

Neue Enzyme für industrielle Anwendungen aus Boden-Genbanken

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

Vorgelegt von

Katrin Lämmle

aus Vaihingen (Enz)

Hauptberichter:	Prof. Dr. Herwig Brunner
Mitberichter:	Prof. Dr. Georg Sprenger
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Dezember 2004

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2004

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den 10. November 2004

Inhalt

ABKÜRZUNGEN	7
ZUSAMMENFASSUNG	9
ABSTRACT	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 Industrielle Anwendung von Enzymen	13
1.2 Überblick über einige technisch relevante Enzyme	16
1.2.1 Lipolytische Enzyme	16
1.2.2 Proteasen	20
1.2.3 Amylasen	21
1.2.4 Phosphatasen und Phytasen	22
1.2.5 Dehalogenasen	23
1.3 Suche nach geeigneten Biokatalysatoren für den technischen Einsatz	26
1.3.1 Traditionelle käufliche Enzyme	26
1.3.2 Gentechnische Modifizierung von Enzymen	26
1.3.3 Identifizierung neuer Enzyme aus Mikroorganismen	27
1.3.3.1 Durchmusterung von Stammsammlungen	27
1.3.3.2 Durchmusterung einer Klonbank	28
1.3.3.3 <i>Data Mining</i> von Genomsequenzen	28
1.4 Natürliche Diversität als Quelle für neue Enzyme	29
1.4.1 Konventionelle Methode	29
1.4.2 Alternativer Ansatz	31
1.5 Aspekte zur Nutzung des Metagenoms	31
1.5.1 DNA-Quelle	31
1.5.2 Extraktion und Aufreinigung der DNA	32
1.5.3 Konstruktion der Genbank	34
1.5.4 Wahl des Vektors	35
1.5.5 Wirtsorganismus	36
1.5.6 Ablage der Genbank	36
1.5.7 Identifizierung neuer Enzyme	37
1.6 Screeningverfahren	37
1.7 Methoden zur Detektion biologischer Dehalogenierung	40
1.7.1 Messung der pH-Absenkung	40
1.7.2 Bestimmung des freigesetzten Chlorids	41
1.7.2.1 Aufbau und Funktionsweise des elektrochemischen Halogenidsensors	42
1.7.2.2 Theorie der ionenselektiven Elektrode	44
1.8 Zielsetzung der Arbeit	46
2 MATERIAL	47
2.1 Chemikalien	47
2.2 Biochemikalien	47

2.3	Verbrauchsmaterialien	48
2.4	Geräte	48
2.5	Lösungen und Puffer	50
2.6	Medien	53
2.6.1	Allgemeine Nährmedien	53
2.6.2	Screening-Medien.....	54
2.7	Antibiotika und Medienzusätze	56
2.8	Bakterienstämme	57
2.9	Plasmide	57
3	METHODEN	58
3.1	Kultivierung, Vereinzlung und Lagerung von Bakterien	58
3.1.1	Kultivierung und Lagerung von Einzelansätzen	58
3.1.2	Kultivierung und Lagerung in Mikrotiterplatten	58
3.1.3	Expression klonierter Enzyme	58
3.1.4	Zentrifugation von Zellen	59
3.2	Isolierung und Reinigung von DNA	59
3.2.1	Phenolextraktion der DNA	59
3.2.2	Ethanol- bzw. Isopropanolfällung der DNA	60
3.2.3	Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA über Spin-Säulen	60
3.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Bodenproben, modifiziert nach Zhou <i>et al.</i> (1996) ..	60
3.2.5	Aufreinigung der isolierten Boden-DNA	61
3.3	Bestimmung der Konzentration von DNA	61
3.3.1	Spektrophotometrisch.....	61
3.3.2	Fluorimetrisch mit SYBR Green I	61
3.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	62
3.5	Gelelelution von DNA-Fragmenten	62
3.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	62
3.7	Dephosphorylierung linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase	63
3.8	Ligation	63
3.9	Transformation	63
3.9.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach Hanahan.....	63
3.9.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen	63
3.9.3	Elektroporation.....	64
3.10	DNA-Sequenzierung und Analyse der Sequenzdaten	64
3.11	Herstellung von Zellextrakten	66
3.11.1	Aufschluss mit der Kugelmühle.....	66
3.11.2	Optimierter Aufschluss mit Lysozym (MTP-Format)	66
3.12	Enzymatische Umsetzungen mit chloriertem Substrat	66
3.12.1	Umsetzung mit ganzen Zellen in Kulturmedium	66
3.12.2	Umsetzung mit ganzen Zellen in Puffer	67
3.12.3	Umsetzung nach Zellaufschluss	67
3.12.4	Aufschluss und Umsetzung für den Testlauf der Halogenid-Screening-Anlage.....	67
3.13	Bestimmung der Proteinkonzentration	68
3.14	Bestimmung der Aktivität von lipolytischen Enzymen	68

3.14.1	pNP-Assay.....	68
3.14.2	MUF-Assay.....	68
3.14.3	Assay mit X-Butyrat.....	69
3.14.4	α -Naphthyl-Assay.....	69
3.14.5	Aktivitätstest mit Esterderivaten der Phenyllessigsäure	69
3.15	Screeningverfahren und enzymatische Assays	70
3.15.1	Replikplattierung auf feste Screening-Medien	70
3.15.2	Tributylin-Assay	70
3.15.3	Phosphatase-Assay	70
3.15.4	Protease-Assay.....	70
3.15.5	Amylase-Assay.....	70
3.15.6	Phytase-Assay	71
3.15.7	Dehalogenase-Assays	71
3.15.7.1	pH-Indikator-Verfahren.....	71
3.15.7.1.1	pH-Agarplatten-Assay	72
3.15.7.1.2	pH-MTP-Assay.....	72
3.15.7.2	pH-Tropfenmessung	72
3.15.7.3	Bestimmung der Chloridkonzentration mit dem Halogenidsensor (Einzelelektrode)	72
3.15.7.4	Messung mit der automatisierten Halogenid-Screening-Anlage.....	73
4	ERGEBNISSE	74
4.1	Herstellung von Genbanken aus Boden-DNA.....	75
4.1.1	Isolierung und Aufreinigung genomischer Boden-DNA.....	75
4.1.2	Klonierung der Boden-DNA	76
4.1.2.1	Enzymatische Fragmentierung der Boden-DNA	76
4.1.2.2	Klonierungsvektor pJOE930	76
4.1.2.3	Ligation und Transformation	78
4.1.2.4	Vereinzelung und Ablage der Klone.....	79
4.1.3	Charakterisierung der Genbanken	79
4.2	Screening der Genbanken auf Enzymaktivität.....	82
4.2.1	Screening auf lipolytische Aktivität	82
4.2.1.1	Durchführung und positive Klone	82
4.2.1.2	Analyse der Insert-Sequenzen	84
4.2.1.2.1	Klon KL01.....	85
4.2.1.2.2	Klon KL02.....	86
4.2.1.2.3	Klon KL04.....	87
4.2.1.2.4	Klon KL05.....	88
4.2.1.2.5	Klon KL06.....	88
4.2.1.2.6	Klon KL07.....	89
4.2.1.2.7	Klon KL09.....	89
4.2.1.2.8	Klon KL10.....	90
4.2.1.2.9	Klon KL11.....	91
4.2.1.2.10	Klon KL12.....	93
4.2.1.2.11	Klon KL13.....	93
4.2.1.2.12	Klon KL15.....	94
4.2.1.2.13	Klon KL16.....	96
4.2.1.2.14	Klon KL18.....	97
4.2.1.2.15	Gesamtübersicht	98
4.2.1.3	Substratspektrum der Klone.....	100
4.2.2	Screening auf Phosphatase-Aktivität.....	102
4.2.2.1	Untersuchung der gefundenen Phosphatasen auf Phytase-Aktivität	102
4.2.3	Screening auf Protease-Aktivität	104
4.2.4	Screening auf Amylase-Aktivität.....	104
4.2.5	Weitere Enzymaktivitäten	105

4.2.6	Screening auf Dehalogenase-Aktivität	106
4.2.6.1	pH-MTP-Assay.....	107
4.2.6.2	pH-Agarplatten-Assay	109
4.2.6.3	Durchführung des Screenings und positive Klone.....	110
4.2.6.4	Überprüfung der dehalogenierenden Aktivität von KL23, KL24 und KL25	112
4.2.6.5	Analyse der Insert-Sequenzen	113
4.3	Entwicklung eines HTP-Systems für das Screening nach Dehalogenasen	115
4.3.1	Grundlegende Methoden der elektrochemischen Chloriddetektion	116
4.3.1.1	Kalibrierung und Nachweisgrenze.....	116
4.3.1.2	Medienoptimierung.....	118
4.3.1.3	Chloriddetektion im Kulturüberstand ganzer Zellen.....	120
4.3.1.4	Chloriddetektion mit Zellextrakten im MTP-Format	121
4.3.2	Parallelisierung und Automatisierung der Chloridmessung	123
4.3.3	Testlauf der Halogenid-Screening-Anlage	128
5	DISKUSSION	129
5.1	Konstruktion von Genbanken aus Boden-DNA durch Direktklonierung	130
5.1.1	Isolierung und Aufreinigung von Boden-DNA.....	131
5.1.2	Klonierung der Boden-DNA	134
5.2	Aktivitäts-Screening	138
5.2.1	Lipolytische Aktivität	139
5.2.2	Phosphatasen und Phytasen.....	142
5.2.3	Proteasen	143
5.2.4	Amylasen	143
5.2.5	Weitere Enzymaktivitäten	144
5.2.6	Dehalogenasen.....	145
5.3	Automatisierung der Chloriddetektion	147
5.4	Ausblick	151
6	ANHANG	153
7	LITERATUR	171
	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	187
	DANKSAGUNG.....	188

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BTB	Bromthymolblau
BSA	<i>bovine serum albumin</i> = Rinderserumalbumin
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> = Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CTAB	Hexadecylmethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt-deionisiertes H ₂ O
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTP	<i>high throughput</i> = Hoch-Durchsatz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCA	Monochloressigsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTP	Mikrotiterplatte
MUF-	4-Methylumbelliferyl-
nd	<i>not determined</i> = nicht bestimmt
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD _{x nm}	Optische Dichte bei x nm
orf	<i>open reading frame</i> = offener Leserahmen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Ketten-Reaktion
pNP-	para-Nitrophenyl-
PR	Phenolrot
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> = Natriumdodecylsulfat
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteil
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
X-Butyrat	5-Brom-4-chlor-3-indolylbutyrat
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat

Des Weiteren gelten die internationalen Abkürzungsregeln nach IUPAC sowie internationale Einheiten- und Größenbezeichnungen.

Sprachkonventionen

Bei manchen im wissenschaftlichen Sprachgebrauch häufig vorkommenden englischen Fremdwörtern wurde auf die künstlich wirkende Übersetzung ins Deutsche verzichtet. Dies wurde durch kursive Schreibweise angezeigt.

Zusammenfassung

In zahlreichen Industriezweigen werden heutzutage biokatalytische Prozesse erfolgreich angewendet. Das Einsatzgebiet von Enzymen reicht von der Lebensmittelproduktion, dem Waschmittelsektor, der Textilindustrie sowie der Zellstoff- und Papierherstellung über die Futtermittelindustrie und umweltschutzrelevante Bereiche bis hin zur Verwendung in der modernen Analytik und in der medizinischen Therapie. Die Fähigkeit von Enzymen, an zahlreichen Substanzen in spezifischer Weise Reaktionen wie beispielsweise Oxidationen, Hydrierungen, Hydrolysen, Methylierungen oder Veresterungen durchzuführen, stellt auch ein großes Potential für Stoffumwandlungen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie dar. Von besonderer Bedeutung ist hierbei vor allem die meist stark ausgeprägte Chemo-, Regio- und Stereospezifität der enzymkatalysierten Reaktion. Sie ermöglicht die spezifische Synthese von chemisch schwer zugänglichen Verbindungen unter milden Reaktionsbedingungen ohne Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Angesichts dieser Vorteile stieg das Interesse an der Nutzung enzymatisch katalysierter Reaktionen vor allem in der organisch-chemischen Synthese in den letzten Jahren stark an und führte zu einem gesteigerten Bedarf an Enzymen, die für den technischen Einsatz geeignet sind.

Strategien zur Bereitstellung geeigneter Biokatalysatoren umfassen die gentechnische Modifizierung bereits vorhandener Enzyme, die Durchsuchung kommerzieller Enzymbibliotheken oder die Durchmusterung mikrobieller Stammsammlungen nach gewünschten Enzymaktivitäten. Als Hauptquelle für neue biotechnologische Produkte und Prozesse wird die beträchtliche physiologische Vielfalt von Mikroorganismen angesehen. Klassische Methoden zur Identifizierung neuer Enzymaktivitäten beruhen auf deren Kultivierung. Da jedoch nur ein geringer Anteil der tatsächlich existierenden Mikroorganismen unter Laborbedingungen kultivierbar ist, bleibt dabei das beträchtliche Potential des unkultivierbaren Anteils der Population unentdeckt. Um einen Verlust an Diversität zu vermeiden, sind daher kultivierungsunabhängige Ansätze erforderlich, die das metabolische Potential eines Standortes in seiner Gesamtheit zugänglich machen.

In dieser Arbeit wurden deshalb Methoden entwickelt, die den Engpass der Kultivierbarkeit umgehen und es stattdessen im Rahmen eines kultivierungsunabhängigen Vorgehens ermöglichen, die gesamte genetische Vielfalt eines Habitats, kodiert durch die Gesamtheit aller enthaltenen mikrobiellen Genome, das Metagenom, für die Entdeckung neuartiger Enzymaktivitäten zu nutzen.

Dazu wurde die genomische DNA der Mikroorganismen aus einer Bodenprobe isoliert und aufgereinigt. Durch die Verwendung einer modifizierten Aufschlussmethode der direkten

Lyse gefolgt von einer Aufreinigung mittels Gelfiltrations-Säulen gelang die Gewinnung hochmolekularer und reiner und damit für die Klonierung geeigneter genomischer DNA. Nach enzymatischer Fragmentierung wurde die Boden-DNA in den Expressionsvektor pJOE930 kloniert, der zwei induzierbare *lac*-Promotoren beinhaltet. Auf diese Weise wurden Genbanken konstruiert, die insgesamt 140000 Klone umfassten. Durch das Screening der Genbanken auf unterschiedlichste Enzymaktivitäten wurden anschließend sowohl deren genetisches Potential und ihre Vielfalt überprüft als auch eine Vielzahl neuartiger Enzyme für mögliche industrielle Anwendungen identifiziert.

Als Grundlage für die Identifizierung neuer dehalogenierender Enzyme wurden Testverfahren untersucht, die auf dem Nachweis einer pH-Absenkung infolge der Freisetzung von Protonen bei hydrolytischen Dehalogenierungsreaktionen beruhen. Des Weiteren wurde auf der Basis eines elektrochemischen Chloridsensors ein parallelisiertes und automatisiertes Screeningsystem für ein sensitives HTP-Screening nach Dehalogenasen entwickelt. Darüber hinaus wurden Nachweisverfahren zur Detektion von Esterasen und Lipasen sowie Phosphatasen, Proteasen oder Amylasen für den Einsatz im HTP-Screening optimiert.

Mit Hilfe der verschiedenen Screeningverfahren wurden insgesamt 70 Enzyme mit unterschiedlicher Aktivität gefunden, darunter 14 lipolytische Enzyme, 13 Phosphatasen, 38 Amylasen, zwei Dioxygenasen und drei Dehalogenasen. Wie die Sequenzanalyse der rekombinanten Klone zeigte, war es mit Hilfe der entwickelten Methoden möglich, neuartige Genprodukte zu identifizieren, deren Sequenzen nur geringe Ähnlichkeit zu bereits bekannten Enzymen aufwiesen, was die Vermutung nahe legt, dass sie aus bisher unbekanntem Mikroorganismen stammen. Die Vielzahl und Vielfalt der entdeckten Enzymaktivitäten sowie die Tatsache, dass alle Sequenzen verschieden waren, sind Hinweise auf die genetische Diversität und den geringen Grad an Redundanz der aus Boden-DNA erstellten Genbanken. Wesentliche Punkte für die Effizienz des Verfahrens waren die Verwendung eines Plasmidvektors, der die heterologe Expression inserierter Gene unabhängig von ihrer Orientierung und gen-eigenen Promotoren ermöglichte, sowie die Gewinnung hochreiner klonierbarer DNA. Die direkte Klonierung metagenomischer DNA erwies sich somit als geeignete Strategie zur Nutzbarmachung der metabolischen Vielfalt eines Habitats für biotechnologische Innovationen.

Abstract

Technological usage of enzymes in processing natural materials has a long tradition. Nowadays, the widespread application of enzymes as key components in detergents, in various processes of food and feed industry, in textile, pulp and paper manufacturing as well as in bioremediation, chemical analysis or medication is successfully established. Due to their ability to selectively catalyze reactions like oxidations, hydrogenations, hydrolyses, methylations or esterifications of various substrates, enzymes are also considered as valuable tools for organic synthesis in pharmaceutical or chemical industry. Thereby, their pronounced chemo-, regio- and enantioselectivity is of particular importance, since it enables the selective synthesis of substances which are chemically difficult to access. In addition, enzymatic reactions proceed under mild conditions without the formation of undesirable by-products. Facing these advantages, interest in usage of biocatalysis for industrial chemical synthesis has been awakened and an increasing demand of industry for novel enzymes to improve existing applications or to establish novel processes for the production of innovative products or intermediates has occurred in the past few years.

Strategies for the supply of an appropriate biocatalyst with specific properties enclose the genetic modification of known enzymes and the screening of commercial enzyme libraries or strain collections for designated enzyme activities. The substantial natural biodiversity of microorganisms is considered to be a major resource for biotechnological products and processes. The classical approach of isolating new enzymes is based on cultivation of microorganisms. However, since only a marginal fraction of microorganisms existing in nature can be cultivated by standard techniques, the tremendous variety of the uncultured majority remains undetected. To avoid this inherent loss of diversity, cultivation-independent approaches are needed, thus providing access to the metabolic potential present in a given habitat in its entirety.

To circumvent the limitations of cultivation, methods of an alternative cultivation-independent approach have been developed in this study, thereby enabling the use of the entire genetic diversity of a microbial consortium in a given habitat, encoded by their collective genomes, the so called metagenome, for the detection of unique biocatalysts.

Genomic DNA was isolated from compost soil using a modified extraction method based on direct lysis and purified by size exclusion chromatography. The recovered DNA was of high molecular weight with low degree of shearing and of sufficient purity to be suitable for subsequent cloning. Following enzymatic digestion, soil DNA was cloned into the expression vector pJOE930, which contains two inducible *lac*-promoters. The resulting

expression plasmid libraries comprised a total of 140000 clones. To check their genetic diversity as well as to discover a wide variety of novel biocatalysts suitable for technical application, the constructed libraries were subsequently screened for various enzymatic activities.

To establish a basis for the identification of novel dehalogenating enzymes, assays based on the monitoring of the decrease of pH due to the enzymatic release of protons during a hydrolytic dehalogenation reaction were tested. Furthermore, an automated and parallelized screening system on the basis of electrochemical chloride detection was developed, thus providing an efficient means for the sensitive high throughput screening for dehalogenases. Existing assays for the detection of esterase and lipase as well as phosphatase, protease or amylase activity were optimized for an application in high throughput screening.

A total of 70 novel enzymes catalyzing different reactions were identified by activity-based screening, including 14 lipolytic enzymes, 13 phosphatases, 38 amylases, two dioxygenases and three dehalogenases. As indicated by sequence analysis, the application of the newly developed methods enabled the detection of novel gene products, whose sequences revealed only limited similarity to known proteins and which therefore probably originate from hitherto unknown microorganisms. The multitude and variety of enzymatic activities as well as the overall dissimilarity of sequences point to the genetic diversity and low level of redundancy of the constructed libraries. Crucial points for attaining a highly efficient cloning procedure consisted in the usage of an expression vector enabling expression of inserted genes independent of orientation and insert-borne promoters as well as in the availability of high-quality genomic DNA suitable for cloning. Consequently, direct cloning of metagenomic DNA turned out to be a suitable strategy for the utilization of metabolic diversity in a given habitat for biotechnical innovations.

1 Einleitung

1.1 Industrielle Anwendung von Enzymen

Biokatalytische Prozesse werden schon seit alters her für die Produktion von Nahrungs- und Genussmitteln genutzt (Ruttloff, 1994). Obwohl sich die Verfahren wie z. B. die Herstellung von Wein, Bier, Brot oder verschiedener Milchprodukte im Laufe der Zeit unter anderem durch neue Technologien, aufgrund eines erweiterten Erfahrungsschatzes und der Kenntnis der Mechanismen der enzymatischen Vorgänge verändert haben, beruhen sie auch heute noch auf denselben Prinzipien wie früher. Im Vordergrund des Interesses stehen dabei bestimmte Enzyme bzw. Enzymgruppen: Stärkemodifizierende, pektinolytisch wirksame oder cellulosespaltende Enzyme, Glucanasen, Invertase, Lactase, Peptidasen, Lipasen, Glucoseoxidase und Katalase sowie zellwandlyisierende Enzyme. Diese werden zur Herstellung spezieller Produkte, zur Erhöhung der Produktqualität, zur Erzielung bestimmter Produkteigenschaften, zur Verbesserung der Verwertung und Zugänglichkeit der Ausgangsprodukte, zur Optimierung eines Herstellungsprozesses, zur Produktion neuartiger Erzeugnisse oder Zusatzstoffe wie z. B. Aromen sowie zur Konservierung und Haltbarmachung von Nahrungsmitteln verwendet. Als Beispiele für unterschiedliche Einsatzbereiche im Lebensmittelsektor seien die Stärke verarbeitende Industrie, das Brauereiwesen, die Milch verarbeitende Industrie, die Backindustrie sowie die Fleisch oder Fisch verarbeitende Industrie genannt.

Ein weiteres klassisches Anwendungsgebiet enzymkatalysierter Reaktionen ist der Waschmittelsektor. Hier dienen vor allem proteolytische Enzyme, aber auch Amylasen und Lipasen als Zusätze moderner Waschmittel der effektiven Entfernung von Schmutzstoffen. Als Weichmacher werden Cellulasen zugesetzt; eine schonende enzymatische Bleiche wird durch Oxidoreduktasen, Peroxidasen und Katalasen erreicht.

In zahlreichen anderen Industriezweigen werden biokatalytische Prozesse ebenfalls erfolgreich angewendet. Das Einsatzgebiet von Enzymen reicht von der Textilindustrie (schonende enzymatische Entschlichtung von Geweben durch Amylasen, Einsatz von Cellulasen bei *stone-washing*-Prozessen), Lederherstellung (Entfernung nicht-lederbildender Bestandteile durch Proteasen), Pelzzurichtung und -veredelung (Weiche durch Proteasen), Zellstoff- und Papierherstellung (u. a. Xylanasen) über die Futtermittelindustrie (Futterzusatzstoffe, Vorbehandlung der Futterstoffe, Silierprozess) und umweltschutzrelevante Bereiche (Bioremediation, Abwasseraufbereitung) bis zur Verwendung in der modernen Analytik (Lebensmittelproduktion und -überwachung, medizinische Diagnostik) und für therapeutische Zwecke (Ruttloff, 1994).

Die Fähigkeit von Enzymen, an zahlreichen Substanzen in spezifischer Weise Reaktionen wie z. B. Oxidationen, Hydrierungen, Hydrolysen, Methylierungen oder Veresterungen durchzuführen, stellt auch ein großes Potential für die Stoffumwandlung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie dar (Ruttloff, 1994). Diese Umsetzungen sind dadurch charakterisiert, dass die umzuwandelnde Substanz in einem Reaktionsschritt in eine andere Verbindung überführt wird (Biotransformation); dabei können auch mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionsschritte miteinander kombiniert sein (Biokonversion). Von besonderer Bedeutung für die industrielle Anwendung ist vor allem die meist stark ausgeprägte Regio-, Stereo- und Substratspezifität der enzymkatalysierten Reaktion (Marrs *et al.*, 1999), die damit den steigenden Bedürfnissen insbesondere der Pharmaindustrie nach hoher Selektivität der zu einem Wirkstoff führenden Syntheseschritte Rechnung trägt (Schmid *et al.*, 2001). Von praktischem Nutzen ist dabei die Tatsache, dass viele Enzyme nicht nur die Reaktionen ihrer natürlichen Substrate katalysieren, sondern dass sie zum Teil eine beachtliche Toleranz gegenüber der umzusetzenden Struktur zeigen (relative Spezifität), die auch die Umwandlung vieler synthetischer Verbindungen erlaubt. Eine große Rolle für die industrielle Anwendung spielt daneben die Erkenntnis, dass derartige Reaktionen zum Teil in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden können. Konventionelle chemische Synthesen und Prozesse laufen oftmals nur unter drastischen Reaktionsbedingungen (hohe Temperatur, Druck, extreme pH-Werte) und unter Bildung unerwünschter Nebenprodukte ab. Dies verursacht aufgrund des gesteigerten Energiebedarfs, des Mehrverbrauchs an Substrat, der notwendigen Aufreinigung oder Abtrennung des Produktes sowie der Entsorgung toxischer Abfälle erhebliche Kosten. Dagegen werden Biotransformationen meist unter milden Reaktionsbedingungen in wässriger Lösung durchgeführt und ermöglichen die spezifische Herstellung eines bestimmten Produktes. Vielfach gelingt die Gewinnung einer chemisch schwer zugänglichen Verbindung erst durch die Einbeziehung biokatalytischer Reaktionsstufen, wie z. B. die Herstellung von enantiomerenreinen optisch aktiven Substanzen (Rozzell, 1999). Durch die Ausnutzung der Enantio- und Regiospezifität ist ein Verzicht auf teure enantiomerenreine Ausgangsstoffe sowie eine Reduzierung der notwendigen Reaktionsschritte möglich, wodurch Aufwand und Kosten des Prozesses gesenkt werden können und erst so ein ökonomisch tragfähiges Herstellungsverfahren resultiert. Aufgrund der Spezifität der Reaktion werden die Bildung unerwünschter toxischer Nebenprodukte und die damit verbundenen Aufreinigungs- und Entsorgungsprobleme vermieden (Marrs *et al.*, 1999). Dies ermöglicht zusammen mit dem verringerten Energieeintrag die Entstehung eines umweltfreundlichen Prozesses (Rozzell, 1999). Angesichts dieser Vorteile ist das Interesse an enzymatisch katalysierten Reaktionen in der organisch-chemischen Synthese in den letzten Jahren stark angestiegen und führte zu einer ständigen Erweiterung ihres Anwendungsbereiches (Schmid *et al.*, 2001). Dazu

beigetragen haben auch die Fortschritte auf den Gebieten der Mikrobiologie und Molekulargenetik, die z. B. durch die rekombinante Produktion von Enzymen in mikrobiellen Expressionssystemen eine fortlaufende Gewinnung des Biokatalysators ermöglichen. Einige biotechnologische Prozesse haben inzwischen eine große industrielle Bedeutung erlangt. Dies betrifft insbesondere die Synthese enantiomerenreiner chiraler End- und Zwischenprodukte für die pharmazeutische Industrie. Auch bei der Gewinnung einer Reihe von Spezialprodukten sowie von Fein- und Grundchemikalien nutzt man zunehmend derartige Verfahren, wobei oft chemische und biokatalytische Reaktionsschritte miteinander kombiniert werden (Ruttloff, 1994). Beispiele für den Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen sind die Herstellung von Acrylamid ausgehend von Acetonitril (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999), die Darstellung enantiomerenreiner Alkohole durch enzymatische Resolution racemischer Alkoholgemische, die Produktion von Aspartam mit Hilfe von Thermolysin und Aspartase sowie die hydrolytische Spaltung von Penicillin zu 6-Aminopenicillansäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese halbsynthetischer Penicilline dient (Schmid *et al.*, 2001).

Der anhaltende Trend zur Umstellung chemischer Synthesen auf spezifische biokatalytische Prozesse im Bereich der synthetischen Chemie sowie die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten enzymkatalysierter Reaktionen in vielen anderen Industriezweigen führen zu einem gesteigerten Bedarf an Enzymen, die für diesen technischen Einsatz geeignet sind. Dazu trägt auch der Wunsch vieler Unternehmen bei, bestehende biokatalytische Verfahren durch die Verwendung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften zu optimieren (Schmid *et al.*, 2001). Zu diesen Aspekten zählen etwa größere Stabilität unter den erforderlichen technischen Reaktionsbedingungen (d. h. extreme pH-Werte oder Temperatur, Lösungsmittelstabilität, Toleranz gegenüber Zusätzen oder Oxidation, hohe Standzeit), erhöhte Aktivität, veränderte Aktivitätsoptima (z. B. bezüglich pH-Wert oder Temperatur), ein erweitertes Substratspektrum sowie eine erhöhte Enantio- und Regioselektivität. Die Möglichkeiten zur Gewinnung neuartiger Verbindungen, deren Herstellung mit den klassischen Synthesemethoden nicht oder nur unter erheblichem Aufwand zu verwirklichen ist, sowie zur Entwicklung wirtschaftlich rentabler und dabei umweltverträglicher Produktionsprozesse (Thayer, 2001) sind weitere Gründe für das gesteigerte Interesse an neuen Enzymen. Dabei wird die Machbarkeit biokatalytischer Prozesse in Zukunft oft von der Verfügbarkeit geeigneter Biokatalysatoren abhängen (Schmid *et al.*, 2001).

1.2 Überblick über einige technisch relevante Enzyme

Unter den für industrielle Zwecke eingesetzten Enzymklassen sind die Hydrolasen von besonderer Bedeutung (Schmid, 2002). Hydrolasen umfassen eine Gruppe von Enzymen, die chemische Bindungen durch die Reaktion mit Wasser spalten (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Dabei sind sie in der Lage, ein breites Spektrum von Substraten umzusetzen, oft verbunden mit einer hohen Stereoselektivität der Reaktion auch gegenüber unnatürlichen Substraten (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Sie benötigen keine Cofaktoren und sind in isolierter Form sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmitteln stabil (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999; Schmid, 2002). Neben hydrolytischen Spaltungen werden unter bestimmten Reaktionsbedingungen auch verwandte Reaktionen wie z. B. Kondensationen und Alkoholyse katalysiert. Eine Vielzahl von Hydrolasen ist kommerziell erhältlich (Schmid, 2002).

Hydrolasen bilden die 3. Hauptgruppe (EC 3) der Enzymklassifizierung der *International Union of Biochemistry* und werden nach der Art der hydrolysierten chemischen Bindung in weitere Gruppen unterteilt.

1.2.1 Lipolytische Enzyme

Esterasen (EC 3.1.1.x) stellen eine diverse Gruppe von Hydrolasen dar, die sowohl Bildung als auch Hydrolyse von Esterbindungen katalysieren und bei Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen weit verbreitet sind. Viele zeichnen sich durch ein breites Substratspektrum und hohe Regio- und Stereospezifität aus. Daneben beruht das industrielle Interesse an diesen Enzymen auch auf ihrer Unabhängigkeit von Cofaktoren sowie ihrer Stabilität und Aktivität in organischen Lösungsmitteln. Von besonderer Bedeutung sind dabei zwei Hauptklassen der Esterasen: Lipasen (EC 3.1.1.3) und Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) (Bornscheuer, 2002).

Echte Lipasen (Triacylglycerolester-Hydrolasen, EC 3.1.1.3) katalysieren sowohl die Hydrolyse als auch die Synthese von Estern aus Glycerin und langkettigen Fettsäuren. Ihre bevorzugten Substrate sind wasserunlösliche langkettige Triacylglyceride, die an der Interphase zwischen hydrophober Lipid- und hydrophiler Wasserphase zu Di- und Monoglyceriden, Fettsäuren und Glycerin umgesetzt werden (Jaeger *et al.*, 1994). Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) hydrolysieren dagegen bevorzugt wasserlösliche kurzkettige Ester (Jaeger und Wohlfarth, 1993; Bornscheuer, 2002).

Neben der Hydrolyse und Synthese von Triglyceriden werden von Lipasen auch weitere Reaktionen katalysiert wie z. B. die Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer

Alkohole, Umesterung von Lipiden, Transesterifikationen (Glycerolyse bzw. Alkoholyse) und Interesterifikationen (Jaeger *et al.*, 1994).

Lipasen unterscheiden sich sowohl in ihrer Größe (20 - 60 kDa) als auch in ihrer Primärsequenz erheblich, von kurzen homologen Sequenzabschnitten im N-terminalen Bereich abgesehen (Jaeger *et al.*, 1994). Durch Röntgenstrukturanalysen konnten jedoch spezifische Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Struktur aufgedeckt werden (Jaeger *et al.*, 1994).

Als charakteristische Sekundärstruktur weisen Lipasen und Esterasen den so genannten α/β -Hydrolase fold auf (Bornscheuer, 2002), der als generelles Faltungsmuster für verschiedene Hydrolasen identifiziert wurde (Ollis *et al.*, 1992). Dieser besteht aus acht parallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die durch α -Helices miteinander verbunden sind, und dient der korrekten Positionierung der Aminosäuren der so genannten katalytischen Triade (Ollis *et al.*, 1992). Sie stellt das aktive Zentrum des Enzyms dar und wird aus den drei Aminosäureresten Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat gebildet (Jaeger *et al.*, 1994; Bornscheuer, 2002). Die Anordnung ihrer Seitenketten ist dabei derjenigen von Serinproteasen sehr ähnlich (Brady *et al.*, 1990).

Das an der katalytischen Triade beteiligte Serin ist dabei meist Bestandteil des Motivs GX SXG, das innerhalb der Gruppe der lipolytischen Enzyme hochkonserviert vorliegt (Boel *et al.*, 1988; Brenner, 1988; Bornscheuer, 2002), wobei das erste X meist für Histidin oder auch Tyrosin steht (Woolley und Petersen, 1994).

Dieses Pentapeptid wurde für Enzyme der Familie der Lipasen zu folgendem Sequenzmuster erweitert: [LIV]-x-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-**S**-x-G-[GSTAC] (PROSITE-Eintrag PS00120: LIPASE_SER, Sigrist *et al.*, 2002); in der Blocks-Datenbank ist eine erweiterte Form (IPB000734) dieses Lipase-Motivs enthalten.

Obwohl das hochkonservierte GX SXG-Motiv bei den meisten Esterasen und Lipasen auftritt, wurden zwischenzeitlich auch andere konservierte Motive identifiziert (Arpigny und Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002).

Zur Identifizierung von lipolytischen Enzymen der GDXG-Familie (Klassifizierung nach PROSITE, Sigrist *et al.*, 2002) wurden von Bairoch (1995) zwei charakteristische Motive beschrieben, die z. B. im Gen der Lipase 2 aus *Moraxella* TA144 (Feller *et al.*, 1991) enthalten sind. Neben der konservierten Aminosäure-Sequenz um das aktive Serin beinhalten die Vertreter dieser Gruppe einen zweiten Bereich, der ein konserviertes Histidin und zwei bis drei konservierte Glycinreste enthält; innerhalb der Abfolge [LIVMF](2)-x-[LIVMF]-**H-G-G**-[SAG]-[FY]-x(3)-[STDN]-x(2)-[ST]-H stellt das erste Histidin diesen Rest dar (s. PROSITE-Eintrag PS01173, LIPASE_GDXG_HIS, Sigrist *et al.*, 2002). Das aktive Serin ist in der Abfolge [LIVM]-x-[LIVMF]-[SA]-G-D-**S**-[CA]-G-[GA]-x-L-[CA]

enthalten, wobei das konservierte Pentapeptid GX SXG hier in der Form GDSAG auftritt (s. PS01174, LIPASE_GDXG_SER, Sigrist *et al.*, 2002).

Die lipolytischen Enzyme der GDSL-Familie (s. u., Arpigny und Jaeger, 1999) enthalten statt des üblichen Pentapeptids GX SXG um das aktive Serin ein GDS(L)-Motiv (Upton und Buckley, 1995), welches zu folgendem Muster erweitert wurde: [LIVMFYAG](4)-G-D-**S**-[LIVM]-x(1,2)-[TAG]-G (PROSITE-Eintrag PS01098, LIPASE_GDSL_SER, Sigrist *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu anderen lipolytischen Enzymen, bei denen sich das Serin enthaltende Motiv meist nahe der Mitte des Proteins befindet, liegt das GDS(L)-Motiv sehr viel näher am N-Terminus. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur einer Esterase aus *Streptomyces scabies*, die zu dieser Familie gehört, ergab, dass diese statt des α/β -Hydrolase folds ein unterschiedliches Faltungsmuster in Form eines tertiären α/β -folds aufweist; darüber hinaus wird das aktive Zentrum aus einer katalytischen Diade gebildet (Arpigny und Jaeger, 1999).

Das Reaktionszentrum ist bei Lipasen unter einer deckelähnlichen Struktur aus ein oder zwei α -Helices, dem so genannten *Lid*, verborgen und für das Substrat nicht zugänglich (Brady *et al.*, 1990; Winkler *et al.*, 1990; Schrag *et al.*, 1991; Noble *et al.*, 1993).

Die Anlagerung des Enzyms an die Phasengrenzfläche von wasserunlöslichem Substrat und wässriger Lösung bewirkt eine Konformationsänderung der Lipase, in Folge derer sich der Deckel öffnet und das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich wird (Jaeger *et al.*, 1994). Dieser Übergang von katalytisch inaktivem zu aktivem Enzym wird als Interphasenaktivierung bezeichnet und stellt eine Besonderheit bei Lipasen dar, die bei Esterasen nicht auftritt (Sarda und Desnuelle, 1958). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei nur von der Ausdehnung der Interphase und nicht von der Enzym- oder Substratkonzentration abhängig (Jaeger und Wohlfarth, 1993).

Basierend auf Homologien ihrer Aminosäuresequenzen und auf grundlegenden biologischen Eigenschaften wurden 53 verschiedene bakterielle Esterasen und Lipasen in acht Familien eingeteilt (Arpigny und Jaeger, 1999; Jaeger *et al.*, 1999). Die Familie der echten Lipasen besteht dabei aus sechs Unterfamilien und umfasst die schon früher beschriebenen Gruppen I bis III der *Pseudomonas*-Lipasen sowie Enzyme aus gram-positiven Bakterien. In Familie II sind vornehmlich sekretierte oder membrangebundene Esterasen aus unterschiedlichen Mikroorganismen mit konserviertem GDS(L)-Motiv um das katalytisch aktive Serin (s. o., GDSL-Familie) zusammengefasst. Die Mitglieder der Familie IV weisen hohe Sequenz-Ähnlichkeit zu den hormonsensitiven Lipasen aus Säugern auf und enthalten neben dem konservierten Motiv GDSAG um das

aktive Serin ein weiteres hochkonserviertes Motiv um ein Histidin (s. o., GDXG-Familie) (Jaeger *et al.*, 1999).

Aufgrund der Vielzahl der von ihnen katalysierten Reaktionen, die im Allgemeinen mit hoher Regio- und Enantioselektivität ablaufen (Jaeger *et al.*, 1999), nehmen Lipasen in der industriellen Anwendung eine wichtige Rolle ein (Gilbert, 1993; Jaeger und Wohlfarth, 1993; Jaeger *et al.*, 1999). Sie werden hauptsächlich in der Waschmittel- bzw. Detergens- und Nahrungsmittelindustrie sowie in der organischen Synthese eingesetzt (Ruttloff, 1994; Jaeger und Reetz, 1998; Bornscheuer und Kazlauskas, 1999).

Das kommerziell wichtigste Anwendungsgebiet ist ihre Verwendung in Kombination mit Detergenzien (Jaeger und Reetz, 1998). Als Waschmittelzusatz lösen sie Fettverschmutzungen aus der Textilfaser und verhindern außerdem die erneute Anlagerung bereits gelöster Fette an die Faser. Für diesen Zweck werden Lipasen aus Mikroorganismen eingesetzt, die bei hohen Waschttemperaturen und hohen pH-Werten stabil sind und außerdem eine geringe Substratspezifität aufweisen (Jaeger und Reetz, 1998).

In der Nahrungsmittelindustrie finden Lipasen Anwendung in der Milchverarbeitung und bei der Modifikation von Fetten und Ölen. Bei der Herstellung von Käse werden Lipasen zur Beschleunigung der Reifung, zur Geschmacksverstärkung und zur Veränderung des Käsearomas eingesetzt. Durch Umesterung der Triglyceride kann neben den physikalischen Eigenschaften eines Fettes wie z. B. der Schmelztemperatur auch sein Geschmack verändert werden (Jaeger und Reetz, 1998). Auf diese Weise werden auch Spezialfette wie z. B. Kakaobutteraustauschfette und Margarinefette hergestellt. Des Weiteren können funktionelle Triglyceride für Säuglingsnahrung oder spezielle Diäten synthetisiert werden. Weitere Produkte der Katalyse von Lipasen sind geruchs- und geschmacksintensive Verbindungen (*Flavour-Ester*), die z. B. als Aromakonzentrate Verwendung finden.

In der Medizin werden Lipasen als Therapeutika bei Störungen der Fettverdauung (Substitutionstherapie bei Pankreasinsuffizienz) eingesetzt. In Schlankheitsmitteln enthaltene Lipaseinhibitoren verhindern die Hydrolyse der Fette und damit die Resorption in Form von Fettsäuren.

In der organischen Synthese katalysieren Lipasen eine Vielzahl von Transformationen zur Darstellung von Feinchemikalien und Zwischenstufen pharmazeutisch relevanter Verbindungen. Aufgrund ihrer Substrat-, Regio- und Stereospezifität werden sie vor allem für die Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen eingesetzt (Überblick s. Jaeger und Reetz, 1998; Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Von besonderer Bedeutung sind dabei auch Umsetzungen in wasserfreien organischen Lösungsmitteln (Reetz, 2002).

Im Gegensatz zu den Lipasen wurden bisher nur wenige Esterasen für die Synthese optisch reiner Verbindungen verwendet, unter anderem aufgrund der begrenzten kommerziellen Verfügbarkeit und ihrer oft mäßigen Enantioselektivität (Bornscheuer, 2002). Aus den Estern racemischer Gemische von Aminosäuren lassen sich aber mit Hilfe der enantioselektiven Hydrolyse durch Esterasen optisch aktive Aminosäuren gewinnen; analog erhält man aus den Estern racemischer Gemische von Alkoholen die optisch aktiven Einzelkomponenten. Auf diese Weise wird z. B. aus dem Bernsteinsäureester des DL-Menthols das L-Menthol gewonnen (Ruttloff, 1994).

1.2.2 Proteasen

Die Hydrolyse einer Peptidbindung (Carbonsäureamidbindung zweier Aminosäuren) wird durch Proteasen (Peptidhydrolasen, EC 3.4) katalysiert. Während Exopeptidasen (EC 3.4.11 - 19) nur die Bindungen nahe des Endes einer Polypeptidkette spalten, hydrolysieren Endopeptidasen (EC 3.4.21 - 99) auch ketteninterne Bindungen. Nach ihrem katalytischen Mechanismus erfolgt die weitere Unterteilung der Endopeptidasen in Serin- (EC 3.4.21), Cystein- (EC 3.4.22), Aspartat- (EC 3.4.23; saure Proteasen), Metallo- (EC 3.4.24) und Threonin-Endopeptidasen (EC 3.4.25). Proteasen setzen im Gegensatz zu Lipasen nur lösliche Substrate um (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Die kommerziell bedeutsamsten Enzyme sind die Subtilisine. Sie werden als Waschmittelzusatz zur Entfernung von Proteinverschmutzungen eingesetzt. Durch die Methoden des *Protein Engineering* konnten die Eigenschaften der heutzutage verwendeten Subtilisine dahingehend verbessert werden, dass sie hohe pH-Werte und hohe Temperaturen tolerieren und eine hohe Stabilität gegenüber Detergenzien, Oxidationsmitteln und organischen Lösungsmittelzusätzen besitzen (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). In der Nahrungsmittelindustrie werden Peptidasen für zahlreiche Anwendungen eingesetzt: In der Fleisch oder Fisch verarbeitenden Industrie unterstützen sie den Reifungsprozess, bei der Käseproduktion dienen sie der Fällung und Reifung des Käsebruchs. Weitere Einsatzgebiete sind das Brauerei- und Brennereiwesen sowie die Backwarenindustrie, die enzymatische Modifizierung (z. B. partielle enzymatische Hydrolyse) von Proteinen zur Veränderung der Produkteigenschaften oder zur Entwicklung neuer Produkte sowie die Herstellung von Peptidmischungen für Peptiddiäten (Ruttloff, 1994).

Bei der Lederherstellung und Pelzzurichtung werden Proteasen für Enthaarung, Beize und Weiche eingesetzt. Weitere Einsatzgebiete sind die Proteinanalytik (Endgruppenbestimmung, Sequenzanalyse, Reinigung von Proteinen), die Peptidsynthese (z. B. Umwandlung von Schweine- in Humaninsulin) sowie die Futtermittelindustrie (enzymatische Vorbehandlung von Futterstoffen) (Ruttloff, 1994).

Zwei Hauptanwendungsgebiete in der organischen Synthese sind die enantioselektive Hydrolyse von natürlichen und unnatürlichen α -Aminosäureestern und die Synthese von Di- und Oligopeptiden. Daneben werden Proteasen für die enantioselektive Hydrolyse von Estern sekundärer Alkohole und für regioselektive Reaktionen von Zuckern eingesetzt (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999).

1.2.3 Amylasen

Hinsichtlich ihrer wirtschaftlichen Bedeutung liegen die stärkewodifizierenden Enzyme an zweiter Stelle, hinter den Proteasen für die Waschlittelindustrie (Ruttloff, 1994). Stärke besteht aus den beiden Polysacchariden Amylose und Amylopektin. Während bei der Amylose die Glucosebausteine linear über 1,4- α -glykosidische Bindungen miteinander verbunden sind, enthält das verzweigte Amylopektin auch Seitenketten, die über 1,6- α -glykosidische Bindungen mit der Hauptkette verknüpft sind. Zu den hydrolytisch aktiven stärkespaltenden Enzymen gehören die α -Amylase und β -Amylase sowie die Glucoamylase (γ -Amylase).

α -Amylasen (EC 3.2.1.1) sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet; die für industrielle Anwendungen genutzten Enzyme stammen aus zahlreichen Mikroorganismen (z. B. *Bacillus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*) (Ruttloff, 1994). Als Endoenzyme hydrolysieren sie die 1,4- α -glykosidischen Bindungen in allen Kettentypen der Stärkepolysaccharide und führen dadurch zur Verflüssigung der Stärke. Dabei entstehen hauptsächlich Maltose, Maltotriosen und α -Grenzextrine; die verzuckernde α -Amylase aus *Bacillus subtilis var. amylosacchariticus* bildet als Endprodukt auch Glucose (Ruttloff, 1994). Je nach Herkunft besitzen die α -Amylasen unterschiedliche Molekulargewichte, pH- (3,5 - 9,0) und Temperatur-Optima (45 - 90 °C).

β -Amylasen (EC 3.2.1.2) werden in höheren Pflanzen sowie auch von einigen Mikroorganismen gebildet. Sie hydrolysieren als Exoenzyme die 1,4- α -glykosidischen Bindungen von Amylose bzw. Amylopektin vom nichtreduzierenden Kettenende her unter Abspaltung von Maltose-Einheiten.

γ -Amylasen (EC 3.2.1.3, Glucoamylasen) setzen ebenfalls vom nichtreduzierenden Kettenende her β -D-Glucose frei; neben 1,4- α -Bindungen können auch 1,6- α -Bindungen gespalten werden (Ruttloff, 1994).

Amylasen werden vor allem in der Stärke verarbeitenden Industrie für die Produktion von Süßungsmitteln, Malto- und Cyclodextrinen und weiteren Stärkehydrolysaten sowie in der Brau- und Backwarenindustrie eingesetzt. Daneben spielen sie als Waschlittelzusatz zur effektiven Entfernung von Polysaccharidverschmutzungen eine große Rolle; man setzt dabei alkalitolerante und thermostabile *Bacillus*-Amylasen ein (Schmid, 2002). Eine

Anwendung in der Textilindustrie ist die schonende enzymatische Entschlichtung von Geweben (Ruttloff, 1994).

1.2.4 Phosphatasen und Phytasen

Phosphatasen (Phosphor-Monoester-Hydrolasen, EC 3.1.3) katalysieren als Untergruppe der Esterasen (EC 3.1) die hydrolytische Spaltung von Monoestern der Ortho-Phosphorsäure. Die Untergruppen der alkalischen (EC 3.1.3.1) und sauren (EC 3.1.3.2) Phosphatasen unterscheiden sich in ihrem pH-Wirkoptimum, besitzen aber beide ein breites Substratspektrum. Alkalische Phosphatasen werden beispielsweise in der Lebensmittelanalytik zum Nachweis bestimmter Lebensmittelinhaltsstoffe (L- α -Lecithin), im Rahmen einer medizinischen Substitutionstherapie bei Verdauungserkrankungen oder bei der Antitumor-Therapie verwendet (Ruttloff, 1994).

Das Substrat für eine weitere Untergruppe der Phosphatasen, die Phytasen, ist die Phytinsäure (Hexaphosphorsäureester des Inositols). Phytinsäure bzw. ihr Salz, das Phytat, stellt mit bis zu 80 % die Hauptspeicherform von Phosphor in Pflanzen, vor allem in Getreide und Sämereien, dar (Golovan *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2001). Bei der Keimung wird der Phosphor durch Phytasen freigesetzt. Phytinsäure kann jedoch von Geflügel und Schweinen nicht verdaut bzw. verwertet werden. Deshalb muss für ein optimales Wachstum der Tiere dem Tierfutter zusätzlich mineralischer Phosphor beigefügt werden (Golovan *et al.*, 2001). Andererseits wird das unverdaute Phytin mit dem Kot ausgeschieden, dort zersetzt und trägt zusätzlich zu einer hohen Phosphatfracht des Mistes bei, die bei Verwendung des Kotes als Dünger unter anderem zur Eutrophierung von Gewässern führt (Golovan *et al.*, 2001). Zudem bindet Phytin divalente Metallionen unter Ausbildung schwerlöslicher Phytate sowie Proteine, so dass diese Moleküle den Tieren ebenfalls aus der Nahrung entzogen werden (antinutritiver Effekt) (Ruttloff, 1994; Lassen *et al.*, 2001). Eine Lösung des Problems besteht in der Zufütterung des Enzyms Phytase. Es setzt aus dem im pflanzlichen Futter enthaltenen Phytin das anorganische Phosphat frei und macht es so für die Tiere verwertbar. Auf diese Weise entfällt die zusätzliche Gabe von Phosphat; zudem wird die Belastung der Umwelt durch die Reduktion des fäkalen Phosphors beträchtlich verringert (Ruttloff, 1994; Golovan *et al.*, 2001; Lassen *et al.*, 2001). Somit sind Phytasen für die effektive Kontrolle der Umweltverschmutzung von großer Bedeutung (Pandey *et al.*, 2001).

Phytasen gehören zur Familie der sauren Histidinphosphatasen, die zwei homologe Sequenzregionen enthalten, die jeweils um einen konservierten Histidinrest angeordnet sind. Beide Histidinreste sind vermutlich Bestandteile des aktiven Zentrums. Das erste

Histidin ist im N-terminalen Teil des Enzyms lokalisiert und bildet infolge eines nucleophilen Angriffs einen intermediären Phospho-Histidin-Komplex aus; das typische Sequenzmotiv um dieses aktive Histidin lautet [LIVM]-x(2)-[LIVMA]-x(2)-[LIVM]-x-R-H-[GN]-x-R-x-[PAS] (PROSITE-Eintrag PS00616: HIS_ACID_PHOSPHAT_1, Sigrist *et al.*, 2002). Das zweite Histidin befindet sich im C-Terminus und fungiert wahrscheinlich als Protonen-Donor für die freigesetzte Alkoholgruppe des Inositols; es ist Bestandteil der konservierten Aminosäureabfolge [LIVMF]-x-[LIVMFAG]-x(2)-[STAGI]-H-D-[STANQ]-x-[LIVM]-x(2)-[LIVMFY]-x(2)-[STA] (PROSITE-Eintrag PS00778: HIS_ACID_PHOSPHAT_2, Sigrist *et al.*, 2002).

Bezüglich ihres Reaktionsmechanismus unterscheidet man 3-Phytasen (Myo-inositol-hexakisphosphat-3-phosphohydrolase, Phytat-3-Phosphatase, EC 3.1.3.8) von 6-Phytasen (Myo-inositol-hexakisphosphat-6-phosphohydrolase, Phytat-6-Phosphatase, EC 3.1.3.26). Während 3-Phytasen zuerst den Phosphatrest an Position 3 des Inositolrings abspalten, hydrolysieren 6-Phytasen zuerst die Esterbindung an Position 6 (Lassen *et al.*, 2001). Der weitere Abbauweg ist unklar, endet jedoch meist bei Inositol-Monophosphat.

Phytasen sind extrazelluläre Enzyme und werden von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen gebildet. Phytase-produzierende Organismen im Boden sind hauptsächlich Pilze, aber auch Bakterien (Pandey *et al.*, 2001). In der Regel haben Phytasen ein Molekulargewicht zwischen 40 und 100 kDa und zeigen ein breites Substratspektrum; ihre pH- bzw. Temperaturoptima liegen bei pH 4,5 - 6,0 bzw. 45 - 60 °C (Pandey *et al.*, 2001). Für industrielle Zwecke werden hauptsächlich Pilz-Phytasen aus *Aspergillus sp.* verwendet (Pandey *et al.*, 2001). Für die Anwendung als Tierfuttermittelzusatz ist vor allem eine ausreichende Thermostabilität der Enzyme wichtig (Pandey *et al.*, 2001).

1.2.5 Dehalogenasen

Halogenierte Kohlenstoffverbindungen werden in der Natur von zahlreichen Pilzen, Mikroorganismen, Algen sowie höheren Pflanzen und Tieren synthetisiert und in die Umwelt freigesetzt (Fetzner, 1998). Diese Substanzen besitzen zum Teil antibakterielle, insektizide und andere biologische Eigenschaften und dienen so ihren Produzenten vermutlich als Schutz gegen Fressfeinde oder zur Schwächung von Nahrungskonkurrenten (Fetzner, 1998). Marine Algen setzen täglich große Mengen an flüchtigen halogenierten Verbindungen frei; auch abiotische Prozesse wie z. B. Waldbrände und Vulkanaktivität führen zur Freisetzung dieser Substanzen in die Natur (Fetzner, 1998). In der chemischen Industrie sind chlorierte Kohlenwasserstoffe aufgrund ihrer chemischen und thermischen Stabilität weit verbreitet. Sie dienen als Lösungsmittel, Isolatorflüssigkeit oder Entfetter, bilden wichtige Synthesewegstufen und finden sich als Endprodukte in Form von

Herbiziden, Fungiziden und Insektiziden (z. B. DDT, Lindan, PCP), als Kunststoffe (z. B. PVC) und in Pharmazeutika wieder (Müller und Lingens, 1986). Gelangen diese Stoffe in die Umwelt, sind sie persistenter als die entsprechenden nicht-halogenierten Verbindungen, da für ihren Abbau meist die geeigneten Enzyme fehlen und deshalb keine effizienten Stoffwechselwege zur Verfügung stehen (Janssen *et al.*, 1994; Swanson, 1999). Für die toxischen und xenobiotischen Eigenschaften dieser Verbindungen ist im Allgemeinen der Halogen-Ligand verantwortlich (Janssen *et al.*, 2001). Unvollständiger oder ineffizienter Abbau unter Belassung des Halogensubstituenten führt zur Bildung toxischer und reaktiver Intermediate wie z. B. Epoxiden, Acylhaliden oder 2-Haloaldehyden, die als Zellgifte wirken (Janssen *et al.*, 2001). Halogenierte Varianten von Intermediärmetaboliten wie z. B. Fluorocitrat sind toxisch, weil sie durch die Hemmung der beteiligten Enzyme Schlüsselreaktionen des zentralen Stoffwechsels blockieren (Slater *et al.*, 1997).

