTTCGACAATGTCAGCCCGGCAACCGCCAGGTGATC 5360
 H F I S G A F V G S A S G K L F D N V S P A N G Q V I

GGCCGCGTCCACGAGGCCGGCCGCGCGGAGGTCGACGCTGCGGTCAAAGCTGCCGTCGCCGCGTCAAGGGACCCCTGGGG 5440
 G R V H E A G R A E V D A A V K A A R A A L K G P W G

GAAGATGACGGTGGCCGAGCGCGCTGAGATTCTGCATCGCGTGGCCGATGGCATCACGGCGCGCTTCGACGAGTTTCTCG 5520
 K M T V A E R A E I L H R V A D G I T A R F D E F L *XhoI*

AGGCCGAATGCCTCGACACCGCAAGCCGAAGTCGCTGGCCAGCCACATCGACATTCCGCGCGGCGCGGCAATTTCAAG 5600
 E A E C L D T G K P K S L A S H I D I P R G A A N F K

GTATTCGCCGACCTGCTCAAGAAATGTTGCCAATGACGCCTTCGAGATGGCCACCCCGACGGCGCGGTTGCACTCAACTA 5680
 V F A D L L K N V A N D A F E M A T P D G A G A L N Y

CGGCGTGCGCCGCCCCAAGGGGTGATCGGGGTGATCAGCCCGTGAACCTGCCGCTGCTGCTGATGACCTGGAAGTTCG 5760
 G V R R P K G V I G V I S P W N L P L L L M T W K V

GCCCGCGCTGGCCTGCGGCAACTGCGTGGTGGTCAAGCCATCCGAGGAAACCCGCTGACCGCCACCCTGCTCGGCGAG 5840
 G P A L A C G N C V V V K P S E E T P L T A T L L G E

GTGATGCAGGCGCTGGCGTCCGGCCGGCGTGTACAACGTGGTGACGTTTCGGCGGCGATTCCGGCCGGGCTTCCCT 5920
 V M Q A A G V P A G V Y N V V H G F G G D S A G A F L

CACCGAGCACCCGGACGTCGACGCTACACCTTACC GGCGAGACCGGCACCGCGAAACCATCATGCGCGCCGGGCCA 6000
 T E H P D V D A Y T F T G E T G T G E T I M R A A A

AGGGCGTGCGCCAGGTGTGCTGGAGCTGGGCGGCAAGAACCGGCATCGTCTTCGCCGACTGTGACCTGGACAAGGCC 6080
 K G V R Q V S L E L G G K N A G I V F A D C D L D K A

ATCGAGGGCACCCCTGCGCTCGGCCTTCGCCAAGTGC GGCCAGGCTGCTGGGACCGAGCGGGTGTATGTGAGCGGCC 6160
 I E G T L R S A F A N C G Q V C L G T E R V Y V E R P

GATCTTCGACGCGTTTCGTCGCCCGCTGAAGCGCGGCCGAAGCGTTGAAGATCGGCGAACC GAACGATCCAGAGGCCA 6240
 I F D A F V A R L K A G A E A L K I G E P N D P E A

ATTTCCGGCCGCTGATCAGCCACAAGCACCGTGAAAAAGTCTCAGTTACTACCAGCAGGCACTCGACGACGGCGCCACC 6320
 N F G P L I S H K H R E K V L S Y Y Q Q A V D D G A T *SalI*

GTTGTACCCGCGCGCGGTGCCGAGATGCCGGCGCACCTCGCCGGCGCGCTGGGTGCAGCCGACTATCTGGACCGG 6400
 V V T G G G V P E M P A H L A G G A W V Q P T I W T G

CCTGGCCGACGATTCGGCGGTGGTACCGAGGAAATCTTCGGCCCGTGTGCCACATCCGCCCGTTCGACACGGAAGCGG 6480
 L A D D S A V V T E E I F G P C C H I R P F D T E A

AAGCCATTGAACTGGCCAACAGCCTGCCTTACGGCCTGGCCTGGCGATCTGGACCGAGAACGCTTCGCGCGCCACCAGC 6560
E A I E L A N S L P Y G L A S A I W T E N A S R A H R

GTCGCCGGGCGAGATCGAGGCCGGCATCGTCTGGGTCAACAGCTGGTTCCTGCGCGACCTGCGCACCGCCTTCGGTGGTGC 6640
V A G Q I E A G I V W V N S W F L R D L R T A F G G A

CAAGCAGTCGGGTATTGGCCGCGAAGGGGGTGTGCACTCGCTGGAGTTCTACACCGAGCTGAAAAACATCTGTGTGAAAC 6720
K Q S G I G R E G G V H S L E F Y T E L K N I C V K

xy1F
TCTGAGGACCTGGCCATGAACGCACCGCAGCAAAGCCCTGAAATCGGTTCGCGAAATCCTCGCCCGCGCTACCGCACCAA 6800
L Stop M N A P Q Q S P E I G R E I L A A G Y R T N

CCTGCATGATCAGGGCGAAGGCTTCCCGTCTGCTGATCCACGGTTCGGGCCCGCGCTCACCGCTGGGCCAACTGGC 6880
L H D Q G E G F P V L L I H G S G P G V T A W A N W

GCGGGATCATTCCGCGAGCTGGCGCAGACGCGCCGGGTGATCGCCCCGGACATGCTCGGCTTCGGTACAGCGAACGTCGG 6960
R G I I P Q L A Q T R R V I A P D M L G F G Y S E R P

GCCGATGGCCAATACAGCCAGGGCGCTGGGTGAGCATGCCATCGGCGTGTCTGACGCCCCTCGGCATCCAGCAGGCCGA 7040
A D G Q Y S Q A R W V E H A I G V L D A L G I Q Q A D

CATCGTCGGCAACTCGTTCGGCGGGGGCTGGCGCTGGCACTGGCCATCCGTACCCCCGAGCGTGTGCGCCGGTGGTGC 7120
I V G N S F G G G L A L A L A I R H P E R V R R L V

TGATGGGCGAGCTCGGTGTGTCTTTCCCATCACCGCAGGACTGGAAACAGCCTGGGGCTACACGCCGCTCGCTGGCCAAC 7200
L M G S V G V S F P I T A G L E T A W G Y T P S L A N

ATGCGCAGGCTGCTCGATCTGTTCCGCCACGACCGCACCCCTGGTCAACGACGAGCTGGCCGAGCTGCGCTACCAGGCCAG 7280
M R R L L D L F A H D R T L V N D E L A E L R Y Q A S

Sall
CATCCGCCCGGCTTTTCAGGAGTCGTTCCGCCGATGTTCCGCCGCCACGGCAGAACGGAGTCTCGACGATCTGGCCAGCA 7360
I R P G F Q E S F A A M F P P P R Q N G V D D L A S

PstI
ACGAGACCGATATCCGCGCTCTGCCACGAAACCCTGGTTCATCCACGGCCGAGGATCGGATCATCCCGCTGCAGGCT 7440
N E T D I R A L P H E T L V I H G R E D R I I P L Q A

TCGCTGACCCTCGCGCAGTGGATTCCCAACGCCAGCTACACGTGTTCCGGCCAGTGCAGCCACTGGACTCAGATCGAACA 7520
S L T L A Q W I P N A Q L H V F G Q C G H W T Q I E H

CGCCGAGCGTTCGCCCCGCTGGTTCGAGAATTTCCTCGCCGAGCCGACGCACTCCATTCTGAGAGAGACCGATATGGA 7600
A E R F A R L V E N F L A E A D A L H S Stop M D

CAAGACATTGATCAACAAACTCGGCGACGAGCTCTACCAGCGATGGTCCAGCGGAGACCGTACGCGCGTACCAGCC 7680
K T L I N K L G D E L Y Q A M V Q R E T V T P L T S

GCGGCTTCGACATCAGCGTCGAGGACGCCCTACCACATCTCCCTGCGCATGCTGGAACGGCGCCTCGCCGCTGGCGAGCGA 7760
R G F D I S V E D A Y H I S L R M L E R R L A A G E R

GTGATCGGCAAGAAGATCGGCGTACCAGCAAGGCCGTGCGAAGCATGCTCGGCGTGCACCAGCCGACTTCGGCTACCT 7840
V I G K K I G V T S K A V Q N M L G V H Q P D F G Y L

CACCGACGCGATGGTCTACAACAGCGGCGAGCGATGCCGATCAGCGAGAAGCTGATCCAGCCACGCGCCGAGGGCGAGA 7920
T D A M V Y N S G E A M P I S E K L I Q P R A E G E

TCGCTTCATCTCAAGAAGGATTTGATGGTTCGGGCGTGACCAATGCCGACGTGCTGGCCGCCACCGAATGCGTGATT 8000
I A F I L K K D L M G P G V T N A D V L A A T E C V I

CCCTGCTTCGAAGTGGTTCGATTCGCGCATCCAGGACTGGAAGATCAAGATCCAGGACACCGTGGCAGACAACGCCCTCTG 8080
P C F E V V D S R I Q D W K I K I Q D T V A D N A S C

CGGGCTGTTCTGCTCGGCGACCAGGCCGTCTACCGCGCCAGGTGATCTGGTACCTGCGGCATGGTGGTTCGAGAAAA 8160
G L F V L G D Q A V S P R Q V D L V T C G M V V E K

ACGCCAGCTGCTCTCCACCGCGCTGGAGCGGCTGCGCTCGGCTCGCCGCTCAACTGCGTGGCTGGCTGGCCAAACACC 8240
N G Q L L S T G A G A A A L G S P V N C V A W L A N T