Trotz dieser Eigenschaften existieren jedoch Mikroorganismen, die in der Lage sind, halogenierte Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen oder in co-metabolischen Prozessen abzubauen (Swanson, 1999). Der kritische Schritt des Abbaus, die eigentliche Dehalogenierung, wird durch mikrobielle Dehalogenasen katalysiert. Die Spaltung der Halogen-Kohlenstoff-Bindung kann dabei durch unterschiedliche Reaktionsmechanismen, beispielsweise reduktiv, oxidativ oder hydrolytisch, erfolgen (Swanson, 1999).

Die hydrolytischen Enzyme fasst man zur Gruppe der Halidohydrolasen (EC 3.8) zusammen. Anhand der umgesetzten Substrate – Halogenalkane, Halogenaromaten, Halogencarbonsäuren – lassen sich diese weiter unterteilen (Müller und Lingens, 1988; Fetzner, 1998). Unter den 2-Halogencarbonsäure-Dehalogenasen sind vier Klassen bekannt, die sich bezüglich ihrer Stereoselektivität, ihres Substratspektrums, ihres exakten Reaktionsmechanismus (Retention oder Inversion der Produktkonfiguration) sowie ihrer Sequenzhomologie unterscheiden (EC 3.8.1.2, EC 3.8.1.9, EC 3.8.1.10, EC 3.8.1.11) (Swanson, 1999). Im Allgemeinen sind diese Enzyme induzierbar und haben eine geringe Affinität zu ihren Substraten; ihr pH-Optimum liegt bei ca. 9,0. Sie besitzen ein breites Substratspektrum und setzen verschiedene, in 2-Stellung monohalogenierte Carbonsäuren um (Slater *et al.*, 1997). Haloacetat-Dehalogenasen (EC 3.8.1.3) katalysieren dagegen nur die Umsetzung von Haloacetaten, nicht aber von länger-kettigen halogenierten Carbonsäuren (Janssen *et al.*, 1994).

Alle hydrolytischen Haloalkan-Dehalogenasen gehören zur Superfamilie der α/β -Hydrolasen (Ollis *et al.*, 1992) und bestehen aus einer Hauptdomäne, die durch den α/β -*fold* gebildet wird, sowie einer α -helikalen *cap*-Domäne (Copley, 1998; Janssen *et al.*, 2001). Das zwischen diesen beiden Domänen befindliche katalytische Zentrum wird wie bei Lipasen und Esterasen durch eine katalytische Triade gebildet, wobei statt Serin Aspartat als

nucleophile Aminosäure enthalten ist (Janssen *et al.*, 2001). Die Katalyse erfolgt über die Bildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes. Zur Bindung des Halidions tragen ein konservierter Tryptophanrest in der Hauptdomäne sowie variable Reste in der *cap*-Domäne bei.

Neuere Studien zur Klassifizierung der Halogencarbonsäure-Dehalogenasen basieren auf Homologien ihrer Nukleotid-Sequenzen (Hill *et al.*, 1999); demnach lassen sich diese in zwei evolutionär nicht miteinander verwandte Gruppen I und II einteilen, die sich auch funktionell unterscheiden (Hill *et al.*, 1999). Mitglieder der Gruppe II dehalogenieren selektiv das L-, nicht jedoch das D-Isomer der 2-Monochlorpropionsäure unter Inversion der Produktkonfiguration am chiralen C-Atom. Sie bilden einen Zweig einer großen Superfamilie von Hydrolasen, die auch Epoxidhydrolasen, verschiedene Phosphatasen sowie einige nicht näher charakterisierte Enzyme umfasst (Koonin und Tatusov, 1994). Trotz dieser Variabilität der Substratspezifität enthalten alle Mitglieder dieser Superfamilie drei stark konservierte Sequenzmotive (Koonin und Tatusov, 1994). Die Strukturaufklärung zweier Gruppe-II-Halogencarbonsäure-Dehalogenasen, L-DEX und DhIB, ergab, dass sich deren Struktur grundsätzlich von der der Haloalkan-Dehalogenasen bzw. α/β -Hydrolasen unterscheidet (Hisano *et al.*, 1996; Ridder *et al.*, 1997). Die Hauptdomäne einer Untereinheit besitzt eine α/β -Struktur, bestehend aus sechs parallelen β -Faltblättern, die von fünf α -Helices flankiert werden; die in die Hauptdomäne inserierte Subdomäne wird aus vier α -Helices gebildet (Hisano *et al.*, 1996). Eine katalytische Triade ist in L-DEX nicht vorhanden; stattdessen wurden neun konservierte Aminosäurereste identifiziert, die für die Katalyse essenziell sind (Kurihara *et al.*, 1995); ein konserviertes Aspartat dient dabei als nucleophile Aminosäure, die an der Bildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes beteiligt ist. Sieben Aminosäurereste bilden die hydrophobe Bindungstasche für die Alkylgruppe des Substrats (Li *et al.*, 1998). Die genannten Reste liegen bei fast allen Mitgliedern der Gruppe II hochkonserviert vor (Hill *et al.*, 1999).

Gruppe-I-Dehalogenasen führen die Katalyse nicht über einen kovalenten Mechanismus aus. Vermutlich findet die Aktivierung des Wassermoleküls für den nucleophilen Angriff direkt durch das Enzym statt (Janssen *et al.*, 2001). Über ihre räumliche Struktur ist nichts bekannt.

Neben der Verwendung zur Dekontamination verseuchter Standorte oder zur Behandlung belasteter Abgase und Abwässer ist die Anwendung von Dehalogenasen als industrielle Biokatalysatoren bisher noch begrenzt, da vor allem die oxidativen und reduktiven Dehalogenierungen sehr komplex sind, teilweise Cofaktoren benötigen, sehr langsam ablaufen und die Enzyme aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind (Swanson,

1999). So beschränkt sich die industrielle Anwendung derzeit auf hydrolytische Dehalogenasen und Hydrogenhalid-Lyasen. Diese werden vor allem für die Herstellung optisch aktiver Intermediate bei der Produktion von Pharmazeutika und Agrochemikalien verwendet (Swanson, 1999). Eine 2-Haloalkanoat-Dehalogenase aus *Pseudomonas putida* wurde beispielsweise für die Auftrennung racemischer 2-Chlorpropionsäure zu S-Chlorpropionsäure eingesetzt, die als *building block* für die Synthese von Herbiziden und entzündungshemmenden Arzneimitteln Anwendung findet (Swanson, 1999). In entsprechender Weise wurden auch die beiden Enantiomere des Lactats aus racemischer 2-Chlorpropionsäure in optisch reiner Form und hoher Ausbeute erhalten (Fetzner und Lingens, 1994). Die Verbesserung einer Haloalkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus* soll die Rückführung chlorierter Nebenprodukte in den Produktionskreislauf ermöglichen (Swanson, 1999).

1.3 Suche nach geeigneten Biokatalysatoren für den technischen Einsatz

Für die Suche nach einem für industrielle Zwecke geeigneten Biokatalysator existieren verschiedene Strategien.

1.3.1 Traditionelle käufliche Enzyme

Die einfachste und schnellste Methode besteht in der Erprobung bereits kommerziell erhältlicher Enzyme oder der Durchsuchung kommerzieller Enzym-Bibliotheken (Demirjian *et al.*, 1999). Diese Proteine stehen in einer für die technische Anwendung ausreichenden Menge zur Verfügung; zudem wurde ihre Eignung für den industriellen Einsatz oftmals schon mehrere Jahre in der Praxis erprobt und dabei die spezifischen anwendungsorientierten Anforderungen ermittelt. Allerdings ist die Anzahl käuflicher Präparationen beschränkt (Demirjian *et al.*, 1999).

1.3.2 Gentechnische Modifizierung von Enzymen

Bekannte Enzyme können auch mittels moderner Methoden der Molekularbiologie modifiziert und auf diese Weise maßgeschneiderte Biokatalysatoren mit verbesserten oder neuen Eigenschaften wie z. B. Veränderung der Substratspezifität, Erhöhung der Enantioselektivität, Erhöhung der spezifischen Aktivität oder Verbesserung der Stabilität generiert werden. Dazu werden die Techniken der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns verwendet (Arnold, 2001; Bornscheuer, 2002).

Ausgehend von der bekannten Aminosäuresequenz und Struktur eines Proteins wird beim rationalen Proteindesign versucht, mittels bioinformatischer Methoden vorherzusagen,

welche Veränderungen der Struktur die Eigenschaften des Enzyms in die gewünschte Richtung lenken könnten. Dazu sind neben der genauen Kenntnis der Proteinstruktur auch detaillierte Informationen über mechanistische und dynamische Vorgänge bei der Katalyse-Reaktion erforderlich. Die experimentelle Überprüfung der Hypothese erfolgt beispielsweise durch positionsgerichtete Mutagenese eines Gens, die anschließende rekombinante Expression des veränderten Proteins sowie seine Aufreinigung und Charakterisierung hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft (Baumann, 2002).

Bei der gerichteten Evolution unterscheidet man nicht-rekombinierende von rekombinierenden Techniken (Baumann, 2002). Im ersten Fall dienen verschiedene Mutagenese-Methoden wie z. B. *error prone* PCR (Leung *et al.*, 1989), chemische Mutagenese, UV-Bestrahlung oder Verwendung von Mutator-Stämmen dazu, zufällige Mutationen in DNA-Fragmente einzuführen.

Alternativ können Verfahren basierend auf dem Prinzip der Rekombination homologer Sequenzen angewendet werden. Mit Hilfe der Technik des *DNA shuffling* (Stemmer, 1994a, 1994b) ist es beispielsweise möglich, Fragmente homologer Sequenzen im Rahmen einer *in vitro* Rekombination unter Bildung vollständiger chimärer Gene neu zu kombinieren und auf diese Weise parentale Gene zu mutieren oder DNA-Sequenzen verwandter Organismen zu vermischen. Als Parental-Stränge dienen dabei homologe Sequenzen mit zuvor eingeführten Punktmutationen oder homologe Vertreter einer Genfamilie.

In beiden Fällen werden anschließend die mutierten bzw. neu erzeugten Gene in Form großer Mutantenbibliotheken (10^3 - 10^6 Klone) rekombinant in Mikrotiterplatten exprimiert. Mittels geeigneter Selektions- oder Screeningverfahren können Enzymvarianten, die hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften verändert sind, identifiziert und anschließend einer näheren Charakterisierung unterzogen werden. Im Anschluss kann die DNA der besten Variante als Ausgangsmaterial für die nächste Runde eingesetzt werden, um so die Eigenschaften des Enzyms schrittweise zu verbessern.

1.3.3 Identifizierung neuer Enzyme aus Mikroorganismen

Statt auf bekannte oder modifizierte Enzyme zurückzugreifen, kann die Suche nach einem geeigneten Biokatalysator auch durch Identifizierung neuer Enzyme erfolgen.

1.3.3.1 Durchmusterung von Stammsammlungen

Eine Quelle für neue Enzyme stellen beispielsweise aus der Umwelt isolierte Mikroorganismen dar, die als Reinkulturen in Stammsammlungen abgelegt und konserviert wurden. Dazu gehören z. B. die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) oder die ATCC (*American Type Culture Collection*); auch eine Reihe von Industrieunternehmen bietet inzwischen den Zugang zu eigenen Sammlungen an

(Demirjian *et al.*, 1999). Unter Anwendung geeigneter Testverfahren können diese auf neue, bisher unentdeckte Enzymaktivitäten hin durchmustert werden. Ein systematisches Screening kann sich allerdings aufgrund der unterschiedlichen Medienansprüche der einzelnen Organismen als recht schwierig erweisen. Zudem kann die Medienzusammensetzung die erfolgreiche Expression des gesuchten Proteins beeinflussen, die jedoch eine notwendige Voraussetzung für seine Entdeckung ist. Dementsprechend beschränkt sich die Suche auf Enzyme, die im Organismus tatsächlich exprimiert werden, d. h. deren Expression nicht reprimiert ist. Der Etablierung und Unterhaltung einer eigenen Stammsammlung stehen meist die hohen Kosten entgegen (Demirjian *et al.*, 1999). Ein weiteres Problem stellt die Stammredundanz dar. Sie kann dazu führen, dass ein neu isolierter Stamm nach seiner phänotypischen und phylogenetischen Charakterisierung (z. B. bezüglich Kolonie-Morphologie, biochemischer Eigenschaften, PCR-basierter Klassifizierung) als vermeintliches Duplikat eines bereits vorhandenen Stammes eliminiert wird, obwohl sich die Enzymaktivitäten beider Stämme aufgrund geringer Unterschiede der Aminosäuresequenzen zum Teil signifikant unterscheiden (Demirjian *et al.*, 1999).

1.3.3.2 Durchmusterung einer Klonbank

Gegenüber der Suche in Stammsammlungen hat das Durchsuchen von Genbanken, die die Gene eines kultivierten Organismus bereits in klonierter Form enthalten, den Vorteil, dass auch Enzyme aufgespürt werden können, deren Expression im Ursprungstamm aufgrund regulatoriver Elemente reprimiert ist. Da die betreffenden Gene bereits kloniert sind, ist es zudem einfacher, identifizierte Kandidaten molekulargenetisch zu verändern oder sie in größerem Maßstab zu exprimieren. Des Weiteren vereinfacht die Beschränkung auf einen oder wenige Wirtsorganismen die Anwendung systematischer Screeningmethoden (Demirjian *et al.*, 1999). Die Entfernung des Gens von seinen regulatorischen Elementen infolge der Klonierung kann andererseits seine Expression auch ausschalten. Eine andere *Codon usage*, die spezielle Struktur der klonierten DNA sowie die Toxizität des Genprodukts können weitere Gründe für eine schwache Expression im Klonierungsstamm sein. Die Aktivität des Enzyms kann auch aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen vermindert sein oder ganz ausbleiben. Von Nachteil ist auch die Größe der Genbank von mehreren tausend Klonen, die erforderlich ist, um das gesamte Genom eines Organismus für das Screening abzudecken (Demirjian *et al.*, 1999).

1.3.3.3 Data Mining von Genomsequenzen

In den letzten Jahren ermöglichten das Vorliegen von vollständig sequenzierten bakteriellen Genomen und die Fortschritte in den Methoden der Bioinformatik auch die *in silico* Suche in

diesen Genomen nach neuen Enzymen. Dabei werden mögliche Funktionen durch Vergleich mit bekannten Gensequenzen abgeleitet (Marrs *et al.*, 1999).

1.4 Natürliche Diversität als Quelle für neue Enzyme

Als Hauptquelle für neue biotechnologische Produkte und Prozesse wird indes die biologische Vielfalt von Mikroorganismen angesehen (Bull *et al.*, 1992).

Aufgrund ihrer großen Anpassungsfähigkeit an verschiedene Umgebungsbedingungen sind Mikroorganismen in der Lage, die unterschiedlichsten Lebensräume zu besiedeln (Pace, 1997; Whitman *et al.*, 1998). Man findet sie in heißen Oberflächenquellen ebenso wie in der Tiefsee, in der Antarktis oder in der Wüste (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Dabei können sie bei extremen pH-Werten, Temperaturen, Druckbedingungen oder Salzkonzentrationen überleben (Schmid, 2002). Diese Anpassung beruht auf der evolutiven Entwicklung spezialisierter Enzyme, deren funktionelle Eigenschaften optimal auf die gegebenen Umweltbedingungen und spezielle Stoffwechselwege abgestimmt sind (Lorenz und Schleper, 2002). Viele dieser Enzyme könnten interessant für biotechnologische Anwendungen und von hohem ökonomischem Nutzen sein (Hunter-Cevera, 1998). Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden versucht man deshalb, sich Zugang zu diesen Biokatalysatoren zu verschaffen.

1.4.1 Konventionelle Methode

Der konventionelle Ansatz zur Identifizierung neuer Enzyme aus bisher unbekanntem Mikroorganismen beruht auf der Möglichkeit, Mikroorganismen unter selektiven Bedingungen zu isolieren und in Reinkultur zu kultivieren. Üblicherweise wird dazu eine Umweltprobe auf entsprechende Nährmedien ausplattiert und auf solche Mikroorganismen selektioniert, die in der Lage sind, unter den vorgegebenen Wachstumsbedingungen zu überleben (Miller, 2000). Aus einer Reinkultur des Mikroorganismus kann anschließend das verantwortliche Enzym bzw. das entsprechende Gen isoliert und näher charakterisiert werden. Der Identifizierung durch Selektion kann auch eine Anreicherung der Probe in Flüssigkultur vorangehen, um den Anteil an positiven Kandidaten und damit die Chance auf ein erfolgreiches Screening zu erhöhen (Demirjian *et al.*, 1999). Durch Auswahl der Proben aus ungewöhnlichen Lebensräumen (ökologische Nischen) erhofft man sich ebenfalls eine Steigerung der Ausbeute an neuartigen Enzymen (Clausen, 1997).

Neben dem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand sowie der geringen Wahrscheinlichkeit, dass in der ausgewählten Probe ein geeigneter Organismus enthalten ist, gibt es jedoch weitere Gründe, die die Entdeckung von gesuchten Enzymen mit der konventionellen Methode verhindern. Eine wesentliche Einschränkung ist die Notwendigkeit des Wachstums der

Mikroorganismen unter Laborbedingungen (Miller, 2000). Eine erfolgreiche Kultivierung kann beispielsweise durch die Abhängigkeit des Wachstums von speziellen Umgebungsbedingungen wie z. B. der symbiotischen Gemeinschaft mit anderen Arten, ungewöhnlichem Nährstoffbedarf oder anderen Faktoren verhindert werden, da diese im Labor nicht ohne erheblichen Aufwand nachgestellt werden können oder in den meisten Fällen nicht bekannt sind (Miller, 2000).

Es wird angenommen, dass aufgrund dieser Schwierigkeiten lediglich 0,001 bis 15 % der in verschiedenen Standorten tatsächlich existierenden Organismen kultivierbar sind (Amann *et al.*, 1995). Der Befund, dass eine große Diskrepanz zwischen der mikroskopischen Bestimmung der Zellzahl in einer Probe und der Bestimmung der Anzahl von lebenden Zellen mittels wachstumsbasierter Methoden besteht (s. Tabelle 1), ist unter dem Begriff „*great plate count anomaly*“ seit langem bekannt (Staley und Konopka, 1985).

Tabelle 1: Kultivierbarkeit als prozentualer Anteil der kultivierbaren Mikroorganismen eines bestimmten Lebensraumes im Vergleich zur darin vorkommenden Gesamtzahl an Zellen (Amann *et al.*, 1995)

Habitat	Anteil der kultivierbaren Mikroorganismen [%]
Meerwasser	0,001 - 0,1
Süßwasser	0,25
mesotrophes Seewasser	0,1 - 1,0
unbelastetes Mündungswasser	0,1 - 3,0
Belebtschlamm	1 - 15
Sediment	0,25
Boden	0,3

Folglich stellen die bisher kultivierten Spezies höchstwahrscheinlich nur einen Bruchteil der tatsächlich existierenden Diversität dar; die Mehrheit aller bakterieller Spezies ist dagegen noch unbekannt (Torsvik *et al.*, 1990a; Amann *et al.*, 1995; von Wintzingerode *et al.*, 1997). Diese These wird durch kultivierungsunabhängige Verfahren bestätigt, die die Diversität einer Probe auf molekularer Ebene mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden analysieren, wie z. B. Reassoziationsstudien, 16S-rRNA-Analyse, *in-situ*-Hybridisierungstechniken oder *genetic-fingerprint*-Techniken wie DGGE bzw. TGGE (DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990; Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Torsvik *et al.*, 1990a; Torsvik *et al.*, 1990b; Überblick: Amann *et al.*, 1995; Muyzer, 1999).

1.4.2 Alternativer Ansatz

Angesichts der Tatsache, dass die bekannten kultivierbaren Mikroorganismen nur einen verschwindend geringen Teil der tatsächlich existenten mikrobiellen Vielfalt ausmachen (Torsvik *et al.*, 1990a), bleibt bei der Verwendung konventioneller, auf Wachstum beruhender Methoden zur Identifikation neuer Enzymaktivitäten ein großer Teil der vorhandenen Diversität ungenutzt, da das beträchtliche Potential des unkultivierbaren Anteils der Population verloren geht. Um dagegen das metabolische Potential eines Standortes in seiner Gesamtheit für die Entdeckung neuer Enzyme nutzen zu können, sind alternative Ansätze erforderlich, die den Schritt der Kultivierung umgehen und auf diese Weise auch den Zugang zur metabolischen Vielfalt der unkultivierbaren Mikroorganismen erlauben. Da die genetische Vielfalt einer mikrobiellen Population eines Habitates durch die Gesamtheit ihrer Genome, das Metagenom (Handelsman *et al.*, 1998), repräsentiert wird, besteht eine Strategie folglich darin, die genomische DNA dieser Mikroorganismen direkt aus einer Umweltprobe zu extrahieren, sie in ein geeignetes Expressionssystem zu klonieren und die entstandene Genbank anschließend auf diejenigen Sequenzabschnitte zu durchsuchen, die für neue Enzymaktivitäten kodieren. Dadurch bleibt die ursprünglich auf DNA-Ebene vorhandene Diversität erhalten und kann für die Identifizierung neuer Enzyme genutzt werden.

1.5 Aspekte zur Nutzung des Metagenoms

Verschiedene inhaltliche und methodische Aspekte eines derartigen Verfahrens sowie die dabei eventuell auftretenden Schwierigkeiten sollen im Folgenden kurz aufgezeigt werden.

1.5.1 DNA-Quelle

Aufgrund seiner enormen Diversität stellt das Habitat Boden eine viel versprechende Quelle für die Entdeckung neuartiger Enzymaktivitäten dar. Es repräsentiert vermutlich einen der komplexesten Lebensräume (Amann *et al.*, 1995; Ritz *et al.*, 1997; Rondon *et al.*, 1999): Abschätzungen aufgrund von Reassoziationsstudien gehen davon aus, dass in 1 g einer Bodenprobe mehrere tausend verschiedene Arten existieren (Torsvik *et al.*, 1990a; Chatzinotas *et al.*, 1998; Rouhi, 1999). Mehrere Studien zur Untersuchung der Komplexität verschiedener Böden auf molekularer Ebene (z. B. über 16S rRNA) bestätigen die enorme mikrobielle Diversität (Liesack und Stackebrandt, 1992; Stackebrandt *et al.*, 1993; Barns *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 1995; Borneman *et al.*, 1996; Kuske *et al.*, 1997), die vom kultivierbaren Anteil über die extrahierbaren Bakterien bis zur Gesamtpopulation deutlich ansteigt (Ritz *et al.*, 1997). Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft variiert dabei je nach Standort und Nutzung des Bodens (s. o. und Bruce, 1997; Kuske *et al.*, 1997;

Chatzinotas *et al.*, 1998). Häufig lassen sich auf molekularer Ebene identifizierte, bisher unbekannte Arten aus verschiedensten Standorten aber auch alle derselben neu eingerichteten Bakterien-Division zuordnen, d. h. es existieren Gruppen unbekannter Mikroorganismen, deren Mitglieder ubiquitär vorkommen und oft einen großen Anteil der vorhandenen Spezies darstellen, aber bis jetzt kaum oder überhaupt nicht kultiviert wurden (Rondon *et al.*, 1999).

Äußere Störeinflüsse können die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft massiv beeinflussen. So wird die Diversität eines Standortes beispielsweise durch Pestizide oder durch eine Veränderung der Gaszusammensetzung der Atmosphäre verringert und dabei bestimmte Spezies angereichert (Atlas, 1984; Atlas *et al.*, 1991; Ovreas *et al.*, 1998).

In Anbetracht dieser enormen natürlichen Vielfalt beinhalten Bodenorganismen vermutlich eine Fülle unbekannter Enzyme mit einzigartigen Eigenschaften. Deshalb stellt die DNA dieser Organismen eine aussichtsreiche Ressource für ein breites Spektrum an neuen Enzymen dar, die durch Direktklonierung aufgespürt und so für die technische Anwendung zugänglich gemacht werden könnten.

1.5.2 Extraktion und Aufreinigung der DNA

Zur Nutzung des Metagenoms eines Standortes muss die mikrobielle DNA in ausreichender Menge und Reinheit aus der Umwelt-Probe isoliert werden. Weitere Kriterien bei der Wahl der Aufschlussmethode sind ihre Effizienz bezüglich des Anteils an aufgeschlossenen Zellen, die Diversität und Größe der gewonnenen DNA sowie der Arbeits- und Zeitaufwand. Die Isolierung von DNA aus Bodenproben kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Bei der Zellextraktionsmethode (indirekte Lyse) werden die Zellen zuerst von den Bodenpartikeln abgetrennt und anschließend lysiert (Faegri *et al.*, 1977; Bakken, 1985; Holben *et al.*, 1988; Jacobsen und Rasmussen, 1992). Im Gegensatz dazu erfolgt bei der direkten Lyse der Aufschluss der Zellen *in situ*, d. h. ohne vorherige Abtrennung der Bodenbestandteile innerhalb der Bodenmatrix mit anschließender Aufreinigung der freigesetzten DNA (Ogram *et al.*, 1987; Tsai und Olson, 1991; Moré *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1996).

In der Regel werden mit Methoden der direkten Lyse höhere Ausbeuten erzielt als bei der Zellextraktion (Steffan *et al.*, 1988) (Leff *et al.*, 1995), da auch extrazelluläre DNA (Steffan *et al.*, 1988) und die DNA der Bakterien, die fest an Bodenpartikel gebunden sind (Ogram *et al.*, 1987), extrahiert wird. Die erhaltene DNA kann allerdings stark geschert sein, vor allem bei Anwendung mechanischer Aufschlussverfahren wie z. B. einer Kugelmühle (Ogram *et al.*, 1987; Leff *et al.*, 1995). Zudem ist der Anteil an inhibitorischen Substanzen (s. u.), die bei der DNA-Aufreinigung mitextrahiert werden, wesentlich höher als bei indirekten Verfahren (Steffan *et al.*, 1988).

Die indirekte Lyse hat dagegen den Vorteil, dass die DNA anschließend in größerer Reinheit vorliegt und weniger geschert ist (Jacobsen und Rasmussen, 1992; Courtois *et al.*, 2001). Sie kommt nicht mit Nuklease-produzierenden Mikroorganismen in Berührung und wird nach der Zellyse auch nicht an Bodenpartikel gebunden (Holben *et al.*, 1988). Nachteile im Vergleich zur direkten Lyse bestehen in der geringeren Ausbeute, dem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand sowie darin, dass Bakterien, die fest an der Bodenmatrix haften, eventuell nicht mit aufgeschlossen werden und deshalb die Zusammensetzung der isolierten DNA nicht repräsentativ für den jeweiligen Standort ist, d. h. möglicherweise ein Teil der Diversität verloren geht (Ogram *et al.*, 1987; Leff *et al.*, 1995).

Die verschiedenen Lyseverfahren basieren alle auf einem oder mehreren der folgenden Prinzipien: physikalisches Aufbrechen der Zellen (z. B. Gerier-Tau-Zyklen, Homogenisierung mit einer Kugelmühle, Ultraschall, Mörsern mit flüssigem Stickstoff, Hitze), chemische Lyse (z. B. Detergenzien wie SDS oder Sarkosyl, Salz, Phenol-Chloroform bzw. heißes Phenol, Chelatbildner wie EDTA oder Chelex 100) und enzymatische Lyse (z. B. Lysozym, Proteinase K, Achromopeptidase, Pronase E) (Miller *et al.*, 1999). Die freigesetzte DNA kann anschließend durch Extraktions- und Fällungsschritte grob gereinigt und aufkonzentriert werden.

Problematisch bei der weiteren Verarbeitung der DNA sind kontaminierende Substanzen, insbesondere Huminstoffe, die vor allem bei der direkten Isolierung der DNA aus Boden immer mitextrahiert werden (Tebbe und Vahjen, 1993). Huminstoffe sind dunkel gefärbte hochmolekulare Substanzen von heterogener chemischer Zusammensetzung, die während der Umwandlung organischer Substanz im Boden gebildet werden (Paul und Clark, 1996) und mit Bodentyp, Bodenbiologie, Vegetation und Ähnlichem variieren (Blume *et al.*, 2002). Aufgrund der Dissoziation von Protonen ihrer Carboxyl- bzw. alkoholischen Gruppen sind sie negativ geladen (Blume *et al.*, 2002) und werden deshalb trotz ihrer komplexen chemischen Zusammensetzung leicht bei der Isolierung der DNA mitaufgereinigt (Braid *et al.*, 2003). Dann inhibieren sie sowohl Restriktionsenzyme (Steffan *et al.*, 1988; Porteous und Armstrong, 1991; Tsai und Olson, 1991; Smalla *et al.*, 1993) als auch die *Taq*-Polymerase (Tsai und Olson, 1992), verringern die Spezifität von PCR-Primern (Stach *et al.*, 2001), vermindern die Effizienz bzw. Sensitivität von DNA-DNA-Hybridisierungen (Steffan *et al.*, 1988; Tebbe und Vahjen, 1993; Bachoon *et al.*, 2001), verringern die Transformationseffizienz (Tebbe und Vahjen, 1993) oder stören die spektrophotometrische oder fluorimetrische Quantifizierung der DNA (Steffan *et al.*, 1988; Bachoon *et al.*, 2001).

Vor der weiteren Verarbeitung der DNA müssen diese inhibitorischen Stoffe deshalb gründlich entfernt werden. Dazu steht eine Reihe von Aufreinigungsverfahren zur Verfügung, die sich sowohl in der Anwendung als auch in Qualität und Ausbeute der gereinigten DNA unterscheiden (Bachoon *et al.*, 2001). Trotz verschiedenster methodischer

Prinzipien werden die Störstoffe dabei aber meist nicht vollständig entfernt (Miller *et al.*, 1999). Die Wahl einer geeigneten Aufreinigungsmethode ist somit ein kritischer Punkt bei der Gewinnung von DNA mit ausreichender Reinheit.

1.5.3 Konstruktion der Genbank

Im weiteren Verlauf kann die isolierte und aufgereinigte DNA auf unterschiedliche Art und Weise zur Identifizierung neuer Enzyme genutzt werden.

Ein möglicher Ansatz basiert auf der Sequenzähnlichkeit der Mitglieder innerhalb einer Enzymklasse. So können konservierte Sequenzbereiche gut charakterisierter Enzyme oder Enzymklassen als Vorlage zur Herstellung von degenerierten PCR-Primern dienen, mit deren Hilfe kodierende Sequenzen verwandter Enzyme aus der DNA herausamplifiziert werden. Die entstandenen PCR-Produkte werden anschließend in ein geeignetes Vektorsystem kloniert und analysiert (s. u.) (Seow *et al.*, 1997; Eschenfeldt *et al.*, 2001). Diese Vorgehensweise erlaubt die Identifizierung von Enzymen, die z. B. aus verwandten Organismen anderer ökologischer Nischen stammen. Diese weisen zwar vergleichbare funktionelle Eigenschaften auf, unterscheiden sich aber in den optimalen Katalysebedingungen (Demirjian *et al.*, 1999). Die Anwendung dieser Methode ist allerdings auf bekannte Enzyme mit stark konservierten Sequenzbereichen, aus denen die Primersequenzen abgeleitet werden können, beschränkt (Rondon *et al.*, 1999).

Soll die genomische DNA nach ihrer Extraktion aus der Boden-Probe direkt in ein geeignetes Vektorsystem kloniert werden, wird sie durch partiellen oder totalen Verdau fragmentiert. Die Fragmentgröße hängt zum einen davon ab, welche Gene aufgespürt werden sollen. Während für die Isolierung einzelner Gene (z. B. Hydrolasen mit 1 - 2 kb) Fragmentgrößen bis maximal 10 kb ausreichend sind, erfordert die Klonierung kompletter Gencluster, die ganze Stoffwechselwege umfassen, Fragmente von mehreren Dutzend Kilobasen; so sind beispielsweise Gencluster der Polyketidsynthasen oft größer als 100 kb (Lorenz *et al.*, 2002).

Zum anderen muss auch die Größe der resultierenden Genbank in Betracht gezogen werden. Für die Beziehung zwischen Insertgröße, Genomgröße und der Zahl der Klone, die durchmustert werden muss, um in einer kompletten Genbank eines Genoms ein einzelnes Gen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zu finden, gilt (Clarke und Carbon, 1976; Cottrell *et al.*, 1999):

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{F}{G}\right)}$$

(Gl. 1)

mit

- N Zahl der Klone (Größe der Genbank)
- F Fragmentlänge [bp]
- G Gesamtgröße des Genoms [bp]
- P Wahrscheinlichkeit für das Auffinden eines bestimmten Gens

Das Genom von *E. coli* K12 hat eine Größe von $4,64 \cdot 10^6$ bp (Blattner *et al.*, 1997); bei einer Insertgröße von 4 kb und einer Wahrscheinlichkeit von 99 % beträgt die notwendige Größe der Genbank nach obiger Formel (Gl. 1) 5340 Klone. Die Genbank eines Habitates mit einer angenommenen Komplexität von beispielsweise 1000 Spezies müsste bei einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 4 kb und der Annahme, dass ein Genfragment in beiden Orientierungen enthalten sein kann, für eine vollständige Abdeckung aller Genome bereits 10^7 Klone umfassen. Eine Reduktion der erforderlichen Klonzahl ist nur durch Vergrößerung der Insertgröße möglich, was wiederum Nachteile bezüglich der Expression mit sich bringen kann (s. u.).

1.5.4 Wahl des Vektors

Die Größe der Zielgene sowie die Methode des Screenings haben auch Einfluss auf die Wahl des Klonierungsvektors. Für die Klonierung einzelner Enzymgene sind Vektoren mit kleinen Klonierungskapazitäten (1 - 10 kb) wie z. B. Plasmide oder λ -Vektoren geeignet. Im Falle eines Expressionsscreenings kann die Transkription der Gene dabei vom vektor-eigenen Promotor aus stattfinden, so dass die Erkennung fremder Promotoren durch die wirtseigene RNA-Polymerase nicht erforderlich ist und somit die Expression des Proteins und die Detektion der Enzymaktivität unabhängig von den nativen Promotoren ist (Short, 1997; MacNeil *et al.*, 2001). Für die Klonierung großer Fragmente wie z. B. ganzer Gencluster sind dagegen Vektoren mit hoher Aufnahmekapazität nötig (Cosmide, Fosmide, BACs). Hier erfolgt die Transkription auch unter Ausnutzung der natürlichen Promotoren, die durch die RNA-Polymerase des Wirts erkannt werden müssen; die Expression ist

deshalb unter Umständen nicht gewährleistet oder nur sehr schwach. Im Vergleich zu Wirtsorganismen wie *Bacillus* oder *Streptomyces* bietet *E. coli* hier den Vorteil, dass gelockerte Bedingungen bezüglich der Promotorerkennung und der Translationsinitiation vorliegen (Lorenz *et al.*, 2002).

1.5.5 Wirtsorganismus

In der Regel ist *E. coli* aufgrund seiner bekannten Genetik, der Verfügbarkeit etablierter molekularbiologischer Werkzeuge und seiner sehr guten Transformationskompetenz der Wirtsorganismus der Wahl. Gewisse Erfordernisse bezüglich der Expression oder des Screenings (z. B. Expression fremder Gene mit hohem GC-Gehalt) können es jedoch erforderlich machen, andere Expressionswirte wie beispielsweise *Streptomyces* zu verwenden oder Klonierung und Expression in unterschiedlichen Wirtsorganismen durchzuführen (Lorenz *et al.*, 2002). Von Nachteil kann dabei der Mangel an geeigneten Vektoren, eine verschlechterte Transformationseffizienz, mycelartiges Wachstum oder dergleichen mehr sein.

1.5.6 Ablage der Genbank

Die Lagerung der Genbank kann sowohl untransformiert in Form der ligierten DNA als auch in Form transformierter Bakterienzellen erfolgen (Demirjian *et al.*, 1999). Letztere können als vereinzelte Kolonien in Mikrotiterplatten abgelegt oder als Mischkultur bzw. in Form der daraus isolierten Gesamt-DNA aufbewahrt werden. Eine Lagerung als „nackte“ DNA bietet größtmögliche Flexibilität bezüglich der Transformation in unterschiedliche Wirtsorganismen, die z.B. aufgrund bestimmter Hintergrundaktivitäten erforderlich sein kann. Von Vorteil ist dabei auch der geringe Platzbedarf. Ein der Transformation nachfolgendes Screeningverfahren auf Agarplatten ist schnell, einfach und mit hohem Durchsatz durchzuführen. Andererseits ist es oft erforderlich, einzelne Klone in Mikrotiterplatten-Assays systematisch zu screenen. Dies setzt eine vereinzelte Lagerung der Kolonien in Mikrotiterplatten voraus. Neben dem schnellen und reproduzierbaren Zugriff auf bestimmte Klone hat diese Art der Ablage auch den Vorteil, dass einzelne Arbeitsschritte einfacher zu automatisieren sind. Dem steht jedoch der hohe Platzbedarf und der hohe Arbeitsaufwand sowohl für die Vereinzelung als auch bei der Durchführung der MTP-Assays gegenüber.

1.5.7 Identifizierung neuer Enzyme

Die Verfahren zur Identifizierung der Gene, die für neue Enzymaktivitäten kodieren, können auf Sequenzähnlichkeiten basieren oder die funktionelle Expression des Gens voraussetzen.

Sequenzbasierte Methoden nutzen konservierte Sequenzbereiche gut charakterisierter Enzyme bzw. Enzymklassen als Vorlage zur Herstellung von Oligonukleotiden, die dann im Rahmen einer DNA-DNA-Hybridisierung als Hybridisierungssonden zur Identifikation der Zielgene verwendet werden (Richardson *et al.*, 2002). Es ist auch möglich, aus konservierten Sequenzbereichen degenerierte PCR-Primer abzuleiten und anschließend durch spezifische PCR-Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte diejenigen Klone zu identifizieren, die das Gen eines verwandten Enzyms enthalten (Courtois *et al.*, 2003). Diese Methoden erlauben das Aufspüren homologer Sequenzen verwandter Enzyme. Ihre Anwendung ist dabei beschränkt auf bekannte Enzyme mit konservierten Sequenzbereichen. Eine Entdeckung völlig neuartiger Sequenzen ist deshalb meist nicht möglich.

Ein Screening nach neuen Enzymen kann auch über den direkten Nachweis der Enzymaktivität erfolgen (Expressionsscreening). Voraussetzung dafür ist die funktionelle Expression des Proteins und ein sensitives und selektives Testsystem zum Nachweis der Aktivität (Dalboge und Lange, 1998). Im Gegensatz zu sequenzbasierten Screeningverfahren ist auf diese Weise die Entdeckung neuer, bisher unbekannter Sequenzen mit ähnlicher enzymatischer Funktion möglich (Lorenz und Schleper, 2002). Für die Durchführung eines Expressionsscreenings wurden verschiedene Methoden beschrieben (s. 1.6).

Beide Arten des Screenings können auch ergänzend eingesetzt werden.

1.6 Screeningverfahren

Konventionelle Methoden zur Identifizierung neuer oder verbesserter Enzymaktivitäten im Rahmen eines Expressionsscreenings beruhen auf einer phänotypischen Selektion oder einem Screening der Klone auf Agarplatten oder in Mikrotiterplatten (Demirjian *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000).

Selektive Testsysteme können für solche Enzymaktivitäten angewendet werden, die für Überleben und Wachstum der jeweiligen Zelle essenziell sind, dadurch dass sie z. B. die Verwertung des angebotenen Substrates ermöglichen, die Auxotrophie eines mutierten Stammes komplementieren oder Resistenz gegenüber cytotoxischen Agenzien vermitteln (Olsen *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Wahler und Reymond, 2001b). Selektionsverfahren

erlauben zwar nur eine qualitative Unterscheidung der Klone, ermöglichen aber aufgrund ihrer Durchführung auf Agarplatten einen sehr hohen Durchsatz, da üblicherweise nur die Kolonien mit der gewünschten Aktivität wachsen (Demirjian *et al.*, 1999). Der bei diesen Verfahren ausgeübte Selektionsdruck kann allerdings zu Mutationen führen, die nicht direkt die gesuchte katalytische Aktivität betreffen, sondern beispielsweise nur die schwache Expression eines Biokatalysators erhöhen oder durch Induktion eines alternativen Stoffwechselweges oder einer allgemeinen Stressantwort das Wachstum unter den stringenten Bedingungen ermöglichen (Olsen *et al.*, 2000).

Screeningverfahren basieren dagegen auf der (halb)quantitativen Detektion eines spezifischen Signals, das als direkte Folge der katalytischen Aktivität eines Klons ausgebildet wird (Wahler und Reymond, 2001b). Dabei werden die Klone, die ohne Selektionsdruck angezüchtet wurden, einzeln auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht und positive Klone über den direkten Vergleich der Messwerte identifiziert (Olsen *et al.*, 2000). Dies setzt eine physikalische Separation der Kolonien voraus, die entweder durch Ausplattieren auf Agarplatten oder Vereinzelung in Mikrotiterplatten erreicht wird (Demirjian *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2001; Wahler und Reymond, 2001b).

Ein Screening auf Agarplatten erlaubt die schnelle visuelle Identifikation positiver Klone. Es beruht beispielsweise auf einer Hofbildung infolge der Umwandlung eines unlöslichen Substrates zu einem löslichen Produkt oder auf der Umsetzung eines präzipitierbaren chromogenen Substrates in ein unlösliches farbiges bzw. fluoreszierendes Molekül (Demirjian *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000); die Detektion einer Reaktion, bei der z. B. infolge einer Hydrolyse Säure gebildet wird, ist auch über den Farbumschlag eines pH-Indikators möglich (Wahler und Reymond, 2001b). Der Produktnachweis kann direkt oder durch Kopplung mit nachgeschalteten Reaktionen erfolgen. Bei toxischen Nachweissystemen oder Verfahren, die eine Lyse der Zellen erforderlich machen, ist auch ein Überführen der Zellen auf Filtermembranen möglich (Olsen *et al.*, 2000). Mit Hilfe eines Agarplatten-basierten Screenings können mehrere tausend Kolonien gleichzeitig auf einer Platte analysiert werden. Auf diese Weise ist eine flexible, einfache und schnelle Durchmusterung auch von Genbanken, die nicht in Mikrotiterplatten abgelegt wurden, möglich (Demirjian *et al.*, 1999). In den letzten Jahren haben digitale Bildverarbeitungssysteme dabei eine Steigerung des Durchsatzes sowie eine quantitative Signalverarbeitung ermöglicht (Olsen *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Agarplatten-Assays sind Nachweissysteme in Mikrotiterplatten oft einfacher zu entwickeln und liefern eher quantitative Ergebnisse. Zudem erleichtert das

Mikrotiterplattenformat ein systematisches Screening der Klone sowie die Automatisierung einzelner Verfahrensschritte (Demirjian *et al.*, 1999). Infolge der hohen Sensitivität mancher Tests ist der Nachweis sehr geringer Produktkonzentrationen möglich; dies erlaubt die Reduktion des Assayvolumens sowie die Detektion von Enzymen mit geringer Aktivität (Olsen *et al.*, 2000).

Für die Analyse im Mikrotiterplattenformat müssen die Kolonien in vereinzelter Form vorliegen, was aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes den Durchsatz im Vergleich zu Plattenverfahren limitiert (Demirjian *et al.*, 1999). Die Verwendung von automatisierten Systemen wie z. B. Pipettierstationen und Pickrobotern führt zwar zu einer Steigerung des Durchsatzes; sie ist jedoch mit erheblichen Mehrkosten verbunden (Olsen *et al.*, 2000). Neue Verfahren wie z. B. die FACS-Analyse erlauben durch die Untersuchung einzelner Zellen ohne ihre vorherige Vereinzelnung und Wachstum einen höheren Durchsatz (Demirjian *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000).

Für die meisten Screeningverfahren wird statt des echten Substrats eine Modellverbindung verwendet, die dem echten Substrat möglichst ähnlich ist (Demirjian *et al.*, 1999). Substratanaloga, die von Hydrolasen umgesetzt werden, bestehen in der Regel aus einem detektierbaren chromogenen oder fluorogenen Anteil und einem funktionellen Rest. Während für ein Agarplattenscreening meist präzipitierbare Substrate wie z. B. indigogene Substanzen wie X-Gal oder X-Phosphat verwendet werden, deren Farbentwicklung auf die Kolonie bzw. ihre unmittelbare Umgebung begrenzt ist (Cohen *et al.*, 2001), sind für Assays im Mikrotiterplattenformat lösliche Substrate gebräuchlich, die eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivität erlauben. Als chromogene Substrate werden häufig pNP- oder Nitroanilin-Derivate verwendet, die spektrophotometrisch nachgewiesen werden können. Die Sensitivität fluorogener Substrate, die z. B. auf Umbelliferon oder Cumarin basieren, ist um den Faktor 1000 erhöht (Demirjian *et al.*, 1999). Assays, die eine katalytische Umsetzung mit Hilfe chromogener und fluorogener Substanzen nachweisen, sind einfach und verlässlich durchzuführen und lassen sich leicht in ein Hochdurchsatzformat umwandeln (Wahler und Reymond, 2001b).

Eine Verstärkung der Farbreaktion ist durch Kopplung an ein Hilfssystem möglich, z. B. durch Zugabe von Substanzen zur Bildung eines Farbkomplexes oder Nachschaltung einer weiteren Enzymreaktion, die ein farbiges Produkt bildet. Auf dieselbe Weise können auch Enzymreaktionen, die mit dem echten Substrat durchgeführt werden, indirekt nachgewiesen werden (Demirjian *et al.*, 1999).

Mit steigender Zahl der zu untersuchenden Klone werden Screeningmethoden benötigt, die einen hohen Durchsatz erlauben. Ein solches Screening kann hierarchisch aufgebaut sein

oder in Form eines automatisierten Hochdurchsatz-Screenings erfolgen (Demirjian *et al.*, 1999).

Ein automatisiertes Hochdurchsatz-Screening setzt meist die Vereinzelung aller vorhandenen Klone in Mikrotiterplatten oder ähnliche Formate voraus, die z. B. mit Hilfe von Pickrobotern erfolgen kann. Anschließend werden alle Klone unter Zuhilfenahme automatisierter Pipettier- und Testsysteme durch Bestimmung einer spezifischen Messgröße auf Enzymaktivität untersucht (s. o.) (Demirjian *et al.*, 1999). Die automatisierte Durchführung der Analyse erhöht neben dem Durchsatz auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und erleichtert die Auswertung großer Datenmengen. Durch eine Miniaturisierung der Systeme kann der Verbrauch von Chemikalien reduziert werden, was einen wichtigen ökonomischen und ökologischen Faktor darstellt (Tholey und Heinzle, 2002); zudem ist so die Durchführung einer größeren Anzahl an Reaktionen unter identischen Bedingungen gewährleistet (Wahler und Reymond, 2001a).

1.7 Methoden zur Detektion biologischer Dehalogenierung

Bei der enzymatisch katalysierten hydrolytischen Dehalogenierung chlorierter Kohlenwasserstoffe wird der Halogenligand durch eine Hydroxylgruppe aus dem Wasser ersetzt; gleichzeitig entsteht Chlorwasserstoff (Müller und Lingens, 1988; Janssen *et al.*, 1994). Die Reaktion kann deshalb sowohl über die Detektion des abgespaltenen Chloridions als auch über die Messung des absinkenden pH-Wertes nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Systemen, bei denen unter Verwendung von Substratanaloga die Bildung eines bestimmten Produkts oder auch der Verbrauch des Substrats nachgewiesen wird, erlaubt der Nachweis des freigesetzten Halogenids bzw. Protons die Verwendung verschiedener echter Zielsubstrate.

1.7.1 Messung der pH-Absenkung

Eine Absenkung des pH-Wertes infolge der Freisetzung einer Säure tritt bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen wie z. B. Esterhydrolyse auf und kann als sensitiver Gradmesser für den Verlauf der Reaktion verwendet werden (Wahler und Reymond, 2001b; Tholey und Heinzle, 2002). Die Änderung des pH-Wertes wird dabei durch Zugabe eines Säure-Base-Indikators sichtbar gemacht. Bei diesen organischen Farbstoffen handelt es sich meist um schwache Säuren, deren protonierte Form eine andere Färbung aufweist als die konjugierte Base. Ihre Farbe ist somit abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Am Umschlagspunkt des Indikators liegen Säure und Base in gleicher Konzentration vor;

die resultierende Farbe der Lösung ist eine Mischung der Farben der Indikatorsäure und -base zu gleichen Anteilen.

pH-Indikatoren wurden bereits für den Nachweis verschiedener enzymatisch katalysierter Reaktionen, die ein Proton verbrauchen oder bilden, verwendet, darunter z. B. die enzymatische Hydrolyse durch Esterasen, Lipasen und Proteasen (Janes *et al.*, 1998). Während dabei die Verwendung der Indikatoren in Agarplatten eine qualitative visuelle Detektion erlaubt, kann in Lösung eine Reaktion sowohl qualitativ als auch quantitativ verfolgt werden (Janes *et al.*, 1998).

Auch zur Detektion dehalogenierender Aktivität wurden schon verschiedene Agarplattensysteme eingesetzt (Saber und Crawford, 1985; Strotmann und Röschenthaler, 1987; Schanstra *et al.*, 1993). Die semiquantitative Bestimmung der Aktivität von Dehalogenasen in Lösung mit Hilfe von pH-Indikatoren wurde ebenfalls beschrieben (Holloway *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999; Marvanova *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2001).

1.7.2 Bestimmung des freigesetzten Chlorids

Gegenüber der Messung der Absenkung des pH-Wertes, die bei verschiedenen hydrolytischen Reaktionen auftritt, hat der Nachweis des freigesetzten Halogenids den Vorteil, dass spezifisch nur Dehalogenierungsreaktionen identifiziert werden.

Für die Chloriddetektion stehen chromatographische Verfahren, spektrophotometrische Tests sowie elektrochemische Analysemethoden zur Verfügung.

Ionenchromatographische Verfahren, die z. B. unter Verwendung von Anionenaustauscher- oder *reversed-phase*-Säulen durchgeführt werden, sind sehr empfindlich und bieten den Vorteil, dass mehrere Anionensorten gleichzeitig quantitativ bestimmt werden können. Von Nachteil sind allerdings der erhebliche Zeitaufwand bei der Durchführung, auch aufgrund der speziellen Vorbehandlung biologischer Proben, sowie die hohen Kosten für die Säulenmaterialien und Reagenzien (Mörsberger, 1990). Aus diesen Gründen sind derartige Verfahren für ein Screening einer großen Anzahl von Klonen nicht geeignet.

Chloridionen können auch kolorimetrisch durch chloridionen-spezifische chemische Reaktionen nachgewiesen werden. Ein Verfahren beruht auf der Bildung eines rot gefärbten Eisen(III)-thiocyanatkomplexes bei der Reaktion von Quecksilber(II)-thiocyanat, Ammoniumeisen(III)-sulfat und Chloriden in der Gegenwart von 9 N Salpetersäure; die Absorption des Komplexes wird anschließend photometrisch bei 460 nm bestimmt (Iwasaki *et al.*, 1956; Bergmann und Sanik, 1957). Qualitativ kann eine dehalogenierende Aktivität auch durch Fällung des freigesetzten Chlorids als unlösliches Silberchlorid nach Zugabe von Silbernitrat bestimmt werden (Weightman *et al.*, 1985). Die amperometrische Titration von Chloridionen mit elektrolytisch erzeugten Silberionen nutzt ebenfalls die Ausfällung als

unlösliches Silberchlorid; die Dauer des gemessenen Stromflusses ist dabei der Chloridionen-Konzentration direkt proportional (Slater *et al.*, 1979).

Alle diese Methoden sind relativ umständlich und aufwändig in der Durchführung. Insbesondere aufgrund der Verwendung toxischer oder korrosiver Reagenzien unter drastischen Reaktionsbedingungen sind sie für ein Screening eher ungeeignet.

Eine sensitive Detektion von Chloridionen kann auch elektrochemisch mit Hilfe ionenselektiver Elektroden erfolgen. Sie zeichnet sich insbesondere durch ihre große Sensitivität sowie durch geringen apparativen Aufwand, Schnelligkeit und Zuverlässigkeit der Messung ohne aufwändige Probenvorbereitung aus (Mörsberger, 1990). Von Nachteil sind die Querempfindlichkeit gegenüber anderen Ionen sowie die Komplexbildung mit Cyaniden oder Thiosulfat, die zu einer Messwertverfälschung bzw. Inaktivierung der Elektrode führen können (Oehme, 1991).

1.7.2.1 Aufbau und Funktionsweise des elektrochemischen Halogenidsensors

Am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB wurde für die elektrochemische Chloriddetektion ein potentiometrisches Halogenidsensor-System auf Basis der Fließinjektionsanalyse entwickelt (Otto *et al.*, 1987; Mörsberger, 1990).

Der vorhandene Chloridsensor (s. Abb. 1) besteht aus einem Fließinjektionssystem, bei dem mit Hilfe eines HPLC-Probengebers die Proben über ein automatisches Injektionsventil mit fester Probenschleife (20 μ l) in einen konstanten Transportpufferstrom eingespritzt und in einer speziell geformten Durchflusszelle an der Oberfläche einer ionenselektiven Elektrode vorbeigeführt werden. Die während der Kontaktzeit auftretende geringe Potentialänderung kann in Relation zum Potential der Bezugselektrode detektiert werden. Die verstärkten Signale werden auf einem angeschlossenen x/y-Schreiber ausgegeben. Die Auswertung der aufgezeichneten Signalhöhen, die den Potentialdifferenzen direkt proportional sind, erfolgt manuell. Zwischen Chloridkonzentration und Signalthöhe besteht bis ca. 200 μ M ein direkter linearer Zusammenhang; oberhalb dieser Konzentration ist die Beziehung logarithmisch, gemäß einer erweiterten Nernst-Gleichung (s. 1.7.2.2).

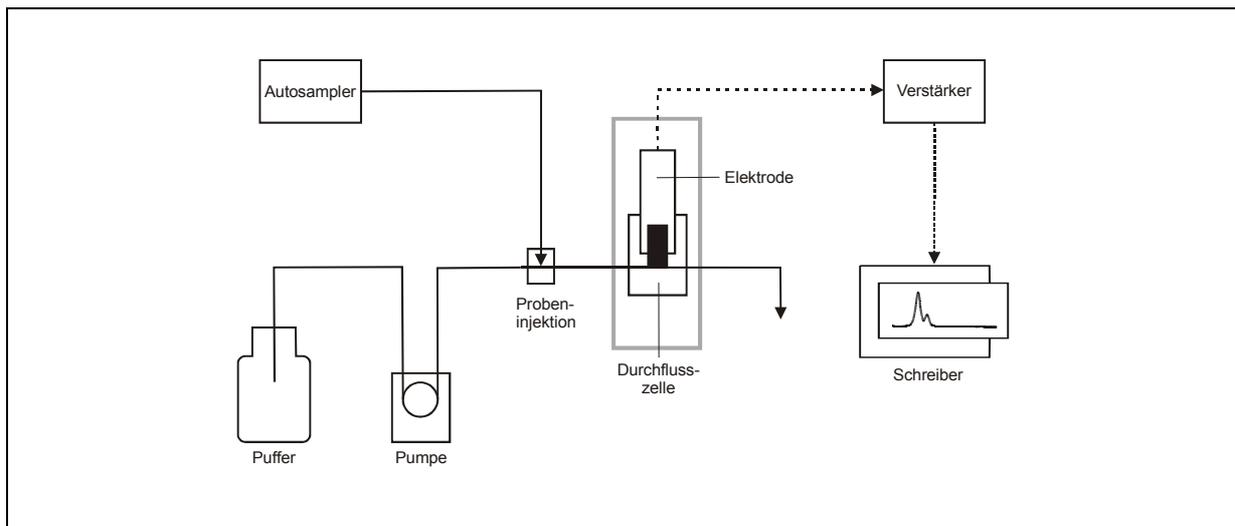


Abb. 1 Halogenidsensor-System: Schematische Darstellung des Gesamtaufbaus.

Die eigentliche Messeinheit wird aus der Durchflusszelle mit angeschlossener Bezugselektrode (Ag/AgCl) sowie dem auswechselbaren Elektrodenkopf gebildet (Abb. 2). Das ionenselektive Sensorelement des Elektrodenkopfes ist eine heterogen aufgebaute Festkörpermembran in Form eines zylindrischen $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgCl}$ -Mischpresslings.