CTCGGCCACTTCGGCATCGCTGAAGGCCGGCGAAGTGATCCTGTCCGGCTCGTGGTTCGCTGGAACCGGTCAAGGCC 8320
L G H F G I A Stop

GGTGATTTTCATGCGCGTTCGATATCGGCGGCATCGGCAGCGCCTCCGTGCGCTTCATCTGATCGAGGACAGCCTGATGAGC 8400
M S

xy1Q
AAGAACTGAAAGCGGCGATTATCGGCCCGGGCAACATCGGCACGGACCTGGTTCGATGAAGATCGTGGCTCCGAATGGAT 8480
K K L K A A I I G P G N I G T D L V M K I V R S E W I

CGAGCCGGTTCGGATGGTTCGGCATCGACCCCAACTCCGATGGCCTCAAGCGCGCCCGGAGTTCGGCCTGAAGACCACCG 8560
E P V W M V G I D P N S D G L K R A R E F G L K T T

CCGAAGGCGTCGACGGCCTCGTGCCGACGTGCTCGACGACGATATCCGATCGCCTTCGATGCCACTTCCGCCTATGTA 8640
A E G V D G L V P H V L D D D I R I A F D A T S A Y V

Sall
CATGCCGAGAACAGCCGCAAGCTCAACGAACTGGGCGTGTGATGTCGACCTGACCCCGGCCCATCGGCCCTACTG 8720
H A E N S R K L N E L G V L M V D L T P A A I G P Y C

CGTGCCGCGGTTGAACCTCAAGCAGCACGTCGGCAGCTGGAAATGAACGTCAACATGGTCACCTGCGGTGGCCAGGCCA 8800
V P P V N L K Q H V G T L E M N V N M V T C G G Q A

CCATCCCAGTGGTCGCGCGGTATCGCGCGTGCAGCCGGTGGCCTACGGCGAGATCGTCGCCACGGTGTCTCGCGCTCC 8880
T I P M V A A V S R V Q P V A Y G E I V A T V S S R S

ATCGGCCCCGGGCACCCGCAAGAACATCGACGAGTTACCCCGCACCACCGCCGGTGCATCGAGCAGGTGCGGCGGGCCAA 8960
I G P G T R K N I D E F T R T T A G A I E Q V G G A K

GGAAGGCAAGGCGATCATCGTCGTCAACCCGGCCGAGCCGCGCTGATGATGCGCGACACCATCCACTGCCTGACCGAAA 9040
E G K A I I V V N P A E P P L M M R D T I H C L T E

CCGAGCCGGACCAGGATGCGATCACCGCATCGGTCCACGCGATGATCGCCGAGGTGCAGAAGTACGTGCCCGGCTACCGG 9120
T E P D Q D A I T A S V H A M I A E V Q K Y V P G Y R

CTGAAGAATGGCCCGGTATTCGACGGCAACCGCGTCTCGATCTTCATGGAGGTGCGAGGGCCTGGGCGACTACCTGCCCAA 9200
L K N G P V F D G N R V S I F M E V E G L G D Y L P K

GTACGCCGGCAACCTCGACATCATGACCGCCGCGCGCTGCGCACCGGCGAGATGTTTCGCCGAGGAAATCGCCAGCGGCA 9280
Y A G N L D I M T A A A L R T G E M F A E E I A S G

CCATTCAACTGCCACGTGCGTGAAGCGGCACTGGCCTAAAGGAGTCGCACCATGAATCTGCAAGGCAAGAACGTACCCCTG 9360
T I Q L P R R E A A L A Stop ^{xy1K} M D L Q G L N V T L

CACGACATGAGCCTGCGCGACGGCATGCACGCCAAGCGCCACCAGATCAGC**CTCGAG** 9417
H D M S L R D G M H A L R H Q I S L E

6.2. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Clusters um *benD* aus *P. putida* Idaho

*Bam*HI

GGATCCTAGTGGTCACGTTCCAAGTGGTCCCCTTGTCTATCCCCCAGTAGCTTCATTGCGGGCGGTTTATTTACCAAGC 80
GATGGGGACTCCGCTCGGCTGCATCATATCAGTGGGGTCAAAAAGCTCCGGCCTTGAAAACCCCTCGGTGTGCAGAAGGCA 160

*Eco*RI

GTGGAT**GAATTC**GACAGTACCCTCCCAGCCAGGATAAAAACACGCCAAAAGAAACCAATCGTGGCACCCAAATGACGTACA 240
GCGACTAAAAGCGAGCTGCTGGCTGGTTCCAAAGCAGAGCGAATCGTTTTAACCTGGCTGTAAAGCACTTTGAAAAGGAAC 320
GTCTCCCGGTGGATGCCCAAGCAGCCCGGGAGACATTGCAGGAGGTGTTAAGTATCAAACAATGGGTTGATCGACACCTG 400
ATAGCTGCAAAAAGGATTTTTAGAAAAGCGTGAGTTGTTTCGAAGCATTGCCATTTCTGAAGTTACCGAAAAAGTACCGAA 480
CATCCGTAATCTGGATAACGTTCTGCACAATCCGGATAGCCCCCGCCAGCCGTCTCCCTAACCTGACCAGGTCTAAAC 560

benA

AATAACAAGGGAGACCCTGGCCATGTCCCTGGGATTGACTACCTCAATGCCATGCTCGAGGACGACCCTGAAAAGGGCA 640
M S L G F D Y L N A M L E D D R E K G

TCTTACGCTGCAAGCGGGAGATGTTACCCGACCCACGGCTGTTTCGACCTGGAGATGAAACACATCTTCGAGGGCAACTGG 720
I L R C K R E M F T D P R L F D L E M K H I F E G N W

ATCTACCTGGCCACGAAAGCCAGATCCCCGAGAAGAATGACTTCCTCACCTGACCATGGGGCGCCAGCCGATTTTCAT 800
I Y L A H E S Q I P E K N D F L T L T M G R Q P I F I

CGCGCGCAACAAGGACGGTGAAGTCAATGCCTTCCTCAACGCCTGCAGCCACCGCGGTGCCATGCTGTGCCGCAACAAGC 880
A R N K D G E V N A F L N A C S H R G A M L C R H K

GCGGCAACCCTTCCAGCTATACTGCCCGTCCACGGCTGGACGTTCAACAACAGCGGCAAACCTGCTGAAGGTGAAAGAC 960
R G N R S S Y T C P F H G W T F N N S G K L L K V K D

CCCAGCAACGCCGGCTACCCCGACAGCTTCAACTGCGACGGCTCCACGACCTGACCAAGGTGGCAGCCTTCGAGTCGTA 1040
P S N A G Y P D S F N C D G S H D L T K V A R F E S Y

CCGGGGCTTTTTGTTTCGGCAGCCTGAACGCCGATGTGAAGCCGCTGGTTCGAGCACCTGGGCGAGTCAGCGAAGATCATCG 1120
R G F L F G S L N A D V K P L V E H L G E S A K I I

ACATGATCGTCGATCAGTCGCTGAAGGCCTGGAAGTGCTGCGCGGTGCCAGCTCGTACATCTACGAAGGCAACTGGAAG 1200
D M I V D Q S P E G L E V L R G A S S Y I Y E G N W K

CTCACCGCCGAAAACGGCGCTGACGGCTACCACGTAAGCTCCGTGCACTGGAACCTACGCCGCCACCCAGAACCAGCGCAA 1280
L T A E N G A D G Y H V S S V H W N Y A A T Q N Q R K

GCAGCGGAGCGGGTGAAGGATCAAGACCATGAGTGCTGGCGCCTGGGCCAAGCAGGGCGGGGTTTCTATTCTTCG 1360
Q R E A G D E I K T M S A G A W A K Q G G G F Y S F

ACCACGGCCACCTGCTGCTGTGGACCCGTTGGGCCAACCAGGACCGCCCGCCTATGAGCGCCGACCAACTGGCC 1440
D H G H L L L W T R W A N P E D R P A Y E R R D Q L A

GCCGATTTTCGGCCAGGCGCGCGCGACTGGATGATCGAAAACCTCGCGCAACCTGTGCTGTACCCCAACGTGTACCTGAT 1520
A D F G Q A R A D W M I E N S R N L C L Y P N V Y L M

GGACCAGTTTCAGCTCGCAGATCCCGCTTGGCCGCGGATTTCCGGTGAACAAGACCGAAATCACCATCTACTGCATCGCGC 1600
D Q F S S Q I R V A R P I S V N K T E I T I Y C I A

CGAAAGGCGAGAGCGCCGATGCCCGGCCAAACGTATTTCGCCAGTACGAAGACTTCTTCAACGTCAGCGGCATGGCCACC 1680
P K G E S A D A R A K R I R Q Y E D F F N V S G M A T

CCGGACGACCTGGAAGAATTCGTTTCGTGCCAGACCGGCTATGGTGGCGGCACCGGCTGGAACGACATGTCTCGCGGCGC 1760
P D D L E E F R S C Q T G Y G G T G W N D M S R G A

GAAACACTGGGTGCAAGGCGCCGATGAGGCGCCAGGGAGATTGAA**Xho**I**CTCGAG**CCCCCTGCTGTCCGGCGTGCACCGGAGG 1840
K H W V E G A D E A A R E I E L E P L L S G V R T E