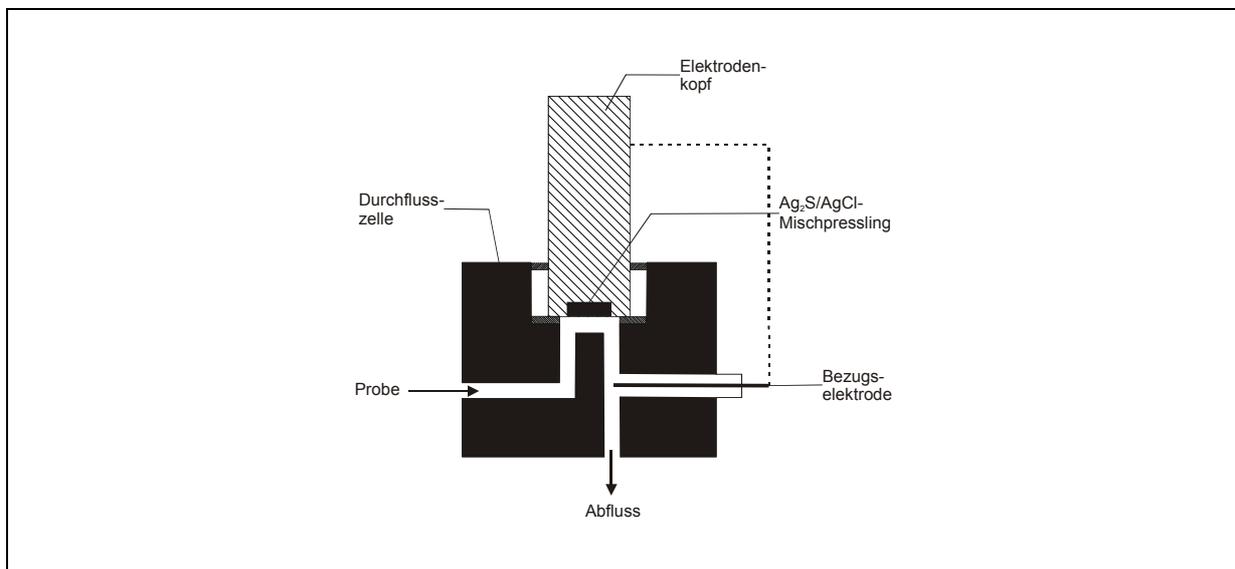


Abb. 2 Halogenidsensor-System: Durchflusszelle mit ionenselektiver Elektrode und Bezugselektrode.

Die Nachweisgrenze ionenselektiver Elektroden mit Festkörpermembran hängt vom Löslichkeitsprodukt der ionenaktiven Substanz ab, in diesem Fall des eingepressten Silberhalogenids. Der Messbereich einer mit einem Mischpressling aus Ag_2S und AgCl ausgerüsteten Elektrode ist, bedingt durch das relativ große Löslichkeitsprodukt von AgCl ($K_L = 1,56 \cdot 10^{10}$ bei 25°C), nach unten begrenzt. Die Gleichgewichtskonzentration von

gelöstem AgCl, welche der unteren theoretischen Nachweisgrenze entspricht, ergibt sich daraus zu $c = 1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/l AgCl. Der praktisch nutzbare Messbereich einer Chloridelektrode liegt zwischen 10 µM und 100 mM Chlorid (Oehme, 1991).

Die selektive Messung von Chloridionen kann aufgrund von Querempfindlichkeiten der Elektrode gegenüber anderen Ionen, die schwerer lösliche Silbersalze bilden (insbesondere Bromid, Iodid und Sulfid), gestört werden. Auch die Komplexbildung mit Cyaniden oder Thiosulfaten sowie die Reduktion von AgCl zu metallischem Silber durch starke Reduktionsmittel spielen hier eine Rolle (Oehme, 1991). Eine geeignete Probenvorbereitung kann diese störenden Einflüsse minimieren.

1.7.2.2 Theorie der ionenselektiven Elektrode

Ionenselektive Elektroden gehorchen der Nikolskij-Gleichung (Gl. 2), die einer erweiterten Nernst-Gleichung für potentiometrische Messelektroden entspricht. Sie berücksichtigt auch Querempfindlichkeiten einer für die Ionenart i entwickelten Elektrode gegenüber Störionen j (Oehme, 1991):

$$E = E_0 \pm 2,303 \frac{RT}{nF} \cdot \log(a_i + k_{ij} \cdot a_j^{n/m})$$

(Gl. 2)

mit

E	Elektrodenpotential
E_0	Standardpotential für $a_i = 1$ mol/l
\pm	+ Kationen, – Anionen
R	allgemeine Gaskonstante $8,3144 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
T	Temperatur in °K
F	Faraday-Konstante $9,6493 \cdot 10^4$ Coulomb/val
n, m	Wertigkeit des Ions i bzw. j mol/val
a_i, a_j	Aktivität der Ionenarten i und j
k_{ij}	Selektivitätskonstante

Die Selektivitätskonstante k_{ij} ist ein Maß für die Querempfindlichkeit einer ionenselektiven Elektrode gegenüber anderen Ionen. Für eine „ideale“, für die Ionenart i spezifische Messelektrode gilt $k_{ij} = 0$ und die obige Gleichung geht in die Nernst-Gleichung (Gl. 3) über:

$$E = E_0 \pm 2,303 \frac{RT}{nF} \cdot \log a_i$$

(Gl. 3)

In diesem Fall bewirkt eine Änderung der Aktivität eines einwertigen Ions i um den Faktor zehn eine Potentialänderung um 59 mV.

Bei halblogarithmischer Auftragung des Potentials E einer Messkette (bestehend aus Mess- und Bezugselektrode) über der Aktivität a_i ist der Bereich der Gültigkeit der Nernst-Gleichung durch einen linearen Kurvenverlauf gekennzeichnet. Im unteren nichtlinearen Messbereich in der Nähe der Nachweisgrenze verliert die Nernst-Gleichung ihre Gültigkeit: die Kurve verläuft gekrümmt. Abweichungen von der Nernst-Gleichung treten bereits bei Chloridkonzentrationen unter $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l auf (Oehme, 1991). Hier gelten komplexe Abhängigkeiten von verschiedenen Faktoren, die nur über die Erstellung von Kalibrierkurven durch Ausmessen von Lösungen bekannter Konzentrationen berücksichtigt werden können (Frazer *et al.*, 1983).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die beträchtliche physiologische Vielfalt von Mikroorganismen birgt ein großes Potential an neuen interessanten Produkten für die Biotechnologie in sich. Die eingeschränkte Kultivierbarkeit stellt jedoch einen Engpass bei der Identifizierung neuer Enzyme dar, wenn nur mit klassischen wachstumsbasierten Methoden gearbeitet wird. Um die Suche nach neuen industriell verwendbaren Enzymen zu verbessern, sollten deshalb in der vorliegenden Arbeit Methoden für ein kultivierungsunabhängiges DNA-basiertes Verfahren entwickelt werden. Diese Methoden sollten die Isolierung, Aufreinigung und Klonierung der Boden-DNA umfassen. Unter Verwendung dieser Methoden sollten anschließend mit genomischer DNA der Boden-Mikroorganismen Genbanken in *E. coli* angelegt und diese mit verschiedenen Assayverfahren auf unterschiedliche Enzymaktivitäten hin durchmustert werden, um einerseits ihr genetisches Potential und ihre Vielfalt zu überprüfen und andererseits neuartige Enzyme für eine mögliche industrielle Anwendung zu finden. Um dabei auch ein sensitives Hochdurchsatz-Screening nach Dehalogenasen zu ermöglichen, sollten zum einen Verfahren etabliert werden, die eine mikrobielle Umsetzung chlorierter Substrate und ihre Detektion direkt in Mikrotiterplatten erlauben. Zum anderen sollte auf Basis der vorhandenen ionensensitiven Chloridanalytik ein parallelisiertes und automatisiertes Screeningsystem entwickelt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Bio-Rad Protein Assay Lösung	Bio-Rad, München
Bromthymolblau, Na-Salz, wasserlöslich	Fluka, Buchs SG (CH)
Chloressigsäure, purris.	Fluka, Buchs SG (CH)
Glycerintributyrat (Tributyrin)	Merck, Darmstadt
Glycerol Sigma Ultra ca. 99 %	Sigma, Deisenhofen
Iod, doppelt sublimiert, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, zur Analyse (max. 0,005 % Br)	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Kartoffelstärke, löslich	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver (BBL Skim Milk Powder)	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumacetat, wasserfrei, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Phenolrot, Na-Salz, wasserlöslich	Riedel-de Haën, Seelze
Phytinsäure, Na-Salz, aus Getreide	Sigma, Deisenhofen
SYBR Green I	Sigma, Deisenhofen
X-Phosphat Dinatrium-Salz	Applichem, Darmstadt; Roth, Karlsruhe

Alle anderen verwendeten Laborchemikalien und Reagenzien entsprachen dem Reinheitsgrad "zur Analyse" und wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Bio-Rad (München), Fluka (Buchs SG, CH), Aldrich (Steinheim), Riedel-de Haën (Seelze) und Serva (Heidelberg) bezogen.

2.2 Biochemikalien

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Promega, Mannheim
DNA-Größenstandards: 1-kb-, 1-kb-Plus- und High-Mass-DNA-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Kalbsthymus-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma, Deisenhofen
Phytase aus <i>Aspergillus ficuum</i> (3,5 U/mg)	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	Promega, Mannheim; NEB, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim

Folgende Primer, die durch MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert wurden, wurden für die Sequenzierung der Genbank-Inserts in pJOE930 bzw. pBluescript SK+ verwendet:

Tabelle 2: Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz
T3 Promotor	5' – AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG – 3'
T7 Promotor	5' – GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C – 3'
pJOE-f	5' – CAG CGG GTG TTG GCG GGT GTC – 3'
pJOE-r	5' – GTG AGC GAG GAA GCG GAA GAG C – 3'

2.3 Verbrauchsmaterialien

Chroma Spin+TE-1000	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Corning 245 mm Square Bioassay Dish	Corning Life Sciences, Wiesbaden
Micro-Mesh-Sortiment (Schleifpapier)	Dick GmbH, Metten
Nitrocellulose Protran BA 85 (0,45 µM Porengröße, 87 bzw. 132 mm Durchmesser)	Schleicher & Schuell, Dassel
Petrischalen, 96er-Mikrotiterplatten, Abdeckplatten, Adhäsivfolie (Nr. 676001), SILVERseal (Alufolie)	Greiner, Frickenhausen
QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen Plasmid Maxi Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quarzküvette, 10 mm Schichtdicke, 105.203-QS	Hellma, Müllheim/Baden
Spezial-Mahlperlen für die Mikrobiologie (SM1), 0,1 - 0,2 mm, bleifrei	Helmut Clauss, Nidderau

2.4 Geräte

96-Nadel-Replikator	Boekel Scientific, Pennsylvania (USA)
Agagel Mini / Midi-Wide / Standard	Biometra, Göttingen
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad, München
Fluorimeter Spectrafluor Plus	Tecan, Crailsheim
Homogenisator Ultra-Turrax	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen i. Br.

IDA Gel Documentation System	Raytest, Straubenhardt
MTP-Spektrophotometer Spectramax Plus	Molecular Devices, München
MTP-Schüttler Titramax 101	Heidolph Instruments, Schwabach
pH-Meter 2001	Sentron, Roden (NL)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer Spekol 1200 und Specord 200	Analytik Jena, Jena
Kugelmühle MM 200	Retsch GmbH, Haan
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Zentrifugen:	
Minizentrifuge HF-120 Capsulefuge	Tomy Tech USA, Inc., Californ. (USA)
Biofuge pico, Biofuge fresco, Multifuge 3 S/5-R	Heraeus (über Kendro), Hanau
Halogenidsensor-System (Fraunhofer IGB):	
Einspritzmodul Auto Sample Injector 231,	Gilson/Abimed
Dosierautomat Dilutor 401,	(Villiers le Bel (F)/Langenfeld)
Schlauchpumpe Minipuls 3	
Ionenselektive Messeinheit	Fraunhofer IGB Stuttgart
Verstärkereinheit	Fraunhofer IGB Stuttgart
(10^{15} -Ohm-Impedanzwandler)	
Schreiber BD 41	Kipp & Zonen B. V., Delft (NL)
Automatisierte Halogenid-Screening-Anlage (Fraunhofer IPA):	
Geräteplattform: Tecan Genesis RSP 150	Tecan, Crailsheim
Schlauchpumpe P-1	Pharmacia LKB, Freiburg
Motorventile (20 µl Schleife) und Injektionsports	Rheodyne, Bensheim
Ionenselektive Sensoreinheiten (jeweils	Haaf Mess-Regeltechnik, Waibstadt
Durchflusszelle mit Mess- oder Bezugselektrode)	
Impedanzwandler und Vorverstärker	Haaf Mess-Regeltechnik, Waibstadt
Steuerelektronik (Messwerterfassungskarte, Kabel,	National Instruments, München
Connector block)	
Software: LabView	National Instruments, München

2.5 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit ddH₂O angesetzt. Lösungen für sterile Arbeiten wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

<u>Acetatpuffer</u> (Phytaseassay)	0,147 g/l 30,02 g/l 0,1 g/l	CaCl ₂ × 2 H ₂ O Natriumacetat Trihydrat Tween 20 pH 5,5 mit Essigsäure (100 %) 1 Woche haltbar
<u>Bromthymolblau (Stammlösung)</u>	5 mg/ml	Bromthymolblau Na-Salz, in ddH ₂ O sterilfiltrieren
<u>10%ige CTAB-Lösung</u>	10 g	CTAB abwiegen mit 0,7 M NaCl auf 100 ml auffüllen und über Nacht rühren
<u>EDTA pH 8.0</u>	0,5 M	Na-EDTA pH 8,0 mit NaOH-Plätzchen
<u>Eisensulfatlösung</u>	108 g/l 1 ml/l	FeSO ₄ × 7 H ₂ O 10 M H ₂ SO ₄
<u>Farbreagenz</u> (Phytaseassay)	80 % 20 %	Molybdatlösung Eisensulfatlösung direkt vor Gebrauch ansetzen
<u>Fast-Red-Stammlösung</u>	1 mg/ml	Fast Red, in ddH ₂ O direkt vor Gebrauch ansetzen
<u>KI/I₂-Lösung (15 ×)</u>	6 g 5 g	Iod Kaliumiodid in 120 ml ddH ₂ O lösen
<u>K-Phosphatpuffer (1 M) pH 7,0</u>	0,385 M 0,615 M	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ pH 7,0 überprüfen

Material

<u>Laufpuffer-Konzentrat pH 5,0</u> (0,5 M Na-Acetatpuffer)	10,47 ml/l 26 g/l	Eisessig (0,183 M) Natriumacetat (0,317 M) pH 5,0 überprüfen
<u>Laufpuffer pH 5,0</u> (50 mM Na-Acetatpuffer)		Verdünnung Laufpuffer-Konzentrat 1:10 mit ddH ₂ O
<u>Molybdatlösung</u>	15 g/l 55 ml/l	NH ₄ -heptamolybdat × 4 H ₂ O 10 M H ₂ SO ₄ bei RT im Dunkeln 1 Monat haltbar
<u>Monochloracetat pH 7,0</u>	3 M	Chloressigsäure pH 7,0 mit 10 M und 0,5 M NaOH sterilfiltrieren (hitzeempfindlich)
<u>MUF-Acylester-Stammlösung</u>	5 mg/ml	MUF-Acylester in DMSO/Isopropanol (1:1)
<u>α-Naphthylacetat-Stammlösung</u>	20 mg	α-Naphthylacetat in 5 ml Aceton vorlösen 45 ml ddH ₂ O zugeben direkt vor Gebrauch ansetzen
<u>Na-Phosphatpuffer (1 M) pH 8,0</u>	0,068 M 0,932 M	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ pH 8,0 überprüfen
<u>Na-Phytat-Substratlösung</u>	8,4 g/l	Na-Phytat × 12,5 H ₂ O (bei Gehalt H ₂ O 10 - 13 mol) gelöst in Acetatpuffer pH 5,5 mit Essigsäure (100 %) 50 ml direkt vor Gebrauch ansetzen
<u>Phenolrot (Stammlösung)</u>	5 mg/ml	Phenolrot Na-Salz, in ddH ₂ O sterilfiltrieren
<u>Phenyllessigsäure-Ester-Stammlösung</u>	10 %	Phenyllessigsäure-Ester in Ethanol mit 10 % Triton X-100
<u>pNP-Acylester-Stammlösung</u>	5 mM	pNP-Acylester in DMSO

Material

<u>pNP-Acylester-Substratlösung</u>	1 VT	pNP-Acylester-Stammlösung
	9 VT	50 mM K-Phosphatpuffer pH 7,0
	0,5 %	falls Lösung trüb: Triton X-100
		kalt stellen direkt vor Gebrauch ansetzen
<u>0,9 % (w/v) Saline</u>	9 g/l	NaCl in ddH ₂ O
<u>20 % (w/v) SDS</u>	20 g	SDS in 100 ml ddH ₂ O lösen
<u>TAE-Puffer (50 ×)</u>	242 g/l	Tris-Base
	57,1 ml/l	Eisessig
	50 mM	EDTA pH 8,0
<u>TE-Puffer pH 7,5</u>	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA pH 8,0
<u>TFB1-Puffer</u>	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl ₂
	15 %	Glycerin pH 5,8
<u>TFB2-Puffer</u>	10 mM	Na-MOPS
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
	15 %	Glycerin pH 7,0
<u>Theorell-Stenhagen-Puffer</u>	33 mM	Zitronensäure
	33 mM	Phosphorsäure
	3,54 g/l	Borsäure (57 mM)
	343 ml/l	1 N NaOH
		pH 3 - 11 mit konzentrierter Salz- oder Phosphorsäure
<u>Tris-HCl pH 7,5 / 8,0 / 8,5</u> (Stammlösung)	1 M	Tris-Base pH 7,5 bzw. 8,0 bzw. 8,5 mit HCl

Material

<u>Tris-Puffer pH 7,1 / pH 7,5</u> (Chloriddetektion)	50 mM	Tris-Base pH 7,1 bzw. 7,5 mit H ₂ SO ₄
<u>10 % (w/v) Triton X-100</u>	10 g	Triton X-100 in 100 ml ddH ₂ O lösen
<u>X-Butyrat-Stammlösung</u> (X-Butyrat-Assay)	5 mg/ml	X-Butyrat in DMSO/Isopropanol (1:1)
<u>Zhou-Extraktionspuffer</u> (Zhou <i>et al.</i> , 1996)	100 mM 100 mM 100 mM 1,5 M 1 %	Tris-HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 Na-Phosphatpuffer pH 8,0 NaCl CTAB (aus 10%iger Lösung)

2.6 Medien

Die flüssigen Nährmedien wurden autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für Agarplatten wurde den Lösungen zusätzlich 15 g/l Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden diese auf ca. 50 °C abgekühlt und nach Zugabe weiterer Medienzusätze (z. B. Antibiotika) in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden in Plastiktüten bei 4 °C gelagert.

96er-Mikrotiterplatten wurden bei der BASF mit Hilfe eines Dilutors mit LB-Agar befüllt und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

2.6.1 Allgemeine Nährmedien

<u>LB-Medium</u>	10 g/l 5 g/l 10 g/l	Pepton Hefeextrakt NaCl pH 7,5 mit 5 M NaOH
<u>LB I (LB ohne NaCl)</u>	10 g/l 5 g/l	Pepton Hefeextrakt pH 7,0 mit 5 M NaOH
<u>LB II (halbkonzentriertes LB)</u>	5 g/l 2,5 g/l	Pepton Hefeextrakt pH 7,0 mit 5 M NaOH

<u>LB mit 5 % DMSO</u>	10 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	950 ml	ddH ₂ O
		pH 7,5 mit 5 M NaOH
	50 ml	DMSO (entspricht 5 % v/v)

<u>SOC-Medium</u>	20 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:	
10 mM	MgCl ₂	
10 mM	MgSO ₄	
20 mM	Glucose	

2.6.2 Screening-Medien

Allen Screening-Medien (mit jeweils 15 g/l Agar) wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C das entsprechende Antibiotikum und zusätzlich IPTG (0,1 mg/ml) zugegeben.

Kombinierte X-Phosphat-Magermilch-Platten

nach Gerhardt *et al.* (1981) und Calamia und Manoil (1990)

Nutrient Agar:

5 g/l	Pepton
3 g/l	Fleischextrakt
	pH 7,0 mit 5 M NaOH

nach dem Autoklavieren steril zugeben:

pro 1 l: + 200 ml	sterile Magermilch (100 g/l)
40 µg/ml	X-Phosphat (20 mg/ml)
	direkt vor Gebrauch ansetzen

Stammlösung Magermilch:

10 g/100 ml	BBL Skim Milk Powder in ddH ₂ O
	vollständig lösen,
	15 min bei 121 °C autoklavieren

X-Phosphat-Platten

Nutrient Agar:

5 g/l Pepton
3 g/l Fleischextrakt
pH 7,0 mit 5 M NaOH

nach dem Autoklavieren steril zugeben:

40 µg/ml X-Phosphat (20 mg/ml)
direkt vor Gebrauch ansetzen

pH-Indikator-Platten

nach Holloway *et al.* (1998) und Chang *et al.* (1999)

2 g/l Pepton
1 g/l Hefeextrakt
pH 8,2 mit 5 M NaOH

nach dem Autoklavieren steril zugeben:

15 mM Monochloracetat (Substrat)
pH-Indikatoren, s. a) oder b)

a) B-Platten:

50 µg/ml Bromthymolblau

b) BR-Platten:

13 µg/ml Bromthymolblau

13 µg/ml Phenolrot

Stärke-Platten

LB-Medium pH 7,0
10 g/l lösliche Kartoffelstärke (1 % w/v)

Tributylin-Platten

LB-Medium pH 7,0
10 g/l Tributyrin (1 % w/v)
mit Ultra-Turrax homogenisieren

nach dem Autoklavieren steril zugeben:

27 µg/ml X-Gal

2.7 Antibiotika und Medienzusätze

In Wasser gelöste Antibiotika und sonstige Medienzusätze wurden nach der Sterilfiltration (0,2 µm) als Stammlösung in Aliquots bei -20 °C gelagert und den Medien nach Bedarf jeweils frisch zugesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	30 - 50 mg/ml in ddH ₂ O	30 - 50 µg/ml
Streptomycin	10 mg/ml in ddH ₂ O	50 µg/ml

Tabelle 4: Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Bromthymolblau	5 mg/ml in ddH ₂ O, Lagerung RT	13 bzw. 50 µg/ml
IPTG	200 mg/ml (840 mM) in ddH ₂ O	0,1 mg/ml (0,42 mM)
Phenolrot	5 mg/ml in ddH ₂ O, Lagerung RT	13 bzw. 50 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml (49 mM) in Dimethylformamid	27 µg/ml (65 µM)
X-Phosphat	20 mg/ml in ddH ₂ O, frisch ansetzen	40 µg/ml
Monochloracetat	3 M Chloressigsäure in ddH ₂ O, pH 7,0 mit 10 M/0,5 M NaOH, sterilfiltriert	15 mM

2.8 Bakterienstämme

Tabelle 5: Verwendete *E.-coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz/Herkunft
DH5 α	ElectroMAX DH5 α -E Cells / MAX Efficiency DH5 α Competent Cells F ⁻ Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>gal phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
HB101	F ⁻ <i>thi-1 hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (str ^r) <i>xyl-5 mtl-1</i>	Promega, Mannheim
Klon 1164	HB101 mit 2-Haloacetat-Dehalogenase II (DehCII) aus <i>Pseudomonas sp.</i> CBS3, kloniert in Cosmidvektor pMMB33 (<i>kan^r</i>) (Insert >30kb)	Prof. Rudolf Müller, Universität Hamburg; (Mörsberger, 1990); (Frey <i>et al.</i> , 1983)

2.9 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe [bp]	Genotyp/Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pJOE930	3040	<i>amp^r lacPOZ'</i> und <i>lacPOZ''</i> ColE1	(Altenbuchner <i>et al.</i> , 1992)
pBluescript SK+	2958	<i>amp^r lacPOZ'</i> ColE1	Stratagene Europe, Amsterdam (NL) (Short <i>et al.</i> , 1988)

3 Methoden

3.1 Kultivierung, Vereinzlung und Lagerung von Bakterien

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von Einzelansätzen

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen wurden je nach Bedarf 5 - 20 ml Nährmedium mit einer Einzelkolonie beimpft und 12 - 15 h bei 37 °C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Diese Kulturen sind bei 4 °C einige Tage haltbar.

Zur mittelfristigen Aufbewahrung sowie zur Vereinzlung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen bzw. ausplattiert und mindestens über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm umwickelt und waren so bei 4 °C ca. zwei Monate haltbar.

Zur langfristigen Lagerung wurden Stammkulturen angelegt. Dazu wurden 0,5 ml einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur mit 0,5 ml sterilem Glycerol gemischt und bei -70 °C gelagert. Diese Glycerinkulturen sind mehrere Jahre haltbar.

3.1.2 Kultivierung und Lagerung in Mikrotiterplatten

Für die Vereinzlung und Kultivierung von transformierten Bakterien in 96er-Mikrotiterplatten wurden die Bakterienkolonien einzeln mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Agarplatte gepickt und in die mit jeweils 200 - 250 µl flüssigem LB-Medium befüllten Nöpfchen der Mikrotiterplatte überführt. Diese wurde anschließend mit Adhäsivfolie (Greiner) verschlossen und mindestens zwei Tage bei 37 °C inkubiert.

Zur mittelfristigen Lagerung über ca. drei Monate wurden diese vereinzelt Klone mittels eines 96-Nadel-Replikators in mit LB-Agar befüllte 96er-Mikrotiterplatten überstempelt, nach 2-tägiger Inkubation bei 37 °C mit einem Plastikdeckel und Parafilm verschlossen und bei 4 °C gelagert.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Klone in je 200 µl LB-Medium mit 5 % DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Alufolie (Greiner) verschlossen und bei -70 °C gelagert.

3.1.3 Expression klonierter Enzyme

Für die induzierte Kultivierung von Zellen in einer 96er-Mikrotiterplatte wurde diese pro Nöpfchen mit jeweils 200 - 250 µl des entsprechenden Mediums mit Antibiotikum und Induktor (s.u.) befüllt. Anschließend wurde das Medium 1:20 bis 1:100 mit

ÜN-Bakterienkulturen oder durch Überstempeln aus bewachsenen Lagerplatten beimpft und mindestens über Nacht bei 37 °C ohne oder mit Schütteln (ca. 100 rpm) inkubiert.

E. coli DH5 α mit Plasmid pJOE930 wurde während des Wachstums in LB_{Amp} durch Zusatz von 0,42 mM IPTG induziert; den Kulturen des Klons 1164 in LB_{Kan} wurden 15 mM MCA zur Induktion zugesetzt.

Einzelne Flüssigkulturen (5 ml) wurden ca. 3 h nach dem Beimpfen aus Stammkulturen oder von Einzelausstrichen durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm weiter inkubiert.

3.1.4 Zentrifugation von Zellen

Zum Pelletieren von Zellen wurden Bakterienkulturen in 96er-Mikrotiterplatten 15 min bei 3000 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach einem Zellaufschluss wurde die Zentrifugationszeit auf 30 bis 45 min erhöht.

Bakterienkulturen in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen wurden 5 min bei 13000 g und 4 °C abzentrifugiert. Die Zentrifugation nach einem Zellaufschluss in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen erfolgte 30 min bei 10000 g und 4 °C.

3.2 Isolierung und Reinigung von DNA

Zur Isolierung kleinerer und größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden das *QIAprep Spin Miniprep Kit* und das *Qiagen Plasmid Maxi Kit* nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

Die Aufreinigung genomischer DNA aus Bodenproben erfolgte mittels spezieller Methoden (s. u.).

3.2.1 Phenolextraktion der DNA

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen aus einer DNA-Lösung wurde ein Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zugegeben, kurz gemischt und 1 min bei 13000 g abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und erneut extrahiert, bis keine weiße Protein-Interphase mehr zu sehen war. Anschließend wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 extrahiert. Die DNA-Lösung wurde anschließend mit Ethanol oder Isopropanol gefällt (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.2 Ethanol- bzw. Isopropanolfällung der DNA

Zur Fällung mit Ethanol wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat pH 5,2 oder 2,0 - 2,5 M Ammoniumacetat (Endkonzentration) und dem 2,5fachen Volumen Ethanol (96 %, -20 °C) versetzt, mindestens 2 - 18 h bei -20 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Fällung mit Isopropanol erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol und sofortige Zentrifugation 30 min mit 13000 g bei 4 °C.

Anschließend wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 15 min zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 10 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen.

3.2.3 Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA über Spin-Säulen

Zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA-Fragmenten bis 10 kb (z. B. nach enzymatischen Modifikationen wie Restriktionsverdau oder Behandlung mit Alkalischer Phosphatase) wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte mit mindestens 40 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5. Alternativ wurden statt der *QIAquick Spin Columns* auch *QIAprep Spin Columns* verwendet, wobei die DNA dann mit 50 µl Puffer eluiert wurde.

3.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Bodenproben, modifiziert nach Zhou et al. (1996)

Vor dem eigentlichen Aufschluss wurde das Bodenmaterial mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 drei Mal gewaschen (Zentrifugation 10 min, 1500 g). Anschließend wurde 1 g Bodenprobe mit 2,6 ml Zhou-Extraktionspuffer versetzt, durch Vortexen gut gemischt und drei Gefrier-Tau-Zyklen durch abwechselnde Inkubation in flüssigem Stickstoff und im 65°C-Wasserbad unterworfen. Nach Abkühlen der Probe auf ca. 37 °C wurden 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 300 µl 20 % SDS dazupipettiert und der Ansatz 2 h bei 65 °C im Wasserbad inkubiert, wobei alle 15 - 20 min durch Schwenken gemischt wurde. Nach Zentrifugation 10 - 15 min bei 4000 g wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet durch Resuspendieren in 2 ml Zhou-Extraktionspuffer, 10-minütige Inkubation bei 65 °C und Zentrifugation (10 min, 4000 g) erneut extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt, mit 1/10 Volumen 10 % CTAB versetzt, gemischt und erneut 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) bis zur vollständigen Entfernung der Interphase extrahiert (Zentrifugation 10 min, 4000 g). Die wässrige Phase wurde in 1-ml-Portionen aufgeteilt, jeweils mit 0,7 Volumen Isopropanol 1 - 2 h bei RT gefällt und 30 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit

70 % Ethanol gewaschen, 10 min bei 50 °C getrocknet und in jeweils 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen.

3.2.5 Aufreinigung der isolierten Boden-DNA

Um die nach obiger Extraktion in Form von Huminstoffen enthaltenen Verunreinigungen zu entfernen, wurde die DNA-Lösung anschließend durch Gelfiltration mit zentrifugierbaren Chroma Spin+TE-1000-Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Vor der Aufreinigung wurde die Säule mit 10 mM Tris-HCl pH 8,5 equilibriert; anschließend wurden zwischen 70 und 100 µl Probe aufgegeben.

3.3 Bestimmung der Konzentration von DNA

3.3.1 Spektrophotometrisch

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde im Allgemeinen spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer 70-µl-Mikroquarzküvette (Hellma) bestimmt. Dabei entspricht $\Delta E_{260} = 1,0$ einem Gehalt doppelsträngiger DNA von ca. 50 µg/ml und einzelsträngiger DNA von ca. 33 µg/ml.

3.3.2 Fluorimetrisch mit SYBR Green I

Bei geringer Konzentration oder Verunreinigung der DNA durch Huminstoffe wurde die Quantifizierung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I in Mikrotiterplatten durchgeführt (Vitzthum *et al.*, 1999; Vitzthum *et al.*, 2001).

Dazu wurde in einer 96er-Mikrotiterplatte die Probe in TE-Puffer pH 7,5 so verdünnt, dass in 50 µl Probenvolumen zwischen 0,3 und 5 µg/ml DNA enthalten waren (meist 1 - 5 µl Probe). Anschließend wurden 200 µl SYBR-Green-I-Lösung (Verdünnung 1:5000 in TE-Puffer pH 7,5, Endverdünnung 1:6250) zugefügt und 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Fluorimeter des Typs *Spectrafluor Plus* (Tecan) bei 485 nm (Anregung) bzw. 535 nm (Emission).

Zur Erstellung von Kalibriergeraden wurden aus einer Stammlösung von Kalbsthymus-DNA (100 µg/ml in TE-Puffer pH 7,5) verschiedene Verdünnungsstufen (0,0 / 0,1 / 0,3 / 0,7 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0 / 5,0 µg/ml) in TE-Puffer pH 7,5 hergestellt und gemeinsam mit den Proben vermessen.

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA im wässrigen Rohextrakt einer aufgeschlossenen Bodenprobe wurde diese so verdünnt, dass ihre Absorption bei 535 nm und 485 nm kleiner als 0,05 war (ca. 1:30 bis 1:50) (Zipper *et al.*, 2003).

3.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele in 1 × TAE-Puffer gegossen, die je nach Größe und Dicke pro Geltasche mit 10 - 50 µl Probevolumen beladen werden konnten. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit je 1/10 Volumen 10 × Auftragspuffer versetzt. Als Größenmarker wurde 1-kb-, 1-kb-Plus- oder High-Mass-DNA-Leiter verwendet. Die Elektrophorese wurde in Agagel-Kammern (Biometra) bei 80 - 90 V in 1 × TAE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 10 - 20 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (1 µg/ml in 1 × TAE mit 10 mM EDTA pH 8,0) gefärbt und 15 - 30 min in ddH₂O entfärbt. Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht im IDA Gel Documentation System (Raytest).

3.5 Gelelution von DNA-Fragmenten

Das zu isolierende DNA-Fragment bzw. der DNA-Größenbereich wurde auf dem UV-Leuchttisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zum analytischen Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen wurden 0,2 - 0,5 µg DNA in 20 µl Endvolumen im enzyspezifischen Puffer mit 0,1 µg/µl BSA bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für 1 - 3 h mit 5 - 10 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA inkubiert. Bei hitzeempfindlichen Enzymen wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen bei 65 °C abgestoppt.

Für präparative Zwecke wurden in maximal 120 µl Endvolumen bis zu 0,1 µg/µl DNA mit 6 - 10 U Enzym pro 1 µg DNA 1 - 3 h bei der optimalen Temperatur verdaut.

Für einen Partial- bzw. Totalverdau genomischer DNA wurde die Inkubationszeit je nach verwendetem Enzym auf ca. 15 min reduziert bzw. auf 16 h erhöht.

Beim Verdau genomischer DNA aus Boden wurden maximal 0,03 µg DNA pro 1 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die inhibierende Wirkung von eventuell noch vorhandenen Huminsäuren kann durch Zugabe von 10 µg/µl (final) nicht-acetyliertem BSA verringert werden (persönliche Mitteilung Hubert Zipper). Der Restriktionsansatz wird dazu in Gegenwart von nicht-acetyliertem BSA vor Zugabe des Restriktionsenzym 5 min auf Eis inkubiert.

3.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase

Einem Restriktionsverdau oder aufgereinigter DNA, die optional zuvor 5 min bei 60 °C erhitzt worden war, wurden pro pmol DNA-Enden 0,01 U CIAP (0,01 U/μl verdünnt in 1 × CIAP-Reaktionspuffer) zugegeben und in 50 μl Endvolumen mit 1 × CIAP-Reaktionspuffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe der gleichen Menge CIAP und Fortsetzung der Inkubation weitere 30 min wurde die Mischung 10 - 15 min bei 65 - 70 °C erhitzt. Die weitere Aufreinigung erfolgte über *QIAquick Spin Columns* und/oder durch Gelelektion.

3.8 Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurden 25 - 80 ng linearisierte Vektor-DNA mit Insert-DNA in 3- bis 5-fachem molarem Überschuss in 10 - 20 μl Endvolumen in 1 × Ligasepuffer mit 1 μl T4-DNA-Ligase (3 U/μl) über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei 21 °C (T3 Thermocycler) inkubiert.

3.9 Transformation

Für Transformationen wurden entweder käuflich erworbene *E. coli* „MAX Efficiency DH5α Competent Cells“ oder „ElectroMAX DH5α-E Cells“ von Gibco BRL Life Technologies verwendet oder kompetente *E. coli* DH5α, die nach dem Hanahan-Protokoll selbst hergestellt worden waren.

3.9.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach Hanahan

125 ml LB-Medium wurden mit 1 % einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α inokuliert und bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4 - 0,6 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis gestellt, anschließend 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 30 ml eisgekühltem TFB1-Puffer resuspendiert. Nach 1 h auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml eisgekühltem TFB2-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquots zu je 50 oder 100 μl bei -70 °C eingefroren (Hanahan, 1983).

3.9.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

In vorgekühlten Reaktionsgefäßen wurde zu 50 μl kompetenten Zellen die zu transformierende DNA, meist 1 μl Ligationsansatz bzw. 1 - 10 ng DNA, zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen 45 sec bei 42 °C, anschließend

nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl SOC-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C geschüttelt (200 rpm) und danach zu je 100 µl auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Je nach Bedarf wurde die Zellsuspension zuvor entsprechend verdünnt oder die Zellen schonend abzentrifugiert (2 min, 1000 g) und das gesamte Pellet in 100 µl resuspendiert und ausplattiert.

3.9.3 Elektroporation

Alle Elektroporationen wurden mit käuflichen „ElectroMAX DH5 α -E Cells“ von Gibco BRL Life Technologies folgendermaßen durchgeführt: In vorgekühlten 1,5-ml-Reaktionsgefäßen wurde zu 40 µl kompetenten Zellen 1 µl eines 20-µl-Ligationsansatzes gegeben, vorsichtig gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite, Bio-Rad) pipettiert und im Elektroporator (MicroPulser, Bio-Rad) unter Anwendung des voreingestellten Programms Ec1 einmal gepulst; dabei sollte die Abklingzeit bei ca. 4,5 - 5,0 ms liegen. Nach sofortiger Entnahme der Küvette wurde den Zellen umgehend 1 ml SOC-Medium (RT) zugegeben, vorsichtig gemischt und die Zellsuspension in einem 15-ml-Reaktionsgefäß 1 h bei 37 °C und 200 - 220 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektionsmedium (9,4 cm \varnothing) zu je 100 µl, auf größeren Platten (14,5 cm \varnothing) zu je 200 - 330 µl und auf großen Platten im Format 24,5 \times 24,5 cm (Corning Life Sciences) zu je 1 ml bzw. maximal 3 ml ausplattiert. Bei Bedarf wurde der gesamte Transformationsansatz zuvor pelletiert, in der entsprechenden Menge Flüssigkeit resuspendiert und auf einer einzigen Selektionsplatte ausplattiert.

3.10 DNA-Sequenzierung und Analyse der Sequenzdaten

Für die Sequenzierung von rekombinanten Klonen wurde die Plasmid-DNA nach dem Prinzip des *primer walking* sequenziert (Sanger *et al.*, 1977).

Mit Hilfe der Programme *SeqMan II* und *EditSeq* aus dem *Lasergene99*-Programmpaket Version 4.06 (DNASTAR, Inc., Wisconsin, USA) wurden die so erhaltenen Sequenzabschnitte zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt und editiert.

Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des PEDANT-Software-Systems (**P**rotein **E**xtraction, **D**escription and **A**nalysis **T**ool) (Frishman *et al.*, 2001). DNA- und Proteinsequenzen werden dabei unter Anwendung verschiedener bioinformatischer Methoden automatisch analysiert und Genprodukte sowohl funktionell als auch strukturell nach multiplen Kategorien klassifiziert. Zur Analyse und Klassifizierung der Sequenzen wird auf folgende Datenbanken und Algorithmen zugegriffen (s. auch Frishman *et al.*, 2001):

Tabelle 7: Datenbanken des PEDANT-Systems (Frishman *et al.*, 2001)

Anwendung	Inhalt/Funktion	Referenzen
Blocks	Datenbank von Proteinfamilien; besteht aus Blocks: multiple <i>Alignments</i> konservierter Sequenz-Abschnitte ohne Lücken	(Henikoff und Henikoff, 1994) (Henikoff <i>et al.</i> , 2000)
COGs	<i>Cluster of orthologous groups of proteins</i> : Gruppe ähnlicher Proteine gleicher Funktion aus unterschiedlichen Spezies	(Tatusov <i>et al.</i> , 1997) (Tatusov <i>et al.</i> , 2001)
EMBL	Nukleotid-Sequenz-Datenbank	(Stoesser <i>et al.</i> , 2003)
MIPS Functional Categories	automatische Einteilung in funktionelle Kategorien, basierend auf Homologie	(Mewes <i>et al.</i> , 1997)
PDB	experimentell bestimmte Daten zur 3D-Struktur von Makromolekülen	(Berman <i>et al.</i> , 2000)
Pfam	Proteindomänen-Familien	(Bateman <i>et al.</i> , 2002)
PIR-PSD	annotierte Protein-Sequenz-Datenbank	(Wu <i>et al.</i> , 2002)
PROSITE	Datenbank von Proteinfamilien und Domänen; besteht aus biologisch signifikanten Bereichen, Sequenzmustern und Profilen	(Sigrist <i>et al.</i> , 2002)
SCOP	Klassifikation der Proteine bekannter Struktur (PDB) im Hinblick auf strukturelle und evolutionäre Verwandtschaft	(Murzin <i>et al.</i> , 1995)
STRIDE	Vorhersage Sekundärstruktur	(Frishman und Argos, 1995)
SWISS-PROT	annotierte Protein-Sequenz-Datenbank	(Boeckmann <i>et al.</i> , 2003)
TrEMBL	computer-annotierte Ergänzung zu SWISS-PROT	(Boeckmann <i>et al.</i> , 2003)
PSI-BLAST und BLASTP	<i>Alignment</i> -Algorithmen	(Altschul <i>et al.</i> , 1997)

Eine vollständige Übersicht aller verwendeten Datenbanken und bioinformatischen Methoden findet sich unter <http://pedant.mips.biochem.mpg.de/about.html>.

Die Nukleotidsequenzen der sequenzierten Inserts wurden bei der Nukleotidsequenz-Datenbank *GenBank* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA) (Benson *et al.*, 2004) hinterlegt.

Multiple und paarweise Sequenz-*Alignments* wurden mit Hilfe des Programms ClustalW (1.82) (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt.

3.11 Herstellung von Zellextrakten

Der Aufschluss von Zellen erfolgte bei Einzelansätzen in der Kugelmühle oder mit Lysozym; im Mikrotiterplattenformat wurde ein optimierter Lysozymbaufschluss angewendet.

3.11.1 Aufschluss mit der Kugelmühle

Zur Gewinnung von Zellextrakten für eine enzymatische Umsetzung wurde 1 ml einer induzierten Bakterienkultur abzentrifugiert, mit 1 ml Tris-Puffer gewaschen und optional das Pellet über Nacht bei -70 °C eingefroren. Nach Zugabe von ca. 200 µl Spezial-Mahlperlen (Claus) sowie 200 µl Tris-Puffer wurden die Zellen in einer Kugelmühle (MM 200, Retsch) 2 min lang aufgeschlossen. Der durch 2-malige Zentrifugation gewonnene Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet und bei 4 °C gelagert.

3.11.2 Optimierter Aufschluss mit Lysozym (MTP-Format)

Die in je 200 µl Medium in einer 96er-Mikrotiterplatte kultivierten Bakterien wurden abzentrifugiert und die Zellpellets mit je 100 - 200 µl Tris-Puffer (pH 7,1 oder 7,5) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen der Überstände wurden die Pellets mindestens 18 h bei -70 °C gelagert. Anschließend wurden je 200 µl Tris-Puffer (pH 7,5) mit 1 mg/ml Lysozym sowie je 50 µg/ml Kanamycin und Streptomycin zugegeben und bei 37 °C unter Schütteln mit 150 - 200 rpm eine Stunde lang inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Überstände in eine frische Mikrotiterplatte überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei Verwendung des Aufschlusspuffers ohne Lysozym wurden die Ansätze statt einer Stunde mindestens 5 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert, um eine vollständige Abtötung aller Zellen durch die Antibiotika zu gewährleisten.

Beim Aufschluss von je 1 ml Flüssigkultur in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden die Zentrifugationsparameter entsprechend angepasst (s. 3.1.4).

3.12 Enzymatische Umsetzungen mit chloriertem Substrat

Alle Umsetzungen wurden mit induzierten Bakterienkulturen (s. 3.1.3) durchgeführt.

3.12.1 Umsetzung mit ganzen Zellen in Kulturmedium

Die Bakterien wurden direkt in den abgewandelten LB-Medien LB I und LB II mit 15 mM MCA als Substrat kultiviert. Die Detektion einer Dehalogenase-Aktivität erfolgte nach dem Abzentrifugieren der Zellen entweder durch elektrochemische Bestimmung des

Chloridgehalts in den abgenommenen Überständen (s. 3.15.7.3 oder 3.15.7.4) oder direkt durch Zugabe von pH-Indikatoren und Messung des pH-Wertes.

3.12.2 Umsetzung mit ganzen Zellen in Puffer

Die Bakterien wurden in LB-Medium ohne Substrat kultiviert.

Bei der Durchführung in 96er-Mikrotiterplatten wurden die Zellen mit je 100 - 200 µl Tris-Puffer gewaschen und anschließend die Zellpellets in je 100 - 200 µl Tris-Puffer mit 6 - 15 mM MCA als Substrat 1 - 4 h bei 37 °C inkubiert (falls mit Schütteln: 160 - 200 rpm). Die elektrochemische Chloriddetektion erfolgte nach dem Abzentrifugieren der Zellen in den Überständen; pH-Indikatoren wurden direkt nach der Umsetzung zugegeben.

In 1,5-ml-Reaktionsgefäßen wurde für eine Umsetzung 1 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und nach dem Waschen das Zellpellet in 0,2 - 1,0 ml Tris-Puffer mit 10 - 15 mM MCA 1 h bei 30 - 37 °C mit 200 - 400 rpm inkubiert. Die Chloriddetektion bzw. Sichtbarmachung der Änderung des pH-Wertes erfolgten anschließend in den Überständen.

3.12.3 Umsetzung nach Zellaufschluss

Der Zellaufschluss der induzierten Kulturen in Mikrotiterplatten erfolgte wie in 3.11.2 beschrieben. Einzelansätze wurden alternativ mit der Kugelmühle aufgeschlossen (3.11.1). Die Kontrollproben wurden vor der Reaktion 10 min bei 98 °C denaturiert. Für die Umsetzung wurden 100 - 120 µl des Zellextraktes 1 h bei 37 °C mit 6 mM MCA als Substrat inkubiert. Die Chloridbestimmung bzw. Überprüfung der pH-Absenkung wurde anschließend direkt in diesen Ansätzen durchgeführt.

3.12.4 Aufschluss und Umsetzung für den Testlauf der Halogenid-Screening-Anlage

Nach Kultivierung der vereinzelt Klone in Mikrotiterplatten (s. 3.1.3) wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet nach Waschen mit Tris-Puffer mindestens 15 h bei -70 °C eingefroren; *E. coli* DH5α mit pJOE930 (Negativkontrolle) bzw. Klon 1164 (Positivkontrolle) wurden in separaten Mikrotiterplatten auf die gleiche Weise behandelt.

Die Zellpellets wurden anschließend in jeweils 130 µl Tris-Puffer (pH 7,1) mit 15 mM MCA vier Stunden bei 37 °C inkubiert (s. 3.12.2). Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Tris-Puffer mit je 100 µg/ml Kanamycin und Streptomycin sowie 15 mM MCA wurden die Zellen weitere 2,5 - 4,5 h bei 30 - 37°C auf dem MTP-Schüttler inkubiert und nach Lagerung über Nacht bei -20 °C nochmals durch Zugabe von 0,25 - 0,5 mg/ml Lysozym während 1-stündigem Schütteln (150 rpm) bei 37 °C aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Überstand (250 - 260 µl) in frische Mikrotiterplatten überführt.

3.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in abgewandelter Form nach Bradford (1976) als Mikrotiterplatten-Assay.

Zur Herstellung der Farbreagenzlösung wurde Bio-Rad Protein Assay Lösung 1:5 mit Wasser frisch verdünnt. 160 µl dieser Farbreagenzlösung wurden in einer Mikrotiterplatte mit 40 µl Probe gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde im Spectramax Plus die Absorption bei 595 nm gemessen und anhand einer Eichkurve (BSA in 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0 - 70 µg/ml) die Konzentration der Probe bestimmt.

3.14 Bestimmung der Aktivität von lipolytischen Enzymen

Nach ÜN-Kultivierung der zu testenden Bakterien mit Induktion (s. 3.1.3) wurden die Zellen abzentrifugiert und zu 100 mg/ml in 0,9 % steriler Saline resuspendiert. Als Probenlösung wurden in den nachfolgend beschriebenen Assay-Verfahren sowohl die resuspendierten Zellen als auch der zellfreie Kulturüberstand eingesetzt.

3.14.1 pNP-Assay

Bei diesem Nachweis wird das nach enzymatisch katalysierter Spaltung von chromogenen ρ -Nitrophenyl-Acylestern freigesetzte gelbe ρ -Nitrophenol direkt bei 405 nm spektrophotometrisch bestimmt (Purdy und Kolattukudy, 1973).

Die Substratlösung des jeweiligen pNP-Acylesters wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt (s. 2.5). In einer 96er-Mikrotiterplatte wurden 180 µl dieser pNP-Substratlösung mit 20 µl Probenlösung gemischt; weitere Verdünnungsstufen der Probenlösung wurden durch sequentielle Verdünnung mit Substratlösung in der Mikrotiterplatte angesetzt (Endvolumen jeweils 200 µl). Unmittelbar danach wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm über einen Zeitraum von 20 min verfolgt.

Zur Untersuchung der Substratspezifität eines Enzyms wurden verschiedene pNP-Acylester (-Butyrat, -Laurat, -Palmitat) verwendet.

3.14.2 MUF-Assay

Die Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf der Detektion der Fluoreszenz von 4-Methylumbelliferon, das als fluoreszierendes Produkt durch enzymatische Hydrolyse aus nicht-fluoreszierenden 4-Methylumbelliferyl-Acylestern freigesetzt wird (Jacks und Kircher, 1967).

Zu 100 µl Probenlösung wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte 10 µl K-Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µl Triton X-100 (10%ig) und 10 µl MUF-Acylester-Stammlösung (s. 2.5)

pipettiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 330 nm (Anregung) bzw. 420 nm (Emission).

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurden die MUF-Derivate -Butyrat, -Nonanoat und -Palmitat getestet.

3.14.3 Assay mit X-Butyrat

Nach enzymatischer Hydrolyse der Esterbindung wird das aus X-Butyrat freigesetzte Indoxylmolekül durch Luftsauerstoff zu blauem Indigo umgewandelt (Holt und Withers, 1958), das bei 620 nm spektrophotometrisch detektiert wird.

Die Durchführung des Assays erfolgte analog zum MUF-Assay (3.14.2) mit 10 µl X-Butyrat-Stammlösung (s. 2.5) und Messung der Absorption bei 620 nm.

3.14.4 α -Naphthyl-Assay

Bei diesem Nachweis wird das durch Esterhydrolyse aus α -Naphthol-Acylestern freigesetzte α -Naphthol durch Zugabe eines Azobildners wie z. B. Fast Red und Messung der Absorption des gebildeten Chromophors nachgewiesen (Gundlach und Muhlhausen, 1980).

Zu 100 µl Probenlösung wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte 10 µl K-Phosphatpuffer (pH 7,0) sowie 50 µl α -Naphthylacetat-Stammlösung (s. 2.5) pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Fast-Red-Stammlösung wurde die Reaktion gestartet. Die Detektion der Absorption des gebildeten Chromophors erfolgte bei 492 nm.

3.14.5 Aktivitätstest mit Esterderivaten der Phenylelessigsäure

Als weitere Esterase-Substrate wurden Ethyl-, Propyl- und Hexyl-Phenylacetat verwendet. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde die vorgelegte Probenlösung (maximal 750 µl) mit ddH₂O auf 780 µl aufgefüllt, 100 µl K-Phosphatpuffer (pH 7,0) und 20 µl Stammlösung des jeweiligen Phenylelessigsäure-Esters hinzugegeben und der Reaktionsansatz bei 28 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1 M HCl abgestoppt. Mittels HPLC (bei Ethyl-Phenylacetat) bzw. Gaschromatographie (bei Hexyl- und Propyl-Phenylacetat) wurde der Verlust an Ester bzw. die infolge der Esterhydrolyse entstehende Säure detektiert.

3.15 Screeningverfahren und enzymatische Assays

3.15.1 Replikaplattierung auf feste Screening-Medien

Nach der Kultivierung in 96er-Mikrotiterplatten (s. 3.1.2) wurden rekombinante Bakterien mit Hilfe eines 96-Nadel-Replikators auf die Screening-Medien (s. 2.6.2) im Format 12 × 12 cm überstempelt. Anschließend wurden die Platten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert (s. u.).

3.15.2 Tributyrin-Assay

Zur qualitativen Detektion lipolytischer Aktivität wurden die Zellen direkt auf Tributyrin-Platten (s. 2.6.2) ausgestrichen oder ausplattiert und ÜN bei 37 °C, anschließend bei RT oder 4 °C weiter inkubiert. Positive Kolonien wurden durch Bildung eines klaren Hofes gegenüber dem trüben Hintergrund identifiziert (Lawrence *et al.*, 1967).

3.15.3 Phosphatase-Assay

Die zu testenden Klone wurden auf kombinierte X-Phosphat-Magermilchplatten (s. 2.6.2) entweder überstempelt (s. 3.15.1) oder ausgestrichen und mindestens zwei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert. Positive Klone waren anhand ihrer blauen Färbung erkennbar.

Für die Vereinzelung positiver Klone wurden auch X-Phosphat-Platten ohne Magermilchzusatz verwendet.

Als Positivkontrolle wurde von der BASF ein *E.-coli*-XL1Blue-Klon zur Verfügung gestellt, der das Gen der alkalischen Phosphatase (*phoA*) aus *E. coli*, kloniert in den Vektor pBluescript KS II (Stratagene), enthält.

3.15.4 Protease-Assay

Die Untersuchung auf Protease-Aktivität erfolgte wie unter 3.15.3 beschrieben auf kombinierten X-Phosphat-Magermilchplatten. Positive Klone wiesen eine Hofbildung auf.

Als Positivkontrolle wurde der Wildtyp-Stamm *Bacillus subtilis* LU1573 (BASF) verwendet, der trotz fehlender Ampicillin-Resistenz auf den Screening-Platten aktiv war.

3.15.5 Amylase-Assay

Nach Replikaplattierung (s. 3.15.1) oder Ausstreichen der Zellen auf Stärke-Platten (s. 2.6.2) wurden diese mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Optional wurden die Zellen anschließend über Chloroform-Dampf 3 - 4 min lysiert und ÜN bei RT oder 30 °C inkubiert.

Nach 2- bis 3-stündiger Inkubation der Stärke-Platten bei 4 °C wurde das Medium mit 1:15 verdünnter KI/I₂-Lösung überschichtet (Abzug) und diese sofort durch vorsichtiges Schwenken auf der gesamten Fläche verteilt. Nach kurzer Einwirkzeit wurde die Flüssigkeit wieder abgegossen und die Platte sofort visuell begutachtet. Positive Klone wurden anhand eines farblosen Hofes gegenüber der violett angefärbten Stärke identifiziert. Die Violettfärbung der stärkehaltigen Gebiete hielt ca. 3 - 4 min an.

Als Positivkontrolle wurden die Platten punktuell mit wenigen µl Speichel benetzt.

3.15.6 Phytase-Assay

Die Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung in Na-Phytat (Inositol-Hexaphosphorsäure, Na-Salz) durch das Enzym Phytase führt zur Freisetzung von anorganischem Phosphat. Dieses bildet mit einer zugesetzten Molybdat-Eisensulfat-Lösung (Farbreagenz) einen blauen Komplex, dessen Intensität ein Maß für die Menge an freigesetztem Phosphat und damit für die Aktivität des Enzyms ist. Sie wird durch Messung der Absorption bei 620 nm bestimmt.