*Pst*I

ACGAAGGCCCTGTTTCGTG**CTGCAG**CACAAGTACTGGCAGGACACCATGATCCAGGCCCTCAAGGACGAACAGCAGCTGATC 1920
D E G L F V L Q H K Y W Q D T M I Q A L K D E Q Q L I

benB

CCCCTGGAGGCCGTCGAATGAGCCCTGTATGACACCGTGCAGGACTTCCCTGTACCAGCGAAGCGCGTACTCTGGACGATGCC 2000
P V E A V Q Stop
M S L Y D T V R D F L Y R E A R Y L D D A

CAGTGGGACCAAGTGGCTGGAAGTGTACGCCAGCGATGCCAGCTTCTGGATGCCGAGCTGGGACGATGACGACACCCCTCAC 2080
Q W D Q W L E L Y A S D A S F W M P S W D D D D T L T

CGAAGACCCACAAAGCGAAATCTCACTGATCTGGTACGGCAACCGTGGCGGCCTGGAAGACCGCGTGTTCGGCATCAAGA 2160
E D P Q S E I S L I W Y G N R G G L E D R V F R I K

CCGAGCGCTCCAGTGCACCGTGCACACCCGACCTCGCAACAACATCAGCAACATCGAGATCGTTCGAGCAGGGCGAG 2240
T E R S S A T V P D T R T S H N I S N I E I V E Q G E

GGCAGCTGCCAGGTGCGCTTCAACTGGCACACCTGAGCTTCCGCTACAAGACCACCGACAGTTACTTCCGCACCAGCTT 2320
G S C Q V R F N W H T L S F R Y K T T D S Y F G T S F

CTACACCTTCGACCTGCGCGGTGAGCAGCCGCTGATCAAGGCCAAGAAGGTGGTGTGAAGAAGACTACGTCGCCAGG 2400
Y T L D L R G E Q P L I K A K K V V L K N D Y V R Q

TCATCGACATCTACCACATCTGATACTGGGTTTTTCGAGCATTGCCCGGTGCGTCTTGTGACGCGCCGTGGCCCGGCTCG 2480
V I D I Y H I Stop

benC
CCC GCGAGGTGCAACATGAGCTACCAGATCGCACTGAATTTGGAAGACGGGGTTACCCGTTTCATGAAGCCACAGGTCA 2560
M S Y Q I A L N F E D G V T R F I E A T G Q

GGAAACCGTGGCCGACGCCGCTTACCGCCAAGGCATGAACATTCGGCTGGACTGCCGCGACGGCGCTTGCGGGACCTGCA 2640
E T V A D A A Y R Q G M N I P L D C R D G A C G T C

AGTGAAGGCTGAGTCCGGTCTTATGACCTTGGCGACAACCTCATCGAAGACGCCCTTGAAGCAGACGAAATCGCCGAA 2720
K C K A E S G R Y D L G D N F I E D A L S E D E I A E

GGCTACGTGCTGACGTGCCAGATGCGCGCCGAAAGCGACTGCGTCATCCGCATCCCGGCTTGTGCGAGCTGTGCAAGAC 2800
G Y V L T C Q M R A E S D C V I R I P A S S Q L C K T

CGAGCAGGCCACTTTTCGAGGCCGCCATCAGCGATGTGCGCCAACCTGTCGGTTCAGCACCATTGCCCTGTGATCAAGGGTG 2880
E Q A T F E A A I S D V R Q L S V S T I A L S I K G

AGGCCCTGAGCCGTCTGGCCTTCTGCGGGGCGAGTACGTCAACCTGAAGGTGCCGGGCGAGCAGAGCCGGGCTTAC 2960
E A L S R L A F L P G Q Y V N L K V P G S E Q S R A Y

PstI
TCGTTTCAGCTCG**CTGCAGA**AGGACGGCGAAGTCACTTCCGTGATCCGCAACGTACCGGGTGGGCTGATGAGCAGCTTCT 3040
S F S S L Q K D G E V S F L I R N V P G G L M S S F L

GACCAACCTTGCCAAAGCCGGCGACAGCCTGAGCCTGGCCGGGCGCTTGGGCGAGCTTCTACCTGCGGCCGATCCAGCGCC 3120
T N L A K A G D S L S L A G P L G S F Y L R P I Q R

CGCTGTTGCTGCTGGCCGGTGGTACCGGGCTGGCTCCGTTACCGCGATGCTGGAGAAGATCGCCGAGCAGGGCAGCGAG 3200
P L L L L A G G T G L A P F T A M L E K I A E Q G S E

CACCCGTTGCACCTGATCTACGGCGTGACCAAGACTTTGACCTGGTCAACTCGACCGCCTGCAAGCGCTGGCGGCACG 3280
H P L H L I Y G V T N D F D L V E L D R L Q A L A A R

TATCCCCAACTTACCTACAGCGCCTGCGTCCGCAACCCGGACAGCCAGTACCCGCGAGAAGGGCTATGTACCCAGCACA 3360
I P N F T Y S A C V A N P D S Q Y P Q K G Y V T Q H