Für den Test wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte 70 µl Probe in Acetatpuffer zu 30 µl Na-Phytat-Substratlösung pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 25 µl 10%iger Trifluoressigsäure abgestoppt und mit 50 µl Farbreagenz versetzt. Nach 10- bis 60-minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 620 nm mit einem MTP-Spektrophotometer des Typs Spectramax Plus gemessen.

Zur Erstellung von Kalibrierkurven wurden 5 mg einer Phytase aus *Aspergillus ficuum* (3,5 U/mg, Sigma) in 1 ml Acetatpuffer gelöst und in Konzentrationen zwischen 0,001 - 0,018 U/well bzw. 0,01 - 0,18 U/ml im Test eingesetzt.

3.15.7 Dehalogenase-Assays

Bei der enzymatisch katalysierten hydrolytischen Dehalogenierung chlorierter Kohlenwasserstoffe wird der Halogenligand durch eine Hydroxylgruppe aus dem Wasser ersetzt; gleichzeitig entsteht Chlorwasserstoff (Janssen *et al.*, 1994). Die Reaktion wurde daher sowohl über die Detektion des abgespaltenen Chloridions als auch über die Verfolgung des absinkenden pH-Wertes nachgewiesen.

3.15.7.1 pH-Indikator-Verfahren

Für den Nachweis der pH-Absenkung auf Agarplatten und in Lösung wurden Vorschriften von Chang *et al.* (1999) und Holloway *et al.* (1998) modifiziert.

3.15.7.1.1 pH-Agarplatten-Assay

Für den Agarplatten-Assay wurden die zu testenden Bakterien auf LB_{Amp}-Platten mit 0,42 mM IPTG ausgestrichen bzw. ausplattiert und mindestens über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pinzette autoklavierte Nitrocellulose vorsichtig aufgelegt, diese nach vollständiger Benetzung durch die Feuchtigkeit der Plattenoberfläche langsam wieder abgenommen und mit den anhaftenden Kolonien nach oben auf pH-Indikator-Platten (s. 2.6.2) abgelegt. Diese wurden anschließend bei RT 30 min bis 5 h inkubiert. Positive Kolonien wurden anhand ihrer Gelbfärbung identifiziert, die je nach Aktivität nach einigen Minuten auftrat und maximal 2 - 3 Tage anhielt.

3.15.7.1.2 pH-MTP-Assay

Die Umsetzung des chlorierten Substrats mit ganzen Zellen bzw. Zellextrakt in Lösung erfolgte wie in Abschnitt 3.12 beschrieben. Anschließend wurden den Ansätzen jeweils 13 µg/ml Phenolrot und 13 µg/ml Bromthymolblau zugegeben; bei der Verwendung von Phenolrot allein wurde dessen Konzentration auf 20 - 40 µg/ml erhöht. Im Falle einer Umsetzung des Substrats führt die damit verbundene Abnahme des pH-Wertes zu einer Farbänderung der Indikatoren von rot (Phenolrot allein) bzw. lila (Mischung beider Indikatoren) zu gelb, die visuell begutachtet wurde.

3.15.7.2 pH-Tropfenmessung

Zur Überprüfung des Absinkens des pH-Wertes nach einer Dehalogenierungsreaktion wurde mit dem pH-Meter 2001 (Sentron) eine so genannte Tropfenmessung durchgeführt. Dazu wurden 60 - 90 µl Lösung auf die Spitze der waagrecht gehaltenen pH-Elektrode pipettiert.

3.15.7.3 Bestimmung der Chloridkonzentration mit dem Halogenidsensor (Einzelelektrode)

Theoretische Grundlagen, Funktionsweise und Aufbau dieses Einzelelektroden-Systems wurden im Abschnitt 1.7.2.1 erläutert. Die Bedienung des HPLC-Probengebers für die Probeninjektion sowie der Peristaltik-Pumpe zur Erzeugung des Transportpufferstroms erfolgte nach Angaben der Hersteller.

Für die Messung wurden jeweils 50 - 80 µl Probe über die 20-µl-Probenschleife in den Durchflusspufferstrom (50 mM Na-Acetatpuffer pH 5,0, Flussrate 25 ml/h) injiziert. Die Aufzeichnung der Signale erfolgte auf einem angeschlossenen x/y-Schreiber (Empfindlichkeit 50 - 200 mV, Geschwindigkeit 5 mm/min). Die Auswertung wurde von Hand durchgeführt: Nach Ausmessen der Signalhöhe vom Anfang des Anstiegs bis zur Spitze in [cm] wurde diese in [mV] umgerechnet. Anhand einer zuvor erstellten

Kalibrierkurve, bei der die Messsignale von KCl-Lösungen definierter Konzentration in [mV] über der eingesetzten Konzentration in [μ M] aufgetragen worden waren, konnte die Konzentration der Probe ermittelt werden.

Im Lauf einiger Tage überzog sich die glatte Sensoroberfläche mit einem amorphen Silberniederschlag, der durch Polieren auf sehr feinem Schmirgelpapier (Micro-Mesch der Korngrößen 4000 - 12000, Dick GmbH) unter Benetzung mit etwas Laufpuffer entfernt wurde.

3.15.7.4 Messung mit der automatisierten Halogenid-Screening-Anlage

Die Entwicklung des parallelisierten und automatisierten Messsystems auf der Basis des vorhandenen Halogenidsensors (s. o.) wird in den Abschnitten 4.3 bzw. 4.3.2 erläutert (Geräte-Komponenten der Anlage s. Abschnitt 2.4).

Für die Messung entnimmt der Pipettierroboter einer 96er-Mikrotiterplatte gleichzeitig vier Proben à 100 μ l (Ansauggeschwindigkeit 150 μ l/sec) und injiziert sie über vier automatische Motorventile mit 20- μ l-Probenschleife in den Durchfluspufferstrom (50 mM Na-Acetatpuffer pH 5,0, Flussrate 100 ml/h). Dieser fließt in je vier parallel angeordneten Durchfluszellen an den ionenselektiven Elektroden bzw. Referenzelektroden vorbei. Die Steuerung des gesamten Messvorgangs sowie die Aufzeichnung und Analyse der Daten erfolgt automatisch durch ein speziell entwickeltes Steuerprogramm auf Basis der Programmiersprache LabView. Die Messdaten (Signale in [V]) werden im ASCII-Format gespeichert; die Auswertung erfolgt in Excel.

Das durch die Größe der verwendeten Probenschleife definierte Probenvolumen beträgt 20 μ l.

Für eine korrekte Detektion des Flüssigkeitsspiegels, über die die Probenentnahme geregelt ist, wurden mindestens 100 μ l Probe entnommen. Die Injektionsnadeln folgen beim Aufziehen der Probe dem Flüssigkeitsspiegel nach unten. Um einen Abbruch des Messvorgangs durch Aufstoßen der Nadeln auf dem Boden der Mikrotiterplatte zu vermeiden, ist ein Flüssigkeitsvolumen von jeweils mindestens 250 μ l erforderlich.

4 Ergebnisse

Ein alternatives kultivierungsunabhängiges Verfahren, das es ermöglicht, das gesamte metabolische Potential der Mikroorganismen eines Standortes für die Entdeckung neuer Enzyme zu nutzen, besteht in der Extraktion der genomischen mikrobiellen DNA aus Umweltproben, ihrer Klonierung in ein geeignetes Expressionssystem und der anschließenden Durchmusterung der Klone der konstruierten Genbank auf Enzymaktivität (Abb. 3). Die den einzelnen Verfahrensschritten zugrunde liegenden Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und verbessert.

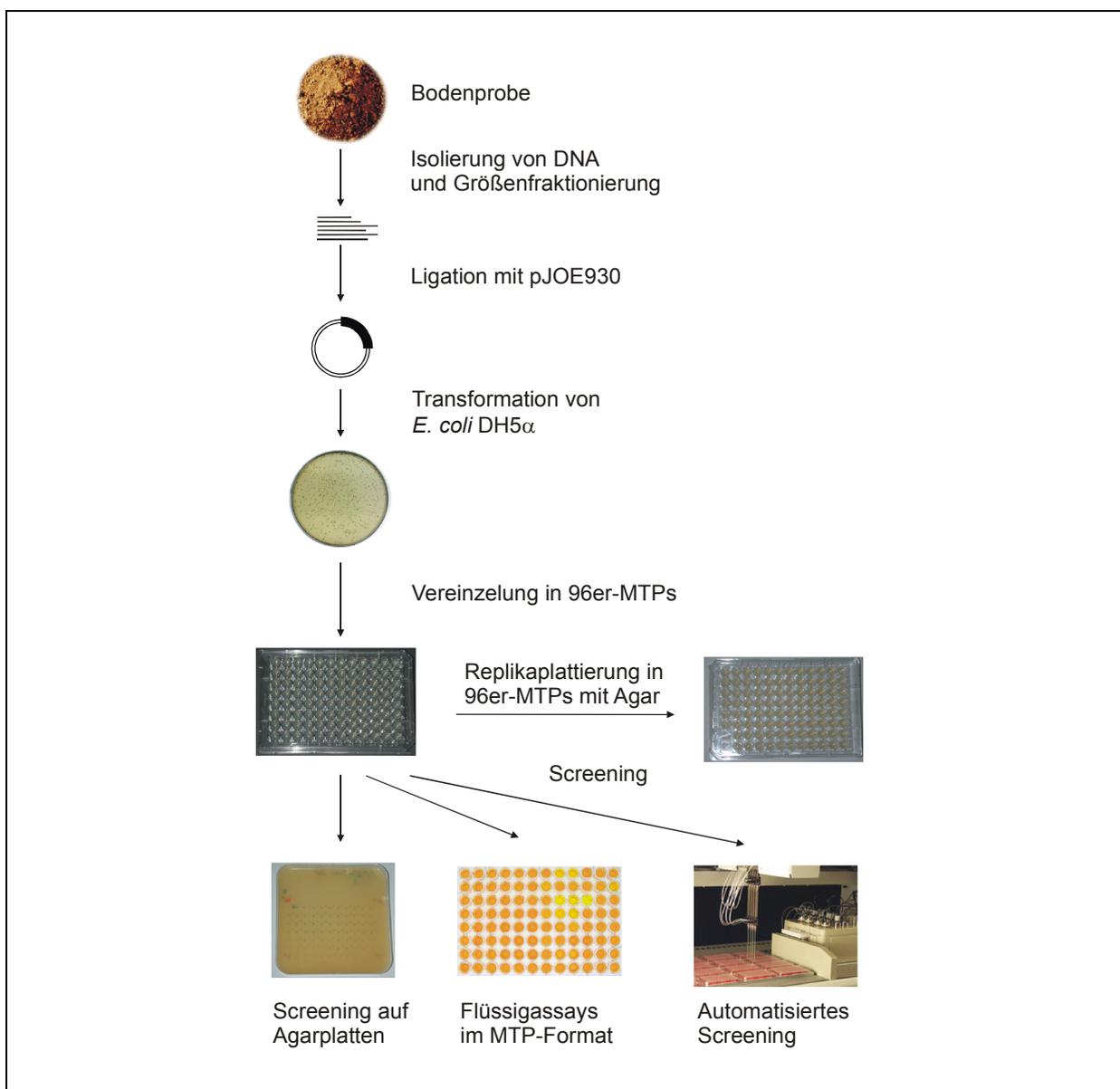


Abb. 3 Strategie zur Herstellung von Genbanken aus genomischer Boden-DNA und der Durchmusterung nach neuen Enzymaktivitäten.

4.1 Herstellung von Genbanken aus Boden-DNA

4.1.1 Isolierung und Aufreinigung genomischer Boden-DNA

Zur Isolierung von DNA aus Bodenproben gibt es eine Vielzahl von Protokollen, die sich hinsichtlich der Art des Zellaufschlusses und der weiteren Aufarbeitung unterscheiden (s. 1.5.2). Da mit einer modifizierten Aufschlussmethode nach Zhou *et al.* (1996) die DNA in hoher Ausbeute isoliert werden kann und gleichzeitig der Fragmentierungsgrad gering ist (Kauffmann, 2002), wurde diese Methode auch hier gewählt.

Für den Aufschluss wurde Kompostboden aus einem Garten in der Nähe von Stuttgart verwendet. Aus 3 g Probe wurde die genomische DNA isoliert und in 300 µl Tris-HCl aufgenommen (Durchführung s. 3.2.4). Aufgrund der direkten Extraktion der DNA aus der Bodenprobe wurden auch humine Substanzen mitextrahiert, die zu einer Braunfärbung des erhaltenen Boden-DNA-Extraktes führten. Durch eine Aufreinigung des DNA-Extraktes über zentrifugierbare Gelfiltrations-Säulen (Chroma Spin+TE-1000, s. 3.2.5) wurden diese Verunreinigungen entfernt: Die zuvor braun gefärbte DNA-Lösung war anschließend annähernd farblos und klar, während das Säulenmaterial infolge der Rückhaltung der huminen Substanzen eine braune Färbung aufwies.

Um Ausbeute und Fragmentierung der DNA abzuschätzen, wurden sowohl Boden-DNA-Extrakt als auch aufgereinigte DNA-Lösung auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 4 A).

Die photometrisch bestimmte Konzentration der aufgereinigten DNA-Lösung betrug ca. 0,12 µg/µl (Mittelwert zweier Aufreinigungen). Aus 1 g Bodenprobe wurden auf diese Weise ca. 12 µg aufgereinigte DNA erhalten. Die Reinheit der DNA wurde durch Restriktionsspaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen überprüft. Wie Abb. 4 B und C zeigen, war die DNA sowohl mit *Hsp92II* als auch mit *Sau3AI* oder *EcoRI* verdaubar.

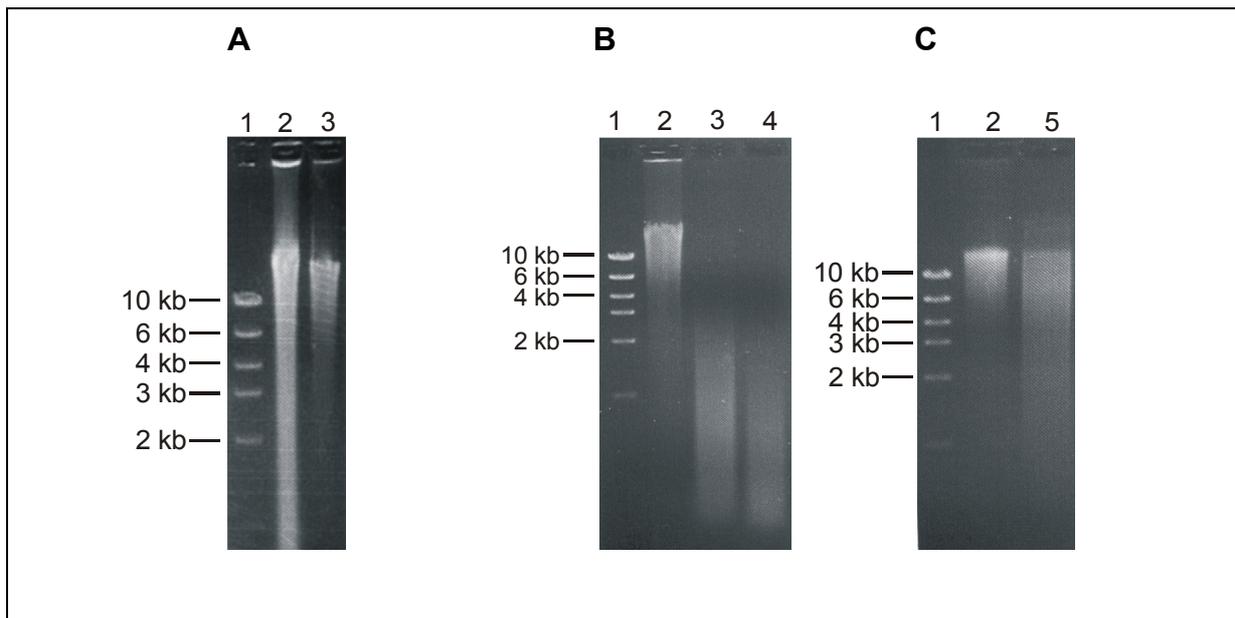


Abb. 4 Aufreinigung und Restriktionsverdau metagenomischer Boden-DNA (Kompostboden). **A** Boden-DNA-Extrakt, isoliert mit modifizierter Methode nach Zhou *et al.* (1996), vor und nach Aufreinigung durch Gelfiltrations-Chromatographie. 1: High-Mass-DNA-Leiter; 2: Boden-DNA-Extrakt (5 μ l) vor der Aufreinigung; 3: DNA-Lösung (5 μ l) nach Aufreinigung über Chroma Spin+TE-1000-Säulen. **B, C** Restriktionsverdau der aufgereinigten Boden-DNA mit *Hsp92II*, *Sau3AI* oder *EcoRI*. 1: High-Mass-DNA-Leiter; 2 - 5: aufgereinigte Boden-DNA: 2: unverdaut, 3: verdaut mit *Hsp92II* (Inkubation 15 min, 37 °C), 4: verdaut mit *Sau3AI* (15 min, 37 °C), 5: verdaut mit *EcoRI* (ÜN, 37 °C).

4.1.2 Klonierung der Boden-DNA

4.1.2.1 Enzymatische Fragmentierung der Boden-DNA

Die mit der modifizierten Zhou-Methode isolierte und über Gelfiltrations-Säulen aufgereinigte genomische Boden-DNA wurde durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* (12 U/ μ g DNA) (s. 3.6) über Nacht bei 37 °C fragmentiert. Nach dem Verdau wurde die DNA über *QIAquick Spin Columns* aufkonzentriert (s. 3.2.3). Nach Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel wurden die DNA-Fragmente des gewünschten Größenbereichs unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* aus dem Gel eluiert.

Auf diese Weise wurden drei verschiedene Insert-Fractionen mit Fragmentgrößen von 3 - 8 kb (Insert-Fraktion 1), 3 - 5 kb (Insert-Fraktion 2) und 5 - 8 kb (Insert-Fraktion 3) isoliert.

4.1.2.2 Klonierungsvektor pJOE930

Als Klonierungsvektor für die Konstruktion der Boden-Genbanken wurde pJOE930 ausgewählt (Altenbuchner *et al.*, 1992) (s. Abb. 5). Als positiver Selektionsvektor besitzt er die Eigenschaft, dass nach einer Transformation nur diejenigen Klone überleben und

wachsen sollten, deren Plasmid ein Insert enthält. Dazu tragen zwei lange palindromische Sequenzen bei, die durch die Ausbildung cruciformer Strukturen die Vermehrung des Plasmids stark behindern, wenn sie nicht durch eine nicht-palindromische Sequenz wie z. B. ein eingefügtes Insert voneinander getrennt werden (Hagan und Warren, 1983; Warren und Green, 1985). Zudem besitzt er zwei induzierbare *lac*-Promotoren. Rekombinante Kolonien können aufgrund der enthaltenen N-terminalen Sequenzen von *lacZ* (*lacZ α*) durch α -Komplementation über ein Blau-Weiß-Screening auf Agarplatten mit IPTG und X-Gal identifiziert werden.

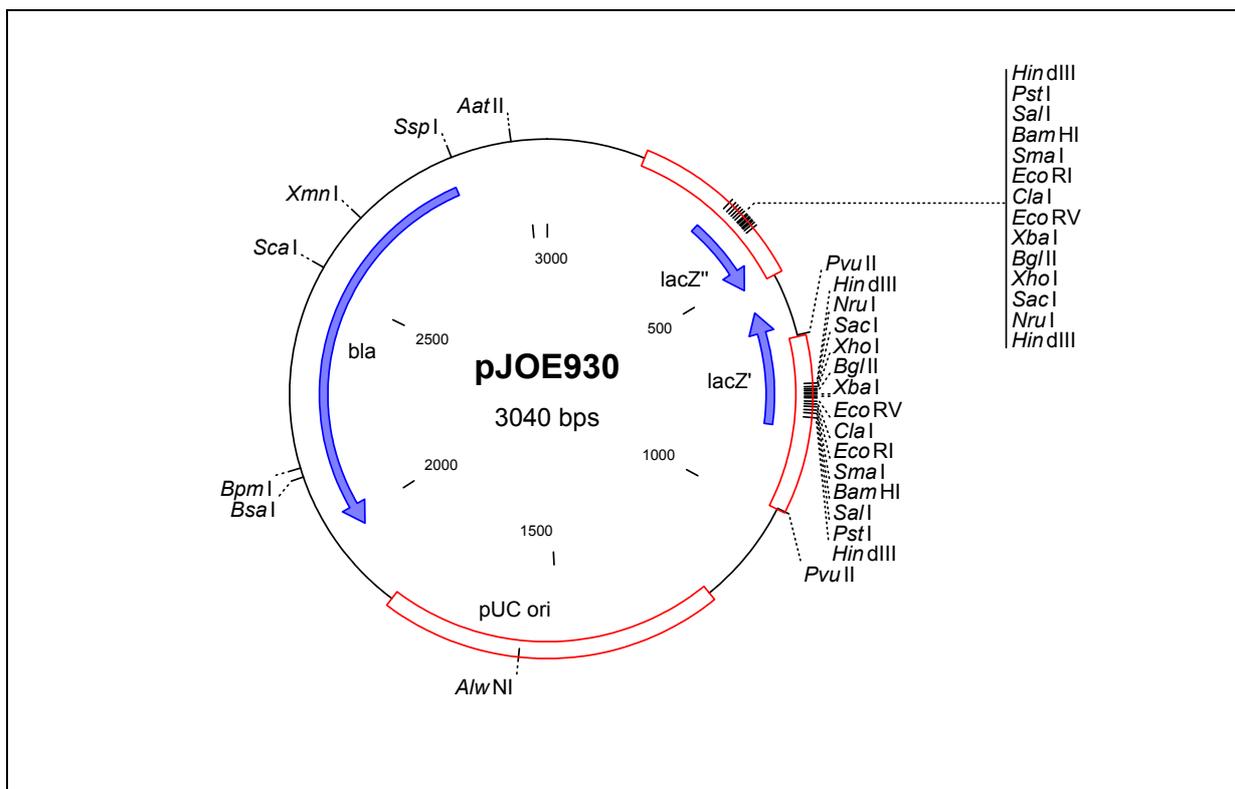


Abb. 5 Klonierungsvektor pJOE930. Als rote Box wurden jeweils die palindromischen Sequenzbereiche (Position 188 - 524 bzw. 985 - 649) der beiden *lac*-Operons (188 - 524 bzw. 1039 - 578) dargestellt, die durch einen nicht-palindromischen Abschnitt voneinander getrennt sind. Mit *lacZ'* bzw. *lacZ''* (blaue Pfeile) wurden die unterschiedlich langen N-terminalen Sequenzen der β -Galactosidase bezeichnet. Weitere Merkmale: Ampicillin-Resistenz (*bla*); Replikationsursprung (pUC ori).

Für die Klonierung wurde pJOE930 mit *EcoRI* linearisiert, mit CIAP dephosphoryliert und über ein Agarosegel aufgereinigt (s. Tabelle 8). Ein Teil der Vektorpräparationen wurde zusätzlich mit *SacI* verdaut, dessen Erkennungssequenz im Polylinker innerhalb der für die Klonierung gewünschten Schnittstelle liegt. Dies sollte die Religation des ausgeschnittenen *lacZ*-Fragmentes in den Vektor verhindern und so die Anzahl an blauen Kolonien verringern (Altenbuchner *et al.*, 1992). In Vorversuchen war es auf diese Weise gelungen, bei einer

Selbstligation von pJOE930 die Zahl der blauen Kolonien ohne Zusatzbehandlung um den Faktor 60 zu reduzieren. Eine Aufreinigung des Vektorfragments über ein Agarosegel verringerte sowohl die Anzahl der blauen als auch der religierten weißen Kolonien.

Tabelle 8: Vektorpräparationen von pJOE930

Vektorpräparation Nr.	<i>EcoRI</i>	<i>SacI</i>	CIAP	Gelelution
1	+	-	-	+
2	+	-	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+

4.1.2.3 Ligation und Transformation

Zur Erstellung verschiedener Genbanken (L1 bis L6) wurden die Boden-Insert-Fractionen in verschiedene Vektorpräparationen von pJOE930 ligiert, wobei die Vektormenge und das molare Verhältnis von Insert zu Vektor variiert wurde (s. 3.8 und Tabelle 9). Die Ligationen wurden mit Ausnahme von L5 (2 h, 21 °C) über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Als Kontrolle wurde Vektor-DNA ohne Insert ligiert.

Anschließend wurden elektrokompetente *E. coli* DH5 α mit je 1 μ l der Ligationsansätze durch Elektroporation transformiert und auf Selektionsmedium mit X-Gal und IPTG ausplattiert (s. 3.9.3).

Tabelle 9: Genbanken von Boden-DNA in pJOE930

Genbank	Vektor- präparation	Vektor [ng] pro Ligationsansatz	Insert-Fraktion (Insert-Größe)	molares Verhältnis Insert : Vektor
L1	2	77	1 (3 - 8 kb)	1,2 : 1
L2	3	77	1 (3 - 8 kb)	1,2 : 1
L3	1	25	2 (3 - 5 kb)	3,0 : 1
L4	1	25	3 (5 - 8 kb)	3,0 : 1
L5	4	25	2 (3 - 5 kb)	3,3 : 1
L6	4	25	2 (3 - 5 kb)	3,3 : 1

Im Folgenden werden für L1 bis L6 gleichbedeutend die Bezeichnungen „Ligationsansatz“ und „Genbank“ verwendet.

4.1.2.4 Vereinzeln und Ablage der Klone

Da nur ein Teil der weißen Kolonien ein inserthaltiges Plasmid enthielt (s. 4.1.3), wurden nur die inserthaltigen hellweißen Klone für Lagerung und Screening im 96er-Format in Mikrotiterplatten abgelegt.

Die durch Boden-DNA transformierten Bakterien wurden dazu in 96er-Mikrotiterplatten vereinzelt und zur mittelfristigen Lagerung in mit LB-Agar befüllte 96er-Mikrotiterplatten replikaplatziert. Die langfristige Lagerung der Genbanken erfolgte ebenfalls im 96-well-Format in LB-Medium mit 5 % DMSO (s. 3.1.2).

Insgesamt wurden 31967 hellweiße Klone der Genbanken L1, L2 und L3 in Mikrotiterplatten abgelegt (s. auch Tabelle 10).

4.1.3 Charakterisierung der Genbanken

Die Eigenschaften der aus Boden-DNA hergestellten Genbanken sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Zur Charakterisierung der Genbanken wurde die Gesamtzahl aller ausplattierten weißen Klone bestimmt (Spalte 2). Für jede Genbank wurde die durchschnittliche Anzahl der pro 1 µl Ligationsansatz erhaltenen weißen Klone ermittelt (Spalte 3) sowie daraus die pro 1 µg Vektor-DNA bzw. pro 1 µg Boden-DNA erhaltene Zahl an Klonen berechnet (Spalte 4 und 5). Zur Überprüfung der Qualität der Genbanken wurden die Plasmide aus einer variablen Anzahl an weißen Kolonien isoliert und die Insertgröße durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* ermittelt (Spalte 7 und 8). Dabei zeigte es sich, dass nicht alle weißen Kolonien ein Insert enthielten, sondern einige Plasmide ohne Insert religiert waren und replizieren konnten, trotz der speziellen Struktur von pJOE930, die das eigentlich verhindern sollte. Diese Klone unterschieden sich durch ihre etwas dunklere, zum Teil gelbliche Färbung und die größere und erhabene Ausdehnung der Kolonie von den inserthaltigen weißen, eher durchsichtigen und flachen Klonen. Zur Bestimmung der Inserthäufigkeit wurde der Anteil dieser hellweißen Klone (= inserthaltige weiße Klone) an der Gesamtzahl aller weißen Kolonien einer Transformationsplatte durch Auszählen ermittelt (Spalte 10); die Bestimmung des Anteils aller weißen Klone bezüglich der Gesamtzahl aller Transformanden erfolgte mit Hilfe des Blau-Weiß-Screenings (Spalte 9).

Die Anzahl der pro Genbank ausplattierten weißen Kolonien lag zwischen 7200 und 51100. Die sechs Genbanken umfassten insgesamt 139800 Klone; dabei wurden nicht die gesamten 20 µl der einzelnen Ligationsansätze transformiert. In Mikrotiterplatten wurden davon 31967 hellweiße Klone vereinzelt.

Pro 1 µl Ligationsansatz wurden zwischen 1600 und 5300 weiße Klone erhalten. Die Zahl der Klone pro 1 µg Vektor-DNA lag somit zwischen $1,2 \cdot 10^6$ und $3,5 \cdot 10^6$ bzw. pro 1 µg Boden-DNA zwischen $1,8 \cdot 10^5$ und $7,0 \cdot 10^5$.

Der Anteil an weißen Klonen bezogen auf die Gesamtzahl aller Klone lag zwischen 92 und 98 %. Der Anteil der inserthaltigen weißen Klone bezogen auf alle weißen Klone lag zwischen 52 und 74 %.

Zwischen 93 und 100 % der Plasmide der hellweißen Kolonien enthielten ein Insert; für Genbank L4, bei der für die Ligation die größeren DNA-Fragmente von 5 - 8 kb eingesetzt worden waren, lag der Anteil an hellweißen Klonen mit Insert bei 76 %.

Aus den dunkleren weißen Kolonien wurden, von vereinzelt Ausnahmen abgesehen, nur solche Plasmide isoliert, die ohne Insert religiert waren. Diese waren nicht mit *EcoRI* verdaubar.

Die Inserts der rekombinanten Plasmide, die aus den inserthaltigen Klonen isoliert wurden, waren zwischen 1,0 und 7,5 kb groß. Die durchschnittliche Insertgröße betrug zwischen 3,0 und 5,2 kb, wobei nach Ligation der 5-8-kb-Fragmente (L4) die durchschnittliche Größe mit 5,2 kb um ca. 2 kb höher war als nach Ligation der 3-5-kb-Fragmente mit 3,3 kb (Mittelwert aus L3, L5 und L6).

Tabelle 10: Zusammenfassung der Eigenschaften der Genbanken aus Kompostboden (Erläuterungen s. Text)

Genbank	Anzahl Klone gesamt	Klone pro 1 µl Ligationsansatz	Klone pro 1 µg Vektor	Klone pro 1 µg Boden-DNA	eingesetzte Fragmentgröße [kb]	Insertgröße (min - max) [kb]	durchschnittliche Insertgröße [kb]	weiße Klone (Blau-Weiß-Screen) [%]	hellweiße Klone von allen weißen insgesamt (Aus-zählen) [%]	in MTP abgelegt (nur hellweiße)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
L1	51100	4600	$1,2 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^5$	3 - 8	1,6 - 3,2	3,3	97	65	23398
L2	30700	5300	$1,4 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^5$	3 - 8	3,2 - 6,4	3,5	98	57	4942
L3	18500	2300	$1,8 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^5$	3 - 5	1,8 - 3,8	3,5	95	69	3627
L4	7200	1600	$1,3 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$	5 - 8	1,0 - 7,5	5,2	93	52	
L5	22400	4400	$3,5 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^5$	3 - 5	1,2 - 4,3	3,0	92	74	
L6	9900	3200	$2,6 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^5$	3 - 5	1,2 - 3,9	3,3	95	70	
Gesamt	139800									31967

4.2 Screening der Genbanken auf Enzymaktivität

Mit Hilfe von verschiedenen Agarplatten-Verfahren wurden die Klone der erstellten Boden-Genbanken auf Lipase- bzw. Esterase-, Phosphatase-, Protease-, Amylase- und Dehalogenase-Aktivität untersucht. Dabei durchliefen nicht immer alle Klone alle Tests. Die nähere Untersuchung der gefundenen Phosphatasen auf die Fähigkeit zur Verwertung von Phytat erfolgte in Mikrotiterplatten (s. 4.2.2.1).

4.2.1 Screening auf lipolytische Aktivität

4.2.1.1 Durchführung und positive Klone

Für das Screening nach Lipasen und Esterasen wurde *E. coli* DH5 α mit den Ligationsansätzen L3 bis L6 elektrotransformiert und die Transformationsansätze direkt auf tributyrinhaltige Agarplatten ausplattiert (s. 3.15.2). Die Hydrolyse der Esterbindungen des kurzkettigen Triglycerids Tributyrin zu Glycerin und Buttersäure führte zur Bildung eines klaren Hofes um positive Kolonien gegenüber dem trüben Hintergrund (Abb. 6).

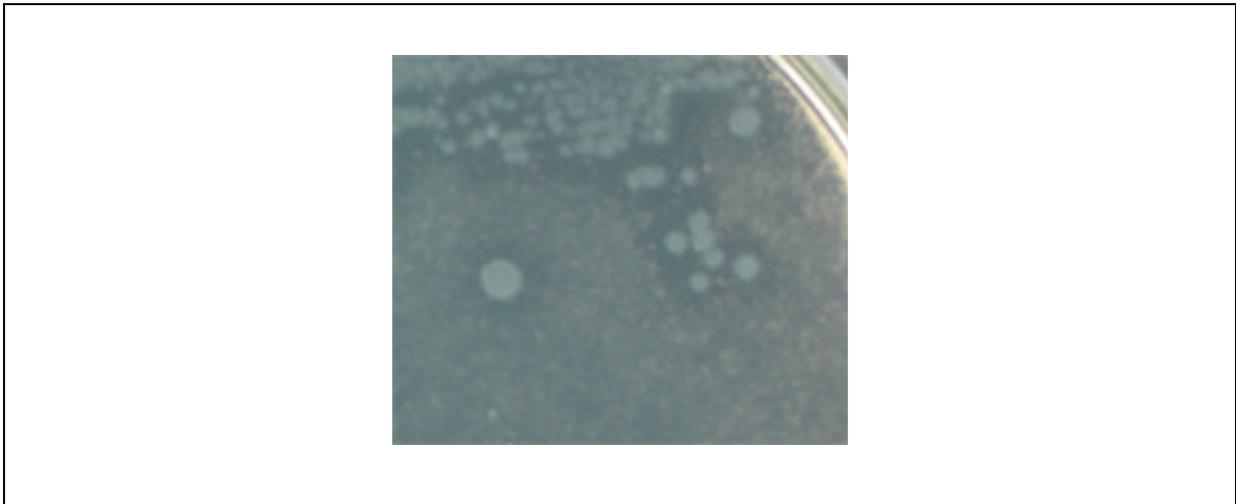


Abb. 6 Phänotyp eines rekombinanten *E.-coli*-DH5 α -Klons mit lipolytischer Aktivität auf Tributyrin-Agar.

Von insgesamt ca. 21000 untersuchten weißen Klonen wiesen bei diesem initialen Screening 19 eine Hofbildung auf. Die Aktivität war bei einigen Klonen bereits nach ÜN-Inkubation erkennbar, bei anderen erst nach 3 - 10 Tagen. Bei längerer Inkubation der Tributyrin-Platten (> 14 Tage) führte die Autohydrolyse des Tributyrins zu einer Hofbildung aller Kolonien.

Nach Einzelausstrichen auf Tributyrin-Platten waren von diesen positiven Klonen noch 14 Klone aktiv. Zur Bestätigung ihres lipolytischen Phänotyps wurden die rekombinanten

Plasmide isoliert, *E. coli* DH5 α erneut mit diesen transformiert und die Zellen auf Tributyrin-Agar ausplattiert. Alle 14 rekombinanten Plasmide vermittelten den *E.-coli*-Klonen einen stabilen lipolytischen Phänotyp. Im Vergleich zum Primärscreening war die Aktivität einiger Klone nach der Retransformation stärker oder trat etwas früher auf.

Die eindeutig positiven Klone wurden mit KL01, KL02, KL04, KL05, KL06, KL07, KL09, KL10, KL11, KL12, KL13, KL15, KL16 und KL18 bezeichnet. Sie stammten aus allen vier Genbanken (s. Tabelle 11). Bezogen auf die Zahl der pro Genbank untersuchten weißen Klone ergaben sich Trefferraten von 1 zu 1100 bis 1 zu 2600. Die Anzahl von insgesamt 14 positiven Klonen bei 21000 untersuchten Kolonien entspricht einem Verhältnis von 1 zu 1500.

Tabelle 11: Screening der Genbanken L3 bis L6 auf die Hydrolyse von Tributyrin. Anzahl getestete Klone: insgesamt ausplattierte weiße Kolonien, bestehend aus hell- und dunkelweißen Klonen, gerundet auf volle 100; Trefferrate: gerundet auf volle 100.

Genbank	L3	L4	L5	L6	Gesamt
Anzahl getestete Klone	7800	2600	4300	6100	21000
positive Klone nach Retransformation	7	1	3	3	14
Trefferrate	1 : 1100	1 : 2600	1 : 1400	1 : 2000	1 : 1500
Bezeichnung der Klone	KL01 KL05 KL09 KL10 KL15 KL16 KL18	KL12	KL06 KL07 KL11	KL02 KL04 KL13	

Die Insertgrößen der rekombinanten Plasmide (pKL01 bis pKL18) wurden durch Sequenzierung ermittelt (s. Tabelle 12); teilweise wurden die Insertfragmente dazu in den Vektor pBluescript SK+ (Stratagene) umkloniert. Die Inserts waren zwischen 2,9 und 5,5 kb groß und wiesen GC-Gehalte zwischen 52 und 68 % auf.

Tabelle 12: Aktivität der Klone KL01 bis KL18 auf Tributyrin-Platten sowie Größe und GC-Gehalt der Inserts ihrer rekombinanten Plasmide. Optischer Eindruck der Aktivität: + gering; ++ mäßig; +++ stark aktiv.

Klon	Genbank	Aktivität	Insertgröße des Plasmids [bp]	GC-Gehalt [%]
KL01	L3	++	4221	63
KL02	L6	+++	3305	58
KL04	L6	+	2926	58
KL05	L3	++	3425	62
KL06	L5	+++	3207	59
KL07	L5	++	3026	68
KL09	L3	+	3101	65
KL10	L3	++	3177	61
KL11	L5	+	3423	64
KL12	L4	+	5215	67
KL13	L6	+++	3757	59
KL15	L3	+	5533	52
KL16	L3	++	3493	59
KL18	L3	++	3626	59

4.2.1.2 Analyse der Insert-Sequenzen

Im Rahmen der Sequenzanalyse der Inserts der rekombinanten Plasmide mit Hilfe des PEDANT-Software-Systems (s. 3.10) wurden mögliche kodierende Regionen ermittelt, die abgeleiteten Genprodukte unter Anwendung unterschiedlicher bioinformatischer Methoden automatisch analysiert, mit bekannten Sequenzen verglichen und sowohl funktionell als auch strukturell klassifiziert. Die Ergebnisse wurden anschließend für jeden einzelnen offenen Leserahmen in Form eines integrierten Proteinreports dargestellt.

Die kompletten Ergebnisse dieser PEDANT-Analysen (mit Ausnahme der Daten zur strukturellen Klassifizierung) sind in Tabellenform im Anhang aufgelistet (s. Tabelle 20 bis Tabelle 34), und zwar jeweils für denjenigen offenen Leserahmen, der aufgrund der Analyseergebnisse am wahrscheinlichsten für die katalytische Aktivität relevant ist. Dabei wurden neben der am stärksten homologen Sequenz, die auch im Proteinreport von PEDANT angegeben ist, weitere Treffer der BLASTP-Homologiesuche ergänzt.

Für fünf der vierzehn rekombinanten Plasmide ergab die Homologiesuche mittels BLASTP eine direkte Ähnlichkeit zu bekannten Esterasen oder Lipasen (KL01, KL02, KL04, KL15, KL18). Für die Inserts der übrigen Klone wurde indirekt eine solche Ähnlichkeit festgestellt,

beispielsweise aufgrund der Homologie zu anderen hydrolytischen Enzymen, postulierten Esterasen oder hypothetischen Proteinen mit lipolytischen Sequenzmotiven.

4.2.1.2.1 Klon KL01

Der auf dem Insert von pKL01 identifizierte offene Leserahmen *orf1.1* kodierte für 367 Aminosäuren und wies einen GC-Gehalt von 63,5 % auf. Orf1.1 zeigte in der BLAST-Analyse Ähnlichkeiten zu verschiedenen bekannten und postulierten Esterasen, darunter auch lipolytischen Enzymen der GDXG-Familie. Diese weisen neben einer konservierten Aminosäuresequenz um das aktive Serin LIPASE_GDXG_SER (PROSITE-Eintrag PS01174, s. 1.2.1) einen zweiten konservierten Bereich um ein konserviertes Dipeptid, bestehend aus Histidin und Glycin, auf (LIPASE_GDXG_HIS, PROSITE-Eintrag PS01173, s. 1.2.1). Das Motiv IPB002168A der Blocks-Datenbank entspricht diesem Histidin-Motiv in leicht abgewandelter Form. In Orf1.1 war dieser Block ab Position 110 enthalten, wobei sich an sechster Position in Übereinstimmung mit LIPASE_GDXG_HIS ein Valin befindet (Abb. 7).

(1)	[LIVMF]	(2)	-x-	[LIVMF]	-H-G-G-	[SAG]	-[FY]	-x(3)	-[STDN]	-x(2)	-[ST]-H
(2)	x(2)	-[LIVMF]	(2)	-x-	[LI F]	-H-G-G-	[SAG]	-[FYW]	-x(3)	-[STDNEG]	
(3)	HL	F V	H	V	-H-G-G-	A	Y	ILN	G	GL	

Abb. 7 Vergleich der Motive LIPASE_GDXG_HIS (1) und IPB002168A (2) mit der Aminosäuresequenz von KL01_Orf1.1 (3).

Das zweite charakteristische Motiv der GDXG-Familie um das aktive Serin war in Orf1.1 jedoch nicht enthalten. Ab Position 183 wurde das Motiv GSSAG identifiziert, das formal dem innerhalb der Gruppe der lipolytischen Enzyme hochkonservierten Motiv GX SXG entsprechen würde (s. 1.2.1). Statt des an zweiter Stelle häufig vorkommenden Histidins bzw. Tyrosins (bzw. Aspartat bei GDXG-Enzymen) befand sich aber ein nucleophiles Serin. Weitere Hinweise auf die lipolytische Funktion von Orf1.1 sind seine Ähnlichkeit zur Gruppe der Esterasen/Lipasen (COG0657) sowie zu Enzymen der PIR-Superfamilie SF006015. Diese umfasst Mitglieder der GDXG-Familie lipolytischer Enzyme und der Familie der Carboxylesterasen vom Typ B und enthält zahlreiche weitere Treffer der BLAST-Analyse von Orf1.1.

In Übereinstimmung mit diesen Sequenzhomologien war KL01 bei der Untersuchung der Substratspezifität (s. 4.2.1.3) in der Lage, kurz-kettige Esterase-Substrate zu hydrolysieren; länger-kettige Verbindungen wie z. B. pNP-Palmitat wurden dagegen nicht umgesetzt.

Für das Genprodukt eines weiteren Leserahmens *orf1.2* wurden ebenfalls Sequenzhomologien zu hydrolytischen Enzymen, insbesondere verschiedenen Peptidasen, festgestellt. Die beste Sequenz-Übereinstimmung hatte Orf1.2 mit einem Dipeptidyl-Peptidase-IV-verwandten Protein aus *Deinococcus radiodurans* (Identität 46 %, Ähnlichkeit 60 %) (White *et al.*, 1999). Die folgenden Treffer der BLAST-Suche gehören ebenfalls meist zur Gruppe der Dipeptidyl-Peptidasen (EC 3.4.14.5 bzw. -11) sowie der Acylaminoacyl-Peptidasen (EC 3.4.19.1) aus der Prolyl-Oligopeptidase-Familie. Die Ähnlichkeit zur Gruppe der Dipeptidyl-Peptidasen nach Vergleich mit der COG-Datenbank (COG1506) deutet ebenfalls auf eine Peptidase-Aktivität von Orf1.2 hin.

Daneben zeigte Orf1.2 auch Ähnlichkeit zu Enzymen der Gruppe der α/β -Hydrolasen (COG1073 bzw. COG0596) sowie der Lysophospholipasen (COG2267). Das bei lipolytischen Enzymen konservierte Pentapeptid GX SXG war ab Position 264 in der Form GHSMG enthalten, welches einem Teilbereich des Lipase-Blocks (IPB000734) entspricht. Dieser wiederum stellt eine erweiterte Form des Lipase-Musters LIPASE_SER der PROSITE-Datenbank dar (PS00120: [LIV]-x-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-x-G-[GSTAC], s. 1.2.1).

Welcher dieser beiden offenen Leserahmen tatsächlich für die lipolytische Aktivität von KL01 auf Tributyrin-Platten verantwortlich ist, sollte durch Subklonierung der Sequenzen experimentell überprüft werden.

4.2.1.2.2 Klon KL02

Auf dem 3305-bp-Insert von KL02 wurde ein offener Leserahmen (*orf2*) identifiziert, der für 333 Aminosäuren kodierte und einen GC-Gehalt von 58,3 % aufwies. Das *orf2*-Genprodukt zeigte signifikante Ähnlichkeiten zu verschiedenen lipolytischen Enzymen der GDSL-Familie. Proteine dieser Familie enthalten um das katalytisch aktive Serin statt des konservierten Pentapeptids GX SXG ein charakteristisches GDS(L)-Motiv in der Form [LIVMFYAG](4)-G-D-S-[LIVM]-x(1,2)-[TAG]-G (PROSITE-Eintrag PS01098, LIPASE_GDSL_SER) sowie vier weitere konservierte Sequenzbereiche (Upton und Buckley, 1995).

Unter den homologen Sequenzen befanden sich verschiedene Glycerophospholipid-Cholesterin-Acyltransferasen (s. Tabelle 21). Diese katalysieren die Übertragung einer Fettsäure von Phosphatidylcholin auf Cholesterin und sind in Abwesenheit von Acyl-Acceptoren als Phospholipasen aktiv (Thornton *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu echten Lipasen bevorzugen sie statt Triacylglyceriden Phospholipide als Substrat und benötigen keine Interphasenaktivierung (Hilton *et al.*, 1990). Die nach Abspaltung eines Acylrests von Phospholipiden entstehenden Lysophospholipide sind zum Teil starke Hämolyse.

Daneben hatte Orf2 auch Ähnlichkeit zu zahlreichen anderen Lipasen und Esterasen mit GDS(L)-Motiv. Dieses Sequenzmuster war in Orf2 ab Position 57 vollständig enthalten. In Abb. 8 ist ein Vergleich des entsprechenden Sequenzbereichs von Orf2 mit denjenigen homologen Sequenzen der BLAST-Analyse dargestellt, die neben drei weiteren Sequenzen zur Bildung dieses konservierten Motivs verwendet wurden (s. PS01098).

Ahyd_XXFOGA	28	IVMFGDSLSDTG	39
Vpar_A53888	147	VVALGDSLSDTG	158
Plum_A47081	28	LYVFGDSLSDGG	39
Pput_G35115	31	MIVFGDSLSDAG	42
Atha_S21961	205	VFFFGDSVFDTG	216
KL02_Orf2	57	LVVFGDSLSDTG	68

Abb. 8 Vergleich der Aminosäuresequenz von KL02_Orf2 mit homologen Sequenzen der BLAST-Analyse im Bereich des Konsensusmotivs LIPASE_GDSL_SER (PS01098). Ahyd_XXFOGA: Phosphatidylcholin-Sterol O-Acyltransferase aus *Aeromonas hydrophila*; Vpar_A53888: thermolabiles Hämolysin aus *Vibrio parahaemolyticus*; Plum_A47081: Triacylglycerol-Lipase Lip-1 aus *Photobacterium luminescens*; Pput_G35115: hypothetisches Protein aus *Pseudomonas putida*; Atha_S21961: prolin-reiches Protein APG aus *Arabidopsis thaliana*; KL02_Orf2 aus Boden-DNA (diese Arbeit). Übereinstimmungen mit dem charakteristischen Motiv LIPASE_GDSL_SER sind hellgrau unterlegt; Aminosäuren, die in allen Sequenzen übereinstimmen, sind dunkelgrau markiert.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität (s. 4.2.1.3) konnte KL02 kurzkettige Esterase-Substrate (pNP-, MUF-Butyrat, MUF-Nonanoat, α -Naphthylacetat) hydrolysieren; die Umsetzung von Phospholipiden, die die Ergebnisse der Sequenzanalyse bestätigen könnte, wurde nicht getestet.

4.2.1.2.3 Klon KL04

pKL04 besaß mit 2926 bp das kleinste Insert der 14 Tributyrin-aktiven Klone. Die DNA-Analyse zeigte einen offenen Leserahmen von 855 bp, der mit *orf4* bezeichnet wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *orf4*-Gens (284 Aminosäuren) war zu 24 % identisch (39 % ähnlich) mit dem Vorläufermolekül der Tannase aus *Aspergillus oryzae* (Hatamoto *et al.*, 1996).

Tannine (Polyphenole) stellen eine strukturell sehr heterogene Gruppe wasserlöslicher polyphenolischer Substanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels dar. Gallotannine sind Polyester von Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) mit Glucose. Käufliche Tanninsäure besteht aus einem Gemisch unterschiedlicher Gallotannine. Tannasen bzw. Tannin-Acylhydrolasen (EC 3.1.1.20) sind Carboxylesterhydrolasen, die die Esterbindung von Tanninsäure zu Gallussäure und Glucose bzw. die Esterbindung von Digallat hydrolysieren (Hatamoto *et al.*, 1996).

Die Tannase aus *Aspergillus oryzae* enthält das für lipolytische Enzyme charakteristische Pentapeptid GX SXG in der Form GCSDG, welches der Sequenz in Orf4 ab Position 211 (GCSR G) ähnelt.

Bei der Untersuchung des Substratspektrums der Klone KL01 bis KL12 konnte für KL04 die Hydrolyse kurzkettiger Ester (pNP-, MUF-Butyrat, MUF-Nonanoat) nachgewiesen werden (s. 4.2.1.3). Die Aktivität auf Tributyrin-Platten war eher gering.

4.2.1.2.4 Klon KL05

Das Insert von KL05 umfasste einen DNA-Bereich von 3425 bp (GC-Gehalt 62 %). Darin konnte ein offener Leserahmen (*orf5*) von 1248 bp identifiziert werden, der für 415 Aminosäuren kodierte.

Das *orf5*-Genprodukt war zwei hypothetischen Proteinen aus *Caulobacter crescentus* ähnlich (Nierman *et al.*, 2001), wovon eines das Lipase-Motiv LIPASE_SER (PS00120, s. 1.2.1) enthielt. In Orf5 war dieses charakteristische Sequenzmuster zwischen Aminosäure 224 und 233 ebenfalls fast vollständig in der Form IVLAGHSQGS enthalten. Lediglich an Position 4 wurden die ansonsten üblichen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin, Serin oder Threonin durch Alanin ersetzt, das wie die ersten drei genannten Aminosäuren ebenfalls eine aliphatische Seitenkette besitzt.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität war Klon KL05 in der Lage, neben den kurzkettigen Esterase-Substraten auch längerkettiges MUF-Palmitat sowie Ethyl-Phenylacetat zu spalten, wenn auch letzteres mit geringer Aktivität (s. 4.2.1.3).

4.2.1.2.5 Klon KL06

Auf dem 3207 bp großen Insert von pKL06 befand sich der offene Leserahmen *orf6* mit einer Länge von 1257 Nukleotiden. Innerhalb des daraus abgeleiteten Genprodukts (418 Aminosäuren) wurden zwei verschiedene Bereiche identifiziert: Während die C-terminale Region Ähnlichkeit zu postulierten OsmC-ähnlichen Proteinen, die durch Stress induziert werden, aufwies (s. auch COG1764, COG1765), war die N-terminale Region ähnlich zu postulierten Hydrolasen der α/β -Superfamilie (COG1073). Das konservierte Lipase-Motiv LIPASE_SER (PS00120 bzw. IPB000734, Blocks) war in der hydrolytischen Region von Orf6 zwischen Aminosäure 112 bis 121 fast vollständig enthalten, mit Ausnahme der ersten Position (Glutamin statt Leucin, Isoleucin oder Valin).

Die Untersuchung der Substratspezifität (s. 4.2.1.3) ergab für Klon KL06 ein interessantes Substratspektrum. KL06 hydrolysierte sowohl kurz- und längerkettige pNP- bzw. MUF-

Esterase-Substrate (-Butyrat, -Nonanoat, MUF-Palmitat) als auch verschiedene Ester der Phenyllessigsäure (Ethyl-, Hexyl-, Propyl-Phenylacetat) sowie X-Butyrat und α -Naphthylacetat.

4.2.1.2.6 Klon KL07

Die Nukleotidsequenz des 3026-bp-Inserts von KL07 wies mit 68 % den höchsten GC-Gehalt aller sequenzierten Plasmide auf. Nach Analyse der Sequenzdaten konnten mehrere offene Leserahmen identifiziert werden, darunter *orf7* mit 1527 bp (GC: 69,0 %). Für die aus dem *orf7*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz (508 Aminosäuren) waren Ähnlichkeiten zu zwei hypothetischen Proteinen (Rv2627c und Rv0293c) aus *Mycobacterium tuberculosis* vorhanden (Identität 37 bzw. 30 %, Ähnlichkeit 50 bzw. 47 %), die beide die InterPro-Domäne IPR000379 mit einem katalytisch aktiven Serin aufwiesen (Mulder *et al.*, 2003). Der GC-Gehalt des Genoms von *Mycobacterium tuberculosis* ist mit durchschnittlich 65,6 % (Cole *et al.*, 1998) ähnlich hoch wie der des Inserts von pKL07. Das für Lipasen charakteristische Motiv LIPASE_SER (PS00120, s. 1.2.1) war in Orf7 (ab Position 361) und den beiden Proteinen aus *Mycobacterium tuberculosis* leicht abgewandelt enthalten: An sechster Stelle wurde statt [HYWV] ebenfalls das aliphatische Leucin bzw. Isoleucin verwendet.

KL07_Orf7	361	VGLLGLSLGG	370
Mtub_B70573	265	IGLNGLSLGG	274
Mtub_C70837	259	IALTGISLGG	268

Abb. 9 Vergleich der Aminosäuresequenz von KL07_Orf7 mit ähnlichen Sequenzen der BLAST-Analyse im Bereich des aktiven Serins. Übereinstimmungen mit dem LIPASE_SER-Motiv sind hellgrau unterlegt; Aminosäuren, die in allen Sequenzen übereinstimmen, sind dunkelgrau markiert. KL07_Orf7 aus Boden-DNA (diese Arbeit); Mtub_B70573 bzw. Mtub_C70837: hypothetische Proteine aus *Mycobacterium tuberculosis*.

Klon KL07 zeigte beim Test der Substratspezifität (s. 4.2.1.3) mit den längerkettigen Substraten pNP-Laurat, -Palmitat und MUF-Palmitat hohe Aktivitäten. In geringem Maße wurden außerdem verschiedene Phenyllessigsäure-Ester umgesetzt.

4.2.1.2.7 Klon KL09

Das Insert von pKL09 umfasste 3101 bp und enthielt den 1329 bp langen *orf9*, der für 442 Aminosäuren kodierte. Das *orf9*-Genprodukt hatte geringe Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen aus *Nitrosomonas europaea* bzw. *Archaeoglobus fulgidus* (s. Tabelle 26). Alle weiteren homologen Proteine waren mutmaßliche Pectinacetylerasen aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Oryza sativa*, deren Übereinstimmung

mit Orf9 bei $\pm 30\%$ lag. Die Homologie der meisten Sequenzen beschränkte sich dabei auf die N-terminale Hälfte von Orf9.

Ein Sequenzmotiv, das dem charakteristischen Pentapeptid lipolytischer Enzyme GX SXG entspricht, war in Orf9 ab Aminosäure 206 sowie in den genannten homologen Proteinen in der Form GSSAG bzw. GCSAG enthalten. Anstelle der üblicherweise bei Lipasen an der zweiten Position vorkommenden aromatischen bzw. aliphatischen Aminosäuren [HYWV] befanden sich hier die nucleophilen Aminosäuren Serin bzw. Cystein. Über die funktionelle Bedeutung dieses Sequenzbereichs kann daher nur spekuliert werden.

Bei der Untersuchung des Substratspektrums von KL09 (s. 4.2.1.3) war vor allem die Umsetzung aller drei getesteten Ester der aromatischen Phenylelessigsäure auffällig. Die höchste Aktivität wurde dabei für Ethyl-Phenylacetat gefunden.

4.2.1.2.8 Klon KL10

Auf dem 3177-bp-Insert von pKL10 wurden zwei aufeinander folgende Leserahmen (*orf10.1*, 378 - 1148, und *orf10.2*, 1145 - 2026) identifiziert, deren Genprodukte beide ähnlich waren zu verschiedenen hydrolytischen Enzymen mit α/β -Hydrolase fold (Ollis *et al.*, 1992) sowie zu Nicht-Häm-Haloperoxidasen (1.11.1.-), die ebenfalls diese Sekundärstruktur aufweisen. Zu den hydrolytischen Enzymen gehörten mutmaßliche Hydrolasen ohne genauere Spezifikation, eine Haloacetat-Dehalogenase, Dienoat-Hydrolasen, Arylesterasen (EC 3.1.1.2), lipolytische Enzyme mit Lipase-Motiv, Esterasen, 3-Oxo adipat-Enol-Lactonasen, Epoxidhydrolasen (EC 3.3.2.3) sowie Aminopeptidasen; einige dieser Proteine werden in COG0596 zusammengefasst. Unter den zu Orf10.1 homologen Sequenzen war auch eine bifunktionelle Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (ESTE_PSEFL), die ausgeprägte Sequenzhomologie zu bakteriellen Haloperoxidasen aufweist und in der Lage ist, sowohl Esterhydrolysen als auch Halogenierungen zu katalysieren; zudem enthält sie das für Serinhydrolasen charakteristische Pentapeptid GX SXG (Pelletier und Altenbuchner, 1995). Möglicherweise handelt es sich bei Orf10.1 ebenfalls um ein solches bifunktionelles Enzym. Eine experimentelle Überprüfung könnte dies bestätigen.

Das konservierte Lipase-Motiv LIPASE_SER (PS00120, s. 1.2.1) war in Orf10.1 ab Position 99 leicht abgewandelt in der Form ADIMGYSMGA enthalten: Nur in Position 1 wurden die aliphatischen Aminosäuren [LIV] durch Alanin ersetzt. Ein weiteres Sequenzmotiv wurde beim Vergleich mit der Blocks-Datenbank gefunden. Unter dem Eintrag PR00412 sind konservierte Sequenzabschnitte des C-terminalen Teils von Epoxidhydrolasen, der ebenfalls die Struktur des α/β -Hydrolase fold besitzt,

zusammengefasst (s. Prints-Eintrag PR00412, Attwood *et al.*, 2003). Die Sequenz von Orf10.1 wies dabei Ähnlichkeiten zum Sequenzabschnitt PR00412B auf.

KL10 konnte beim Test der Substratspezifität nur die kurzkettigen Ester pNP- bzw. MUF-Butyrat, MUF-Nonanoat sowie α -Naphthylacetat umsetzen (s. 4.2.1.3).

4.2.1.2.9 Klon KL11

Nach Analyse der Sequenzdaten des Inserts (3423 bp) von pKL11 konnten mehrere offene Leserahmen identifiziert werden, darunter *orf11.1* mit 1407 bp und *orf11.2* mit 771 bp.

Das aus *orf11.1* abgeleitete Genprodukt umfasste 468 Aminosäuren und wies Ähnlichkeiten zu zahlreichen Enzymen mit Amidase-Aktivität auf. Amidasen stellen eine Untergruppe (EC 3.5.-) der Hydrolasen dar, die die Bindung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff hydrolytisch spalten. Die beste Übereinstimmung hatte Orf11.1 dabei mit der Indolacetamid-Hydrolase aus *Bradyrhizobium japonicum* (Identität 46 %, Ähnlichkeit 60 %) (Sekine *et al.*, 1989). Des Weiteren waren Ähnlichkeiten zu rekombinant exprimierten oder postulierten Amidasen aus *Mesorhizobium loti*, *Anabaena sp.*, *Streptomyces sp.* und *Mycobacterium smegmatis* sowie zur Untereinheit A der Glutamyl-tRNA(Gln)-Amidotransferase aus *Streptomyces coelicolor* vorhanden (s. Tabelle 28) (Boshoff und Mizrahi, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Marti *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2002); letztere katalysiert eine Transamidierungsreaktion. Derartige Amidotransferasen sowie verwandte Amidasen sind im COG-Cluster COG0154 zusammengefasst, zu deren Mitgliedern auch Orf11.1 homolog war. Alle weiteren BLAST-Treffer waren ebenfalls Proteine mit Amidase-Aktivität.

Viele Enzyme aus verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen, die an der Hydrolyse von Amididen beteiligt sind, sind evolutionär miteinander verwandt. Alle diese Enzyme enthalten in ihrem zentralen Teil eine hochkonservierte Region, die reich an Glycin-, Serin- und Alaninresten ist: G-[GA]-S-[GS]-[GS]-G-x-[GSA]-[GSAVY]-x-[LIVM]-[GSA]-x(6)-[GSAT]-x-[GA]-x-[DE]-x-[GA]-x-S-[LIVM]-R-x-P-[GSAC] (PROSITE-Eintrag PS00571: AMIDASES). Dieses Sequenzmuster, das dem Mittelteil des Sequenzblocks IPB000120 (Blocks-Datenbank) entspricht, war in Orf11.1 ab Aminosäure 154 praktisch vollständig enthalten; lediglich an Position 8 wurde statt Alanin ein Valin verwendet. Auch die genannten homologen Sequenzen beinhalteten das Amidase-Motiv meist vollständig.

Für die aus dem *orf11.2*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz (256 Aminosäuren) waren Ähnlichkeiten zu zahlreichen Vertretern eines nicht-hydrolytischen Enzyms des oxidativen Abbaus von Fettsäuren (β -Oxidation) vorhanden (s. Tabelle 29): Die Enoyl-CoA-Hydratase (EC 4.2.1.17) gehört zur Gruppe der Hydro-Lyasen (EC 4.2.1), die eine Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung durch die Eliminierung eines Wassermoleküls spalten, wobei eine neue

Doppelbindung oder ein neuer Ring entsteht. Beim Fettsäureabbau findet die Reaktion in umgekehrter Richtung statt, d. h. durch Addition eines Moleküls Wasser an die Doppelbindung des Substrats (Enoyl-CoA) wird dieses hydratisiert und so 3-Hydroxyacyl-CoA gebildet. Dessen Hydroxygruppe wird anschließend durch die Oxidoreductase 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.1.1.35) zur Ketogruppe dehydriert bzw. oxidiert. In *E. coli* und in den Peroxisomen eukaryotischer Zellen sind diese beiden Enzyme in Form von Domänen Teil eines Multienzymkomplexes.

Die größte Ähnlichkeit hatte Orf11.2 zur Enoyl-CoA-Hydratase-Domäne des Enzyms HBD-1 aus *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997), das auch eine 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Domäne enthält, gefolgt von der postulierten Enoyl-CoA-Hydratase EchA8 aus *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Auch die weiteren Treffer des BLAST-Alignments waren Enoyl-CoA-Hydratasen oder verwandte Enzyme (z. B. Crotonase, PIR:T47261, Boynton *et al.*, 1996), die in der COG-Datenbank unter anderem in der Gruppe homologer Proteine COG1024 zusammengefasst werden und strukturell die Sekundärstruktur der Domäne PF00378 aufweisen.

Als typisches Sequenzmuster enthalten diese Enzyme eine konservierte Region, die reich an Glycin und hydrophoben Resten ist: [LIVM]-[STA]-x-[LIVM]-[DENQRHSTA]-G-x(3)-[AG](3)-x(4)-[LIVMST]-x-[CSTA]-[DQHP]-[LIVMFY] (PROSITE-Eintrag PS00166: ENOYL_COA_HYDRATASE). Weitere für Enoyl-CoA-Hydratasen konservierte Sequenzabschnitte sind z. B. auch in der Blocks-Datenbank unter IPB001753 (Blocks A - E) zusammengefasst, wobei Block C dem genannten PROSITE-Motiv entspricht. Die Sequenz von Orf11.2 wies Ähnlichkeiten zu den Sequenzabschnitten IPB001753B, -C und -D auf; das ab Aminosäure 106 enthaltene Motiv PS00166 wich dabei an zwei Stellen von der konservierten Abfolge ab: An Position 6 wurde Glycin durch ein Arginin ersetzt, an der letzten Position wurde statt der Reste [LIVMFY] das ebenfalls aromatische Tryptophan verwendet.

Beide genannten Enzymarten sind am Abbau von Fetten beteiligt, im Fall der Enoyl-CoA-Hydratase auch unter Beteiligung eines Wassermoleküls; allerdings handelt es sich dabei nicht um hydrolytische Enzyme, die die hydrolytische Spaltung des Tributyrins katalysieren könnten. Vermutlich dürfte deshalb für die lipolytische Aktivität von KL11 eher das Genprodukt von *orf11.1* verantwortlich sein, zumal es sich bei Amidasen ebenfalls um Hydrolasen handelt. Diese Vermutung sollte aber durch Subklonierung beider Leserahmen noch experimentell überprüft werden.

Bei der Überprüfung der Substratspezifität war KL11 als einziger der getesteten Klone in der Lage, sowohl mit ganzen Zellen als auch mit Kulturüberstand kurz- und länger-kettige

aliphatische Ester (pNP- bzw. MUF-Butyrat, MUF-Nonanoat, pNP-Laurat, -Palmitat, MUF-Palmitat, X-Butyrat, α -Naphthylacetat) zu spalten (s. 4.2.1.3).

4.2.1.2.10 Klon KL12

Auf der Nukleotidsequenz des mit 5215 bp relativ großen Inserts von KL12 konnte ein Leserahmen von 897 bp Länge identifiziert werden (*orf12*). Das korrespondierende Genprodukt (298 Aminosäuren) wies neben Sequenzhomologien zu zwei hypothetischen Proteinen aus *Caulobacter crescentus* (Nierman *et al.*, 2001) auch Ähnlichkeiten zu einer Endo-1,4- β -Xylanase aus *Butyrivibrio fibrisolvans* auf, die die hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindungen von Xylan (Hauptkomponente von Hemicellulose) katalysiert (Lin und Thomson, 1991). Geringe Ähnlichkeiten waren zu verschiedenen lipolytischen Enzymen, darunter hauptsächlich Carboxylesterasen (Typ B), vorhanden.

Das Sequenzmotiv IPB002168C, das beim Vergleich mit der Blocks-Datenbank für Orf12 gefunden wurde, entspricht der konservierten Aminosäuresequenz um das aktive Serin der lipolytischen Enzyme der GDXG-Familie (LIPASE_GDXG_SER, s. 1.2.1). Die in Orf12 ab Position 183 enthaltene Sequenzabfolge IGIAGFSAGGGVA stimmte an Position 6 und 12 nicht mit dem konservierten Motiv überein: Statt des typischen Aspartats war ein Phenylalaninrest enthalten, Leucin wurde durch Valin ersetzt. Ob Orf12 wirklich zu den GDXG-Enzymen gezählt werden kann, ist deshalb fraglich.

Für KL12 konnte die Hydrolyse kurzkettiger Ester (pNP- bzw. MUF-Butyrat, MUF-Nonanoat, X-Butyrat) sowohl mit Zellen als auch mit Kulturüberstand nachgewiesen werden (s. 4.2.1.3).

4.2.1.2.11 Klon KL13

Das Insert von pKL13 umfasste einen DNA-Bereich von 3757 bp (GC-Gehalt 59 %). Darin konnte ein offener Leserahmen (*orf13*) von 1014 bp identifiziert werden, der für 337 Aminosäuren kodierte. Orf13 hatte Ähnlichkeit zu verschiedenen echten und mutmaßlichen hydrolytischen Enzymen, darunter hauptsächlich Poly(3-Hydroxyalkanoat)-Depolymerasen sowie Esterasen (s. a. PFAM-Familie PF00756). Alle genannten Sequenzen enthalten das InterPro-Profil IPR000379 um ein katalytisch aktives Serin (Mulder *et al.*, 2003).

Das für Lipasen charakteristische Motiv LIPASE_SER (PS00120, s. 1.2.1) war in Orf13 ab Aminosäure 180 in der Form IGLFGHSNGG enthalten. Statt der an Position 4 üblichen Aminosäuren [LIVMST] befand sich hier ein aromatisches Phenylalanin.

4.2.1.2.12 Klon KL15

Klon KL15 enthielt mit 5533 bp das größte Insert der Tributyrin-aktiven Klone. Es wies einen GC-Gehalt von 52 % auf. Nach Analyse der Sequenzdaten konnten mehrere offene Leserahmen identifiziert werden, darunter *orf15* mit 660 bp (GC: 59,6 %).

Das aus *orf15* abgeleitete Genprodukt (219 Aminosäuren) zeigte große Ähnlichkeit zu verschiedenen postulierten Carboxylesterasen der Spezies *Xanthomonas*, *Xylella* und *Pseudomonas* (s. Tabelle 32). Daneben wies Orf15 auch 42 % Identität (54 % Ähnlichkeit) zur Carboxylesterase 2 (Esterase II, Gen *estB*) aus *Pseudomonas fluorescens* auf, die bereits in *E. coli* exprimiert und charakterisiert sowie röntgenkristallographisch untersucht wurde (PIR:JU0277, Hong *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1997). EstB weist den typischen α/β -Hydrolase *fold* mit der katalytischen Triade Ser-His-Asp auf (Kim *et al.*, 1997) und enthält um das katalytisch aktive Serin das charakteristische Pentapeptid GX SXG der Serin-Esterasen (Hong *et al.*, 1991). Sie wird der Familie VI der lipolytischen Enzyme zugeordnet, die zu ca. 40 % homolog zu eukaryotischen Lysophospholipasen sind (Arpigny und Jaeger, 1999). Alle fünf Enzyme dieser Familie finden sich auch unter den zu Orf15 homologen Sequenzen der BLAST-Analyse. Mit einer zweiten Carboxylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* (EstA), deren Sequenz zu 90 % mit EstB übereinstimmt, war das *orf15*-Genprodukt zu 41 % identisch (PIR:JQ0885, *submission*: Yu, F.). Weitere Treffer der BLAST-Analyse waren ebenfalls Enzyme mit Esterase- bzw. Lysophospholipase-Aktivität. Die Ähnlichkeit zu zwei Gruppen orthologer Esterasen (COG0400, COG0627) sowie zu α/β -Hydrolasen (COG1073) beim Vergleich mit der COG-Datenbank deutet ebenfalls auf eine Esterase-Aktivität von Orf15 hin.

Das für lipolytische Enzyme charakteristische Pentapeptid GX SXG um das aktive Serin war im *orf15*-Genprodukt ab Position 115 sowie in den ersten sechs ähnlichen Proteinen der BLAST-Analyse (s. o. und Tabelle 32) in der Form GFSQG enthalten. Von der erweiterten Form LIPASE_SER (s. 1.2.1) weichen die Sequenzen jeweils an Position 4 und 6 ab: Die Aminosäuren [LIVMST] wurden durch Glycin oder Alanin ersetzt, statt [HYWV] wurde Phenylalanin verwendet, das ebenfalls eine aromatische Seitenkette enthält.

Ein *Alignment* der genannten ähnlichen Sequenzen und Orf15 ist in Abb. 10 dargestellt.

4.2.1.2.13 Klon KL16

Der auf dem Insert (3493 bp) von pKL16 identifizierte Leserahmen *orf16* kodierte für 398 Aminosäuren. Das aus *orf16* abgeleitete Protein wies große Ähnlichkeit zum *orf9*-Genprodukt aus KL09 auf (47 % identische Aminosäuren, s. *Alignment* in Abb. 11). Infolgedessen stimmten auch die Ergebnisse der Suche nach homologen Sequenzen in den Proteindatenbanken teilweise überein: Die ersten drei Treffer der BLAST-Analyse waren für Orf16 und Orf9 identisch (s. Tabelle 33, Tabelle 26 und 4.2.1.2.7).

Wie Orf9 zeigte Orf16 des Weiteren Ähnlichkeiten zu verschiedenen mutmaßlichen Pectinacetylerasen, hauptsächlich aus *Arabidopsis thaliana*. Die Übereinstimmung mit der klonierten Pectinacetylerase aus *Vigna radiata* (PIR:S68805) (Breton *et al.*, 1996) lag bei 26 % identischen (40 % ähnlichen) Aminosäuren.

Die Aminosäuren 210 - 219 in Orf16 umfassten ein Sequenzmotiv, das bis auf eine Ausnahme mit dem Motiv der GDXG-Familie um das aktive Serin (IPB002168C) übereinstimmte; an 2. Position war statt des Aspartat-Restes ein zweites nucleophiles Serin enthalten – wie an der entsprechenden Position in Orf9 (s. Abb. 11).

Phospho- bzw. Acetyltransferasen, Epoxidhydrolasen, 3-Oxoadipat-Enol-Lactonasen, lipolytische Enzyme mit Lipase-Motiv sowie Chloro- bzw. Bromoperoxidasen.

Orf18 sowie die ersten sechs homologen Enzyme beinhalteten das Lipase-Motiv LIPASE_SER (PS00120, s. 1.2.1) in leicht abgewandelter Form (s. Abb. 12): In Position 1 und 6 wurden die aliphatischen [LIV] bzw. aromatischen [HYWV] Aminosäuren durch Alanin ersetzt. An Position 8 befand sich bei allen Sequenzen ein konserviertes Methionin.

KL18_Orf18	112	AHIVGASMGG	121
Q9KIU0	243	AHVVGASMGG	252
Mtub_C70614	117	AHVVGASMGG	126
Mlep_E87146	120	AHIVGASMGG	129
Acal_Q57172	132	VNVIGASMGG	141
Acal_S57530	141	VNVIGASMGG	150
Paer_D83197	139	AHVLGASMGG	148

Abb. 12 Vergleich der Aminosäuresequenz von KL18_Orf18 mit homologen Sequenzen der BLAST-Analyse im Bereich des Konsensusmotivs LIPASE_SER (PS00120). Übereinstimmungen mit dem LIPASE_SER-Motiv sind hellgrau unterlegt; Aminosäuren, die in allen Sequenzen übereinstimmen, sind dunkelgrau markiert. KL18_Orf18 aus Boden-DNA (diese Arbeit); Q9KIU0: Esterase aus DNA einer Umweltprobe; Mtub_C70614: LipG aus *Mycobacterium tuberculosis*; Mlep_E87146: Hydrolase LipG aus *Mycobacterium leprae*; Acal_Q57172: Esterase EstB aus *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1; Acal_S57530: Carboxylesterase EstB aus *Acinetobacter calcoaceticus* BD413; Paer_D83197: Hydrolase PA3586 aus *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.1.2.15 Gesamtübersicht

Folgende Tabelle (Tabelle 13) gibt einen Überblick über alle mit Hilfe des Tributyrin-Screenings identifizierte Klone. Neben den Angaben zu Größe und GC-Gehalt des gesamten Inserts sowie Position und Länge des für die lipolytische Aktivität mutmaßlich verantwortlichen Leserahmens sind zu dessen Beschreibung jeweils der beste BLASTP-Treffer, die Art weiterer ähnlicher Enzyme und die durch PEDANT identifizierte Motive (Blocks, PROSITE) angegeben. Die letzte Spalte enthält den jeweiligen Sequenzabschnitt der Aminosäuresequenz um das mutmaßliche aktive Serin.

Ergebnisse

Tabelle 13: Eigenschaften der Tributyrin-aktiven Klone KL01 bis KL18. Insert [bp] bzw. GC [%]: Länge bzw. GC-Gehalt des Inserts. Angaben zum offenen Leserahmen (*orf*): ORF (Position): Bezeichnung und Nukleotid-Position des *orfs* innerhalb der Gesamtsequenz des Inserts; ORF [AS]: Länge des korrespondierenden *orf*-Genprodukts in Aminosäuren; Beschreibung: bester BLASTP-Treffer (Organismus), Art weiterer ähnlicher Enzyme (*kursiv*), durch PEDANT identifizierte Motive der Blocks- bzw. PROSITE-Datenbank; Lipase-Motiv: Sequenzabschnitt um das mutmaßliche aktive Serin, rot: Abweichung zu den Aminosäuren, die in der Regel innerhalb des charakteristischen Pentapeptids GXSXG bzw. des Motivs LIPASE_SER (bzw. IPB000734, Blocks) bzw. des Motivs LIPASE_GDXG_SER (bzw. IPB0002168C, Blocks) enthalten sind (Einzelheiten s. Text).

Klon	Insert [bp]	GC [%]	ORF (Position)	ORF [AS]	Beschreibung	Lipase-Motiv
KL01	4221	63	orf1.1 (1245 - 142)	367	BLAST: PIR:E82643 Esterase XF1743 (<i>Xylella fastidiosa</i>); <i>Enzyme GDXG-Familie</i> ; BLOCKS: IPB002168 (A,B) Lipolytic enzymes	XXXXGSSAGG
			orf1.2 (2881 - 1598)	427	BLAST: PIR:B75297 Dipeptidyl-Peptidase IV (<i>Deinococcus radiodurans</i>); <i>Peptidasen</i> ; BLOCKS: IPB000734 Lipase	XXXXGHSMGG
KL02	3305	58	orf2 (1283 - 282)	333	BLAST: PIR:D82761 Lipase/Esterase XF0781 (<i>Xylella fastidiosa</i>); <i>Enzyme GDSL-Familie</i> ; BLOCKS: IPB1087A GDSL lipolytic enzyme PROSITE: LIPASE_GDSL_SER	LVVFGDSLSDTG
KL04	2926	58	orf4 (758 - 1612)	284	BLAST: PIR:JC5087 Tannase precursor (EC 3.1.1.20) (<i>Aspergillus oryzae</i>)	XXXXGCSRGG
KL05	3425	62	orf5 (3387 - 2140)	415	BLAST: PIR:B87427 Hypothetical protein CC1433 (<i>Caulobacter crescentus</i>); BLOCKS: IPB000734 Lipase	IVLAGHSQGS
KL06	3207	59	orf6 (52 - 1308)	418	BLAST: PIR:G83495 Hypothetical protein PA1203 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>); <i>Hydrolasen, OsmC-ähnliche Proteine</i> ; BLOCKS: IPB000734 Lipase	QILIGHSLGG
KL07	3026	68	orf7 (1754 - 228)	508	BLAST: PIR:B70573 Hypothetical protein Rv2627c (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	VGLLGLSLGG
KL09	3101	65	orf9 (397 - 1725)	442	BLAST: TREMBL:Q82U14 Hypothetical protein (<i>Nitrosomonas europaea</i>); <i>postulierte Pectinacetylesterasen</i>	VLVTGSSAGG
KL10	3177	61	orf10.1 (378 - 1148)	256	BLAST: TREMBL:Q9L3R2 Hydrolase (<i>Rhizobium leguminosarum</i>); <i>αβ-Hydrolasen, Nicht-Häm-Haloperoxidasen</i> ; BLOCKS: PR00412B Epoxide hydrolase	ADIMGYSMGA
			orf10.2 (1145 - 2026)	293	BLAST: PIR:F70567 probable bpoA protein (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>); <i>wie oben</i>	PGVVGASLGG
KL11	3423	64	orf11.1 (3275 - 1869)	468	BLAST: PIR:S05311 Indoleacetamide hydrolase (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>); <i>Amidasen</i> ; BLOCKS: IPB000120 Amidase	
			orf11.2 (207 - 977)	256	BLAST: PIR:A69252 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/ Enoyl-CoA hydratase (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>); <i>Enoyl-CoA-Hydratasen</i> ; BLOCKS: IPB1753 (B - D) Enoyl-CoA hydratase/isomerase	

Klon	Insert [bp]	GC [%]	ORF (Position)	ORF [AS]	Beschreibung	Lipase-Motiv
KL12	5215	67	orf12 (4883 - 3987)	298	BLAST: PIR:D87401 hypothetical protein CC1226 (<i>Caulobacter crescentus</i>); <i>hydrolyt. Enzyme (Carboxylesterasen Typ B)</i> ; BLOCKS: IPB002168C Lipolytic enzymes	IGIAGFSAGG
KL13	3757	59	orf13 (3373 - 2360)	337	BLAST: PIR:B83579 hypothetical protein PA0543 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>); <i>hydrolyt. Enzyme. (Esterasen, Poly(3-hydroxyalkanoat)Depolymerasen)</i> ; BLOCKS: PF00756 Putative esterase	IGLFGHSNGG
KL15	5533	52	orf15 (2427 - 3086)	219	BLAST: TREMBL:Q8PPR6 Carboxylesterase (<i>Xanthomonas axonopodis</i>); <i>Carboxylesterasen</i>	IIIAGFSQGG
KL16	3493	59	orf16 (2900 - 1704)	398	BLAST: TREMBL:Q82U14 Hypothetical protein (<i>Nitrosomonas europaea</i>); <i>postulierte Pectinacetyleraseren</i> ; BLOCKS: IPB002168C Lipolytic enzymes	IVVAGSSAGG
KL18	3626	59	orf18 (389 - 1279)	296	BLAST: TREMBL:Q9KIU0 Esterase (Umwelt-DNA); <i>α/β-Hydrolasen</i> ; BLOCKS: IPB000734 Lipase BLOCKS: PF00756 Putative esterase	AHIVGASMGG

4.2.1.3 Substratspektrum der Klone

Zur qualitativen Untersuchung des Substratspektrums der Klone KL01 bis KL12 wurde die Aktivität gegenüber einer Reihe gängiger Esterase-Substrate untersucht, wobei teilweise auch die Kettenlänge des Acylrests variiert wurde. Die verschiedenen Assays wurden sowohl mit ganzen Zellen als auch mit zellfreiem Kulturüberstand nach den Protokollen in Abschnitt 3.14 durchgeführt (persönliche Mitteilung Dr. Michael Breuer).

Bei Verwendung von ganzen Zellen waren alle getesteten Klone in der Lage, die kurzkettigen Substrate pNP-Butyrat und MUF-Butyrat zu hydrolysieren (s. Tabelle 14); MUF-Nonanoat wurde ebenfalls von allen Klonen gespalten. Die pNP- bzw. MUF-Ester längerkettiger aliphatischer Fettsäuren (-Laurat, -Palmitat) wurden dagegen nur noch durch KL05, KL06, KL07 und KL11 umgesetzt. Die Umsetzung von X-Butyrat war im Vergleich zu den kurzkettigen pNP- bzw. MUF-Estern verringert: Nur KL01, KL06, KL09, KL11 und KL12 waren in der Lage, dieses Substrat zu hydrolysieren. Die Esterderivate der aromatischen Phenyllessigsäure (Ethyl-, Hexyl-, Propyl-Phenylacetat) wurden von KL06 und KL09 umgesetzt, mit geringer Aktivität zum Teil auch von KL05 und KL07.

Bei der Verwendung des Kulturüberstands waren Unterschiede in den Aktivitäten festzustellen (Tabelle 15). Kurzkettige pNP- und MUF-Substrate wurden weiter von allen Klonen umgesetzt. Die Hydrolyse von pNP-Laurat oder -Palmitat bzw. MUF-Palmitat konnte aber lediglich für KL11 nachgewiesen werden. Auch X-Butyrat wurde nur noch von KL11

und KL12 umgesetzt. In einem Vorversuch hatte KL11 zudem X-Caprylat hydrolysiert (nicht gezeigt).

Kein Klon war bei Verwendung der Überstände in der Lage, die Ester der Phenylessigsäure umzusetzen. α -Naphthylacetat wurde dagegen von allen getesteten Klonen mit geringer Aktivität hydrolysiert.

Der Nachweis einer Umsetzung von emulgiertem Tributyrin in Lösung war im Gegensatz zum Plattentest (s. 4.2.1.1) mit keinem der Klone möglich.

Tabelle 14: Substratspektrum der Klone KL01 bis KL12 mit ganzen Zellen. [+] Aktivität, [(+)] geringe Aktivität, [-] keine Aktivität, [nd] nicht bestimmt.

Klon	pNP-Butyrat	pNP-Laurat	pNP-Palmitat	MUF-Butyrat	MUF-Nonanoat	MUF-Palmitat	X-Butyrat	Ethyl-Phenylacetat	Hexyl-Phenylacetat	Propyl-Phenylacetat	α -Naphthylacetat
KL01	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	nd
KL02	+	-	-	+	+	-	-	-	(+)	-	nd
KL04	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	nd
KL05	+	-	-	+	+	+	-	(+)	-	-	nd
KL06	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nd
KL07	+	+	+	+	+	+	-	(+)	+	+	nd
KL09	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	nd
KL10	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	nd
KL11	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	nd
KL12	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	nd

Tabelle 15: Substratspektrum der Klone KL01 bis KL12 mit Kulturüberstand. [+] Aktivität, [(+)] geringe Aktivität, [-] keine Aktivität, [nd] nicht bestimmt.

Klon	pNP-Butyrat	pNP-Laurat	pNP-Palmitat	MUF-Butyrat	MUF-Nonanoat	MUF-Palmitat	X-Butyrat	Ethyl-Phenylacetat	Hexyl-Phenylacetat	Propyl-Phenylacetat	α -Naphthylacetat
KL01	+	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	(+)
KL02	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)
KL04	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	nd
KL05	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)
KL06	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)
KL07	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)
KL09	+	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	(+)
KL10	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)
KL11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
KL12	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	nd

4.2.2 Screening auf Phosphatase-Aktivität

Als Substrat zum Nachweis bakterieller alkalischer Phosphatasen wurde X-Phosphat (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) verwendet. Nach hydrolytischer Abspaltung des Phosphatrests entsteht in Anwesenheit von Luftsauerstoff der blaue Farbstoff 5-Brom-4-chlor-Indigo, der positiven Klonen eine hell- bis dunkelblaue Färbung verleiht (Michaelis *et al.*, 1983; Calamia und Manoil, 1990).

Alle in 96er-Mikrotiterplatten vereinzelt Klonen (s. 4.1.2.4) wurden auf Phosphatase-Aktivität untersucht (s. 3.15.1 und 3.15.3).

Von insgesamt knapp 32000 untersuchten Klonen zeigten bei diesem initialen Screening 83 Klonen eine blaue oder bläuliche Koloniefarbe. Nach zwei weiteren Vereinzelausstrichen konnten davon 13 Klonen aufgrund ihrer mittel- bis dunkelblauen Färbung eindeutig als Phosphatase-positiv identifiziert werden.

Tabelle 16: Screening der in 96er-Mikrotiterplatten abgelegten Genbanken auf Phosphatase-Aktivität

Genbank	L1	L2	L3	Gesamt
Anzahl getestete Klone	23398	4942	3627	31967
eindeutig positive Klone	9	3	1	13
Trefferrate positive Klone	1 : 2600	1 : 1647	1 : 3627	1 : 2459

Die 13 eindeutig positiven Klone stammten aus allen drei Genbanken (s. Tabelle 16). Bezogen auf die Zahl der pro Genbank untersuchten Klone ergaben sich Trefferraten von 1 zu 1600 bis 1 zu 3600.

4.2.2.1 Untersuchung der gefundenen Phosphatasen auf Phytase-Aktivität

Im weiteren Verlauf wurden alle Phosphatase-positiven Klone auf Phytase-Aktivität untersucht. Dazu wurden die Zellpellets aus 2 - 5 ml ÜN-Kultur des jeweiligen Klons mit 500 - 600 µl Acetatpuffer versetzt und in der Kugelmühle aufgeschlossen (s. 3.11.1). Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (s. 3.13) wurden jeweils 7 µg Gesamtprotein der Zellextrakte in insgesamt 70 µl Acetatpuffer als Probe im Phytase-Assay eingesetzt (Durchführung s. 3.15.6). Um zu untersuchen, ob die Aktivität bei erhöhter Temperatur eventuell gesteigert ist, wurde der Test zusätzlich bei 50 und 60 °C durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Rohextrakt von *E. coli* DH5α mit pJOE930 eingesetzt.

Zur Überprüfung der Stabilität sowohl des Phosphat-Molybdat-Eisensulfatkomplexes als auch des Substrates bei erhöhter Temperatur wurde auch Kaliumdihydrogenphosphat in Konzentrationen von 0 - 400 μM mit und ohne zugesetztes Substrat vermessen.

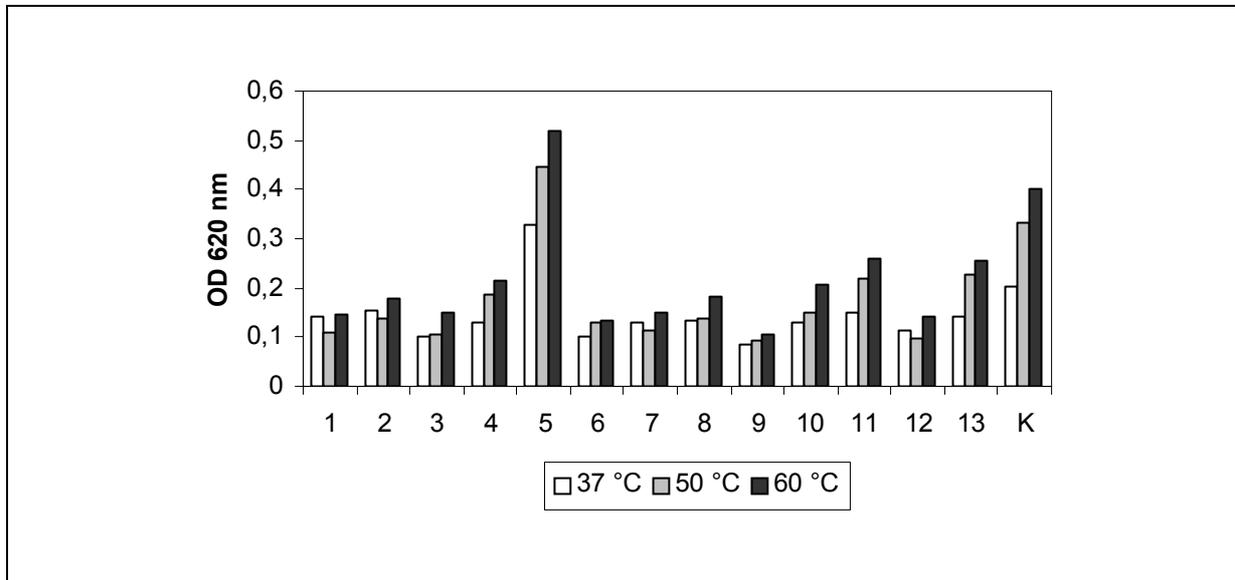


Abb. 13 Untersuchung der Klone mit Phosphatase-Aktivität auf Phytase-Aktivität. Nach Inkubation der Zellextrakte der Phosphatase-positiven Klone mit Na-Phytat als Substrat bei 37, 50 oder 60 °C und Zugabe von Farbreagenz wurde die Intensität des mit freigesetztem Phosphat gebildeten Farbkomplexes und damit die Aktivität der Klone durch Messung der Absorption bei 620 nm bestimmt. 1 - 13: Phosphatase-positiv Klone, 5: KL22; K: *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Negativkontrolle).

Von den 13 untersuchten Klonen wies ein Klon, KL22, eine erhöhte Aktivität auf, die mit zunehmender Temperatur leicht anstieg (Abb. 13). Die Werte der Negativkontrolle sowie der restlichen Klone nahmen mit steigender Temperatur ebenfalls leicht zu. Die Absorption der Phosphatreihe mit und ohne zugegebenes Substrat blieb dagegen bei allen drei Temperaturen gleich, d. h. sowohl der gebildete Phosphat-Molybdat-Eisensulfatkomplex als auch das Substrat waren bei erhöhter Temperatur stabil. Aus den Kalibrierkurven wurde für KL22 eine Aktivität von 0,75 U/mg Gesamtprotein (37 °C) bzw. 1,07 U/mg (60 °C) errechnet.

Nach Isolierung des rekombinanten Plasmids pKL22 aus einer Übernachtskultur und Restriktionsverdau mit *EcoRI*, *BamHI* oder *AatII* ergab sich für das Insert eine Größe von ca. 3,6 kb, welche durch Sequenzierung mit 3643 bp bestätigt wurde. Die Insertsequenz wurde mit Hilfe des PEDANT-Software-Systems einem Homologie-Vergleich mit bekannten Sequenzen verschiedener Datenbanken unterzogen (s. Tabelle 37). Dabei wurde ein offener Leserahmen von 996 bp (*orf22*) identifiziert, der einen GC-Gehalt von 42 % aufwies und für 331 Aminosäuren kodierte. Das *orf22*-Genprodukt wies mit 61 % identischen (76 % ähnlichen) Aminosäuren signifikante Ähnlichkeit zur unspezifischen sauren Phosphatase

NapE aus *Sinorhizobium meliloti* auf (Deng *et al.*, 2001). Auch die nachfolgenden BLAST-Treffer waren unspezifische saure Phosphatasen, wie z. B. das Enzym NapD oder ein NapD-ähnliches Protein, beide ebenfalls aus *Sinorhizobium meliloti*.

4.2.3 Screening auf Protease-Aktivität

Die Detektion proteolytischer Aktivität kann auf Agarplatten erfolgen, die als emulgiertes Substrat Magermilch enthalten und deshalb eine Trübung aufweisen. Aufgrund der hydrolytischen Spaltung der Peptidbindungen des Milchproteins Caseins in lösliche Stickstoffverbindungen bildet sich um Protease-haltige Klone ein klarer Hof.

Die Untersuchung auf Protease-Aktivität (s. 3.15.1 und 3.15.4) erfolgte mit allen in 96er-Mikrotiterplatten vereinzelt Klone (s. 4.1.2.4).

Von 32000 untersuchten Klone war lediglich bei einem Klon eine Hofbildung erkennbar, die jedoch bei Einzelausstrichen nicht mehr reproduzierbar war.

4.2.4 Screening auf Amylase-Aktivität

Werden LB-Agarplatten mit löslicher Stärke versetzt, können Amylase-haltige Klone diese durch Hydrolyse der glykosidischen Bindungen abbauen. Nicht-abgebaute Stärke wird nach Zugabe einer Kaliumiodid-Iod-Lösung durch die auftretende Violett-färbung nachgewiesen, während Amylase-aktive Kolonien durch farblose Höfe umgeben sind.

Die Untersuchung auf Amylase-Aktivität wurde mit allen in 96er-Mikrotiterplatten vereinzelt Klone (s. 4.1.2.4) durchgeführt (s. 3.15.1 und 3.15.5).

Bei diesem initialen Screening waren von insgesamt knapp 32000 untersuchten Klone 59 aktiv. Nach mehreren Vereinzlungsausstrichen trat Hofbildung noch bei 51 Klone auf. Nach Isolierung der rekombinanten Plasmide dieser 51 Klone und Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* sowie *AatII* zeigte es sich, dass davon nur 38 Plasmide ein Insert enthielten; die anderen waren ohne Insert religiert und konnten nicht mehr mit *EcoRI* oder *BamHI* gespalten werden, vermutlich aufgrund von Deletionen der palindromischen Sequenzen (s. auch 5.1.2).

Tabelle 17: Screening der in 96er-Mikrotiterplatten abgelegten Genbanken auf Amylase-Aktivität

Genbank	L1	L2	L3	Gesamt
Anzahl getestete Klone	23398	4942	3627	31967
positive Klone	34	2	2	38
Trefferrate	1 : 688	1 : 2471	1 : 1814	1 : 841

Wiederum stammten die inserthaltigen Klone aus allen drei Genbanken (s. Tabelle 17). Bezogen auf die Zahl der pro Genbank untersuchten Klone ergaben sich so Trefferraten von 1 zu 700 bis 1 zu 2500. Bezieht man die Zahl der positiven Klone auf alle 32000 untersuchten Kolonien, ergibt sich ein Verhältnis von 1 zu 800.

Die Inserts der rekombinanten Plasmide aus L1 waren durchschnittlich 3,4 kb groß; der Verdau beider Plasmide aus L2 ergab jeweils eine Größe von ca. 2,2 kb, und die beiden Plasmide aus L3 enthielten Inserts von ca. 3,4 und 4,2 kb.

4.2.5 Weitere Enzymaktivitäten

Zwei Klone der in Mikrotiterplatten vereinzelt Genbanken (s. 4.1.2.4), KL20 und KL21, wiesen eine braune Färbung auf. Nach Einzelausstrich auf LB-Agar und Inkubation über Nacht waren die Kolonien bräunlich-rosa und davon ausgehend auch die Platte selbst braun gefärbt, wobei die Plattenfärbung den Anschein der Diffusion eines Farbstoffes erweckte. Übernachtkulturen von Einzelkolonien hatten ebenfalls eine braune Farbe. Der braune Phänotyp beider Klone konnte nach Retransformation der isolierten Plasmide in *E. coli* DH5 α bestätigt werden.

Die Sequenzierung der rekombinanten pJOE930-Plasmide ergab für das Insert von KL20 eine Größe von 3173 bp (GC 58,7 %); das Insert von KL21 umfasste einen Bereich von 2509 bp (GC 61,6 %).

Mit Hilfe der PEDANT-Analyse wurde auf dem Insert von KL20 ein offener Leserahmen (*orf20*) identifiziert, der für 366 Aminosäuren kodierte und einen GC-Gehalt von 61,7 % aufwies. Das *orf20*-Genprodukt war sehr ähnlich zur 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. (HPPD_PSESP) (77 % Identität, 86 % Ähnlichkeit) (Ruetschi *et al.*, 1992) und weiteren Enzymen der Familie der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen (EC 1.13.11.27) (s. Tabelle 35). Diese Enzyme katalysieren innerhalb des Abbauweges von Phenylalanin und Tyrosin die Umwandlung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisinsäure. Homogentisat kann durch Luftsauerstoff oxidiert werden und spontan zu melaninähnlichen braunen Pigmenten polymerisieren, die einige Bakterien vor Schädigung durch Licht schützen.

4.2.6.1 pH-MTP-Assay

Mit Phenolrot und Bromthymolblau wurden pH-Indikatoren verwendet, deren Umschlagspunkt im neutralen bzw. leicht basischen Bereich liegt und die einen hohen Kontrast des Farbumschlags zeigen. Phenolrot (Phenolsulfonphtalein, $pK_s = 7,9$, Budavari *et al.*, 1989) verändert seine Farbe zwischen pH 6,4 und 8,2 von gelb über orange nach rotviolett. Bromthymolblau (3,3'-Dibromthymolsulfonphtalein, $pK_s = 7,0$, Budavari *et al.*, 1989) schlägt zwischen pH 6,0 und 7,6 von gelb über grün nach blau um. Die Mischung beider Indikatoren im Verhältnis 1:1 ist im sauren Bereich gelb, im alkalischen Bereich violett gefärbt (Umschlag bei ca. pH 7,5). Die Verwendbarkeit dieser pH-Indikatoren in Mikrotiterplatten ist in Abb. 15 gezeigt.

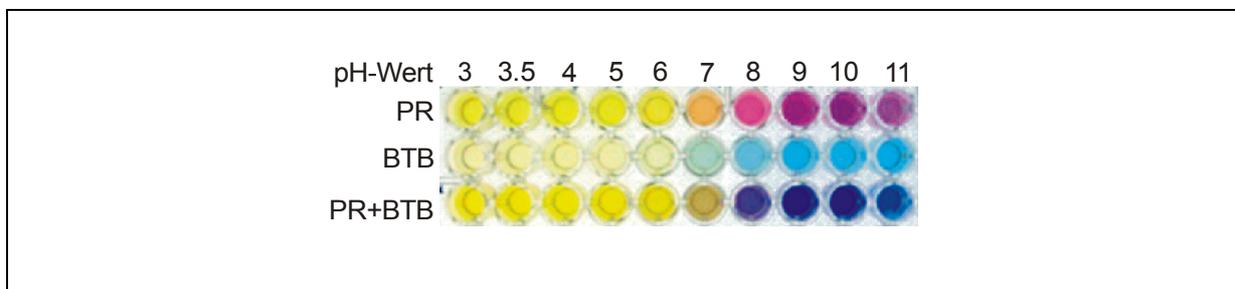


Abb. 15 Farbabstufungen von Phenolrot und Bromthymolblau bei pH 3 - 11. Theorell-Stenhagen-Puffer, dessen pH auf Werte zwischen 3 und 11 eingestellt worden war, wurde mit je 13 $\mu\text{g/ml}$ Phenolrot und/oder Bromthymolblau versetzt. Reihe 1 (PR): + 13 $\mu\text{g/ml}$ Phenolrot; Reihe 2 (BTB): + 13 $\mu\text{g/ml}$ Bromthymolblau; Reihe 3 (PR+BTB): + 13 $\mu\text{g/ml}$ Phenolrot und + 13 $\mu\text{g/ml}$ Bromthymolblau. Spalte 1 - 10: pH 3 - 11.

Um ein pH-basiertes Testverfahren für den Nachweis einer Dehalogenierung nutzen zu können, muss die Absenkung des pH-Wertes infolge der Freisetzung von Protonen detektierbar und mit dem Anstieg der Chloridkonzentration korrelierbar sein. Um zu überprüfen, ob bei Verwendung von 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 als Reaktionspuffer dieser Zusammenhang gegeben ist, wurden Zellextrakte des Dehalogenase-haltigen Klons 1164 (s. 2.8) mit Monochloracetat (MCA) als Substrat in 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 inkubiert (s. 3.12.3) und anschließend sowohl freigesetztes Chlorid (s. 3.15.7.3) als auch der pH-Wert (s. 3.15.7.2) gemessen. In Abb. 16 A ist der Anstieg der Chloridkonzentration nach Dehalogenierung von MCA durch Klon 1164 im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Wie in Abb. 16 B zu sehen ist, sinkt der pH-Wert in diesem Puffersystem entsprechend auf ca. 6,5 ab. Wurde die Umsetzung in 50 mM Tris-Puffer pH 7,1 durchgeführt, war der Abfall des pH-Wertes auf ca. 5,0 noch stärker ausgeprägt (nicht gezeigt).

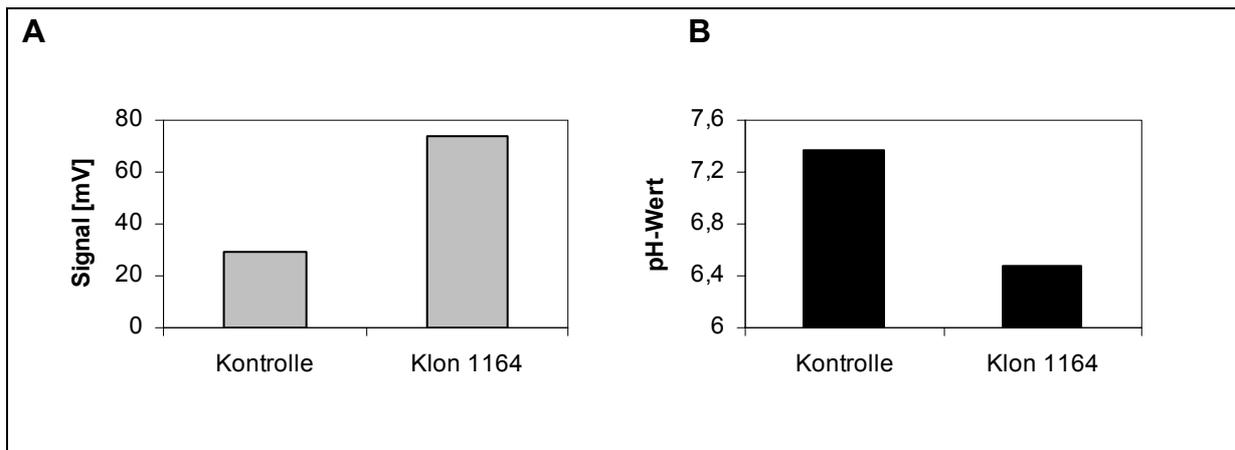


Abb. 16 Chloriddetektion und Messung der pH-Absenkung nach Umsetzung von MCA durch Klon 1164. Nach Umsetzung von 6 mM MCA mit Zellextrakten des Dehalogenase-haltigen Klons 1164 bzw. *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Kontrolle) in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) (s. 3.12.3) wurde mit dem Chloridsensor (s. 3.15.7.3) das freigesetzte Chlorid (Signal in [mV]) detektiert (**A**) sowie mit einer pH-Elektrode der pH-Wert gemessen (**B**).

Die Dehalogenierung von MCA durch Klon 1164 in 50 mM Tris-Puffer pH 7,1 bzw. 7,5 in Mikrotiterplatten konnte anhand der Farbänderung zugegebener pH-Indikatoren (13 μ g/ml) auch direkt sichtbar gemacht werden (Abb. 17).

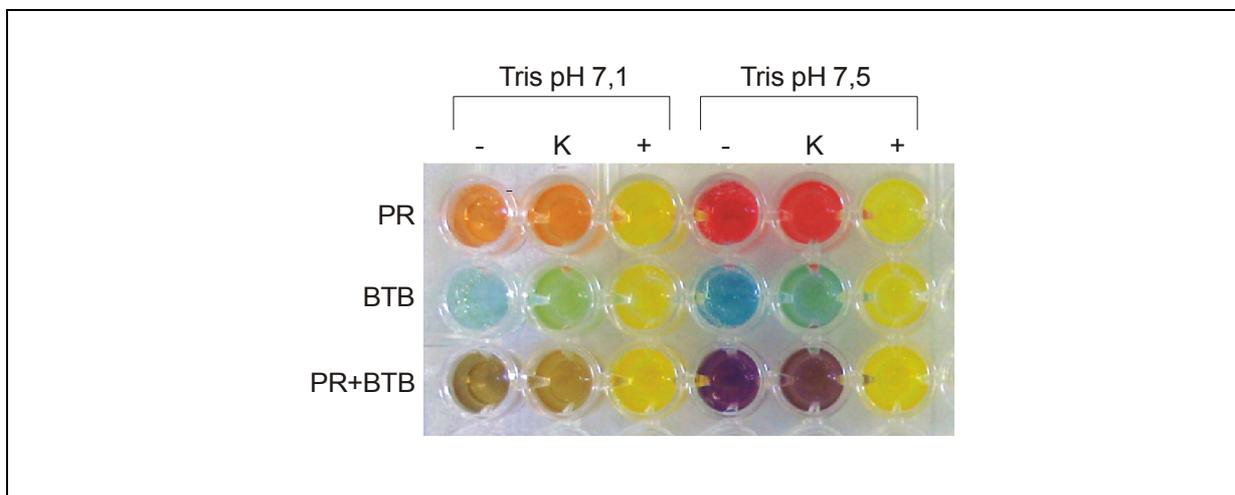


Abb. 17 Detektion einer Umsetzung von MCA durch Klon 1164 mit Hilfe von pH-Indikatoren. Je 200 μ l 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 oder pH 7,1 mit 15 mM MCA wurden ohne weiteren Zusatz (-) oder mit Zellpellets aus je 200 μ l Kultur von *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Kontrolle, K) bzw. Klon 1164 (+) 1 h bei 37 $^{\circ}$ C in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen 13 μ g/ml Phenolrot (PR) und/oder 13 μ g/ml Bromthymolblau (BTB) zugegeben. Spalte 1 - 3: Umsetzung in Tris-Puffer pH 7,1; Spalte 4 - 6: Umsetzung in Tris-Puffer pH 7,5; Reihe 1: + PR; Reihe 2: + BTB; Reihe 3: + PR und + BTB.

Um des Weiteren zu zeigen, dass die Farbänderung der Indikatoren infolge der pH-Absenkung auch mit einem Anstieg der Chloridionen-Konzentration einhergeht, wurde nach Umsetzungen von MCA durch Klon 1164 und der elektrochemischen Messung des

freigesetzten Chlorids den Reaktionsansätzen pH-Indikator zugegeben (Abb. 18). Ansätze, in denen durch Dehalogenierung des Substrats Chlorid freigesetzt wurde (Klon 1164 mit MCA), waren aufgrund der gleichzeitigen Freisetzung von Protonen gelb gefärbt, Ansätze ohne Umsetzung (Kontrolle, Klon 1164 ohne MCA) blieben dagegen rot.

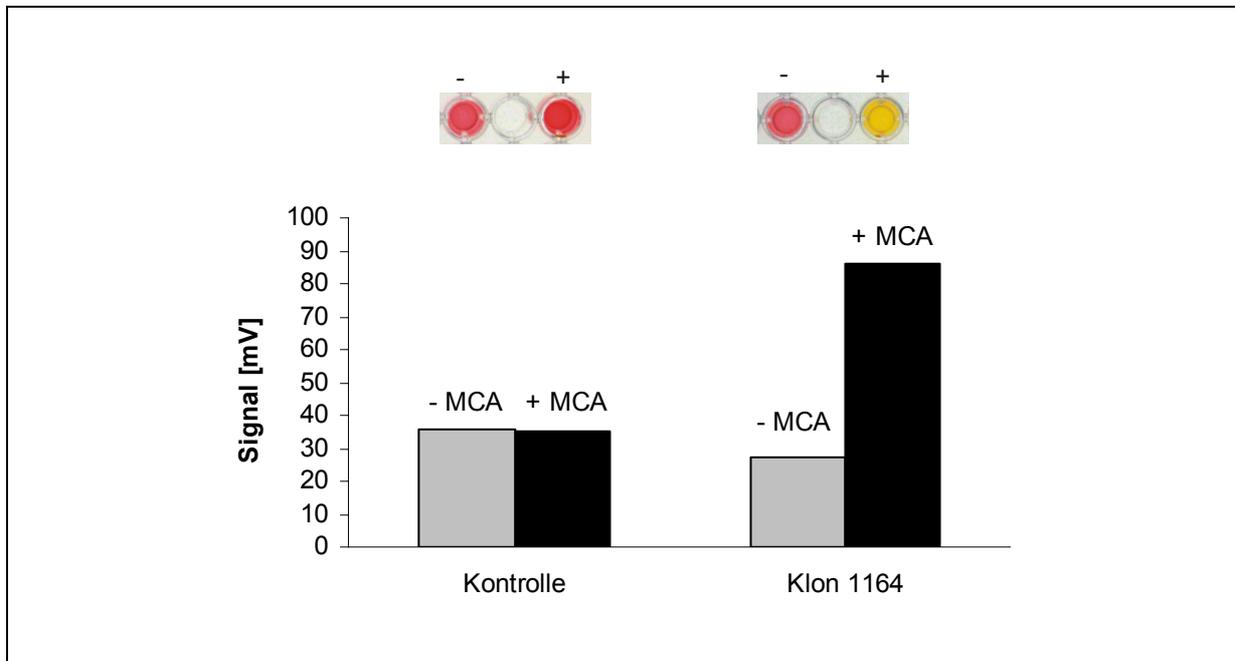


Abb. 18 Chloriddetektion und Visualisierung der pH-Absenkung nach Umsetzung von MCA durch Klon 1164. Nach 1-stündiger Inkubation (37 °C) von *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Kontrolle) bzw. Klon 1164 in je 200 μ l 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 ohne und mit 15 mM MCA wurde mit dem Chloridsensor das freigesetzte Chlorid gemessen (Signal in [mV]); die Absenkung des pH-Wertes wurde durch Zugabe von 20 μ g/ml Phenolrot sichtbar gemacht (- ohne MCA; + mit MCA).

Diese Untersuchungen zeigten, dass dehalogenierende Aktivität bzw. die damit verbundene Freisetzung von Protonen mit Hilfe von pH-Indikatoren sichtbar gemacht werden kann. Aufgrund des stärkeren Farbkontrastes zwischen Positiv- und Negativkontrolle bei einer Umsetzung in Tris-Puffer pH 7,5 im Vergleich zu Tris-Puffer pH 7,1 (s. Abb. 17) erfolgte die weitere Durchführung des pH-MTP-Assay in Tris-Puffer pH 7,5.