TCGAGCCACGCCACCTCAATGACGGCGATGTGGATGTGTACCTGTGCGGCCCGCCACCCATGGTGAAGCGGTACGCCG 3440
I E P R H L N D G D V D V Y L C G P P P M V E A V S R

TACGTGCGTGAAGCAGGGCATTACCCCGCCAACTTCTACTACGAGAAGTTTGGCGCTGCGGCCTGACGCCCCCTGATTCA 3520
Y V R E Q G I T P A N F Y Y E K F A A A A Stop

AAGCAATACGCCACCCCTGTGGGAGCGGGCGAGCCCGCAAGCAGGCTGCGCGGTGGATGGCACGGGCTTCGCCGTGTT 3600
CGCGGGCAAGCCCGCTCCACAGTGATCGCGCAGCCTTTCCGGCTTTGAGCAAGACAATTGCTGCCACAGGGTCTCTCGC 3680

benD SgrAI
GAACTGGAGATTTACATATGAACAACAGATTTCAAGGCAAGGTTGCCCTGGT**CACCGGTG**CCGCCAAGGCATCGGCCGG 3760
M N N R F Q G K V A L V T G A A Q G I G R

AccI
GGCGTGTGCTGGCGGCTGAAGGCTGAAGGCGCGCAAGTGGTGGCG**GTAGAC**CGTTCCGAGCTGGTCCACGAAGTGGCTGG 3840
G V C W R L K A E G A Q V V A V D R S E L V H E L A G

CGAGGGCATGCTCACCTCACCGCCGACCTGGAACAACACGCCGATTGCGCCCGGGTCCATGGCCAGTGGCGTGGAAACCC 3920
E G M L T L T A D L E Q H A D C A R V M A S A V E T

ATGGCCCGCTGGACATCTGGTCAACAACGTCGGCGGCACCATCTGGGCCAAGCCCTTCGAACACTACGAAGTTCGAGCAG 4000
H G R L D I L V N N V G G T I W A K P F E H Y E V E Q

ATCGAGGGCCGAGGTGCGCCGCTCGCTGTTCCCAACCTGTGGTGTGCCACGCCGCGCTGCCGTACATGCTCGAACGTGG 4080
I E A E V R R S L F P T L W C C H A A L P Y M L E R G

CAGTGGCGCCATCGTCAATGTCTCGTCCATCGCTACCCGCGCGTCAACCGTGTGCCTTACGGCGCAGCCAAGGGGGCG 4160
S G A I V N V S S I A T R G V N R V P Y G A A K G G

TCAACGCGCTCACTGCCTGCCTGGCCTTCGAAACCGCCGGCCGGGCGATCCGCGTCAACGCCACTGCGCCCGGGCGGCACC 4240
V N A L T A C L A F E T A G R G I R V N A T A P G G T

SalI/AccI
GAAGCGCCGCCCCGGCGCTACCGCGCAACAGTGCAGAGCAGACCAGCAGGAAAAGCGCTGGTACCAGCAGAT**CTCGA** 4320
E A P P R R V P R N S A E Q T E Q E K R W Y Q Q I V D

CCAGACCCTCGACAGCAGCCTGATGCACCGCTACGGCAGCATCGACGAGCAGGTGGGGCCATTCTGTTCTCGCTCCG 4400
Q T L D S S L M H R Y G S I D E Q V G A I L F L A S

SgrAI
ACGAAGCCTCGTACAT**CACCGCGT**GACCCCTGCCGTTAGGAGCGGGCAGCTGGGCTGAACCGCAACCTCAAGGCAAAAAG 4480
D E A S Y I T G V T L P V G G D L G Stop

benK
CTTTCTTCCACAACAAAACAAGAGCGACAGATGCCATGCGAACCCCTTGATGTACACCCGATCATCGACAATGCGCGCTT 4560
M R T L D V H P I I D N A R F

TACCCGTTTCACTGGATGGTCATGGCCTGGTGGCGCTGCTGCTGATTTTCGACGGCTATGACCTGTTTCATCTACGGTG 4640
T P F H W M V M A W C G L L L I F D G Y D L F I Y G

DraII
TGGTACTGCCGGTTCATCATGAAAGAGT**GGGGCCT**GACCCCGTTGACGGCTGGTGCATTGGGCAGCTATGCGCTGTTCCGGC 4720
V V L P V I M K E W G L T P L Q A G A L G S Y A L F G

ATGATGTTCCGGCCCTGGCCTTCCGGCAGCCTGGCCAGCCGATCGGGCGCAAGAAGGGCATTGCCATCTGTTTCGCTT 4800
M M F G A L A F G S L A D R I G R K K G I A I C F A L