4.2.6.2 pH-Agarplatten-Assay

Für das visuelle Agarplatten-Screening wurden die beiden Verfahren von Chang *et al.* (1999) und Holloway *et al.* (1998) kombiniert und modifiziert (Durchführung s. 3.15.7.1.1). Um zu überprüfen, ob die entwickelte Methode eine Identifikation von Dehalogenase-positiven Klonen auf Agarplatten erlaubt, wurden induzierte Kolonien des Dehalogenase-haltigen Klons 1164 bzw. *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Negativkontrolle) nach dem Wachstum auf LB-Platten mit Induktor auf beide Typen der Indikatorplatten (B- bzw. BR-Platten, s. 2.6.2) überführt und bei RT inkubiert (Abb. 19). Kolonien, die in der Lage

waren, das in den Indikatorplatten enthaltene Substrat MCA zu verstoffwechseln (induzierte Positivkontrolle), wiesen nach ca. 10 - 20 min infolge der pH-Absenkung eine gelbe Färbung auf, die teilweise mit Bildung eines gelben Hofes einherging; diese Gelbfärbung hielt sich maximal 2 - 3 Tage. Im Gegensatz dazu verfärbten sich Kolonien der Negativkontrolle, die das Substrat nicht umsetzen konnten, nur leicht grünlich (B-Platten) bzw. grau-rosa oder ebenfalls grünlich (BR-Platten). Auf Indikatorplatten ohne Substrat trat keine Gelbfärbung der Positivkontrolle auf.

Beide Indikatorplatten selbst färbten sich während der Inkubation mit Bakterien intensiv blau (B-Platten) bzw. lila (BR-Platten). Derselbe Effekt wurde auch von Strotmann und Röschenthaler (1987) beschrieben und auf eine Alkalisierung des Mediums aufgrund des Wachstums der Zellen zurückgeführt.

Somit schien der modifizierte pH-Agarplatten-Assay für ein Screening der Genbank nach Dehalogenasen geeignet zu sein.

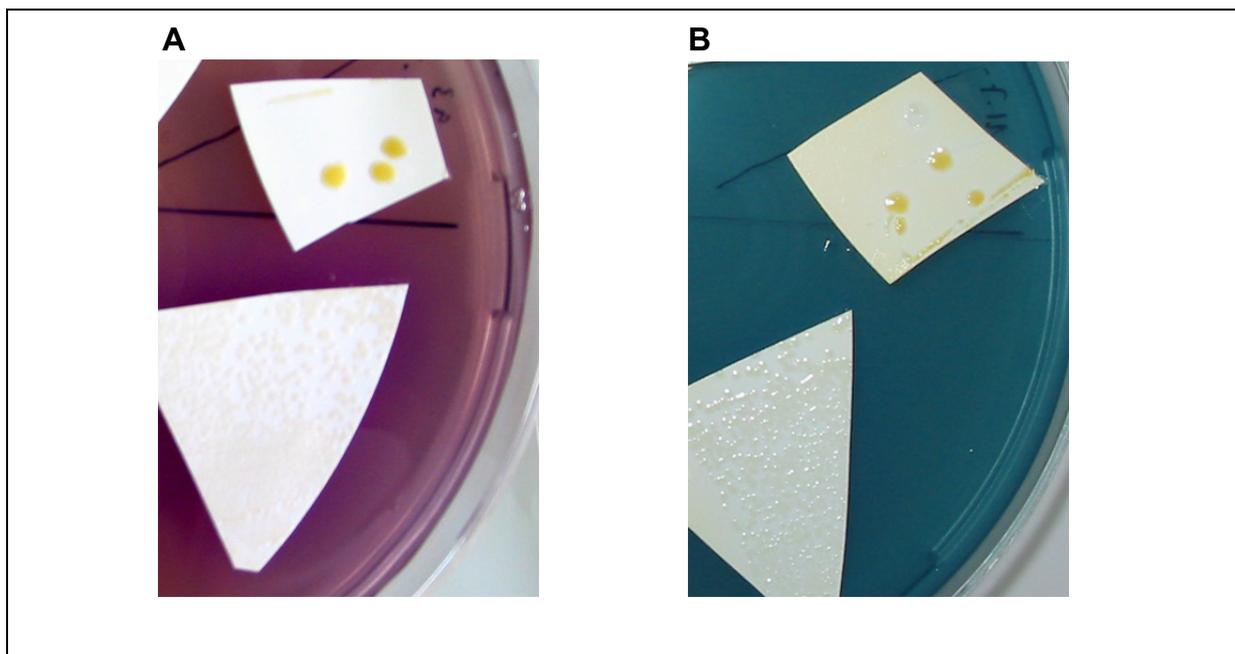


Abb. 19 Tests auf pH-Indikator-Platten. Der Dehalogenase-haltige Klon 1164 bzw. *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Negativkontrolle) wurden auf LB-Platten mit Induktor (MCA bzw. IPTG, s. 3.1.3) ausgestrichen und nach Inkubation ÜN bei 37 °C mit Hilfe steriler Nitrocellulose auf Agarplatten mit pH-Indikator und MCA als Substrat überführt. Die Fotos zeigen Klon 1164 (jeweils oberes Nitrocellulose-Stück, gelbe Kolonien) sowie die Negativkontrolle (jeweils unten) 30 min nach dem Überführen auf eine BR-Platte (lila-rot) (A) bzw. auf eine B-Platte (blau) (B).

4.2.6.3 Durchführung des Screenings und positive Klone

Für das Screening der Genbanken selbst wurde *E. coli* DH5 α mit den Ligationsansätzen L1 bis L6 elektrotransformiert, die Transformanden anschließend mit Hilfe steriler

Nitrocellulose auf die substrathaltigen pH-Indikator-Platten überführt und bei RT inkubiert (s. 3.15.7.1.1). Insgesamt wurden auf diese Weise ca. 59400 Klone untersucht.

Nach 2-stündiger Inkubation wiesen drei Klone eine gelbe Färbung auf, die bei einem der Klone mit der Bildung eines gelben Hofes verbunden war. Abb. 20 zeigt beispielhaft den Ausschnitt einer pH-Indikator-Platte mit einem solchen Klon.

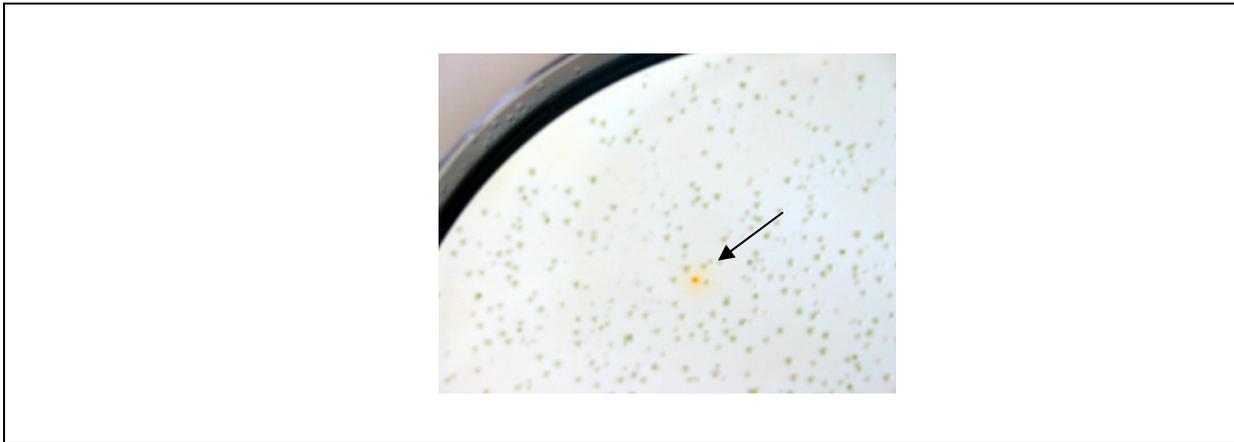


Abb. 20 Identifikation Dehalogenase-aktiver Klone beim Screening der Genbanken auf pH-Indikator-Platten. Positive Klone wurden anhand ihrer Gelbfärbung identifiziert (s. Pfeil).

Die drei positiven Klone, die mit KL23, KL24 und KL25 bezeichnet wurden, stammten aus drei verschiedenen Genbanken (L4, L1 und L6). Bezogen auf die Zahl der pro Genbank durchsuchten Klone ergab sich für L4 eine Trefferrate von 1 zu 4100, für L1 von 1 zu 11300 und für L6 von 1 zu 5900 (jeweils gerundet auf volle 100).

Zur Bestätigung ihres Phänotyps wurden die Klone auf LB_{Amp}-IPTG-Platten vereinzelt und mit steriler Nitrocellulose auf jeweils beide Typen der pH-Indikator-Platten überführt. Die Kolonien aller drei Klone wiesen innerhalb von ca. 15 bis 30 min eine gelbe Färbung auf; die als Negativkontrolle auf denselben Platten ausgestrichenen Zellen von *E. coli* DH5 α mit pJOE930 färbten sich dagegen nur leicht grünlich. KL24 zeigte von den drei positiven Klonen die stärkste Aktivität (s. Abb. 21). Somit konnte der Phänotyp, der auf eine Dehalogenase-Aktivität hindeutet, bei allen drei Klonen bestätigt werden.

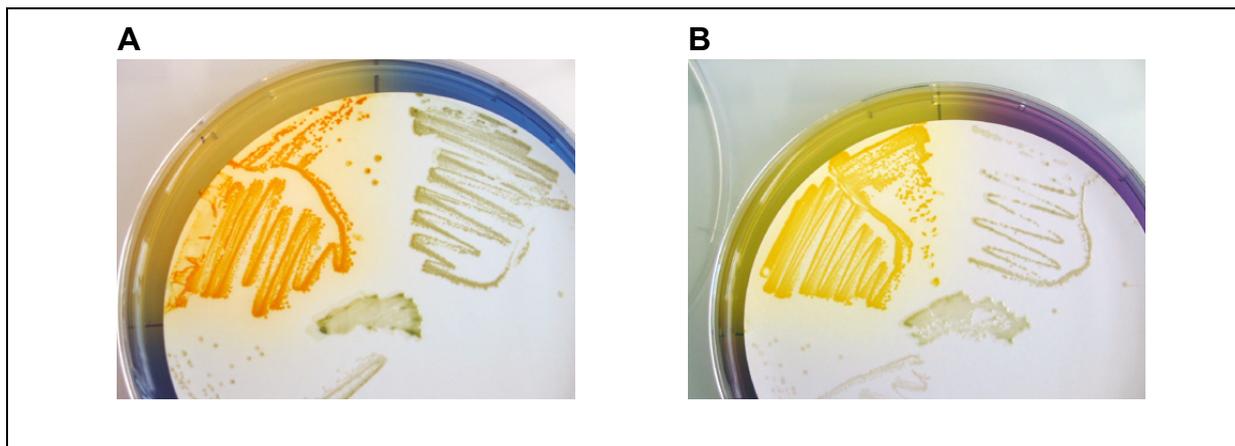


Abb. 21 Einzelausstriche von KL24, überführt auf pH-Indikator-Platten. Während sich KL24 (jeweils links) auf den pH-Indikator-Platten gelb färbte, zeigte die Negativkontrolle (*E. coli* DH5 α mit pJOE930, jeweils rechts) keine Färbung. **A** B-Platte. **B** BR-Platte.

4.2.6.4 Überprüfung der dehalogenierenden Aktivität von KL23, KL24 und KL25

Die weitere Überprüfung einer Dehalogenase-Aktivität von KL23, KL24 und KL25 erfolgte durch Umsetzung von MCA mit ganzen Zellen (s. 3.12.2) bzw. Zellextrakt (s. 3.12.3) aus induzierten Übernachtskulturen und anschließender Detektion des freigesetzten Chlorids mit dem Chloridsensor (s. 3.15.7.3) sowie Zugabe von Phenolrot (s. 3.15.7.1.2).

Bei allen drei Klonen konnte sowohl mit ganzen Zellen als auch mit Zellextrakten die Dehalogenierung von MCA anhand des Anstiegs des Chloridgehaltes nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Dabei war die Aktivität des Klons KL24 wie auch schon auf den pH-Indikator-Platten am höchsten und übertraf auch die der Positivkontrolle. Wie die Farbänderung des zugegebenen pH-Indikators zeigte (Abb. 22 B), fiel der pH-Wert infolge der gleichzeitigen Freisetzung von Protonen entsprechend ab.

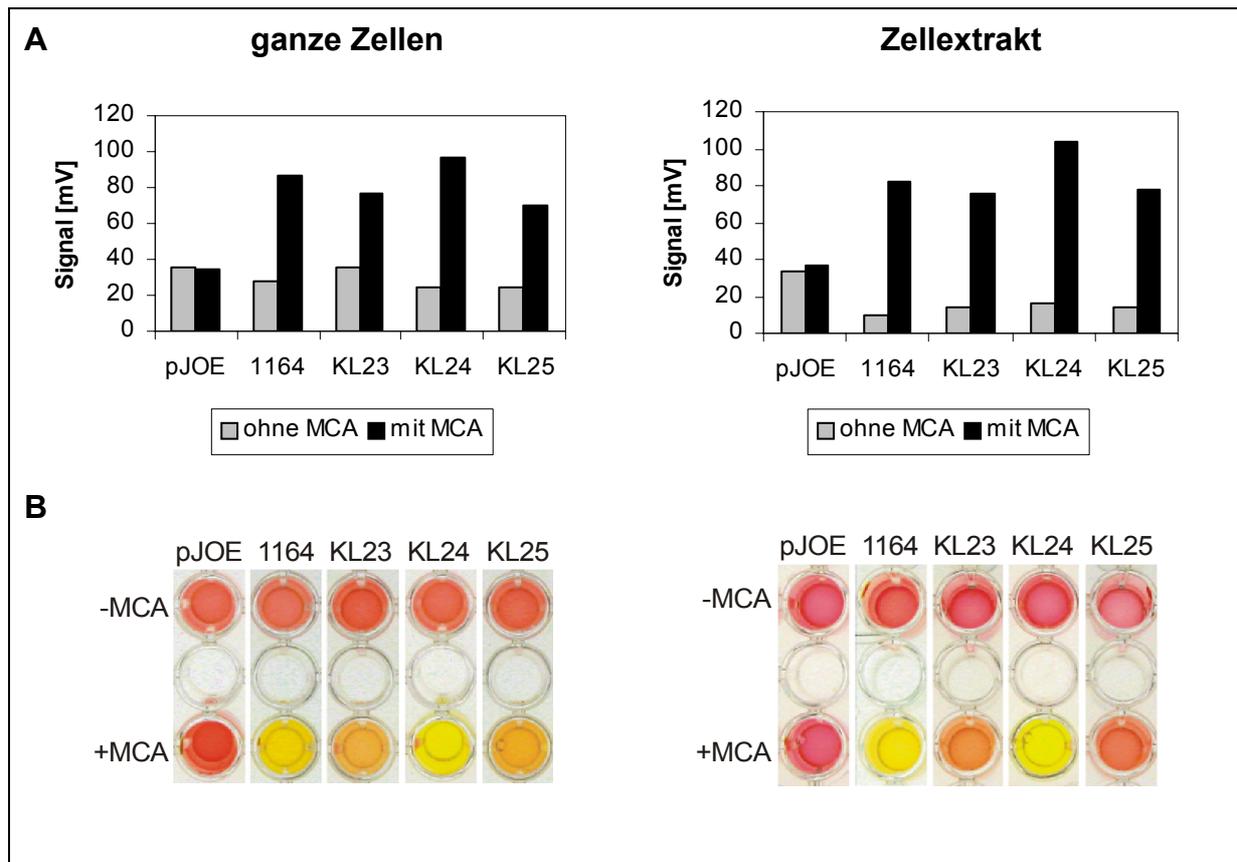


Abb. 22 Dehalogenase-Aktivität der Klone KL23, KL24 und KL25. Nach ÜN-Kultivierung mit Induktion wurden das Zellpellet bzw. der Zellextrakt (s. 3.11.1) der Klone KL23, KL24 und KL25 sowie des Klons 1164 (1164, Positivkontrolle) und *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (pJOE, Negativkontrolle) in Tris-Puffer pH 7,5 mit 15 mM MCA 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde in den Überständen das freigesetzte Chlorid mit dem Chloridsensor nachgewiesen (Signal in [mV]) (A). Die Visualisierung der pH-Absenkung erfolgte durch Zugabe von 20 μ g/ml Phenolrot (B).

4.2.6.5 Analyse der Insert-Sequenzen

Die Sequenzierung der aus Übernachtskulturen isolierten rekombinanten Plasmide ergab für das Insert von KL23 eine Größe von 6122 bp (62,6 % GC), das Insert von KL24 umfasste einen Bereich von 4298 bp (62,3 % GC) und die Insertgröße von KL25 wurde mit 3240 bp (64,2 % GC) bestimmt. Die sequenzierten Bereiche wurden mit Hilfe des PEDANT-Software-Systems einem Homologie-Vergleich mit bekannten Sequenzen verschiedener Datenbanken unterzogen.

Auf den Insertsequenzen von pKL23, pKL24 und pKL25 konnte jeweils ein offener Leserahmen identifiziert werden (*orf23*, *orf24* und *orf25*), dessen korrespondierende Aminosäuresequenz signifikante Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Gruppe II der 2-Halogencarbonsäure-Dehalogenasen (Hill *et al.*, 1999) aufwies (s. Tabelle 38 bis Tabelle 40); die Länge der mutmaßlichen *orf23*-, *orf24*- und *orf25*-Genprodukte (228 bzw. 229 Aminosäuren) war dabei in guter Übereinstimmung mit der Größe der Untereinheiten dieser

Dehalogenasen von durchschnittlich 231 Aminosäuren (Slater *et al.*, 1997). Die größte Ähnlichkeit zeigten alle drei Genprodukte zu beiden Enzymen der Untergruppe B der Gruppe-II-Halogencarbonsäure-Dehalogenasen, der 2-Haloalkanoat-Dehalogenase DehCI aus *Pseudomonas sp.* CBS3 (Schneider *et al.*, 1991) sowie der 2-Haloalkanoat-Dehalogenase HdIIVa aus *Pseudomonas cepacia* MBA4 (Murdiyato *et al.*, 1992), die auf Aminosäureebene zu 67 % identisch (81 % ähnlich) sind (Slater *et al.*, 1997). Während Orf23 die größte Übereinstimmung mit DehCI zeigte (41 % identische, 55 % ähnliche Aminosäuren), wiesen Orf24 und Orf25 die größte Identität mit HdIIVa auf (50 % bzw. 47 % identische Aminosäuren, 70 % bzw. 64 % ähnliche Aminosäuren). Zur Halogenalkanoat-Dehalogenase L-DEX aus *Pseudomonas sp.* YL (Nardi-Dei *et al.*, 1994) (Gruppe II, Untergruppe A) war Orf23 zu 40 %, Orf24 zu 51 % und Orf25 zu 46 % identisch.

Trotz ihrer Ähnlichkeit zu bekannten 2-Halogencarbonsäure-Dehalogenasen waren die Sequenzen der drei neuen Genprodukte untereinander nicht gleich: So betrug die Identität von Orf23 und Orf24 46 %; Orf24 war zu 57 % identisch mit Orf25 und Orf23 wies zu 47 % Identität mit Orf25 auf (alle Werte: ClustalW 1.82).

Wie Abb. 23 zeigt, waren alle konservierten Aminosäurereste, die bei der Katalyse der 2-Haloalkanoat-Dehalogenase L-DEX eine Rolle spielen (s. 1.2.5), ebenfalls in den drei neuen Genprodukten enthalten. Ebenso wurden für alle drei Sequenzen beim Vergleich mit der Blocks-Datenbank Sequenzmotive (PR00413) identifiziert, die innerhalb der Halogencarbonsäure-Dehalogenasen hochkonserviert vorliegen. Sequenzähnlichkeiten zu weiteren Mitgliedern der Superfamilie der Halogencarbonsäure-Dehalogenase-ähnlichen Hydrolasen (Koonin und Tatusov, 1994) waren ebenfalls vorhanden (Pfam-Domäne PF00702, COG1011, COG0546, COG0637).

4.3.1 Grundlegende Methoden der elektrochemischen Chloriddetektion

Anhand der Umsetzung von Monochloressigsäure (MCA) durch den Dehalogenase-haltigen Klon 1164 (s. 2.8) wurden Anzucht-, Aufschluss-, Umsetzungs- und Messbedingungen soweit optimiert, dass in Mikrotiterplatten die Messung dehalogenierender Aktivität sowohl direkt in Kulturüberständen ganzer Zellen als auch nach Zellaufschluss und Umsetzung mit Zellextrakten möglich ist.

4.3.1.1 Kalibrierung und Nachweisgrenze

Die Kalibrierung des Halogenidsensors (s. 1.7.2.1) erfolgte mit Hilfe wässriger KCl-Lösungen definierter Konzentration (10 μM bis 3 mM bzw. bis zu 15 mM Chlorid), die alternierend zu den eigentlichen Proben bzw. im gleichen Messverlauf gemessen wurden, um systematische Fehler zu minimieren, die z. B. durch schleichende Veränderung der Messbedingungen auftreten können. Zur Erstellung der Kalibrierkurven wurden die erhaltenen Messsignale über der eingesetzten KCl-Konzentration aufgetragen.

In Abb. 24 sind typische Beispiele solcher Kalibrierkurven dargestellt. Über große Konzentrationsbereiche lassen sich die Kurven in sehr guter Übereinstimmung durch Polynome dritten Grades beschreiben (Abb. 24 A). Während oberhalb von ca. 500 μM Chlorid eine direkte logarithmische Abhängigkeit des Elektrodenpotentials von der Chloridkonzentration gilt (Abb. 24 B), wie sie durch die Gleichung von Nernst beschrieben wird, sind bei niedrigeren Konzentrationen im so genannten Sub-Nernst-Bereich Potential und Konzentration direkt proportional zueinander (Abb. 24 C, linearer Verlauf). In diesem Messbereich ist daher eine sensitive Detektion geringer Chloridkonzentrationen möglich.

Die Nachweisgrenze des Systems lag mit wässrigen KCl-Lösungen bei 10 - 20 μM Chlorid.

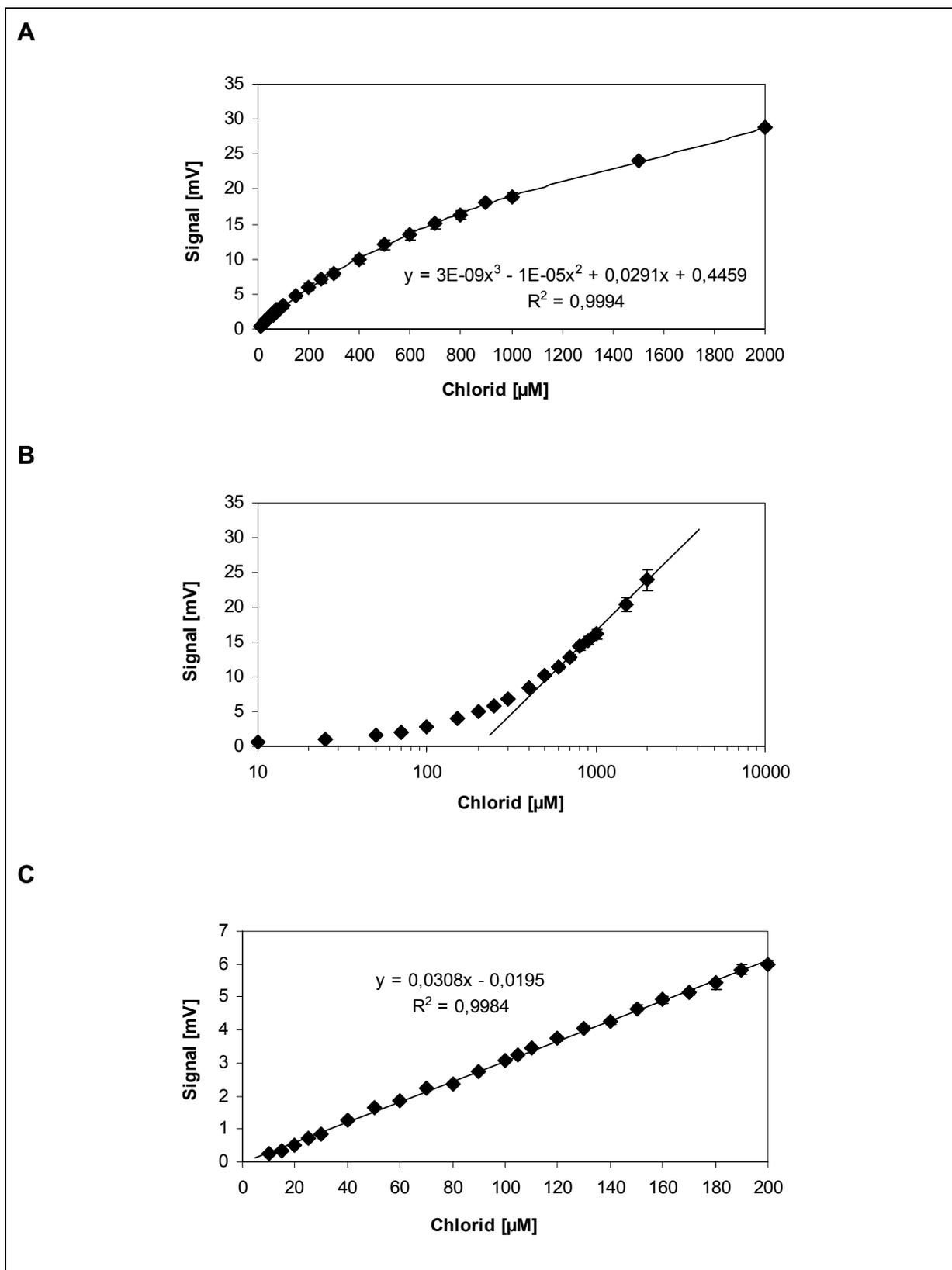


Abb. 24 Kalibrierkurven zur Chloridbestimmung. Optimierte Messbedingungen (25 °C): Durchflusspuffer 50 mM Na-Acetatpuffer pH 5,0; Flussrate 25 ml/h; Injektionsvolumen 50 - 80 μl (20- μl -Probenschleife). **A** Gesamter Konzentrationsbereich – polynomischer Verlauf. **B** Gesamter Konzentrationsbereich – logarithmische Auftragung. **C** Linearer Messbereich.

Auch auf einem Hintergrund von 100 μM Chlorid waren unter den gewählten Messbedingungen Konzentrationsänderungen von 10 - 20 μM Chlorid sicher detektierbar (Abb. 25).

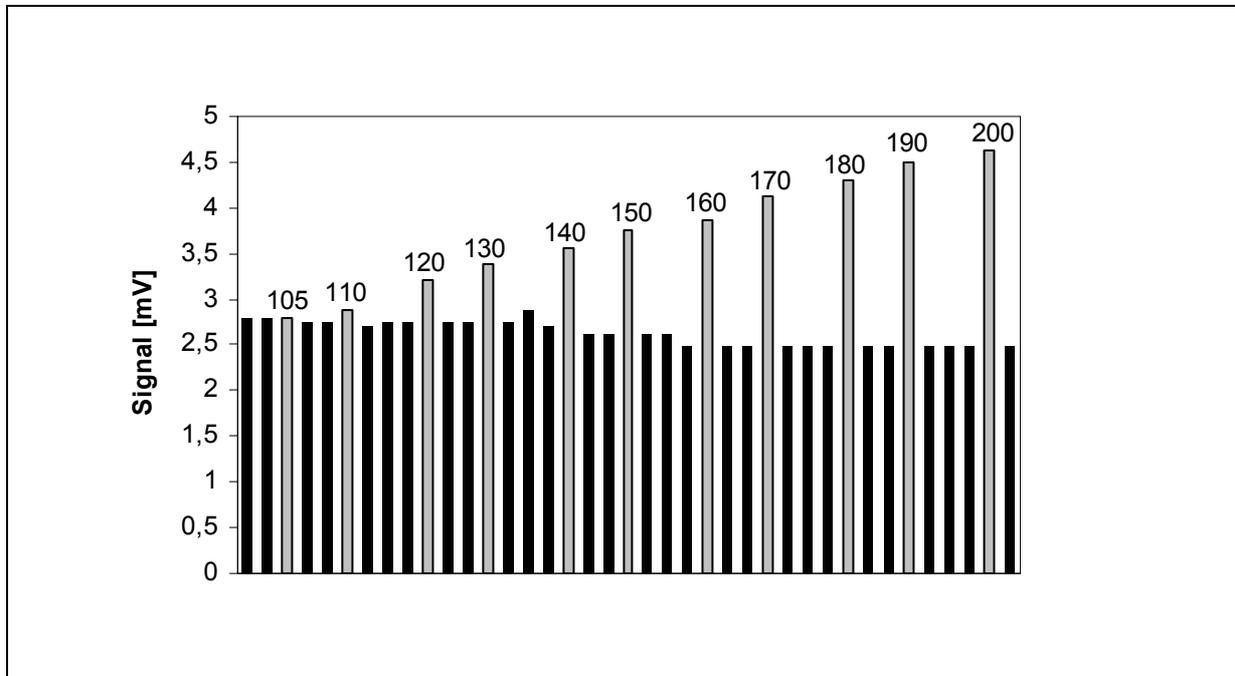


Abb. 25 Detektion von geringen Konzentrationsunterschieden auf Chloridhintergrund. Alternierende Messung von Proben mit 100 μM Chlorid (schwarze Balken) und Proben mit ansteigender Chloridkonzentration von 105 - 200 μM (graue Balken).

4.3.1.2 Medienoptimierung

Die für ein direktes Screening im Kulturüberstand verwendeten Nährmedien sollten einerseits aufgrund ihrer Zusammensetzung ein gutes Wachstum der Zellen ermöglichen. Andererseits sollten sie aber auch bezüglich ihres Chloridgehalts für die sensitive elektrochemische Chloridbestimmung – möglichst im linearen Messbereich – geeignet sein. Dies würde durch zu hohe Chloridgehalte des Mediums erschwert oder unmöglich gemacht. Zunächst wurde deshalb die Eignung von abgewandelten LB-Medien für diesen Zweck getestet.

Eine Vermessung von wässrigen Lösungen der einzelnen Bestandteile von LB-Medium mit dem Chloridsensor ergab, dass deren Chloridgehalt je nach Hersteller große Unterschiede aufweist und auch von der Charge der Chemikalie und der Art ihrer Formulierung abhängt (s. Tabelle 18 und Tabelle 19).

Tabelle 18: Chloridgehalt verschiedener Peptone bzw. Tryptone. Angabe der Konzentration wässriger Lösungen mit je 5 g/l vor / nach dem Autoklavieren in [μM] Chlorid.

Medienbestandteil	Best.-Nr.	Hersteller	Chlorid [μM]
Difco Bacto Tryptone	0123-17-3	BD, Heidelberg	420 / 450
Difco Trypton Pepton	0123-17	BD, Heidelberg	420 / 450
Pepton aus Casein tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie	7213	Merck, Darmstadt	390 / 460
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	8952.2	Roth, Karlsruhe	980 / 1280
Pepton aus Casein pankreatisch verdaut, granuliert, für die Mikrobiologie	107213	Merck, Darmstadt	120 / 210

Tabelle 19: Chloridgehalt verschiedener Hefeextrakte. Angabe der Konzentration wässriger Lösungen mit je 2,5 g/l vor / nach dem Autoklavieren in [μM] Chlorid.

Medienbestandteil	Best.-Nr.	Hersteller	Chlorid [μM]
Difco Bacto Yeast Extract	0127-01	BD, Heidelberg	210 / 260
Hefeextrakt gepulvert, für die Mikrobiologie	3753	Merck, Darmstadt	120 / 190
Hefeextrakt granuliert, für die Mikrobiologie	103753	Merck, Darmstadt	170 / 210
Yeast Extract BioChemica, for microbiology, Packung I	70161	Fluka, Buchs SG (CH)	140 / 180
Yeast Extract	Y-4000	Sigma, Deisenhofen	320 / 420
Yeast Extract BioChemica, for microbiology, Packung II	70161	Fluka, Buchs SG (CH)	240 / 260
Hefeextrakt pulv. f. d. Bakteriologie	2363.1	Roth, Karlsruhe	150 / 290

Durch die Verwendung von granuliertem Pepton (Nr. 107213, Merck) sowie Hefeextrakt von Fluka (Packung I, Nr. 70161) oder gepulvertem (Nr. 3753) bzw. granuliertem (Nr. 103753) Hefeextrakt von Merck für die Zubereitung eines LB-Mediums ohne Natriumchlorid (LB I, s. 2.6.1) konnte dessen Konzentration von ca. 1,5 - 2 mM Chlorid auf ca. 750 - 890 μM Chlorid reduziert werden. Vor diesem Hintergrund war eine elektrochemische Detektion von 300 - 500 μM Chlorid möglich (nicht gezeigt).

Durch eine Halbierung der Konzentration des salzfreien LB-Mediums (LB II, s. 2.6.1) ergab sich eine weitere Reduktion des Chlorid-Hintergrunds auf ca. 370 - 490 μM . Vor diesem Hintergrund ließen sich 200 - 300 μM Chlorid detektieren (nicht gezeigt).

Für eine genaue Konzentrationsbestimmung im linearen Messbereich der Elektrode war jedoch eine Verdünnung der Proben in dem Maße erforderlich, dass der Gesamtchloridgehalt bei maximal 200 μM Chlorid lag (LB I ca. 1:10, LB II ca. 1:4).

4.3.1.3 Chloriddetektion im Kulturüberstand ganzer Zellen

Um zu überprüfen, ob die abgewandelten LB-Medien auch für die Kultivierung von Klonen und ein elektrochemisches Screening nach Dehalogenase-Aktivität direkt in den Kulturüberständen geeignet sind, wurde nach ÜN-Inkubation des Dehalogenase-haltigen Klons 1164 in LB I bzw. LB II mit 15 mM MCA als Substrat der Chloridgehalt der Kulturüberstände elektrochemisch detektiert.

In beiden Medien war der Nachweis des durch Klon 1164 freigesetzten Chlorids möglich (s. Abb. 26). In LB II ließ sich der Umsatz durch verlängerte Inkubation bis 45 h noch steigern. Zellen ohne Dehalogenase (*E. coli* HB101) waren nicht in der Lage, das Substrat umzusetzen.

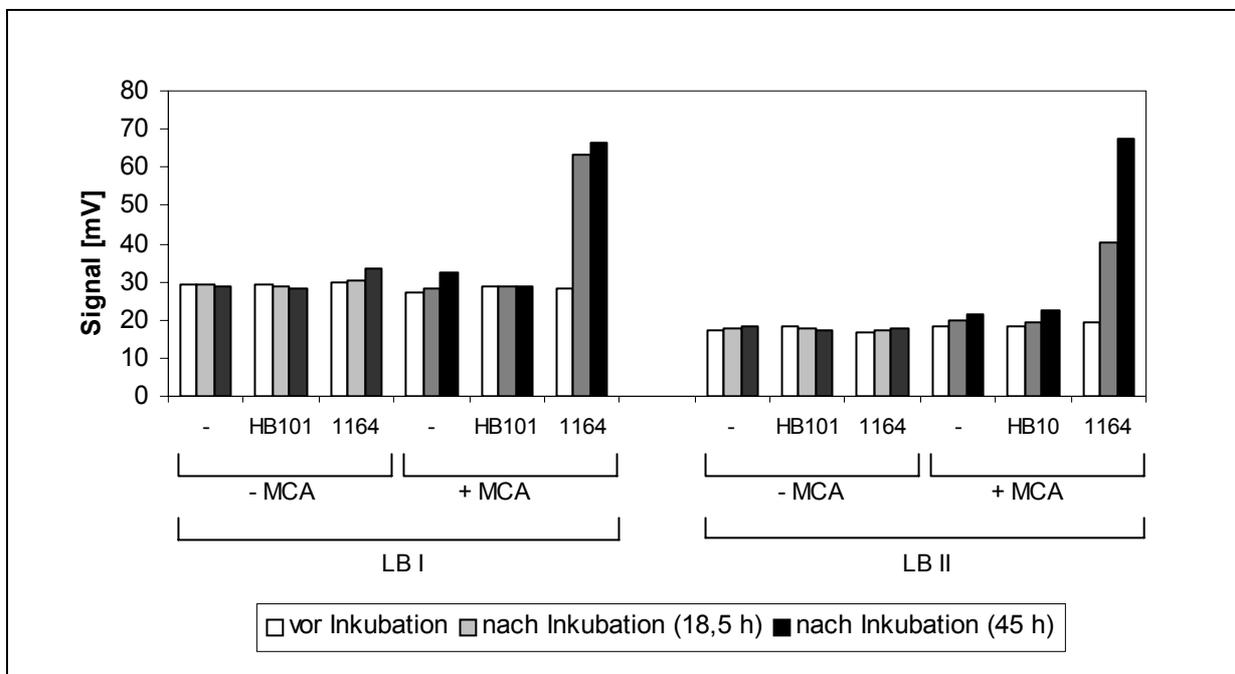


Abb. 26 Chloriddetektion in Kulturüberständen ganzer Zellen in LB I bzw. LB II. 5 ml des entsprechenden Mediums mit 15 mM MCA als Substrat wurden ohne Beimpfung (-), mit *E. coli* HB101 (HB101; Kontrolle) oder Klon 1164 (1164; *E. coli* HB101 mit klonierter Dehalogenase) 18,5 bzw. 45 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde im Überstand mit dem elektrochemischen Chloridsensor der Chloridgehalt gemessen (Signal in [mV]) (vor und nach 18,5 bzw. 45 h Inkubation).

Zur Übertragung des Verfahrens in den Mikrotiterplattenmaßstab erfolgte eine ÜN-Kultivierung von Klon 1164 in einer 96er-Mikrotiterplatte in je 250 µl der beiden abgewandelten LB-Medien mit MCA als Substrat. Auch hier konnte beim Dehalogenase-positiven Klon der Anstieg des Chloridgehaltes im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 27).

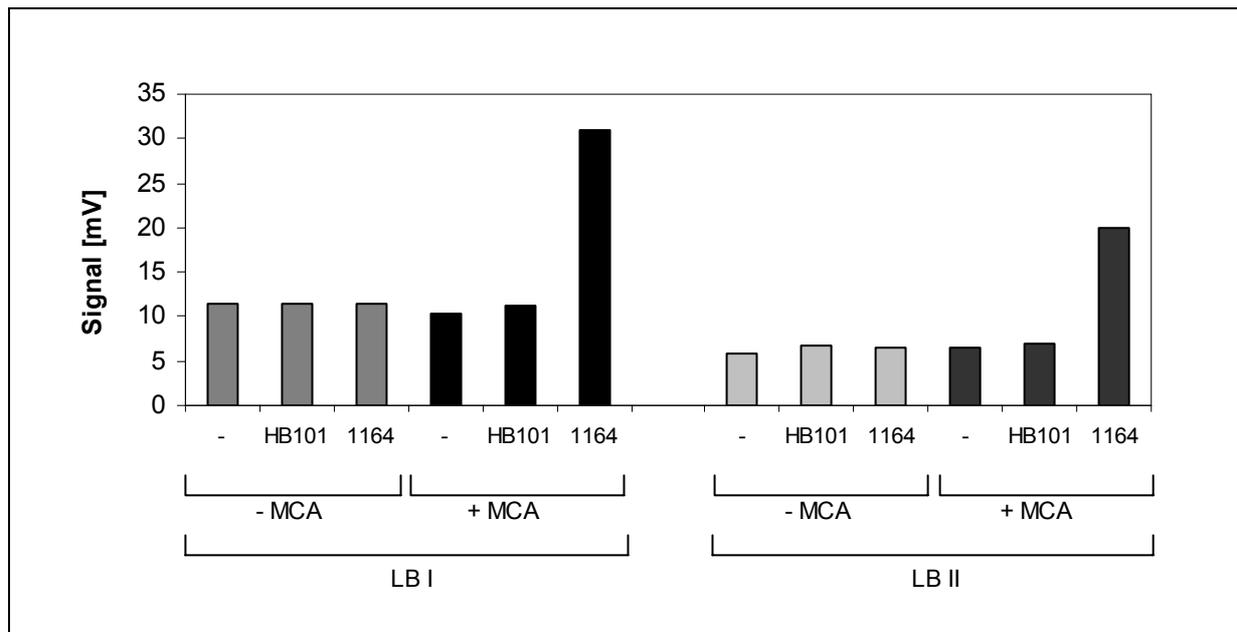


Abb. 27 Chloriddetektion in Kulturüberständen ganzer Zellen nach Umsetzung von MCA in Mikrotiterplatten. In einer 96er-Mikrotiterplatte wurden pro Nöpfchen 250 µl von LB I bzw. LB II mit 15 mM MCA als Substrat ohne Beimpfung (-), mit *E. coli* HB101 (HB101) oder Klon 1164 (1164) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde in den abgenommenen Überständen das freie Chlorid gemessen (Signal in [mV]).

4.3.1.4 Chloriddetektion mit Zellextrakten im MTP-Format

Für ein Screening auf dehalogenierende Aktivität von Zellextrakten wurde ein Verfahren etabliert, das den Zellaufschluss und die anschließende Umsetzung chlorierter Substrate sowie die nachfolgende Chloriddetektion direkt in Mikrotiterplatten ermöglicht. Die gewählte Aufschlussmethode stellt dabei die vollständige Abtötung der Zellen sicher, da die Durchführung des eigentlichen Screenings mit der HTP-Halogenid-Screening-Anlage auch unter Nicht-S2-Bedingungen möglich sein sollte.

Grundlage für den Zellaufschluss waren Protokolle von Sigma und Qiagen, bei denen nach einer ÜN-Kultivierung der Zellen das Zellpellet unter Verwendung von Lysozym und weiteren Zusätzen aufgeschlossen wird. Nach anschließender Zentrifugation der Zelltrümmer kann der Überstand abgenommen und als Zellextrakt weiter verwendet werden.

Für die Optimierung des Aufschlusses, die mit *E. coli* DH5 α mit pJOE930 in Mikrotiterplatten durchgeführt wurde, wurden folgende Parameter variiert: Zugabe von Lysozym zum Zellpellet oder zur Flüssigkultur; Vorbehandlung des Pellets bzw. der Kultur durch Einfrieren (-70 °C) sowie Dauer des Einfrierens; Inkubationstemperatur, -dauer und -art (mit/ohne Schütteln); Lysozymkonzentration; Art und pH-Wert des verwendeten Puffers sowie Zugabe von Zusätzen wie z. B. EDTA oder Triton X-100. Um den Erfolg des

jeweiligen Verfahrens zu überprüfen, d. h. zur Kontrolle auf nicht aufgeschlossene und damit wachstumsfähige Zellen, wurde ein Teil des gewonnenen Zellextraktes auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

Als optimal hinsichtlich kompletter Abtötung der Zellen erwies sich eine 1-stündige Inkubation des zuvor mindestens 18 h bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Zellpellets mit 1 mg/ml Lysozym und je $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Kanamycin bzw. Streptomycin in 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Schütteln bei $150 - 200\text{ rpm}$ (Durchführung s. 3.11.2).

Um zu überprüfen, ob mit dem auf diese Weise gewonnenen Zellextrakt eine Umsetzung halogener Substrate möglich ist, wurden Zellen des Dehalogenase-haltigen Klons 1164 mit der oben beschriebenen Methode aufgeschlossen; anschließend wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ des Zellextraktes mit 6 mM MCA 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde das freigesetzte Chlorid mit dem Chloridsensor gemessen. Zusätzlich wurde die Umsetzung auch mit Zellextrakt durchgeführt, der nach Inkubation von eingefrorenem Zellpellet in Tris-Puffer ohne Lysozym gewonnen wurde.

Wie Abb. 28 zeigt, war die Dehalogenase-Aktivität des Klons 1164 gut detektierbar, obwohl der unspezifische Chloridhintergrund aufgrund des Salzgehalts des verwendeten Lysozyms (5% Na-Acetat und NaCl als Puffersalze) erhöht war. Auch mit Zellextrakt, der ohne Lysozym gewonnen wurde, war ein Nachweis der dehalogenierenden Aktivität möglich; aufgrund des geringeren Chloridhintergrundes waren hier die relativen Signalhöhen am höchsten. Während des Zellaufschlusses mussten diese Ansätze aber mindestens 5 h oder über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert werden, um eine vollständige Abtötung aller Zellen durch die im Aufschlusspuffer enthaltenen Antibiotika zu gewährleisten.

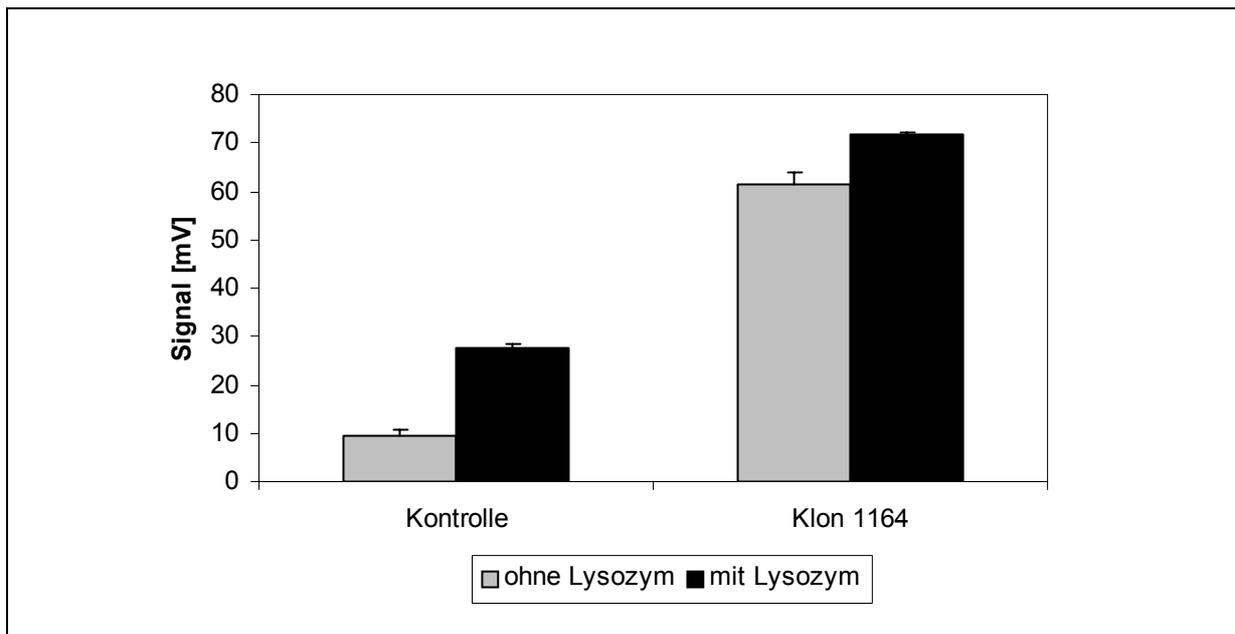


Abb. 28 Chloriddetektion nach Umsetzung mit Zellextrakt in Mikrotiterplatten. Zellpellets aus je 200 μ l Kultur des Klons 1164 bzw. *E. coli* DH5 α mit pJOE930 (Kontrolle) wurden in Aufschlusspuffer mit und ohne Lysozym in einer 96er-Mikrotiterplatte aufgeschlossen (s. 3.11.2). Je 100 μ l dieser Zellextrakte wurden mit Substrat 1 h bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert (Zugabe 100 μ l Tris-Puffer pH 7,5 mit 12 mM MCA); anschließend wurde mit dem Halogenidsensor der Chloridgehalt bestimmt (Signal in [mV]). Die aufgetragenen Werte geben jeweils den Mittelwert aus acht Proben wieder.

Weitere Versuche zeigten außerdem, dass eine Umsetzung des Substrats auch bereits während des Aufschlusses erfolgen kann: In diesem Fall wurde der Aufschlusspuffer zusätzlich mit Substrat (6 mM MCA) versetzt und nach 1-stündiger Inkubation (37 $^{\circ}$ C, 150 - 200 rpm) der Überstand vermessen (nicht gezeigt).

4.3.2 Parallelisierung und Automatisierung der Chloridmessung

Neben der Entwicklung der grundlegenden Methoden für die Detektion einer Dehalogenase-Aktivität in Mikrotiterplatten wurden auch Automatisierungsaspekte auf gerätetechnischer Ebene bearbeitet, um ein effizientes HTP-Screening von Genbanken mit tausenden von Klonen zu ermöglichen. Folgende Punkte waren dabei zu berücksichtigen:

- Beschleunigung des Messvorgangs von > 1 min auf 30 sec pro Messung
- Parallelisierung des Messprozesses auf einen 4fach-Kopf
- Automatische Ansteuerung der Gesamtanlage
- Automatische Datenerfassung und Auswertung
- Erhöhung der Empfindlichkeit der ionenselektiven Elektrode

- Entwicklung eines Verfahrens zur kostengünstigen, reproduzierbaren Herstellung der Messeinheit (d. h. Durchflusszelle mit ionenselektiver Elektrode, insbesondere deren Festkörpermembran, sowie Referenzelektrode)
- Integrierbarkeit des Systems in eine Flow-Box-Umgebung, dadurch möglicher Betrieb unter S2-Laborbedingungen
- Integrierbarkeit des Systems in eine Roboterstraße

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA ein parallelisiertes und automatisiertes Hochdurchsatzsystem auf der Grundlage des vorhandenen Chloridsensor-Systems entwickelt.

Als Kernstück der neuen Halogenid-Screening-Anlage (s. Abb. 29), die ebenfalls nach dem Prinzip der Fließinjektion arbeitet, wurden in einen Pipettierroboter vier neu entwickelte ionenselektive Sensoreinheiten, vier parallele Probenentnahme und -injektionseinheiten mit vier automatischen Motorventilen sowie die mit verbesserten Bezugs Elektroden ausgestatteten Referenzeinheiten eingebaut (Abb. 30). Durch diese Parallelisierung und durch die Verkürzung des Messzyklus von ca. 1 min auf ca. 28 Sekunden konnte die Messdauer für eine 96er-Mikrotiterplatte von knapp 100 min auf ca. 11 min reduziert werden. Die Größe der Vorratsfläche auf der Geräteplattform erlaubt die Bearbeitung von 16 Mikrotiterplatten in einem Arbeitsgang – das entspricht 1536 Proben in 2,9 h. Pro Tag können so bis zu 6000 Klone gescreent werden.

Aufgrund der Verwendung eines Pipettierroboters als Plattform kann das System leicht in eine Roboterstraße integriert werden. Außerdem ist durch den modularen Aufbau aus Einzelkomponenten ein Einbau der Detektionseinheiten in eine andere Geräteumgebung jederzeit möglich.

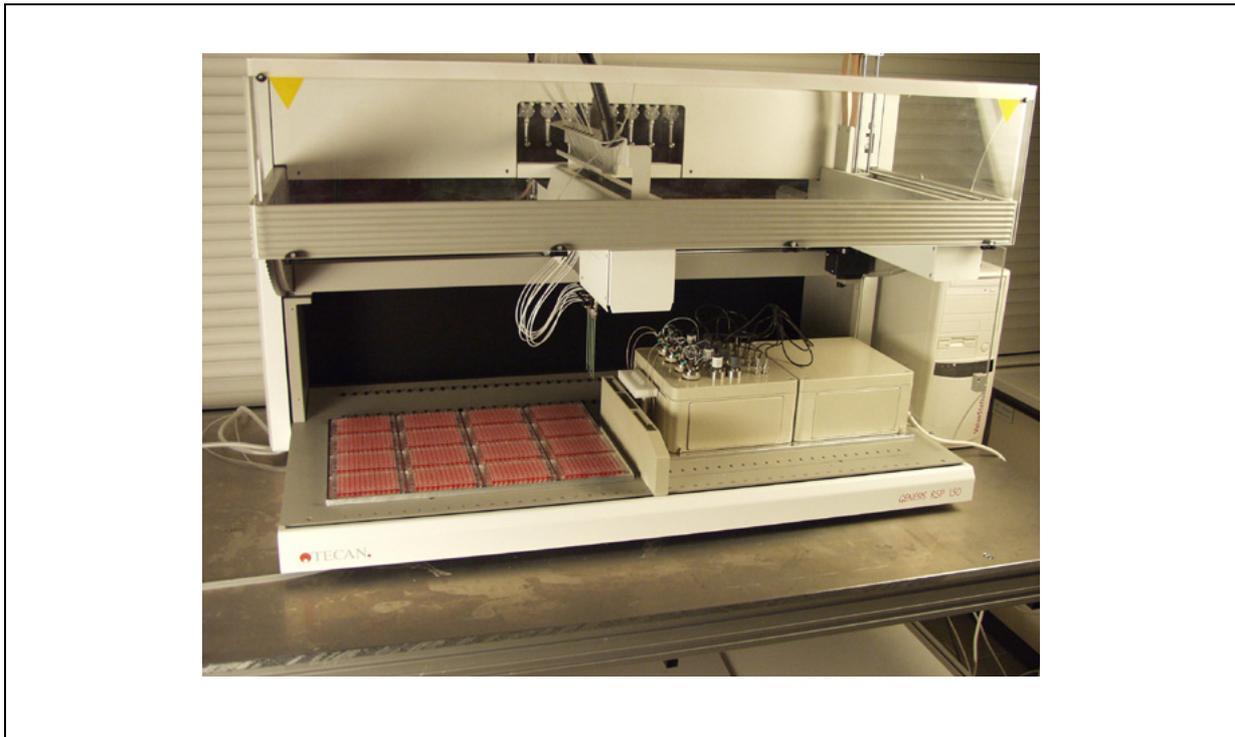


Abb. 29 Gesamtansicht der Halogenid-Screening-Anlage.

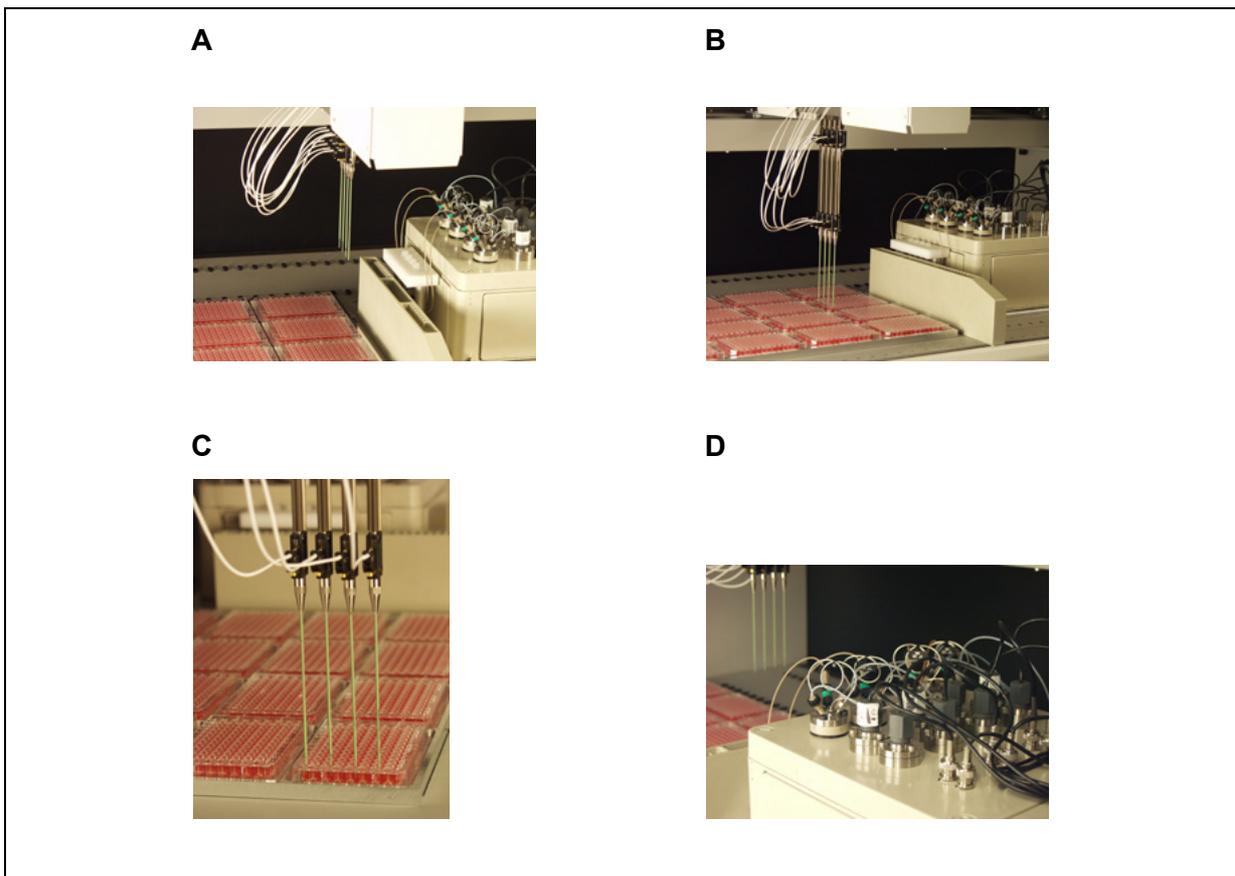


Abb. 30 Detailansichten der Halogenid-Screening-Anlage. **A** Nadeln zur Probenentnahme, Injektionsports, Motorventile, Messelektroden. **B** Probenentnahme aus Mikrotiterplatten. **C** Frontalansicht Probenentnahme. **D** Injektionsmotorventile mit 20-µl-Probenschleife, Mess- und Referenzeinheiten mit eingeschraubten Elektroden.