GTTCTCGGGAGCGACCATCCTCAACGGCTTTGCCAGCAGCCCGAGCGAGTTTGGCATCTACCGCTTCATCGCCGGCCTGG 4880
 F S G A T I L N G F A S S P S E F G I Y R F I A G L
 GCTGTGGCGCCTGATGCCAACGCCGTGGCGCTGATGAACGAATACCGCCCAAGCGCCTGCGCAGCACGCTGGTGGCG 4960
 G C G G L M P N A V A L M N E Y A P K R L R S T L V A
 ATCATGTTTCACTGGTTATTTCGCTGGGCGGCATGCTGTGGCAGGTGTGGCATCTTCATGCTGCCGCGTTTTGGCTGGGA 5040
 I M F S G Y S L G G M L S A G V G I F M L P R F G W E
 GTCGATGTTCTTCGCCGAGCGGTGCCTCTGCTGCTGTTACCGGTGATTCTTTACTACCTGCCTGAATCCATCGGCTTCC 5120
 S M F F A A A V P L L L L P V I L Y Y L P E S I G F
 TGGTGGCCAAAGGCCGTATCGAGGAAGCACGCACATTGCTCAAACGGCTGGACCCGGACTGCGATGTCCAGGCCGATGAC 5200
 L V R Q G R I E E A R T L L K R L D P D C D V Q A D D
 ATGCTTCAGGCGACCGACCGCAAAGGCAGCGGCGCTTCGGTGTGGAAGTGTCCGCAATGGCCTGGCGATTGCGACCCT 5280
 M L Q A T D R K G S G A S V L E L F R N G L A I R T L
 GCGCTGTGGGTTGCGTTCTTCTGCTGCCTGCTGATGGTCTACGCACTGAGTTCCTGGCTGCCAAAAGTGTGCGCAACG 5360
 A L W V A F F C C L L M V Y A L S S W L P K L M A N
 CCGGCTACAGCCTGGGCTCAAGCCTGTCTTCTGCTGGCACTGAACTTTGGCGGCATGGCCGGGGCGATCCTCGGCGGC 5440
 A G Y S L G S S L S F L L A L N F G G M A G A I L G G
 TGGCTGGGTGACCGCTACAACCTGGTCAAGGTGAAGGTGGCGTTCTTCATTGCGCCGCACTGTGATCAGCCTGTGGG 5520
 W L G D R Y N L V K V K V A F F I A A A L S I S L L G
 GGTGAACAGCCCGATGCCGGTGTCTGACCTGCTGATCTTCATTGCGCGGCCACCACCATTGGTACGAGATTCTGCTGT 5600
 V N S P M P V L Y L L I F I A G A T T I G T Q I L L
 ATGCCGGCGTGGCAGATGTACGGCCTGTGGTGGCCTCTACCGCCTGGGCTGGGCTCGGGCATCGCCGTAATGGC 5680
 Y A G A A Q M Y G L S V R S T G L G W A S G I G R N G
 GCCATCGTGGCCCGCTGCTGGGCGGTGGCCTGATGGGCATCAACCTGCCACTGCAACTCAATTCATCGCCTTTGCCAT 5760
 A I V G P L L G G A L M G I N L P L Q L N F I A F A I
 CCCTGGCGCCATCGCCGCGTGGCCATGGCCGTGCACCTGGCCAGTGGTGGCGCCACGCCAGACCCTGGCGGCGCAGG 5840
 P G A I A A L A M A V H L A S G R R H A Q T L A A Q
 CCTGAACCGAACAGAACAAGACGAGGTAACCCCATGACCGTGAACATTTCCATACTGCCGAGGTACAGCAGTTCCTCG 5920
 A Stop M T V N I S H T A E V Q Q F F
 AGGAGGCCGAGGCTTTGGTAATGCGGCCGGCAACCCACGCCTCAAACGCATCGTGCAGCGCCTGCTGCAGGATAACCGCG 6000
 E E A A G F G N A A G N P R L K R I V Q R L L Q D T A
 CGGCTGATCGAAGACCTGGACATCAGCGAAGACGAGTTCCTGGCAGCCGCTGCAGCTACCTCAATCGCCTGGGCGTGGCGG 6080
 R L I E D L D I S E D E F W H A V D Y L N R L G S R G
 CGAAGCGGGGCTGCTGGTGGCGGGGCTGGGCATCGAACACTTCCTCGACCTGCTGCAGGATGCCAAGGACCAGGAGGCAG 6160
 E A G L L V A G L G I E H F L D L L Q D A K D Q E A
 GGCGCGTTGGTGGCACCCACGCACCATCGAAGGCCGTTGTACGTGGCTGGCGCACCGATTGCCAAGGTGAAGTGGCG 6240
 G R V G G T P R T I E G P L Y V A G A P I A Q G E V R
 ATGGACGACGGCAGCGAGGAGGGCGTGGCCACGGTGTGTTCTGGAAGGCCAGGTGCTGGACCCGCACGGACGCCGCT 6320
 M D D G S E E G V A T V M F L E G Q V L D P H G R P L
 GCCGGTGGCACGGTGCACCTGTGGCATGCCAATACCCGTGGTACCTACTCGTTCTTCGACCGAAGCCAGTGGCGGTACA 6400
 P G A T V D L W H A N T R G T Y S F F D R S Q S A Y
 ACCTGCGTGGCGCATCGTTACCGATGCCAGGGGCGCTACCGTGGCGCTCCATCGTGGCATCGGGCTATGGTGGCGAC 6480
 N L R R R I V T D A Q G R Y R A R S I V P S G Y G C D
 CCGCAGGGGCCAACCCAGGAATGCTGGACCTGCTGGGCCGTATGGCCAGCGCCCGGCGCATGTGCACTTCTTTATCTC 6560
 P Q G P T Q E C L D L L G R H G Q R P A H V H F F I S
 GCGCCAGGGTACCGGCACCTGACCACGCAGATAAACCTGTGGGGGACAAGTACCTGTGGGATGACTTTGCCATATGCCA 6640
 A P G Y R H L T T Q I N L S G D K Y L W D D F A Y A
 CACGGATGGGTTGGTGGGGAGGTGGTGTTCGTGCAAGGGTGGGAGGGTGGCATGCCGAGCTGAAGTTCGACTTCCAG 6720
 T R D G L V G E V V F V E G S E G R H A E L K F D F Q
 TTGAGCAGGCCAGGGCGGTGCCGATGAGCAGCGCAGCGGCGCGGGCTTTGAGGAGGCTGATCCACCGCGTG 6800
 L Q Q A Q G G A D E Q R S G R P R A L Q E A Stop
 GGCTGTTTCGCGGCATGCCCGCTCCACAGGTGAAGCCTGTGAGTCTGTTGTTGGAGCGGGCAAGCCCGCAAGCAGCC 6880
 AACACCCAAACAAGAGCCCGCCACAAGGCCGCGCTGCCTTGCAGAAGCTACATGAATACGCTGATCAAGGACTGCT 6960
 M N T L I K D C
 CTGTGTGGCCATCGTGGCGCAGCATTGCCACGACGATCTCCTACCGGCCCGTTGGTGTATTTTTCCACGCCGCC 7040
 S V S A I V A G S I A T T I S Y A G P L V I I F H A A
 GAAGCGGCCGCGCTGTGCGACCGAGTGTGTCATCTGGGTCTGGGCCGTGTCATGGGAGTGCCTTGGTGGCGCT 7120
 E A A G L S H Q Q L S S W V W A V S M G S A L L G A L

GCTCAGCCTGCGCTACCGCGTGCCGGTAGTAATCGCCTGGTCCATCCCAGGGTCGGCCCTGTTGGTCACCGCCTTGCCGC 7200
L S L R Y R V P V V I A W S I P G S A L L V T A L P

AACTGGGCCTGGAGCAGGCCGTGGGCGCCTACCTGGTGGCCACCTGGTCCTGCTGCTGATCGGCATCAGCGGGGCCTTC 7280
Q L G L E Q A V G A Y L V A N L V L L L I G I S G A F

GACCGCATCATCGCGCGCCTGCCGGGCTCTATCGCTGCCGGTATGCAGGCC**GGATCC** 7337
D R I I A R L P G S I A A G M Q A G S

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Knackmuss möchte ich mich sehr herzlich für seine Hilfestellung zum Gelingen dieser Arbeit bedanken. Ich danke ihm außerdem für sein Engagement beim „Abenteuer“ des Industrieprojektes.

Herrn Prof. Dr. Schlömann danke ich für die Diskussionen und Anregungen und die Betreuung insbesondere im genetischen Teil der Arbeit. Danken möchte ich ihm auch für seine Reisen nach Stuttgart, die das Vorankommen der vorliegenden Arbeit förderten.

Mein Dank gilt PD Dr. Hiltrud Lenke, Simone Gittinger und Edina Payer für die Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Den Mitarbeitern Sibylle Bürger, Simone Gittinger, Jörg Rau und Sandra Trott aus Labor 1 danke ich für die gute Zusammenarbeit und die alltäglichen Gespräche fachlicher und nichtfachlicher Art.

Silvia Lakner danke ich für ihre Unterstützung bei den Sequenzierungsarbeiten und das häufige Teekochen.

Bei Monika Thiel bedanke ich mich für ihre Tipps zur Herstellung von Dendrogrammen und für die freundliche Unterbringung während meines Aufenthalts in Freiberg.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Matthias Müller, Margit Mau und Edgar Gabriel.

Der „Kaffeerunde“ und allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für das gute Arbeitsklima.