Die automatisierte Steuerung der gesamten Messanlage sowie die Erfassung und Analyse der Messwerte erfolgt durch ein am Fraunhofer IPA entwickeltes Steuerprogramm auf der Basis der Programmiersprache LabView über eine integrierte Bedienerschnittstelle (Abb. 31). Die Daten (Signale in [V]) werden im ASCII-Format gespeichert; so können sie in Microsoft Excel importiert und dort ausgewertet werden.

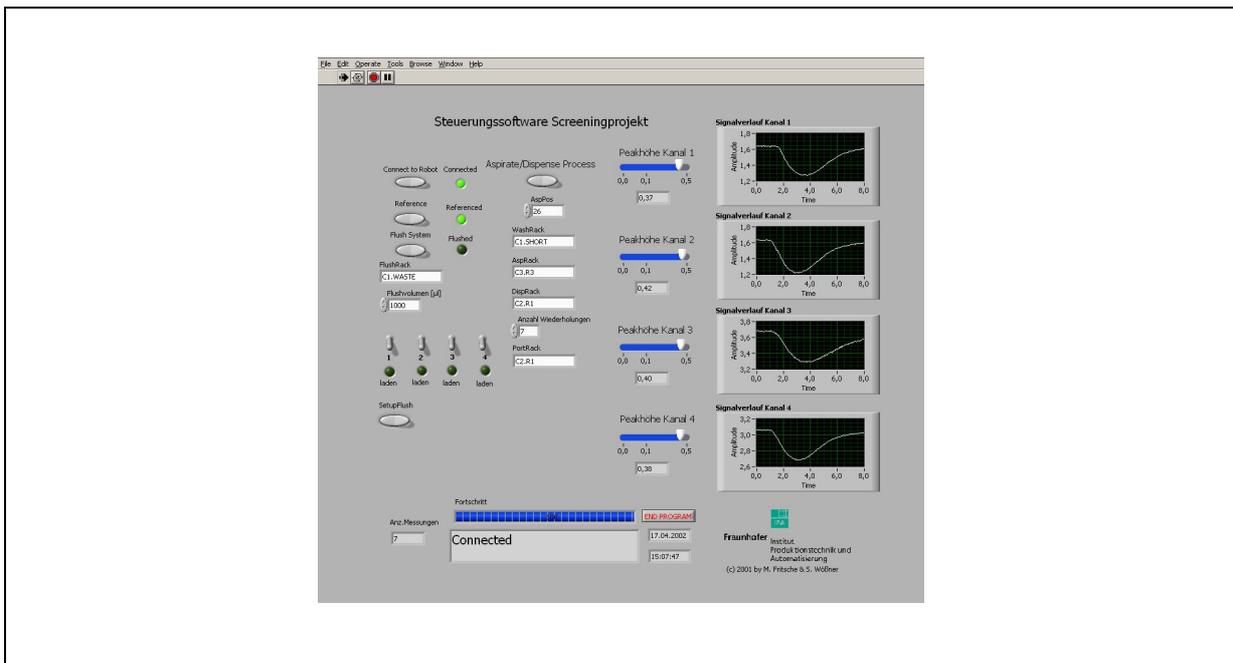


Abb. 31 Bildschirmkopie der integrierten Bedienoberfläche.

Die eingebauten Sensor- und Referenzeinheiten, die jeweils aus einer Durchflusszelle mit eingeschraubter Mess- bzw. Referenzelektrode gebildet werden (s. Abb. 30 D), wurden von der Firma Haaf Mess-Regeltechnik entwickelt. Die kompakten, mit Kunststoff ummantelten Elektrodenköpfe lassen sich einfach in die aus Edelstahl gefertigten Durchflusszellen einschrauben, wodurch ein schneller Austausch möglich ist. Das Probenraumvolumen ist variabel und wird durch die Wahl der Teflondichtung festgelegt.

Die als ionenselektives Sensorelement fungierende heterogene Festkörpermembran der Messelektrode selbst wurde in ihrer chemischen Zusammensetzung optimiert, ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Firma Haaf Mess-Regeltechnik. Um die Sensitivität der damit ausgestatteten Messelektroden zu überprüfen, wurden diese in das nicht-automatisierte Chloridsensor-System eingebaut. Es zeigte sich, dass durch die veränderte chemische Zusammensetzung der Festkörpermembran die Empfindlichkeit im linearen Messbereich gesteigert werden konnte. Konzentrationen ab 10 - 20 μM Chlorid konnten sicher detektiert werden. Anstieg und Abfall der aufgezeichneten Signale waren sehr steil; die stabile

Grundlinie wurde auch nach Vermessung höherer Chloridkonzentrationen schnell wieder erreicht.

Nach Integration der neuen Elektroden in die automatisierte Screening-Anlage lag die Nachweisgrenze mit 20 µl Probenvolumen bei 50 µM Chlorid.

Zur Überprüfung des neuen Systems wurden Vergleichsmessungen mit der Halogenid-Screening-Anlage und parallel dazu mit dem Chloridsensor (Einzelelektrode) durchgeführt: Nach einer Umsetzung von MCA mit Zellextrakten des Klons 1164 in einer Mikrotiterplatte wurde das freigesetzte Chlorid mit beiden Messsystemen gemessen (Durchführung s. 3.12.3). In Abb. 32 sind die Ergebnisse einer solchen Messung dargestellt. Die erhaltenen Messsignale der Halogenid-Screening-Anlage wurden dabei nach Elektroden getrennt ausgewertet; die Abbildung zeigt die Messdaten einer der vier Elektroden. Wie anhand der Messwerte zu sehen ist, konnte mit der automatisierten Screening-Anlage die Dehalogenase-Aktivität des verwendeten Klons detektiert werden.

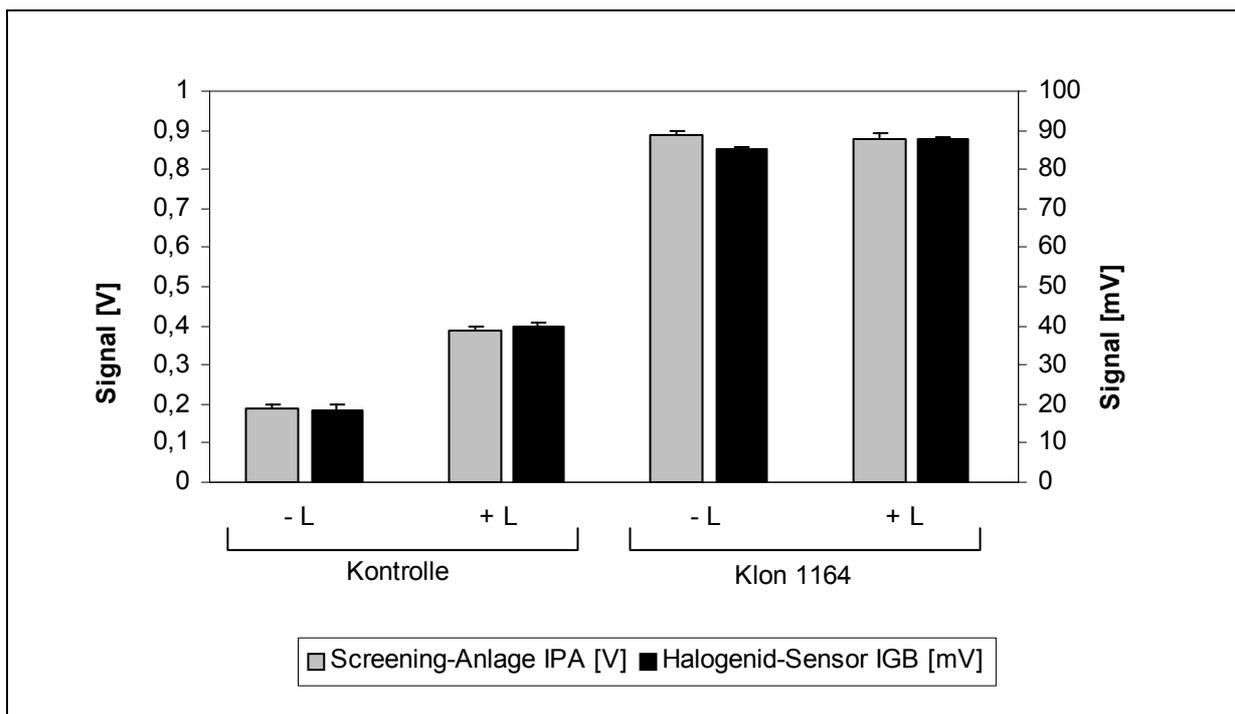


Abb. 32 Vergleichsmessung Chloridsensor und automatisierte Halogenid-Screening-Anlage. Nach Umsetzung von 6 mM MCA mit Zellextrakten von *E. coli* DH5α mit pJOE930 (Kontrolle) bzw. Klon 1164, die mit Aufschlusspuffer ohne (- L) und mit (+ L) Lysozym hergestellt worden waren, wurde mit beiden Elektrodensystemen der Chloridgehalt gemessen. Aufgrund des unterschiedlichen Verstärkungsfaktors sind die Messwerte der Screening-Anlage in [V], die des Halogenidsensors in [mV] aufgetragen; angegeben ist jeweils der Mittelwert aus vier bzw. acht Proben.

4.3.3 Testlauf der Halogenid-Screening-Anlage

Um die Funktion der Anlage unter realen Screening-Bedingungen zu testen, wurde ein Teil der aus Boden-DNA konstruierten und in Mikrotiterplatten abgelegten Genbanken (s. 4.1 und 4.1.2.4) damit auf Dehalogenase-Aktivität untersucht. Anzucht und Aufschluss der Klone, Inkubation mit halogeniertem Substrat (MCA) sowie Abtötung der Zellen erfolgten wie in 3.12.4 beschrieben. Durch Ausplattieren des Überstands einiger Proben der Negativkontrollplatte auf LB_{Amp}-Platten wurde die vollständige Abtötung aller Zellen überprüft. Anschließend wurde der Chloridgehalt der Überstände mit der automatisierten Halogenid-Screening-Anlage gemessen (s. 3.15.7.4; angesaugtes Probenvolumen: 90 - 100 µl). Auf diese Weise wurden ca. 2600 Klone untersucht, wobei in insgesamt drei Messdurchgängen jeweils zwischen acht und elf Mikrotiterplatten verarbeitet wurden.

In Abb. 33 ist exemplarisch die Auswertung der Messung einer Elektrode, mit der jeweils zwei Reihen einer Mikrotiterplatte erfasst wurden, dargestellt. Als Vergleichswert wurde das Messsignal der Positivkontrolle (Dehalogenase-Klon 1164) eingetragen.

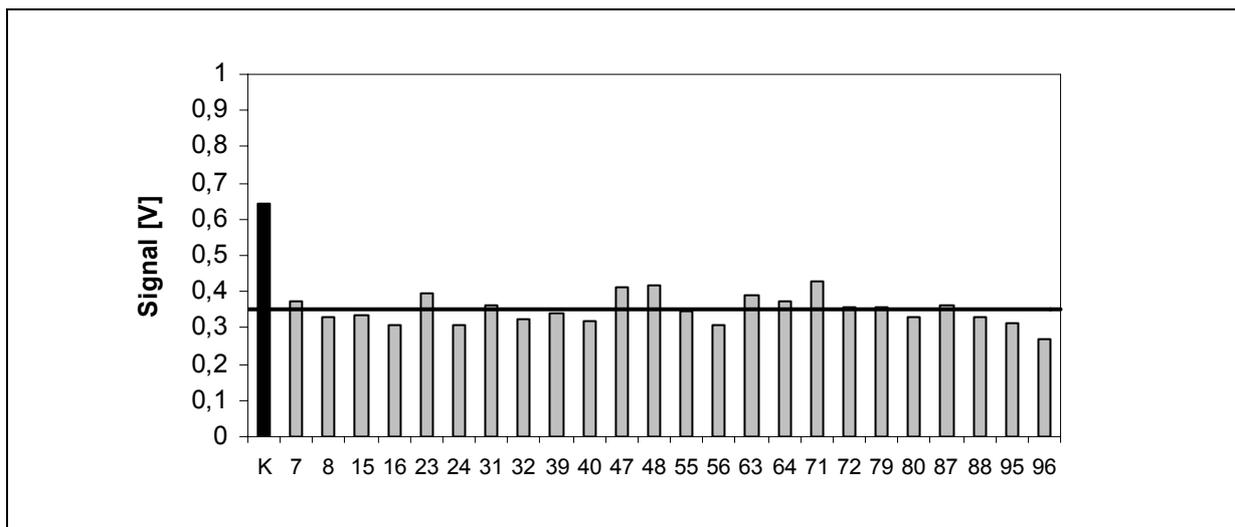


Abb. 33 Dehalogenase-Screening mit der automatisierten Halogenid-Screening-Anlage. Exemplarische Auswertung der Messung einer Elektrode. x-Achse, 7 - 96: Nr. der gemessenen Nöpfchen der 96er-Mikrotiterplatte, graue Balken: zugehörige Messwerte in [V]; K: Positivkontrolle (Dehalogenase-Klon 1164), schwarzer Balken: Messsignal der Positivkontrolle in [V]. (—) Linie: Mittelwert aller Messwerte der Nöpfchen 7 - 96.

5 Diskussion

Enzymatisch katalysierte Reaktionen beinhalten aufgrund ihrer hohen Regio-, Stereo- und Substratspezifität ein großes Potential für Stoffumwandlungen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie (Ruttloff, 1994). Sie ermöglichen die spezifische Synthese von chemisch schwer oder gar nicht zugänglichen Verbindungen unter milden Reaktionsbedingungen ohne Bildung unerwünschter Nebenprodukte.

Angesichts dieser Vorteile stieg das Interesse an enzymatisch katalysierten Reaktionen in der organisch-chemischen Synthese in den letzten Jahren stark an und führte zu einer ständigen Erweiterung ihres Anwendungsbereiches (Schmid *et al.*, 2001). Der Wunsch vieler Unternehmen, chemische Prozesse durch spezifischere enzymatisch katalysierte Reaktionen zu ersetzen, bestehende biokatalytische Verfahren durch die Verwendung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften zu optimieren sowie neuartige Produkte unter Anwendung enzymatisch katalysierter Reaktionen zu erzeugen, führte zu einem gesteigerten Bedarf an neuen Enzymen, die für diesen technischen Einsatz geeignet sind.

Strategien zur Bereitstellung geeigneter Biokatalysatoren umfassen beispielsweise die gentechnische Modifizierung bereits vorhandener Enzyme, die Durchmusterung von mikrobiellen Stammsammlungen nach gewünschten Enzymeigenschaften oder die Isolierung von neuartigen Proteinen aus Anreicherungskulturen.

Obwohl Mikroorganismen aufgrund ihrer großen physiologischen und metabolischen Anpassungsfähigkeit ubiquitär vorkommen, ist sehr wenig über die einzelnen Spezies bekannt. Dies rührt hauptsächlich von der Schwierigkeit her, diese unter Laborbedingungen zu kultivieren. Moderne phylogenetische Analyseverfahren, die die Zusammensetzung der mikrobiellen Population auf molekularer Ebene ohne die Notwendigkeit einer vorherigen Kultivierung untersuchen, haben die frühere Vermutung (*great plate count anomaly*) bestätigt, dass die tatsächlich vorhandene Diversität sehr viel größer ist als bisher angenommen und dass der Anteil der kultivierbaren Mikroorganismen lediglich einen sehr geringen Teil der existierenden Spezies darstellt (Torsvik *et al.*, 1990a; Amann *et al.*, 1995). Klassische Methoden zur Gewinnung neuer Enzyme aus unbekanntem Mikroorganismen, die auf deren Kultivierbarkeit beruhen, lassen daher das beträchtliche Potential der unkultivierbaren Organismen völlig ungenutzt. Die gesamte genetische Vielfalt einer Population ist durch die Gesamtheit ihrer Genome, das Metagenom, repräsentiert (Handelsman *et al.*, 1998). Um auch das metabolische Potential der unkultivierbaren Mikroorganismen als Quelle für neue biotechnologische Anwendungen und Produkte nutzen zu können, sind deshalb alternative Ansätze erforderlich, die die genetische Information des Metagenoms zugänglich machen.

In dieser Arbeit wurden deshalb Methoden entwickelt, die den Engpass der Kultivierbarkeit umgehen und es stattdessen ermöglichen, die durch die DNA des Metagenoms kodierte Diversität insbesondere des Habitates Boden für die Entdeckung neuartiger Enzymaktivitäten zu nutzen. Dazu wurde die genomische DNA der Mikroorganismen aus einer Bodenprobe isoliert und aufgereinigt, fragmentiert und in den Vektor pJOE930 kloniert. Durch das Screening der in *E. coli* angelegten Genbanken auf unterschiedliche Enzymaktivitäten wurden anschließend sowohl deren genetisches Potential und ihre Vielfalt überprüft als auch neuartige Enzyme für eine mögliche industrielle Anwendung identifiziert. Des Weiteren wurde auf der Basis der vorhandenen Chloridanalytik ein parallelisiertes und automatisiertes Screeningsystem für ein sensitives HTP-Screening nach dehalogenierenden Enzymen entwickelt.

5.1 Konstruktion von Genbanken aus Boden-DNA durch Direktklonierung

DNA-basierte Verfahren, die die Kultivierung der Mikroorganismen umgehen, sollen den Zugang zur genetischen Information des Metagenoms inklusive der unkultivierbaren Mikroorganismen ermöglichen. Die aus einer Umweltprobe isolierte DNA kann dazu auf unterschiedliche Art und Weise genutzt werden. Eine Möglichkeit besteht in ihrer direkten Klonierung in ein geeignetes Expressionssystem.

Gegenüber PCR-basierten Klonierungsmethoden hat diese Direktklonierung den Vorteil, dass es nicht erforderlich ist, vor der Klonierung die Sequenz der gesuchten Enzymklasse zu kennen, um beispielsweise PCR-Primer zu entwerfen. Zudem ist man nicht auf Enzyme mit konservierten Sequenzbereichen beschränkt. Stattdessen ist die Identifizierung völlig neuartiger Gene und Genprodukte möglich. Eine durch Direktklonierung erstellte Genbank kann außerdem auf verschiedene Aktivitäten durchmustert werden und enthält nicht nur Gene einer bestimmten funktionellen Klasse.

Es wurden verschiedene Verfahren beschrieben, um bei einer direkten Klonierung der DNA die Trefferwahrscheinlichkeit für ein Enzym mit bestimmten Eigenschaften zu erhöhen. Zum einen kann die Umweltprobe vor der Extraktion der DNA einer Anreicherung unterzogen werden, wie sie auch bei der klassischen Methode zur Isolierung neuer Mikroorganismen und ihrer Enzyme durchgeführt wird. Dazu wird die Probe in Anwesenheit eines spezifischen Substrates in Flüssigkultur inkubiert, wobei sie mehrfach in frisches Medium überführt wird (Entcheva *et al.*, 2001; Knietsch *et al.*, 2003a; Knietsch *et al.*, 2003b). Durch Kultivierung der Probe in Anwesenheit des Substrates wird ein künstlicher Selektionsvorteil erzeugt, so dass diejenigen Organismen angereichert werden, die das Substrat verwerten können. Aufgrund der dadurch erhöhten Trefferwahrscheinlichkeit kann auch die Größe der aus der isolierten DNA erstellten Genbank reduziert werden im Vergleich zu einer

Boden-Genbank ohne Voranreicherung. Infolge der Anreicherung spezialisierter Organismen verringert sich allerdings die Diversität der Probe und damit auch der extrahierten DNA (Entcheva *et al.*, 2001). Die Vielfalt ist des Weiteren vermindert durch die Favorisierung schnell wachsender kultivierbarer Organismen (Knietsch *et al.*, 2003a). In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass aus Genbanken von Bodenproben, die vor der Direktklonierung einer kurzen Anreicherung unterzogen wurden, hauptsächlich Enzyme isoliert werden konnten, die große Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Enzymen aufwiesen, vornehmlich der schnell wachsenden *Enterobacteriaceae* (Entcheva *et al.*, 2001; Knietsch *et al.*, 2003a; Knietsch *et al.*, 2003b). Eine Genbank, die auf diese Weise hergestellt wird, spiegelt nicht mehr die natürliche Diversität wider, sondern enthält stattdessen einen erhöhten Anteil an Genen für Enzyme mit sehr spezifischen Eigenschaften (Knietsch *et al.*, 2003b). Damit eignet sie sich nicht mehr für ein Screening nach anderen Enzymaktivitäten. Die Probennahme aus ökologischen Nischen erhöht ebenfalls die Wahrscheinlichkeit, Enzyme mit speziellen Eigenschaften zu finden. So konnten beispielsweise in einer Genbank, die aus einer Bodenprobe einer alkalischen Wüste konstruiert wurde, neue lipolytische Enzyme identifiziert werden, deren Thermostabilität weit über der kommerziell erhältlicher Lipasen lag (Miller, 2000). In Anbetracht der enormen Diversität der Mikroorganismen im Allgemeinen ist die Wahrscheinlichkeit jedoch sehr hoch, auch aus Proben gewöhnlicher Standorte geeignete Biokatalysatoren zu isolieren.

5.1.1 Isolierung und Aufreinigung von Boden-DNA

Die effektive Isolierung hochmolekularer nicht-fragmentierter DNA ist eine wichtige Voraussetzung für die Erstellung von Genbanken. Die Isolierung der genomischen DNA aus Boden-Mikroorganismen zur Direktklonierung in *E. coli* erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Aufschlussmethode nach Zhou *et al.* (1996). Aus Kompostboden, der einem Garten in der Nähe von Stuttgart entnommen worden war, wurde so ein hellbrauner DNA-haltiger Extrakt gewonnen.

Den verschiedenen Methoden zur Isolierung von DNA aus Bodenproben liegen zwei prinzipiell unterschiedliche Vorgehensweisen zugrunde. Zum einen können die Mikroorganismen zuerst aus der Probe isoliert, d. h. von den Bodenpartikeln abgetrennt und anschließend aufgeschlossen werden (Faegri *et al.*, 1977; Torsvik, 1980). Zum anderen ist auch eine direkte Lyse der Zellen ohne vorherige Extraktion oder Fraktionierung möglich (Ogram *et al.*, 1987; Zhou *et al.*, 1996). Die direkte Lyse hat neben der einfachen Durchführbarkeit (Lorenz *et al.*, 2002) den Vorteil, dass auch extrazelluläre, im Boden frei vorliegende DNA sowie die DNA von Mikroorganismen, die fest an Bodenpartikel gebunden sind, extrahiert wird und auf diese Weise eine mindestens 10fach höhere Ausbeute erreicht werden kann (Steffan und Atlas, 1988; Leff *et al.*, 1995). Dem steht die höhere Integrität

und Reinheit der DNA aus isolierten Bakterien gegenüber (Steffan *et al.*, 1988; Jacobsen und Rasmussen, 1992; Leff *et al.*, 1995). Laut Courtois (2001) kann mit beiden Verfahren eine vergleichbare Verteilung der Diversität erhalten werden.

Der Zellaufschluss im Rahmen der direkten Lyse kann chemisch (z. B. SDS, andere Detergenzien), enzymatisch (z. B. Lysozym, Proteinase K, Pronase), mechanisch bzw. physikalisch (z. B. Glasperlen, Ultraschall, Mörsern, Gefrier-Tau-Zyklen, Hitze) oder durch eine Kombination der verschiedenen Aufschlussprinzipien erfolgen. Die damit isolierte DNA unterscheidet sich in Reinheit, Fragmentierung und Ausbeute (Moré *et al.*, 1994; Leff *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1999).

Eine einfache, relativ schnell durchzuführende, dabei schonende und effiziente Aufschlussmethode der direkten Lyse wurde von Zhou *et al.* (1996) entwickelt. Durch die Kombination einer SDS-basierten Zelllyse mit Hochsalzbehandlung, Proteinase K und Hitze werden die meisten Böden effektiv aufgeschlossen; dabei können aufgrund der schonenden Behandlung DNA-Fragmente > 23 kb isoliert werden. Der Zusatz des Komplexbildners CTAB reduziert den Anteil an störenden Huminsäuren schon während der Extraktion (Zhou *et al.*, 1996). Außerdem komplexiert CTAB Zellwandbestandteile, denaturierte Proteine und Polysaccharide, die anschließend durch Zentrifugation abgetrennt werden können (Müller und Bruchhaus, 1997). Allerdings wird der Grad des Aufschlusses durch den Lehmgehalt des Bodens beeinflusst. Zudem werden gram-positive Bakterien nicht effektiv lysiert (Zhou *et al.*, 1996).

Durch Vorschaltung einer mechanischen Aufschluss-Komponente in Form von drei Gefrier-Tau-Zyklen wurde diese Methode von Kauffmann (2002) modifiziert. Zur verbesserten Entfernung der Huminstoffe werden die erhaltenen Überstände vor der Phenol-Chloroform-Extraktion zusätzlich mit CTAB behandelt. Es wurde gezeigt, dass mit dieser Methode hochmolekulare DNA in hoher Ausbeute mit geringer Fragmentierung erhalten werden kann (Kauffmann, 2002). Trotz der zusätzlichen Gefrier-Tau-Zyklen wurde aber vorrangig die DNA aus gram-negativen Organismen isoliert, während gram-positive Actinomyceten praktisch nicht aufgeschlossen werden konnten.

Die mit Hilfe dieser Methode aus Kompostboden erhaltene DNA war ebenfalls nur geringfügig fragmentiert. Wie an der braunen Färbung des wässrigen Rohextraktes zu erkennen war, wurden bei der Extraktion auch humine Substanzen mitextrahiert, die neben dem hohen Salzgehalt wohl auch zur Bildung des Schmiere beigetragen haben, der beim Auftragen auf ein Agarosegel zu sehen war (s. Abb. 4). Da Huminstoffe im UV-Bereich stark absorbieren (Bachoon *et al.*, 2001), war eine photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in diesem Extrakt nicht möglich. Zwar wurden kürzlich Methoden entwickelt, die eine Quantifizierung der DNA im Rohextrakt mit Hilfe des

Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I erlauben (Zipper *et al.*, 2003); diese waren jedoch zum Zeitpunkt der Erstellung der Genbanken noch nicht vollständig etabliert. Eine genaue Aussage zur Ausbeute ließ sich hingegen für die weiter aufgereinigte DNA treffen (s. u.).

Nicht nur im Hinblick auf die Quantifizierung der DNA sind die mitextrahierten Huminstoffe für die weitere Verarbeitung der DNA problematisch. Da sie beispielsweise nachfolgende enzymatische Reaktionen wie z. B. Restriktionsverdauung stören (Steffan *et al.*, 1988; Porteous und Armstrong, 1991; Tsai und Olson, 1991) oder die Transformationseffizienz (Tebbe und Vahjen, 1993) und die Spezifität von DNA-Hybridisierungen (Steffan *et al.*, 1988; Tebbe und Vahjen, 1993) reduzieren, müssen sie vor der Weiterverwendung der DNA entfernt werden. Ihre Abtrennung ist allerdings schwierig, da sie sich aufgrund ihrer ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften (z. B. negative Ladung) wie DNA verhalten (Braid *et al.*, 2003).

Deshalb stellt die Aufreinigung der DNA nach der Extraktion einen kritischen Schritt für die Gewinnung von DNA dar, die für die weitere Verwendung eine ausreichend hohe Reinheit besitzt (Zhou *et al.*, 1996). In der Literatur wurden verschiedene Methoden zur Entfernung der Huminstoffe beschrieben, wie z. B. selektive Fällungen und Extraktionen, verschiedene Chromatographie-Verfahren (Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie, Silica-Membran), Elektroelution, Aufreinigung über Glasmilch, Behandlung mit PVPP, CsCl-Dichtegradientenzentrifugation oder Agarose-Gelelektrophorese (Ogram, 2000; Bachoon *et al.*, 2001; Braid *et al.*, 2003). Die genannten Aufreinigungsmethoden sind oft sehr zeit- und arbeitsaufwändig, auf eine geringe Probenanzahl beschränkt oder führen zu einem hohen Verlust an DNA (Steffan *et al.*, 1988; Tebbe und Vahjen, 1993; Braid *et al.*, 2003). Die komplette Entfernung der Huminstoffe ist meist sehr schwierig (Tebbe und Vahjen, 1993). Oftmals ist die Anwendung einer dieser Methoden auch nicht ausreichend, um alle Störstoffe zu entfernen (Miller *et al.*, 1999); erst durch Kombination verschiedener Methoden wird eine ausreichende Reinheit der DNA erzielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der ebenfalls stark mit Huminstoffen verunreinigte Bodenextrakt über die Gelfiltrations-Säulen Chroma Spin+TE-1000 der Firma Clontech aufgereinigt. Auf diese Weise konnten die Störstoffe effektiv entfernt werden: Die zuvor braun gefärbte DNA-Lösung war nach der Aufreinigung annähernd farblos, während das Säulenmaterial infolge der Rückhaltung der huminen Substanzen eine braune Färbung aufwies. Weder verschiedene Restriktionsenzyme noch die T4-DNA-Ligase wurden inhibiert. Zudem konnten aufgrund der gewählten Ausschlussgrenze von 1350 bp gleichzeitig DNA-Fragmente entfernt werden, die für eine Klonierung zu klein wären.

Aus 1 g Boden wurden so ca. 12 µg hochmolekulare, reine und klonierfähige DNA erhalten. Damit lag die Ausbeute in einem Bereich, der bei Verwendung der Methode nach Zhou *et al.* (1996) auch in der Literatur beschrieben wird. Während bei Zhou *et al.* (1996) die Ausbeute an DNA im Rohextrakt je nach Bodenprobe zwischen 2,5 und 26,9 µg pro 1 g Boden lag, wurden nach der Aufreinigung mit verschiedenen Methoden (Gelelektrophorese, *Wizard Minipreps Plasmid Purification Resin*, Promega) noch 2 bis ca. 20 µg DNA erhalten. Stach *et al.* (2001) isolierten durchschnittlich 26 µg DNA pro 1 g Boden (Rohextrakt vor Aufreinigung), Henne *et al.* (1999) konnten aus 1 g Boden ca. 15 µg aufgereinigte DNA isolieren. Generell muss beim Vergleich von DNA-Konzentrationen berücksichtigt werden, dass der Gehalt an DNA in einer Probe auch vom Boden- und Sediment-Typ, der Bodenbiologie, den klimatischen Verhältnissen und dem Gehalt an Wasser, Sauerstoff und organischer Substanz abhängt (Moré *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1999). Daneben spielt auch die Lagerung der Probe eine Rolle (Miller *et al.*, 1999; Tien *et al.*, 1999). Schätzungen gehen von ca. $3,8 \cdot 10^9$ bis $1,5 \cdot 10^{10}$ Bakterien pro 1 g Boden (Sediment, Waldboden) aus (Torsvik *et al.*, 1990a; Moré *et al.*, 1994). Unter Einberechnung einer durchschnittlich pro Zelle enthaltenen Menge an DNA von $5 \cdot 10^{-15}$ g (basierend auf Daten für *E. coli*, Moré *et al.*, 1994) könnten somit aus 1 g Boden theoretisch zwischen 19 und 75 µg DNA extrahiert werden. Die hier erhaltene DNA-Menge stimmt damit sehr gut überein.

5.1.2 Klonierung der Boden-DNA

Die direkte Klonierung der genomischen Boden-DNA in den Vektor pJOE930 ermöglichte die Herstellung von Genbanken in *E. coli*, die für ein Screening nach neuen Enzymaktivitäten geeignet waren.

Für die Fragmentierung der aufgereinigten Boden-DNA wurde mit *EcoRI* ein Restriktionsenzym mit 6er-Erkennungssequenz ausgewählt. Dadurch sollte das Risiko verringert werden, dass Gene zerstückelt werden, wie es z. B. bei Enzymen mit 4er-Erkennungssequenz wie *Sau3AI* eher der Fall wäre, da sie statistisch öfter im Genom schneiden. Aufgrund der Reinheit der DNA nach Aufreinigung über Chroma Spin+TE-1000-Säulen war die Zugabe von nicht-acetyliertem BSA, das die hemmende Wirkung von eventuell noch in der DNA-Lösung vorhandenen Huminsäuren verringert (persönliche Mitteilung Hubert Zipper), nicht erforderlich. Durch Gelelektion wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von 3 - 5 kb und 5 - 8 kb erhalten. Für die Expression einzelner Gene wie beispielsweise Hydrolasen mit einer Länge von maximal 1 - 2 kb (Lorenz *et al.*, 2002) ist eine Klonierung von Fragmenten dieser Größe ausreichend. Bei der Suche nach kompletten Genclustern, die ganze Stoffwechselwege umfassen, wären dagegen Fragmentgrößen von mehreren Dutzend Kilobasen erforderlich (Lorenz *et al.*, 2002). Die Aufteilung der Insert-Fraktionen in zwei Größenbereiche sollte einen Selektionsvorteil

kleinerer Fragmente verhindern und so die Chancengleichheit aller Fragmentgrößen bei der Klonierung gewährleisten. Tatsächlich gelang auf diese Weise die Erstellung von Genbanken mit Fragmentgrößen bis 7,5 kb. Bei Ansätzen mit 5 - 8 kb war zudem die durchschnittliche Insertgröße erhöht (s. u.).

Die strukturellen Eigenschaften des als Klonierungs- und Expressionsvektor gewählten Plasmids pJOE930 (Altenbuchner *et al.*, 1992) schienen aus mehreren Gründen für die Erstellung von Genbanken von Vorteil zu sein.

pJOE930 enthält zwei induzierbare *lac*-Promotoren, die einerseits eine Expression unabhängig von gen-eigenen Promotoren erlauben, andererseits die Transkription eines Inserts aus beiden Richtungen, unabhängig von seiner Orientierung, ermöglichen (Altenbuchner *et al.*, 1992). Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer aktiven Expression des Gens, welche unabdingbare Voraussetzung für eine Identifizierung im anschließenden Aktivitätsscreening ist. Damit sollten auch die Chancen steigen, neue Enzyme zu finden. Zudem liegt pJOE930 in hoher Kopienzahl in der Zelle vor. Aufgrund der hohen Anzahl an mRNA-Transkripten sollte damit eine genügende Expression für die Detektion der Aktivität gewährleistet sein.

Tatsächlich ergaben sich beim Screening der Klone auf lipolytische Aktivität (s. 4.2.1.1) Trefferraten von 1 zu 1000 bis 1 zu 2600. Im Vergleich dazu zeigte nach einer Direktklonierung von Boden-DNA in den Vektor pBluescript SK+ nur ein Klon von 95000 Aktivität auf Tributyrin-Platten (Henne *et al.*, 2000). Zu dieser erhöhten Ausbeute beigetragen hat sicherlich das Vorhandensein der zwei Promotoren in pJOE930, die die Transkription von inserierten Genen unabhängig von deren Orientierung ermöglicht haben. Der *lac*-Promotor besitzt die Eigenschaft, dass die Bindung des Repressors an den *lac*-Operator das Operon nicht vollständig blockiert (Knippers *et al.*, 1990). Dies hat zur Folge, dass auch in Abwesenheit des Induktors das folgende Gen transkribiert wird, wenn auch in geringerem Ausmaß. Weder pJOE930 noch der verwendete Wirtstamm *E. coli* DH5 α besitzen zudem ein *lacI*- oder *lacI*^q-Allel, das eine konstitutive Produktion des *lac*-Repressors und damit eine Absicherung der Repression der Expression in Abwesenheit des Induktors erlauben würde (Stader, 1995). Bei Klonierung eines toxischen Gens könnte diese undichte Genregulation zusammen mit der hohen Kopienzahl des Vektors schnell zu einer tödlichen Vergiftung der Zelle schon während des Hochwachstums führen, so dass das betreffende Gen für das anschließende Screening verloren wäre. Das Gleiche gilt für Genprodukte, die infolge dieser hohen Expressionsrate in so großen Mengen gebildet werden, dass sie erst dann toxisch für die Zelle werden. Die kontinuierliche Expression eines Gens führt außerdem zu einem Wachstumsnachteil gegenüber Zellen, die kein Gen exprimieren.

Um zu vermeiden, dass bestimmte Gene, die möglicherweise für ein interessantes Genprodukt kodieren, frühzeitig auf diese Weise ausselektiert werden, könnte ein anderer Wirtstamm verwendet werden, der eine konstitutive Expression des Repressors gewährleistet (z. B. *E. coli* XL1Blue). Denkbar wäre auch die Verwendung eines Vektors mit T7-Promotor, um die Genexpression gezielt induzieren zu können und auf diese Weise eine dichte Genregulation zur Verfügung zu haben. Durch die hohe Geschwindigkeit der T7 RNA Polymerase wird zudem fast ausschließlich die mRNA des Fremdgens synthetisiert (Stader, 1995).

Beim Screening der Boden-Genbanken wurde eine große Anzahl an exprimierten Enzymen identifiziert. Der Vektor pJOE930 hat sich damit trotz seiner nicht 100%igen Genregulation für ein Expressionsscreening als sehr gut geeignet erwiesen.

Weitere strukturelle Merkmale von pJOE930 sind zwei lange palindromische Sequenzen (337 bp), die durch eine nicht-palindromische Sequenz von 124 bp getrennt sind. Nach der Entfernung dieser Sequenz durch Restriktionsverdau ist eine ungehinderte Replikation des Plasmids nur möglich, wenn die Palindrome durch Ligation des Vektors mit einem (fremden) DNA-Abschnitt wieder räumlich voneinander getrennt werden. Ohne eingefügtes Insert bilden die Palindrome dagegen cruciforme Strukturen aus, die entweder die Replikation stark behindern oder durch Nukleasen gespalten werden und auf diese Weise die Vermehrung des Plasmids hemmen (Mizuuchi *et al.*, 1982; Hagan und Warren, 1983; Lindsey und Leach, 1989). So sollten nach einer Transformation im Prinzip nur diejenigen Klone überleben, deren Plasmid ein Insert enthält. Laut Altenbuchner *et al.* (1992) sinkt die Zahl der weißen Kolonien nach Religation von pJOE930 ohne Insert tatsächlich mehr als 100fach ab, wodurch das Kriterium eines positiven Selektionsvektors erfüllt ist. Neben der Dephosphorylierung des Vektors zur Verringerung seiner Religation ist dies ein weiterer Weg, um die Zahl der Klone zu verringern, die nur Vektor-DNA enthalten.

Wie sich bei der Bestimmung der Insertgrößen der Boden-Genbanken jedoch zeigte, enthielt trotz dieses Selektionsmechanismus ein relativ großer Teil der Klone Plasmide, die ohne Insert religiert waren (s. 4.1.3). Auffälligerweise ließen sich diese Konstrukte nicht mehr mit *EcoRI* verdauen. Das gleiche Phänomen trat auch bei Altenbuchner *et al.* (1992) auf und war dort auf teilweise oder vollständige Deletionen der palindromischen Sequenzen mitsamt der Restriktionsschnittstellen zurückzuführen. Diese Beobachtung wäre auch eine plausible Erklärung für den hier beobachteten hohen Anteil insertloser Klone. Da nach einer Deletion der palindromischen Sequenzen keine Sekundärstrukturen ausgebildet werden können, die die Replikation behindern oder durch Nukleasen gespalten werden könnten, war wohl eine normale Vermehrung dieser Vektoren möglich. Solche Deletionen werden möglicherweise durch Verunreinigungen in Form von Nukleasen verursacht, die während

der Aufarbeitung des Vektors in die DNA-Lösung gelangt sind. Eine Abänderung der Prozedur beispielsweise mit Beschränkung auf einen Doppelverdau mit *EcoRI* und *SacI* statt Behandlung mit CIAP oder Gelaufreinigung könnte eventuell die Gefahr einer Kontamination und damit auch die Zahl religierter Plasmide verringern (persönliche Mitteilung Josef Altenbuchner).

Nach Ligation der Boden-DNA in pJOE930 und Transformation in *E. coli* DH5 α wurden pro 1 μ l Ligationsansatz zwischen 1600 und 5300 weiße Klone erhalten – das entspricht ca. $1,2 \cdot 10^6$ bis $3,5 \cdot 10^6$ Klonen pro 1 μ g Vektor-DNA bzw. $1,8 \cdot 10^5$ bis $7,0 \cdot 10^5$ Klonen pro 1 μ g eingesetzter Boden-DNA. Diese Werte liegen deutlich über dem von Henne *et al.* (1999) erzielten Wert von 2000 Klonen pro 1 μ g Boden-DNA. Henne *et al.* (1999) führen das auf die Inhibition des Restriktionsenzym oder der Ligase durch Huminstoffe zurück, die bei der Aufreinigung der DNA nicht entfernt werden konnten. Dies zeigt, dass die gewählte Aufreinigungsmethode geeignet war, um DNA von ausreichender Reinheit zu erhalten.

Die Analyse der klonierten Inserts ergab Größen zwischen 1,0 und 7,5 kb. Trotz der Aufreinigung der Boden-DNA über Chroma Spin+TE-1000-Säulen und Gelelektion der DNA-Fragmente > 3 kb wurden also auch Fragmente um 1 kb kloniert. Dies könnte auf den Wachstumsvorteil zurückzuführen sein, den Zellen mit Plasmiden mit kleinen Inserts haben. Mit 3,3 bzw. 5,2 kb lag die durchschnittliche Insertgröße jedoch in einem Bereich, der für die Expression einzelner Gene wie z. B. Hydrolasen mit einer Länge von maximal 1 - 2 kb (Lorenz *et al.*, 2002) gut geeignet ist.

Für die Klonierung wurde die Boden-DNA in zwei Größenbereiche aufgeteilt (3 - 5 bzw. 5 - 8 kb). Wie die Analyse der Inserts zeigte, war die durchschnittliche Insertgröße nach Klonierung der 5-8-kb-Fragmente um 2 kb erhöht.

Die Inserthäufigkeit wird normalerweise über ein Blau-Weiß-Screening mit X-Gal bestimmt. Auch Altenbuchner *et al.* (1992) verwenden diese Methode zur Angabe des Prozentanteils transformierter Kolonien, da sie nachweisen konnten, dass mit ihrer Vektorpräparation alle weißen Kolonien ein Insert enthielten. Aufgrund des relativ hohen Anteils weißer Klone ohne Insert war die Anwendung dieser Methode hier nicht möglich. Der Anteil der inserthaltigen hellweißen Klone bezogen auf alle weißen Klone lag bei ca. 52 - 74 %. Eine Abänderung des Methodenprotokolls beim Verdau der Vektor-DNA könnte den Anteil an inserthaltigen Klonen möglicherweise erhöhen (s. o.). Vor allem im Hinblick auf die automatisierte Vereinzelung der Klone mit Hilfe eines Pickroboters wäre dies wünschenswert. Wie ein Testversuch zeigte, ist ein Pickroboter nicht in der Lage, geringe

Kontraste zwischen helleren und dunkleren weißen Kolonien zu unterscheiden, so dass neben den inserthaltigen weißen Klonen auch weiße Klone ohne Insert gepickt werden.

5.2 Aktivitäts-Screening

Die aus Boden-DNA in *E. coli* konstruierten Genbanken wurden anschließend mit Hilfe von einfachen Plattentestverfahren auf verschiedene Enzymaktivitäten hin untersucht. Die Durchmusterung auf Aktivität hat gegenüber Sequenz-basierten Screeningmethoden den Vorteil, dass auch Gene bisher unbekannter Mikroorganismen gefunden werden, die keine Homologie zu bereits bekannten Sequenzen aufweisen. So ist die Entdeckung völlig neuartiger Gene und Genprodukte unabhängig von der Kenntnis ihrer Sequenz möglich (Lorenz und Schleper, 2002). Zudem kann sie auch bei der Suche nach Enzymklassen eingesetzt werden, die keine konservierten Sequenzbereiche aufweisen, die für die Herstellung von Hybridisierungssonden oder PCR-Primern erforderlich sind (Cottrell *et al.*, 1999). Sequenz-basierte Verfahren schränken dagegen die Suche auf homologe Sequenzen verwandter Enzyme ein; eine Identifizierung neuartiger Genprodukte ist so meist nicht möglich. Andererseits können mit Hilfe dieser Verfahren eventuell auch Gene gefunden werden, die aufgrund einer geringen heterologen Expression bei einem Expressionsscreening unentdeckt blieben.

Unabdingbare Voraussetzung für ein Screening auf Aktivität ist eine aktive Expression des klonierten Gens. In Anbetracht der großen Diversität der unbekannt DNA könnte sich diese Tatsache als kritischer Punkt des Verfahrens erweisen, beispielsweise im Hinblick auf die Expression eines Gens mit hohem GC-Gehalt in *E. coli* oder einer anderen *Codon usage* (Demirjian *et al.*, 1999). Eine erfolgreiche Expression in *E. coli* setzt zum einen die Klonierung des vollständigen Gens, zum anderen auch die Erkennung des gen-eigenen Promotors durch die *E. coli* RNA Polymerase oder die Transkription des Gens inklusive seiner Ribosomenbindungsstelle ausgehend vom plasmid-kodierten Promotor voraus. Eine Transkription unabhängig vom gen-eigenen Promotor ist nur möglich, wenn das inserierte Gen bezüglich des vektor-eigenen Promotors die richtige Orientierung besitzt. Dieses Problem wurde hier durch die Verwendung eines Klonierungsvektors mit zwei Promotoren umgangen. Des Weiteren kann eine Entfernung des Gens von anderen regulatorischen Elementen seine Expression ausschalten; die Aktivität eines exprimierten Enzyms kann auch aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen verringert sein oder ausbleiben (Demirjian *et al.*, 1999). Die Bildung von Einschlusskörpern infolge einer Überexpression des Gens würde die Detektion der Aktivität ebenso unmöglich machen wie die Bildung eines toxischen Produkts.

Unabhängig von der erfolgreichen Expression ist Enzymaktivität des Weiteren nur nachweisbar, wenn das Substrat in die Zellen gelangt oder das Enzym nach einer Zellyse freigesetzt wird und mit dem Substrat in Kontakt kommen kann.

Die Durchführung eines Expressionsscreenings kann generell sowohl auf Agarplatten als auch in Lösung in Mikrotiterplatten erfolgen. Agarplatten-Assays haben den Vorteil, dass sie einfach und schnell durchzuführen sind und die Untersuchung einer sehr großen Zahl von Klonen in einem Schritt ermöglichen (Demirjian *et al.*, 1999). Testverfahren, die in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, sind meist sensitiver und erlauben die quantitative Bestimmung einer spezifischen Messgröße. Aufgrund der hohen Sensitivität werden auch geringe Enzymaktivitäten detektiert; ein Arbeiten mit Zellextrakten ist ebenfalls möglich. Das Mikrotiterplattenformat erleichtert ein systematisches Screening der einzelnen Klone sowie die Automatisierung einzelner Verfahrensschritte. Aufgrund der notwendigen Vereinzelung der Klone ist die Durchführung jedoch aufwändiger und mit höheren Kosten verbunden.

Positive Klone werden bei Agarplatten-Verfahren meist aufgrund einer Färbung der Kolonien oder einer Hofbildung identifiziert. Die Bildung eines Hofes kann üblicherweise jedoch nur erfolgen, wenn die Bakterien zumindest teilweise lysieren und die Enzyme in den Agar diffundieren, da die Trübung der Platten auf der Emulsion eines unlöslichen makromolekularen Substrates beruht, das nicht in die Zellen gelangen kann. Werden für die Klonierung Vektorkonstrukte verwendet, die Sequenzen enthalten, die für eine Ausschleusung des Genprodukts kodieren, kann eine Aktivität auch ohne Zellyse detektiert werden.

Für das Screening der Genbanken wurden Enzymklassen ausgewählt, deren hydrolytische Aktivität einfach nachzuweisen war und die für die Industrie von großem Interesse sind.

5.2.1 Lipolytische Aktivität

Lipolytische Aktivität wurde durch Ausplattieren der Transformationsansätze auf Tributyrin-Platten nachgewiesen (s. 4.2.1.1).

Lipasen und Esterasen können unter anderem anhand ihres Substratspektrums voneinander unterschieden werden. Während Lipasen bevorzugt wasserunlösliche Triacylglyceride langkettiger Carbonsäuren (≥ 10 C-Atome, Jaeger *et al.*, 1999) spalten, zeigen Esterasen hier keine Aktivität. Kurzkettige Triacylglyceride (< 10 C-Atome, Jaeger *et al.*, 1999) wie Tributyrin werden dagegen von beiden Enzymen hydrolysiert (Bornscheuer, 1999). Für ein direktes Screening speziell auf Lipasen werden daher Triglyceride langkettiger Fettsäuren, d. h. echte Lipase-Substrate wie z. B. Triolein (Trioleylglycerol) in Agarplatten eingesetzt (Hartel *et al.*, 1971; Jaeger *et al.*, 1999). Die Verwendung des

kurzkettigen Tributyrin in dieser Arbeit sollte das Auffinden sowohl von Esterasen als auch Lipasen ermöglichen. Durch zusätzliche Untersuchungen zur Substratspezifität können anschließend die gefundenen Genprodukte als Lipasen oder Esterasen eingeordnet werden.

Auf diese Weise konnten von insgesamt ca. 21000 untersuchten weißen Klonen vierzehn Klone mit stabilem lipolytischem Phänotyp identifiziert werden. Beim Screening einer ebenfalls aus Boden-DNA erstellten Genbank zeigten drei von 286000 untersuchten Klonen Aktivität auf Tributyrin-Platten (Henne *et al.*, 2000). Diese Rate (1 zu 95000) liegt deutlich unter der in dieser Arbeit erzielten von 1 zu 1500. Rondon *et al.* (2000) konnten auf Bacto-Lipid-Agar unter 3600 BAC-Klonen zwei Lipasen identifizieren; für die Klonierung wurden hier allerdings BAC-Vektoren verwendet, in die Boden-DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 27 kb kloniert worden waren, so dass die Anzahl der Klone nicht direkt vergleichbar ist. Diese hohe Rate ist sicherlich auch auf das Vorhandensein der zwei in pJOE930 enthaltenen Promotoren zurückzuführen, die eine Expression der klonierten Gene unabhängig von ihrer Orientierung und unabhängig von den gen-eigenen Promotoren ermöglicht haben.

Die rekombinanten Plasmide pKL01 bis pKL18 wiesen Fragmente zwischen 2,9 und 5,5 kb mit einem GC-Gehalt von 52 bis 68 % auf. Wie die große Anzahl aktiver Klone zeigt, war trotz dieses hohen GC-Gehaltes die Expression der Gene in *E. coli* möglich.

Mit Hilfe des PEDANT-Software-Systems wurden die Inserts unter Anwendung verschiedener bioinformatischer Methoden mit bekannten Sequenzen verglichen und analysiert. Für offene Leserahmen von fünf der vierzehn Insertsequenzen ergab die Homologiesuche mittels BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) eine direkte Ähnlichkeit zu Esterasen oder Lipasen (KL01, KL02, KL04, KL15, KL18). Dabei handelte es sich sowohl um bereits bekannte charakterisierte als auch um postulierte Enzyme, deren mögliche lipolytische Funktion ebenfalls durch Vergleich der Sequenz eines vollständig sequenzierten bakteriellen Genoms mit bekannten Sequenzen abgeleitet worden war, aber noch nicht genauer untersucht wurde. Die Identität auf Aminosäureebene lag dabei maximal bei 47 % (KL06, KL18); meist betrug die Übereinstimmung der Sequenzen nur ca. 30 bis 39 %. Sequenzhomologien traten auch zu Mitgliedern bestimmter Enzymfamilien auf, die Esterasen, Esterase-ähnliche Enzyme oder Hydrolasen umfassen. Für einen Teil der Sequenzen konnten auch typische lipolytische Sequenzmotive oder Domänen identifiziert werden. Teilweise wurden für die Klone Ähnlichkeiten zu anderen hydrolytischen Proteinen wie beispielsweise Amidasen oder Peptidasen festgestellt. Andere Sequenzen wiederum waren ähnlich zu Proteinen mit unbekannter Funktion. Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie zu bestimmten Esterasen oder Lipasen war es hier schwierig, den für

die lipolytische Aktivität mutmaßlich relevanten Genabschnitt zu identifizieren; zum Teil waren lediglich die enthaltenen konservierten Sequenzmotive ein Indiz für die katalytische Aktivität. Nur durch eine Subklonierung des entsprechenden Leserahmens lässt sich in diesen Fällen überprüfen, ob die Vermutung zutrifft.

Die relativ geringe Sequenzübereinstimmung der identifizierten Gene zu bekannten Esterasen und Lipasen zeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe der entwickelten Methoden neue Enzyme aus Bodenproben zu isolieren, die vermutlich aus bisher unbekanntem Mikroorganismen stammen. Die Tatsache, dass alle aufgespurten Sequenzen verschieden waren, ist ein Hinweis darauf, dass die erstellte Genbank einen geringen Grad an Redundanz aufweist.

Zur Untersuchung des Substratspektrums der gefundenen Klone wurden Umsetzungen mit typischen Esterase-Substraten unterschiedlicher Kettenlängen sowie Estern der aromatischen Phenyllessigsäure durchgeführt.

Übliche Methoden zur Bestimmung der Lipase- bzw. Esterase-Aktivität basieren entweder auf titrimetrischen (z. B. pH-Stat) oder spektrophotometrischen bzw. fluorimetrischen Verfahren (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Als Substrate für spektrophotometrische Tests werden häufig pNP-, MUF-, X- oder α -Naphthyl-Esterderivate unterschiedlicher Kettenlänge verwendet. Für einen spezifischen Nachweis einer Lipase im Gegensatz zu einer Esterase sind diese Monoacylster allerdings nicht besonders gut geeignet, da sie meist auch von Esterasen gespalten werden (Hartel *et al.*, 1971; Junge, 1984; Jaeger *et al.*, 1994). Die Umsetzung von Substraten mit länger-kettigen Fettsäuren kann jedoch ein erster Hinweis darauf sein, dass es sich möglicherweise um eine Lipase handelt (Guilbault und Hieserman, 1969; Hespell und O'Bryan-Shah, 1988). Die Meinungen über die für Lipasen spezifische Kettenlänge gehen jedoch auseinander: Während gemäß Jaeger *et al.* (1999) Esterasen auch noch Monoester mit Fettsäure-Kettenlängen von mehr als zehn C-Atomen hydrolysieren, wird laut Bornscheuer und Kazlauskas (1999) pNP-Palmitat (16 C-Atome) nur von Lipasen, nicht aber von Esterasen umgesetzt; auch ein Monoester der Myristinsäure (14 C-Atome) stellt laut Guilbault und Hieserman (1969) ein spezifisches Lipase-Substrat dar. Titrimetrische Methoden, die langkettige Triglyceride wie z. B. Triolein verwenden, sind deshalb für die Identifikation echter Lipasen am verlässlichsten (Junge, 1984; Jaeger *et al.*, 1999).

Für alle getesteten Klone (KL1 bis KL12) konnte die Hydrolyse der kurzkettigen Acylester (α -Naphthylacetat, pNP- bzw. MUF-Butyrat, MUF-Nonanoat) nachgewiesen werden. Ester länger-kettiger aliphatischer Fettsäuren (pNP-Laurat, pNP- bzw. MUF-Palmitat) wurden dagegen nur noch von KL7 und KL11, teilweise auch von KL5 und KL6 hydrolysiert. Während bei KL7 eine Umsetzung nur mit ganzen Zellen erfolgte, war die Aktivität von

KL11 sowohl mit ganzen Zellen als auch im Kulturüberstand nachweisbar. Ob es sich bei diesen beiden Enzymen tatsächlich um Lipasen handelt, sollte durch weitere Untersuchungen unter Verwendung typischer Lipase-Substrate (langkettige Triglyceride, s. o.) nachgeprüft werden. Das Spektrum der Umsetzungen der übrigen Klone deutet eher auf die Aktivität von Esterasen hin; auch dies sollte durch weitere Tests verifiziert werden. KL6 und insbesondere KL9 waren in der Lage, neben X-Butyrat auch Ester der aromatischen Phenyllessigsäure umzusetzen, wobei die Aktivität nur zellassoziiert vorlag.

Obwohl alle Esterase-positiven Klone durch das Screening auf tributyrinhaltigen Agarplatten gefunden wurden, gelang es nicht, die Hydrolyse von Tributyrin in Lösung nachzuweisen. Für eine messbare Aufklärung der Emulsion war vermutlich die Menge an produziertem Enzym und damit die spezifische Aktivität der Klone zu gering, zumal für die Messung weder die potentiellen Esterasegene zuvor in spezielle Expressionsvektoren subkloniert worden waren noch aufgereinigtes Enzym verwendet worden war, sondern lediglich Kulturüberstände bzw. Zellen der rekombinanten Klone mit dem gesamten Insert.

Zur genaueren Charakterisierung der potentiellen Esterasen sind weitere Untersuchungen denkbar. So könnten die Gene subkloniert und nach weiterer Klonierung in geeignete Expressionsvektoren verstärkt exprimiert werden, wodurch eine höhere spezifische Aktivität schon in den Rohextrakten erreicht würde, die die Untersuchung eines erweiterten Substratspektrums auch quantitativ unter Einbeziehung Lipase-typischer Substrate ermöglichen würde. Untersuchungen zur enantioselektiven Hydrolyse weiterer industriell interessanter Substrate oder zur Synthese chiraler Produkte aus prochiralen Zwischenstufen wären ebenfalls interessant. Nach Aufreinigung des Genprodukts (z. B. mittels His-Tag) könnte es bezüglich weiterer Aspekte wie pH- und Temperatur-Optimum (Aktivität, Stabilität), Molekulargewicht oder Lösungsmittelstabilität näher charakterisiert werden.

5.2.2 Phosphatasen und Phytasen

Beim initialen Screening auf Phosphatase-Aktivität zeigten von insgesamt knapp 32000 untersuchten Klonen 83 eine blaue oder bläuliche Koloniefarbe. Nach zwei Vereinzlungsausstrichen behielten noch 13 Klone ihren Phosphatase-haltigen Phänotyp bei, der teilweise mit Hofbildung einherging.

Eine Untergruppe der Phosphatasen, die Phytasen, sind insbesondere als Futtermittelzusatz interessant, da sie aus der pflanzlichen Phosphorspeicherform Phytinsäure anorganisches Phosphat freisetzen und somit für Tiere zugänglich machen, wodurch auf eine Zugabe von mineralischem Phosphor verzichtet werden kann (Lassen et

al., 2001). Auf diesem Grund wurden die 13 Phosphatase-positiven Klone anschließend daraufhin untersucht, ob sie auch in der Lage sind, Phytat zu hydrolysieren (s. 4.2.2.1). Von den 13 untersuchten Klonen zeigte ein Klon, KL22, eine erhöhte Aktivität, die mit steigender Temperatur leicht zunahm. Sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei den übrigen Klonen war ebenfalls ein leichter Anstieg der Werte zu beobachten. Diese Zunahme ist wohl nicht auf einen Zerfall des Substrates oder des gebildeten Phosphat-Molybdat-Eisensulfatkomplexes zurückzuführen, da sich deren Absorptionswerte nicht mit der Temperatur änderten. Möglicherweise weist eine *E.-coli*-eigene Phosphatase bzw. Phytase ein Temperaturoptimum zwischen 50 und 60 °C auf und führt so zu einer Erhöhung der unspezifischen Hintergrundaktivität der Klone mit steigender Temperatur.

Die PEDANT-Analyse des 3,6 kb großen Inserts von KL22 ergab eine Übereinstimmung der aus *orf22* abgeleiteten Aminosäuresequenz von 61 % zur unspezifischen sauren Phosphatase NapE aus *Sinorhizobium meliloti* sowie Ähnlichkeiten zu weiteren sauren Phosphatasen; eine Homologie zu Phytasen wurde jedoch nicht festgestellt. Sowohl die experimentellen Ergebnisse als auch die vorhandene Sequenzhomologie sprechen dafür, dass die in KL22 klonierte Sequenz für eine saure Phosphatase kodiert, zumal auch der Phytase-Assay bei saurem pH-Wert (5,5) durchgeführt wurde. Durch weitergehende Untersuchungen mit dem subklonierten Gen sollte abgeklärt werden, ob es sich dabei tatsächlich um eine als Phytase spezialisierte Phosphatase handelt.

5.2.3 Proteasen

Beim Screening auf Protease-Aktivität konnte kein positiver Klon identifiziert werden. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass im Falle der Synthese einer durch Boden-DNA kodierten Protease das Wachstum der Zellen gestört wird. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass klonierte Enzyme aufgrund einer abweichenden Substratspezifität nicht in der Lage waren, das angebotene Substrat umzusetzen. Als alternatives Substrat könnte z. B. Gelatine verwendet werden (Vermelho *et al.*, 1996). Zur Erhöhung des Kontrastes eines gebildeten Hofes zum trüben Hintergrund könnte die Screening-Platte auch mit Hilfe einer Färbelösung angefärbt werden (Vermelho *et al.*, 1996).

5.2.4 Amylasen

Auf stärkehaltigen Agarplatten wurden unter knapp 32000 untersuchten Klonen 38 Amylase-aktive Klone identifiziert (Trefferrate 1 zu 800). Im Vergleich dazu wurden beim Screening einer in einem BAC-Vektor konstruierten Boden-Genbank unter 3600 Klonen acht Amylasen gefunden (Trefferrate 1 zu 450) (Rondon *et al.*, 2000); für die Konstruktion dieser Genbank wurden Fragmente von durchschnittlich 27 kb kloniert. Trotz der mit

durchschnittlich 3,4 kb um den Faktor 10 kleineren Inserts konnte somit eine vergleichbare Anzahl positiver Klone identifiziert werden. Dies zeigt, dass zur Identifizierung einzelner Gene wie Hydrolasen die Klonierung von Inserts zwischen 3 und 5 kb ausreicht.

5.2.5 Weitere Enzymaktivitäten

Die Klone KL20 und KL21 wurden aufgrund ihres braunen Phänotyps auf Agar und in Flüssigmedium identifiziert. Die Sequenzanalyse der Inserts ergab für jeweils einen offenen Leserahmen (Orf20 bzw. Orf21) große Ähnlichkeit zu verschiedenen 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen, die innerhalb des Abbauweges von Phenylalanin und Tyrosin die Umwandlung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisinsäure katalysieren. Letztere wird durch die Homogentisat-1,2-Dioxygenase weiter zu Maleylacetoacetat umgewandelt. Bei Fehlen oder Mutation der Homogentisat-1,2-Dioxygenase reichert sich die Homogentisinsäure an, wird durch Luftsauerstoff oxidiert und polymerisiert spontan zu melaninähnlichen braunen Pigmenten (Denoya *et al.*, 1994; Milcamps und de Bruijn, 1999). Einigen Bakterien dienen diese komplexen Polymere auch gezielt als Schutz gegen Lichtschäden (La Du und Zannoni, 1963); teilweise wirken sie als Hämolytine. In Anbetracht der großen Homologie von Orf20 und Orf21 zu den genannten 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen ist die Bildung brauner Pigmente höchstwahrscheinlich ebenfalls auf einen derartigen Mechanismus zurückzuführen. Tatsächlich wurde auf dem Insert von KL21 ein weiterer unvollständiger offener Leserahmen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Orf21 gefunden (Position 2120 - 2509), dessen Sequenz Ähnlichkeit zu verschiedenen Homogentisat-1,2-Dioxygenasen aufwies (nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass das Boden-Bakterium, aus dem die Insertsequenz von KL21 ursprünglich stammt, wohl in der Lage ist, Homogentisat im Rahmen des Tyrosin-Abbaus umzusetzen; in KL21 aber konnte die Homogentisinsäure aufgrund des Fehlens einer aktiven Homogentisat-1,2-Dioxygenase (unvollständiges Gen) nicht weiter umgewandelt werden und polymerisierte stattdessen zu braunen Pigmenten.

Andere Autoren beschreiben ebenfalls die Identifizierung braun gefärbter Klone während des Screenings von Boden-Genbanken auf antibakterielle Aktivität (MacNeil *et al.*, 2001; Gillespie *et al.*, 2002). Die entsprechenden Genprodukte wiesen ebenso Ähnlichkeiten zu verschiedenen Mitgliedern der Familie der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen oder zu anderen Enzymen des Abbauweges von Phenylalanin bzw. Tyrosin auf. In einem Fall wurden durch Interaktion des braun gefärbten Polymers der Homogentisinsäure mit Indol, das von *E. coli* innerhalb seines natürlichen Stoffwechsels gebildet und sekretiert wird, sogar neue antibiotisch wirksame Substanzen gebildet (Gillespie *et al.*, 2002).

Zur Klärung, ob infolge der Aktivität von Orf20 und Orf21 tatsächlich Polymerisationsprodukte der Homogentisinsäure gebildet werden, könnten die Pigmente

aus den Kulturüberständen ausgefällt und chemisch analysiert werden. Die Relevanz der mutmaßlichen Leserahmen für die Pigmentbildung könnte durch Subklonierung und Herstellung von Mutanten verifiziert werden.

5.2.6 Dehalogenasen

Für das Screening nach Dehalogenasen wurden Verfahren modifiziert, die mit Hilfe von pH-Indikatoren die pH-Absenkung infolge der Freisetzung von Protonen bei einer hydrolytischen Dehalogenierung nachweisen. Eine Dehalogenierungsreaktion kann auch über die Detektion des abgespaltenen Chloridions nachgewiesen werden. Bestehende Methoden der Chloridbestimmung sind jedoch oft mit bestimmten Nachteilen verbunden: Während kolorimetrische Methoden toxische und korrosive Reagenzien verwenden, weisen Chloridelektroden Querempfindlichkeiten gegenüber anderen Ionen auf oder werden leicht durch Schwermetalle inaktiviert (Holloway *et al.*, 1998). Die Verwendung von pH-Indikatoren erlaubt dagegen ein einfaches, schnelles und billiges Screening einer großen Zahl von Klonen. Bei der Durchführung in Mikrotiterplatten ist die Messung zudem automatisierbar.

Voraussetzung für den Nachweis eines pH-Abfalls ist die geringe Pufferkapazität des verwendeten Mediums bzw. der verwendeten Lösung (Strotmann und Röschenthaier, 1987). Sowohl der im pH-MTP-Assay verwendete Tris-Puffer als auch die aus fünffach verdünntem LB-Medium bestehenden pH-Indikator-Platten erwiesen sich in dieser Hinsicht als geeignet. Aufgrund des geringen Nährstoffangebotes, des hohen pH-Wertes und des toxischen Substrates war es jedoch nicht möglich, die Klone direkt auf den Indikatorplatten anzuzüchten. Deshalb wurden sie für das Screening erst nach Wachstum auf normalem LB-Medium mit Hilfe von Nitrocellulose auf die pH-Indikator-Platten überführt.

Anhand ihrer Gelbfärbung wurden dabei drei Klone identifiziert, die in der Lage waren, das Substrat Monochloracetat zu verwerten (KL23, KL24 und KL25). Ihre dehalogenierende Aktivität wurde nach Umsetzungen in Lösung durch Messungen mit dem Chloridsensor bestätigt. Klon KL24, der schon auf den pH-Indikator-Platten die intensivste Gelbfärbung gezeigt hatte, war hierbei am aktivsten.

Die Genprodukte der auf den Inserts der drei Klone jeweils identifizierten offenen Leserahmen (Orf23, Orf24 und Orf25) wiesen alle signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Enzymen der Gruppe II der Halogencarbonsäure-Dehalogenasen auf, die spezifisch L-2-Monochlorpropionsäure unter Inversion der Konfiguration am chiralen C-Atom umsetzen, nicht aber das D-Isomer der Chlorpropionsäure (Fetzner und Lingens, 1994; Slater *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1999). Diese Enzyme haben nicht nur vergleichbare katalytische Eigenschaften, sondern weisen auch Sequenzhomologien von 33 bis 67 % zueinander auf und gelten deshalb als evolutionär verwandt (Fetzner und Lingens, 1994;

Slater *et al.*, 1997). Die Identität von Orf23, Orf24 und Orf25 mit diesen Dehalogenasen betrug 41 % bis 50 %. Dies deutet auf eine evolutionäre Verwandtschaft zu dieser Enzym-Gruppe hin. Eine Überprüfung ihrer Substratspezifität, insbesondere anhand der Umsetzung der beiden Isomere der Chlorpropionsäure, könnte Aufschluss darüber geben, ob sie auch mechanistisch dieser Gruppe zuzuordnen sind.

Die Identität der drei Genprodukte von KL23, KL24 und KL25 zueinander lag zwischen 46 % und 57 %. Obwohl die DNA der drei Genbanken, aus der die Dehalogenasen isoliert wurden, aus einer einzigen Bodenprobe stammte, wurden drei verschiedene Enzyme identifiziert, die zudem nicht identisch mit bekannten Dehalogenasen waren. Diese Ergebnisse sind ein Indiz dafür, dass die aus der Bodenprobe erstellte Genbank nicht redundant ist und die Genome einer Vielzahl verschiedener, noch nicht kultivierter, unbekannter Mikroorganismen enthält. Zudem wurde gezeigt, dass Dehalogenasen auch durch direkte Klonierung der sie kodierenden DNA identifiziert und isoliert werden können. Der verwendete pH-Indikator-Agarplatten-Assay war geeignet, eine große Anzahl von Klonen auf dehalogenierende Aktivität zu durchmustern. Bei Verwendung anderer halogener Verbindungen müsste noch getestet werden, ob diese auch direkt dem Agar zugegeben werden können. Für ein Screening nach Dehalogenasen, die flüchtige halogenierte Verbindungen umsetzen, wäre es denkbar, diese Substrate in den Deckel der Agarplatten zu pipettieren und so eine gesättigte Gasphase zu erzeugen.

Mit Hilfe der verschiedenen Screeningverfahren wurden insgesamt 70 Enzyme mit unterschiedlicher Aktivität gefunden, darunter 14 Esterasen, 13 Phosphatasen, 38 Amylasen, zwei Dioxygenasen sowie drei Dehalogenasen. Die dabei klonierten Boden-DNA-Fragmente waren zwischen 2,5 und 6,1 kb lang und wiesen GC-Gehalte zwischen 41 und 68 % auf. Die Länge der für die katalytische Aktivität mutmaßlich relevanten Genprodukte lag zwischen 219 und 508 Aminosäuren.

Wie die Sequenzanalyse der Klone ergab, war es mit Hilfe des Aktivitätsscreenings möglich, neuartige Genprodukte zu identifizieren, deren Sequenz nur geringe bis mäßige Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen der verschiedenen Datenbanken aufwies. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die Direktklonierung ein geeigneter Weg ist, um Zugang zum beträchtlichen metabolischen Potential der Mikroorganismen zu erhalten und auf diese Weise neue, bisher unbekannte Enzyme für die industrielle Anwendung aufzuspüren. Die große Anzahl und Vielfalt der identifizierten Enzymaktivitäten sowie die Tatsache, dass die Sequenzen alle verschieden waren, belegen das genetische Potential und die Diversität der aus Boden-DNA erstellten Genbanken. Durch die Entwicklung verbesserter Methoden zur Isolierung, Aufreinigung und Klonierung der Boden-DNA wurde die Effizienz gegenüber bereits beschriebenen Verfahren deutlich gesteigert. Wesentliche

Punkte für die erfolgreiche Expression waren höchstwahrscheinlich die Verwendung eines Plasmidvektors, der die Transkription der Gene unabhängig von ihrer Orientierung und gen-eigenen Promotoren ermöglicht, sowie die Gewinnung hochreiner und damit für eine Klonierung geeigneter chromosomaler Boden-DNA. Die Tatsache, dass die auf diese Weise klonierten Gene trotz ihres hohen GC-Gehaltes erfolgreich in *E. coli* exprimiert wurden, bestätigt dessen Eignung als Expressionswirt.

5.3 Automatisierung der Chloriddetektion

Die elektrochemische Bestimmung von Chloridionen mit Hilfe ionenselektiver Elektroden zeichnet sich insbesondere durch die hohe Empfindlichkeit und Selektivität der Messung aus (Mörsberger, 1990). Damit ist ein spezifischer und sensitiver Nachweis von Dehalogenierungsreaktionen möglich. Im Unterschied dazu weisen Verfahren, die auf der Änderung des pH-Wertes beruhen, verschiedene hydrolytische Reaktionen nach (Tholey und Heinzle, 2002). Für die Untersuchung von mehreren tausend Klonen einer Genbank auf dehalogenierende Aktivität ist eine einzelne ionenselektive Elektrode jedoch nicht geeignet. Um ein effizientes und schnelles Screening mit hohem Durchsatz zu ermöglichen, wurde deshalb auf der Basis der vorhandenen ionenselektiven Chloridanalytik eine automatisierte und parallelisierte Halogenid-Screening-Anlage mit neuentwickelten Sensoreinheiten als Kernstück entwickelt. Anhand der Umsetzung von Monochloressigsäure durch einen Dehalogenase-exprimierenden *E.-coli*-Klon wurden des Weiteren Verfahren etabliert, die eine mikrobielle Umsetzung halogener Substrate und ihre elektrochemische Chloriddetektion direkt in Mikrotiterplatten erlauben.

Eine einfache Möglichkeit des Screenings besteht darin, das nach Verwertung des Substrats freigesetzte Chlorid direkt in den Kulturüberständen der vereinzelt Klone zu messen. Die dafür verwendeten Nährmedien sollten sowohl ein gutes Wachstum der Zellen ermöglichen als auch einen geringen Chloridgehalt aufweisen, da vor einem zu hohen Chloridhintergrund eine sensitive Detektion von geringen Konzentrationsunterschieden im linearen Messbereich nicht mehr möglich ist.

Durch die Verringerung der Konzentration der Bestandteile von LB-Medium sowie die Verwendung chloridarmer Medienbestandteile wurden zwei abgewandelte LB-Medien (LB I und LB II) entwickelt, die die Detektion von minimal 200 μM Chlorid erlaubten. Das bei der Umsetzung von Monochloressigsäure durch den Dehalogenase-exprimierenden *E.-coli*-Klon abgespaltene Chlorid konnte in beiden Medien detektiert werden. Beide Medien erwiesen sich somit für den Nachweis dehalogenierender Aktivität direkt im Kulturüberstand als geeignet, wobei die Sensitivität der Messung in LB II aufgrund seiner geringeren Konzentration gegenüber LB I erhöht war. Das verringerte Nährstoffangebot von LB II hatte

andererseits aber ein verschlechtertes Wachstum der Zellen zur Folge: Die nach 24-stündiger Kultivierung erreichte optische Dichte lag lediglich bei ca. 30 - 40 % des Wertes von LB I (nicht gezeigt). Die Wahl des Mediums stellt somit immer einen Kompromiss zwischen Zell- bzw. Enzymmenge und Empfindlichkeit der Messung dar.

Des Weiteren zeigte es sich, dass das während des Wachstums zugesetzte halogenierte Substrat auf Zellen ohne Dehalogenase inhibierend bzw. letal wirkte (nicht gezeigt). Dieser toxische Effekt vieler 2-Halogenalkanoate ist seit langem bekannt (Slater *et al.*, 1997). Die inhibierende Wirkung wird durch die aktive Expression eines dehalogenierenden Enzyms wieder aufgehoben. Beim Screening könnte diese Tatsache dazu genutzt werden, schon während der Anzucht auf solche Klone zu selektieren, die in der Lage sind, das halogenierte Substrat zu verwerten. Ist eine derartige Selektion nicht erwünscht, darf den Klonen das halogenierte Substrat erst nach Abschluss ihrer Wachstumsphase zur Umsetzung zugegeben und die Zellen erst nach weiterer Inkubation auf dehalogenierende Kandidaten durchmustert werden.

Die Verwendung von ganzen Zellen bei einem Screeningverfahren setzt voraus, dass die verwendeten Substrate ins Zellinnere gelangen und die nachzuweisenden Umsetzungsprodukte wieder nach außen. Ist diese Voraussetzung nicht gegeben, muss mit Zellextrakten gearbeitet werden. Für diesen Zweck wurde ein Verfahren etabliert, das den Aufschluss der Zellen und die direkt anschließende Umsetzung und Messung im Zellextrakt erlaubt. Dabei war zu berücksichtigen, dass die Methode einfach, billig und schnell durchzuführen ist, die vollständige Abtötung aller Zellen gewährleistet sowie die Detektion geringer Substratumsätze ermöglicht.

Biologische und chemische Zellaufschlussverfahren haben im Gegensatz zu physikalisch-mechanischen den Vorteil, dass sie Zellinhaltsstoffe schonend freisetzen. Dem stehen die hohen Kosten sowie der relativ hohe Arbeits- und Zeitaufwand gegenüber (Vitzthum, 2000). Zur automatisierungsgerechten Desintegration flüssiger Proben mit Hilfe physikalisch-mechanischer Verfahren wie z. B. gepulster elektrischer Felder liegen grundlegende Untersuchungen vor (Vitzthum, 2000). Neben der Verringerung der Kosten für teure Chemikalien hätten diese auch den Vorteil der Parallelisierbarkeit und würden dadurch einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Da solche Verfahren aber noch nicht in automatisierter Form zur Verfügung stehen, wurde ein enzymatischer Aufschluss mit Lysozym optimiert. Bei der Wahl des Aufschlusspuffers musste berücksichtigt werden, dass sowohl der Aufschluss als auch die nachfolgende Umsetzung und Messung im selben Puffer stattfinden sollten. 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 erwies sich für beide Ansprüche als geeignet. Da der Puffer möglichst chloridfrei sein sollte, wurde sein pH-Wert mit H₂SO₄ eingestellt. Die vollständige Abtötung aller Zellen, die eine wichtige Voraussetzung für ein

mögliches Screening unter Nicht-S2-Bedingungen darstellte, wurde durch Zugabe von Antibiotika erreicht.

Die beschriebenen Verfahren stellen die experimentelle Grundlage für ein effizientes Screening dar. Mit der Weiterentwicklung des vorhandenen Halogenidsensors zur automatisierten und parallelisierten Halogenid-Screening-Anlage wurden die Möglichkeiten der Suche nach industriell relevanten Dehalogenasen auch auf gerätetechnischer Ebene entscheidend verbessert.

Durch die 4fach-Parallelisierung und Beschleunigung des Messvorgangs in Verbindung mit den neuentwickelten Sensoreinheiten ist nun ein sensibles und schnelles HTP-Screening für Dehalogenierungsreaktionen mit hohem Probendurchsatz möglich. Die vollautomatische Steuerung des gesamten Messprozesses erfolgt über ein zentrales Steuerprogramm, welches auch die Erfassung, Verarbeitung und Auswertung von großen Datenmengen erheblich erleichtert – im Gegensatz zur bisherigen Aufzeichnung der Signale mit Hilfe eines Schreibers und ihrer manuellen Auswertung. Aufgrund ihres modularen Aufbaus ist die Anlage in unterschiedliche automatisierte Geräteumgebungen integrierbar.

Die neu entwickelten Messelektroden sowie die Referenzelektroden sind aufgrund ihrer kompakten und stabilen Bauweise sehr viel einfacher zu handhaben als ihre Vorgängermodelle. Ihre Messsignale wiesen einen steilen Anstieg und Abfall auf und erreichten auch nach hohen Chloridkonzentrationen schnell die stabile Grundlinie. Die untere Nachweisgrenze lag bei 50 μM .

Die Überprüfung der Funktion der Anlage unter realen Screening-Bedingungen erfolgte anhand der Untersuchung eines Teils der Boden-DNA-Genbank auf Dehalogenase-Aktivität. Dabei erwies sich die Anlage für die Identifikation Dehalogenase-aktiver Klone als geeignet.

Durch die Anpassung des Gerätes an das 384er-Mikrotiterplattenformat könnte in Zukunft die Zahl der untersuchten Klone pro Zeiteinheit noch weiter gesteigert werden. Eine Entwicklung von Sensoreinheiten für andere Halide wie z. B. Bromid oder Iodid würde die erweiterte Suche nach dehalogenierenden Enzymen mit anderer Spezifität ermöglichen.

Im Vergleich zum pH-Indikator-Agarplatten-Assay ist das elektrochemische Screening von Genbanken mit der Halogenid-Screening-Anlage zwar aufwändiger, da die Genbank für diese Methode zuerst in Mikrotiterplatten vereinzelt werden muss und erst anschließend nach erneuter Kultivierung und eventuell durchgeführtem Zellaufschluss eine Umsetzung des Substrats erfolgen kann. Andererseits können auf diese Weise aber bereits bestehende Genbanken einfach dupliziert und anschließend mit Hilfe dieses automatisierten Verfahrens auf eine Dehalogenase-Aktivität hin untersucht werden. Bei Verwendung eines

membrangängigen Substrats ist dabei ein Zellaufschluss nicht erforderlich, so dass die Detektion des freigesetzten Chlorids auch nach Umsetzung mit ganzen Zellen direkt im Kulturüberstand erfolgen kann. Zudem kann die Anlage in eine Roboterstraße oder ähnliche automatisierte Abläufe integriert werden.

Es steht jedoch außer Frage, dass mit Agarplatten-Assays in kurzer Zeit eine viel größere Zahl von Klonen durchmustert werden kann. In den letzten Jahren haben digitale Bildverarbeitungssysteme dabei eine weitere Steigerung des Durchsatzes sowie eine quantitative Signalverarbeitung ermöglicht (Olsen *et al.*, 2000).

Die genannten Vorzüge von Mikrotiterplatten können auch beim Screening mit pH-Indikatoren genutzt werden, wie die Detektion von Dehalogenierungen mit Hilfe von Bromthymolblau bzw. Phenolrot zeigte. Einen entscheidenden Vorteil gegenüber dieser Art des Screenings mit pH-Indikatoren stellt allerdings die höhere Sensitivität der elektrochemischen Methode dar. Sie ist deshalb für eine exakte Bestimmung der Aktivität besser geeignet.

Generell erfordert jede Entwicklung von Screening-Strategien für neue Enzymaktivitäten die Abwägung der aufgezeigten Vor- und Nachteile der verschiedenen Screeningmethoden. Im Rahmen einer hierarchischen Vorgehensweise können die jeweiligen Vorzüge beider Methoden genutzt werden. Dabei folgen verschiedene Testsysteme in der Weise aufeinander, dass auf jeder Stufe die Zahl der zu untersuchenden Klone reduziert wird (Demirjian *et al.*, 1999). Am Anfang stehen dabei einfache qualitative Verfahren, die den Großteil der negativen Kandidaten aussondern. Für die Suche nach Dehalogenasen steht mit dem pH-Indikator-Agarplatten-Assay eine solche einfache Methode zur Verfügung. Anschließend werden mit aufwändigeren, aber semi-quantitativen Nachweissystemen nur diejenigen Klone genauer untersucht, die in der ersten Stufe als potentielle Kandidaten identifiziert wurden. Sowohl die automatisierte Halogenid-Screening-Anlage als auch der pH-MTP-Assay können auf dieser Stufe für ein Screening nach Dehalogenasen eingesetzt werden. Für eine exakte Charakterisierung einzelner Enzyme bezüglich ihrer Aktivität gegenüber dem Zielsubstrat können im letzten Schritt quantitative Verfahren wie z. B. HPLC, Gaschromatographie oder spezifische spektrophotometrische Methoden eingesetzt werden. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität stellt die elektrochemische Chloriddetektion auch an diesem Punkt das Mittel der Wahl dar.

5.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden bilden die Basis für eine Nutzbarmachung des Metagenoms für biotechnologische Innovationen. Einige Anknüpfungspunkte zu weiterführenden Arbeiten wurden bereits angesprochen. Zukünftige Aspekte der Metagenom-Klonierung sollen im Folgenden kurz aufgezeigt werden.

Grundlegend für die Etablierung neuer biotechnologischer Prozesse ist die Verfügbarkeit eines geeigneten Biokatalysators. Mit der Konstruktion von Genbanken aus Umwelt-DNA steht ein adäquates Mittel für die Bereitstellung eines großen Reservoirs potentieller Enzym-Kandidaten aus verschiedensten Quellen zur Verfügung. Um dieses nicht nur auf die bereits genannten, sondern auch auf zahlreiche weitere Zielaktivitäten hin spezifisch durchsuchen zu können, ist die Entwicklung neuer, sensitiver Nachweisverfahren von großer Bedeutung. Konstruktion, Lagerung und Screening einer Genbank, die das gesamte Metagenom eines Habitats repräsentieren soll, stellen aufgrund ihrer beträchtlichen Größe eine besondere technologische und logistische Herausforderung dar. Automatisierung und Parallelisierung der einzelnen Teilschritte des Screening-Verfahrens, von der Vereinzelnung der Klone bis hin zu ihrer Durchmusterung, sind daher wichtige Faktoren für die Steigerung der Effizienz und damit der Ausbeute der Methode.

Über die Identifizierung neuer biotechnologisch interessanter Enzymaktivitäten hinaus kann die metabolische Diversität der unkultivierbaren Mikroorganismen auch als Quelle für neue natürliche Substanzen wie beispielsweise Antibiotika genutzt werden. Aufgrund seiner bekannten Genetik sowie der Verfügbarkeit molekularbiologischer Werkzeuge wurde für beide Anwendungsbereiche bisher vorrangig *E. coli* als Expressionswirt eingesetzt. Eine Ausweitung auf andere Bakteriengattungen mit unterschiedlichen Expressionseigenschaften wie z. B. *Streptomyces* oder *Pseudomonas* könnte die Entdeckung auch solcher Gene ermöglichen, deren Expression in *E. coli* bisher aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften erschwert oder nicht möglich war. Für eine effektive Nutzung solcher Organismen als Expressionswirte ist die Verbesserung der Stammeigenschaften beispielsweise bezüglich des Wachstumsverhaltens, der Transformierbarkeit oder störender Hintergrundaktivitäten erforderlich. Ebenso sollten geeignete Expressionsvektoren entwickelt oder optimiert werden. Die Vorteile eines Vektorkonstrukts mit zwei Promotoren wurden bereits anhand von pJOE930 aufgezeigt. Signalsequenzen könnten eine Ausschleusung des gebildeten Genproduktes aus der Zelle und somit auch die Verwendung von Substraten, die nicht in die Zelle gelangen können, ermöglichen. Mit Hilfe neuer *Shuttle*-Vektoren könnte eine einzige Genbank in verschiedene Wirtsorganismen übertragen, deren unterschiedliche Expressionseigenschaften genutzt und damit die Wahrscheinlichkeit auf die Entdeckung neuer Aktivitäten oder Substanzen

erhöht werden. Für die erfolgreiche Expression eukaryotischer DNA ist die Verwendung von Expressionssystemen basierend auf Hefe als Wirtsorganismus denkbar.

Auch für den Fall, dass keines der durch Expressionsscreening des Metagenoms aufgespurten Enzyme den Erfordernissen einer industriellen Anwendung genügt, wird durch diese Methode eine große Anzahl verschiedener Enzymvarianten zur Verfügung gestellt, deren Eigenschaften mit Hilfe molekularbiologischer Methoden optimiert und an die gegebenen Bedingungen angepasst werden können. So ermöglichen schrittweise Mutationen einzelner Aminosäuren Einblicke in die wechselseitige Abhängigkeit von Struktur und Funktion, die für das rationale Design verbesserter Enzyme genutzt werden können. Mittels der Kombination von Fragmenten verwandter Gene kann die natürlich vorkommende Diversität weiter vervielfacht werden.

Schließlich können aus der Vielzahl identifizierter neuer Sequenzen mit Hilfe phylogenetischer Analysemethoden Stammbäume erstellt werden, die die evolutionäre Verwandtschaft der einzelnen Mitglieder bzw. verschiedener Untergruppen innerhalb einer Enzymklasse veranschaulichen. Durch Vergleich der Stammbäume verschiedener Standorte lassen sich Rückschlüsse auf das natürliche Vorkommen bestimmter Enzymfunktionen und ihre Entstehung im Hinblick auf Anpassung an selektive Umwelteinflüsse ziehen. Die Gegenüberstellung des Genpools aus kultivierten Spezies mit dem Genpool des Metagenoms kann bisherige Erkenntnisse über die Beschränkung einer enzymatischen Aktivität auf bestimmte Bakterienarten korrigieren und ein repräsentativeres Bild bezüglich ihrer Verbreitung schaffen. Die phylogenetische Klassifizierung der Enzyme kann auch mit ihrer funktionellen Charakterisierung korreliert werden, um Beziehungen zwischen Sequenz und Funktion aufzudecken. Somit sind metagenomische Banken nicht nur hinsichtlich der angewandten Nutzung ihres metabolischen Potentials für industrielle Zwecke von großer Bedeutung. Sie bieten darüber hinaus auch die Möglichkeit, den evolutionären Zusammenhang zwischen Proteinstruktur und katalytischer Spezifität aufzuklären.

6 Anhang

Die folgenden Tabellen stellen die Ergebnisse der PEDANT-Analysen der rekombinanten Klone dar, die mit verschiedenen Screeningverfahren identifiziert wurden und deren Insert anschließend sequenziert wurde (lipolytische Enzyme, eine Phosphatase, Dehalogenasen, andere Enzyme). Dabei ist jeweils derjenige offene Leserahmen angegeben, der aufgrund der Analyseergebnisse am wahrscheinlichsten für die katalytische Aktivität relevant ist. Angegeben sind jeweils neben dessen allgemeinen Eigenschaften wie Position innerhalb der Gesamt-Nukleotidsequenz des Inserts und GC-Gehalt auch die relevanten Ergebnisse der Vorhersagen zur möglichen Proteinfunktion des korrespondierenden Genprodukts; die Daten zur strukturellen Kategorisierung wurden hingegen nicht berücksichtigt. Neben der am stärksten homologen Sequenz, die auch im Proteinreport von PEDANT angegeben ist, wurden weitere Treffer der BLASTP-Homologiesuche ergänzt.

Die Nukleotidsequenzen der Inserts wurden jeweils unter dem angegebenen Zugangs-Code (*Accession number*) bei der Nukleotidsequenz-Datenbank *GenBank* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA) (Benson *et al.*, 2004) hinterlegt.

Tabelle 20: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL01. Angaben zum Insert: Länge in Nukleotiden, GC-Gehalt in %, *accession number* (*GenBank*). Angaben zum offenen Leserahmen (*orf*): *orf*: Bezeichnung; AS: Länge des korrespondierenden *orf*-Genprodukts in Aminosäuren; Pos.: Nukleotid-Position des *orfs* innerhalb der Gesamtsequenz des Inserts; GC [%]: GC-Gehalt in %; Beschreibung: Vorhersage zur möglichen Proteinfunktion, z. B. ähnliches Protein (BLAST), Zuordnung zu Proteinfamilien (COGs, Blocks, PROSITE, Pfam, PIR-Superfamilie). Weitere Informationen zu BLAST-Treffern: Organismus; Ident./Ähnl. [%]: Identität bzw. Ähnlichkeit in %; R. id. AS: Region identischer Aminosäuren; Score.

KL01								
Insert: 4221 bp, 63 % GC, AY687458								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf1.1	367	1245-142	63,4	BLAST: PIR:E82643 Esterase XF1743	Xylella fastidiosa	39 56	322	238
				BLAST: PIR:S74931 Esterase sll0644	Synechocystis sp.	38 56	321	229
				BLAST: TREMBL:Q44087 Esterase Precursor	Acinetobacter lwoffii RAG-1	28 48	225	108
				COG0657 Esterase/Lipase				
				BLOCKS: IPB002168A Lipolytic enzymes IPB002168B Lipolytic enzymes				
				Automatic derived PIR superfamilies: PIR:D70900 probable lipolytic protein ybaC (SF006015)				
orf1.2	427	2881-1598	63,6	BLAST: PIR:B75297 Dipeptidylpeptidase IV-related protein	Deinococcus radiodurans	46 60	297	286
				COG1073 alpha/beta hydrolases COG1506 Dipeptidyl aminopeptidases/ acylaminoacyl-peptidases COG0596 Predicted hydrolases or acyltransferases COG2267 Lysophospholipase				
				BLOCKS: IPB000734 Lipase				
				Automatic derived PIR superfamilies: PIR:S66261 dipeptidyl-peptidase IV (SF001125)				
				Automatically derived EC numbers: PIR:JC5142: 3.4.14.11 X-Pro dipeptidyl-peptidase PIR:E70025: 3.4.19.1 Acylaminoacyl-peptidase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:JC5142 dipeptidylpeptide hydrolase PIR:E70025 hydrolase PIR:E70025 omega peptidase				

Tabelle 21: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL02 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL02								
Insert: 3305 bp, 58 % GC, AY687459								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf2	333	1283-282	58,3	BLAST: PIR:D82761 Lipase/Esterase XF0781	Xylella fastidiosa	30 43	294	105
				BLAST: PIR:S31625 Glycerophospholipid-cholesterol Acyltransferase	Aeromonas salmonicida	29 44	232	91
				BLAST: PIR:XXFOGA Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase (EC 2.3.1.43) precursor = GCAT_AERHY (P10480)	Aeromonas hydrophila	27 40	305	91
				BLAST: PIR:H82485 thermolabile hemolysin VCA0218	Vibrio cholerae	24 40	284	74
				BLAST: PIR:A53888 Thermolabile hemolysin (EC 3.1.1.-) precursor = HLT_VIBPA (Q99289)	Vibrio parahaemolyticus	28 46	160	64
				BLAST: PIR:G35115 hypothetical protein = YTRP_PSEPU (P40604)	Pseudomonas putida	26 37	294	56
				BLAST: PIR:A47081 triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) = LIP1_PHOLU (P40601)	Photobacterium luminescens	29 47	171	52
				BLAST: PIR:S21961 proline-rich protein APG = APG_ARATH (P40602)	Arabidopsis thaliana	23 36	322	47
				COG3240 Phospholipase/lecithinase/hemolysin				
				PFAM domains: PF00657 Lipase/Acylhydrolase with GDSL				
				BLOCKS: IPB001087A GDSL lipolytic enzyme				
				PROSITE motifs: LIPASE_GDSL_SER (PS01098)				
				Automatic derived PIR superfamilies: PIR:S31625 Phosphatidylcholin-sterol O-acyltransferase (SF000421)				
				Automatically derived EC numbers: PIR:XXFOGA 2.3.1.43 Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase PIR:A47081 3.1.1.3 Triacylglycerol lipase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:XXFOGA acyltransferase PIR:XXFOGA carboxylic ester hydrolase PIR:A53888 hemolysis				

Tabelle 22: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL04 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL04								
Insert: 2926 bp, 58 % GC, AY687460								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf4	284	758-1612	59,9	BLAST: PIR:JC5087 tannase precursor (EC 3.1.1.20)	Aspergillus oryzae	24 39	166	50

Tabelle 23: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL05 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL05								
Insert: 3425 bp, 62 % GC, AY687461								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf5	415	3387-2140	60,7	BLAST: PIR:B87427 hypothetical protein CC1433	Caulobacter crescentus	30 45	337	120
				BLAST: PIR:G87332 hypothetical protein CC0674	Caulobacter crescentus	25 43	262	75
				BLOCKS: IPB000734 Lipase				
				PROSITE motifs: SRP54 (PS00300)				

Tabelle 24: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL06 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL06								
Insert: 3207 bp, 59 % GC, AY687462								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf6	418	52-1308	59,3	BLAST: PIR:G83495 hypothetical protein PA1203	Pseudomonas aeruginosa	47 62	119	109
				BLAST: PIR:D87620 hypothetical protein CC2998	Caulobacter crescentus	40 58	109	82
				BLAST: TREMBL:Q9FC51 hypothetical protein SCO7135	Streptomyces coelicolor	37 59	113	77
				BLAST: PIR:T48550 probable esterase-like protein	Arabidopsis thaliana	23 35	232	52
				BLAST: PIR:B84578 probable esterase	Arabidopsis thaliana	23 38	238	51
				COG1073 Hydrolases of the alpha/beta superfamily COG1764 OsmC: Predicted redox protein COG1765 Predicted redox protein				
				BLOCKS: IPB000734 Lipase				

Tabelle 25: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL07 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL07								
Insert: 3026 bp, 68 % GC, AY687463								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf7	508	1754-228	69,0	BLAST: PIR:B70573 hypothetical protein Rv2627c	Mycobacterium tuberculosis	37 50	361	239
				BLAST: PIR:C70837 hypothetical protein Rv0293c	Mycobacterium tuberculosis	30 47	280	123

Tabelle 26: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL09 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL09								
Insert: 3101 bp, 65 % GC, AY687464								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf9	442	397-1725	65,2	BLAST: TREMBL:Q82U14 Hypothetical protein	Nitrosomonas europaea	30 42	181	63
				BLAST: PIR:F69459 probable vtpJ-therm 1 (Gen AF1679)	Archaeoglobus fulgidus	24 37	384	60
				BLAST: PIR: H69351 probable vtpJ-therm 2 (Gen AF0816)	Archaeoglobus fulgidus	29 42	196	57
				BLAST: TREMBL:Q8S0L8 putative pectinacylesterase	Oryza sativa	30 45	149	49
				BLAST: TREMBL:Q84JS1 putative pectinacylesterase	Arabidopsis thaliana	27 45	147	48

Tabelle 27: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL10 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL10								
Insert: 3177 bp, 61 % GC, AY687465								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf10.1	256	378-1148	60,7	BLAST: TREMBL:Q9L3R2 Hydrolase	Rhizobium leguminosarum	43 57	248	203
				BLAST: PIR:A44856 haloacetate dehalogenase H-1 (EC 3.8.1.3)	Moraxella sp. B	35 50	120	71
				BLAST: PIR:S59929 bromide peroxidase BPO2 (EC 1.11.1.-)	Streptomyces aureofaciens	27 41	276	71
				BLAST: SWISSPROT:THCF_RHOER Non-heme haloperoxidase (EC 1.11.1.-)	Rhodococcus erythropolis	26 41	276	66
				BLAST: SWISSPROT:ESTE_PSEFL Arylesterase (EC 3.1.1.2)	Pseudomonas fluorescens	25 41	254	65
				COG0596 Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)				
				BLOCKS: PR00412B Epoxide hydrolase signature				
				Automatically derived PIR superfamilies: PIR:S59929 peroxidase PIR:S18245 tropinesterase				
				Automatically derived EC numbers: PIR:A44856 3.8.1.3 Haloacetate dehalogenase PIR:A47503 3.3.2.3 Epoxide hydrolase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:A44856 hydrolase PIR:S59929 oxidoreductase PIR:A47503 ether hydrolase				
orf10.2	293	1145-2026	63,9	BLAST: PIR:F70567 probable bpoA protein	Mycobacterium tuberculosis	42 54	259	194
				COG1075 Predicted acetyltransferases and hydrolases with the alpha/beta hydrolase fold COG0596 Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)				
				PFAM domains: PF00561 alpha/beta hydrolase fold				

Tabelle 28: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL11, *orf11.1* (Erklärung s. Tabelle 20)

KL11								
Insert: 3423 bp, 64 % GC, AY687466								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf11.1	468	3275-1869	67,0	BLAST: PIR:S05311 indoleacetamide hydrolase = HYI2_BRAJA (P19922)	Bradyrhizobium japonicum	46 60	376	327
				BLAST: SPTREMBL:Q98C06 probable amidase	Mesorhizobium loti	29 43	462	180
				BLAST: PIR:AB2530 amidase	Anabaena/Nostoc sp. PCC 7120	27 42	482	160
				BLAST: SPTREMBL:Q9F6D0 enantiomer selective amidase	Streptomyces sp. R1128	26 42	478	156
				BLAST: PIR:T35815 probable Glu-tRNA(Gln) amidotransferase chain A	Streptomyces coelicolor	27 41	491	153
				BLAST: SPTREMBL:Q9ZHK8 nicotinamidase/pyrazinamidase	Mycobacterium smegmatis	27 43	481	152
				BLAST: PIR:B44761 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase (EC 3.5.2.12) precursor	Flavobacterium sp. (strain KI72)	25 40	493	131
				COG0154 Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransferase A subunit and related amidases				
				BLOCKS: IPB000120 Amidase				
				Automatically derived PIR superfamilies: PIR:S05311 indoleacetamide hydrolase (SF001329: indoleacetamide hydrolase)				
				Automatically derived EC numbers: PIR:B44761 3.5.2.12 6-Aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:B44761 hydrolase				

Tabelle 29: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL11, *orf11.2* (Erklärung s. Tabelle 20)

KL11								
Insert: 3423 bp, 64 % GC, AY687466								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./ Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf11.2	256	207-977	62,7	BLAST: PIR:A69252 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase Hbd1	Archaeoglobus fulgidus	31 52	218	118
				BLAST: PIR:D70893 enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17) EchA8	Mycobacterium tuberculosis (strain H37RV)	30 48	255	114
				BLAST: PIR:T47261 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (EC 4.2.1.55) Crt [validated]	Clostridium acetobutylicum	29 51	251	113
				BLAST: PIR:C69304 probable enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17) Fad-1	Archaeoglobus fulgidus	31 50	233	106
				COG1024 Enoyl-CoA hydratase / carnithine racemase				
				PFAM domains: PF00378 Enoyl-CoA hydratase / isomerase				
				BLOCKS: IPB001753B, IPB001753C, IPB001753D: Enoyl-CoA hydratase / isomerase				
				Automatically derived PIR superfamilies: PIR:A69252 probable 3-hydroxyacyl- CoA dehydrogenase (3-hydroxyacyl- CoA dehydrogenase homology, enoyl-CoA hydratase homology) (SF006408) PIR:D70893 naphthoate synthase (SF001406)				
				Automatically derived EC numbers: PIR:D70893 4.2.1.17 Enoyl-CoA hydratase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:D70893 carbon-oxygen lyase PIR:D70893 hydro-lyase PIR:C69304 fatty acid beta-oxidation				

Tabelle 30: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL12 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL12								
Insert: 5215 bp, 67 % GC, AY687467								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf12	298	4883-3987	67,9	BLAST: PIR:D87401 hypothetical protein CC1226	Caulobacter crescentus	32 45	298	136
				BLAST: PIR:H87535 hypothetical protein CC2313	Caulobacter crescentus	29 40	330	121
				BLAST: PIR:S16567 beta-1,4-D-xylanase	Butyrivibrio fibrisolvens	24 36	256	54
				BLAST: PIR:B69680 para-nitrobenzyl esterase pnba (EC 3.1.1.-)	Bacillus subtilis	27 38	143	39,9
				Automatically derived PIR superfamilies: PIR:S16567 Streptomyces endo-1,4-beta-xylanase A				
				BLOCKS: IPB002168C Lipolytic enzymes				

Tabelle 31: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL13 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL13								
Insert: 3757 bp, 59 % GC, AY687468								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf13	337	3373-2360	59,6	BLAST: PIR:B83579 hypothetical protein PA0543	Pseudomonas aeruginosa (strain PAO1)	33 50	168	85
				BLAST: PIR:C70982 probable lpqC protein	Mycobacterium tuberculosis (strain H37RV)	28 42	285	81
				BLAST: PIR:H70825 probable lpqP protein	Mycobacterium tuberculosis (strain H37RV)	31 48	164	80
				BLAST: PIR:D86998 probable secreted hydrolase	Mycobacterium leprae	27 45	211	77
				BLAST: TREMBL:O82950 polyhydroxybutyrate depolymerase	Pseudomonas stutzeri	27 43	159	51
				BLAST: PIR:S36781 esterase D	Pseudomonas fluorescens	24 38	223	45
				BLOCKS: PF00756 Putative esterase				

Tabelle 32: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL15 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL15								
Insert: 5533 bp, 52 % GC, AY687469								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf15	219	2427-3086	59,6	BLAST: TREMBL:Q8PPR6 Carboxylesterase (Gen XAC0619)	Xanthomonas axonopodis	45 61	215	196
				BLAST: TREMBL:Q8P533 Carboxylesterase (Gen XCC3514)	Xanthomonas campestris	44 60	215	194
				BLAST: PIR:H82658 Carboxylesterase XF1624	Xylella fastidiosa	42 61	215	184
				BLAST: PIR:A83163 probable Carboxylesterase PA3859	Pseudomonas aeruginosa	44 57	207	173
				BLAST: PIR:JU0277 Carboxylesterase (EC 3.1.1.1), estB = EST2_PSEFL (Q53547)	Pseudomonas fluorescens	42 54	211	164
				BLAST: PIR:JQ0885 Esterase A (EC 3.1.1.-), estA = EST1_PSEFL (Q51758)	Pseudomonas fluorescens	41 55	211	161
				COG0400 Predicted esterase COG1073 Hydrolases of the alpha/beta superfamily COG0627 Predicted esterase COG1506 Dipeptidyl aminopeptidases/acylaminoacyl-peptidases COG0412 Dienelactone hydrolase and related enzyme				
				Automatically derived EC numbers: PIR:JU0277 Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:JU0277 carboxylic ester hydrolase PIR:JU0277 hydrolase				

Tabelle 33: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL16 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL16								
Insert: 3493 bp, 59 % GC, AY687470								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./ Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf16	398	2900-1704	59,5	BLAST: TREMBL:Q82U14 Hypothetical protein	Nitrosomonas europaea	30 44	184	70
				BLAST: PIR:F69459 probable vtpJ-therm 1 (Gen AF1679)	Archaeoglobus fulgidus	26 38	344	68
				BLAST: PIR: H69351 probable vtpJ-therm 2 (Gen AF0816)	Archaeoglobus fulgidus	25 38	331	67
				BLAST: PIR:S68805 pectin acetylerase (EC 3.1.1.-) precursor	Vigna radiata	26 40	234	50
				BLAST: NP_851135.1 pectinacetylerase, putative	Arabidopsis thaliana	25 38	231	43
				Automatically derived PIR superfamilies: PIR:H69351 probable vtpJ-therm (SF004992)				
				BLOCKS: IPB002168C Lipolytic enzymes				

Tabelle 34: Sequenzanalyse des Tributyrin-aktiven Klons KL18 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL18								
Insert: 3626 bp, 59 % GC, AY687471								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./ Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf18	296	389-1279	61,7	BLAST: TREMBL:Q9KIU0 Esterase	Umwelt-DNA	47 61	298	267
				BLAST: PIR:C70614 Probable lipG Protein	Mycobacterium tuberculosis (strain H37RV)	44 58	289	229
				BLAST: PIR:E87146 probable Hydrolase, lipG	Mycobacterium leprae	42 56	296	225
				BLAST: TREMBL:Q57172 Esterase estB	Acinetobacter calcoaceticus ADP1	41 59	290	225
				BLAST: PIR:S57530 Carboxylesterase estB	Acinetobacter calcoaceticus BD413	41 59	290	225
				BLAST: PIR:D83197 probable Hydrolase PA3586	Pseudomonas aeruginosa (strain PAO1)	41 56	289	213
				BLAST: TREMBL:O73957 lipolytic enzyme	Sulfolobus acidocaldarius	28 44	276	82
				BLAST: PIR:S34609 Carboxylesterase (EC 3.1.1.1), est5	Pseudomonas sp. (strain KWI-56)	25 40	276	71
				COG0596 Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)				
				PFAM Domains: PF00561 alpha/beta hydrolase fold				
				BLOCKS: PF00756 Putative esterase IPB000734 Lipase				
				Automatically derived PIR superfamilies: PIR:S57530 carboxyl esterase (SF000875)				
				Automatically derived EC numbers: PIR:S34609 3.1.1.1 Carboxylesterase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:S34609 carboxylic ester hydrolase				

Tabelle 35: Sequenzanalyse des braun gefärbten Klons KL20 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL20								
Insert: 3173 bp, 59 % GC, AY691917								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./ Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf20	366	2776-1676	61,7	BLAST: PIR:S21209 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27 = HPPD_PSESP (P80064)	Pseudomonas sp.	77 86	352	577
				BLAST: PIR:F83537 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase PA0865	Pseudomonas aeruginosa (strain PAO1)	57 72	351	393
				BLAST: PIR:C82211 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase VC1344	Vibrio cholerae (strain N16961 serogroup O1)	55 69	367	377
				BLAST: PIR:D87563 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Caulobacter crescentus	51 68	351	358
				BLAST: SWISSPROT:VLLY_VIBVU Hemolysin Vllly	Vibrio vulnificus	54, 67	354	354
				BLAST: SWISSPROT:LLY_LEGPN 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27) (4HPPD) (HPD) (Legiolysin)	Legionella pneumophila	52, 66	350	330
				BLAST: PIR:JQ1388 MelA protein	Shewanella colwelliana	44, 63	349	298
				COG3185 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and related hemolysins				
				BLOCKS: PF01626A bis PF01626F 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase C terminal domain				
				Automatically derived EC numbers: SWISSPROT:HPPD_PIG 1.13.11.27 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase				

Tabelle 36: Sequenzanalyse des braun gefärbten Klons KL21 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL21								
Insert: 2509 bp, 62 % GC, , AY691916								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf21	351	1038-2093	60,5	BLAST: PIR:F83537 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase PA0865	Pseudomonas aeruginosa (strain PAO1)	58 72	348	407
				BLAST: PIR:C82211 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase VC1344	Vibrio cholerae (strain N16961 serogroup O1)	57 73	350	405
				BLAST: PIR:D87563 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Caulobacter crescentus	55 69	350	392
				BLAST: SWISSPROT:VLLY_VIBVU Hemolysin Vly	Vibrio vulnificus	55 70	350	389
				BLAST: PIR:S21209 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27 = HPPD_PSESP (P80064)	Pseudomonas sp.	52 72	353	385
				BLAST: SWISSPROT:LLY_LEGPN 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27) (4HPPD) (HPD) (Legiolysin)	Legionella pneumophila	53 70	351	374
				BLAST: PIR:JQ1388 MelA protein	Shewanella colwelliana	46 67	349	320
				COG3185 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and related hemolysins				
				BLOCKS: PF01626A bis PF01626F 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase C terminal domain				
				Automatically derived EC numbers: PIR:S32821 1.13.11.27 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase				

Tabelle 37: Sequenzanalyse des Phosphatase-aktiven Klons KL22 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL22								
Insert: 3643 bp, 41 % GC, AY691913								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./ Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf22	331	3208- 2213	42,0	BLAST: SPTREMBL:Q93TK1 non-specific acid phosphatase precursor (napE)	Sinorhizobium meliloti	61 76	291	393
				BLAST: PIR:C95377 NapD-like protein	Sinorhizobium meliloti (strain 1021)	61 76	291	393
				BLAST: SPTREMBL:O66011 non-specific acid phosphatase precursor (napD)	Sinorhizobium meliloti	57 76	282	362
				BLAST: TREMBL:Q8TMK8 non-specific acid phosphatase	Methanosarcina acetivorans	42 63	245	210
				BLAST: TREMBL:Q8PVS5 non-specific acid phosphatase	Methanosarcina mazei	37 53	292	163
				BLOCKS: PR00413A Haloacid dehalogenase/ epoxide hydrolase family signature				

Tabelle 38: Sequenzanalyse des Dehalogenase-aktiven Klons KL23 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL23								
Insert: 6122 bp, 63 % GC, AY660872								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf23	228	289-975	60,1	BLAST: SPTREMBL:Q985K5 putative 2-haloacid halidothiolase IVa	Mesorhizobium loti	47 60	222	197
				BLAST: PIR:A38452 2-haloacid dehalogenase I (DehCI) (EC 3.8.1.2) = HAD1_PSEUC (P24069)	Pseudomonas sp. (strain CBS3)	41 55	224	178
				BLAST: PIR:S29096 2-haloacid halidothiolase IVa (Hdl IVa) (EC 3.8.1.2) = HAD4_BURCE (Q51645)	Pseudomonas cepacia MBA4	39 57	202	162
				BLAST: SWISSPROT:HAD_PSEUY 2-haloalkanoic acid dehalogenase (L-DEX) (EC 3.8.1.2) (Q53464)	Pseudomonas sp. (strain YL)	40 55	205	153
				BLAST: PIR:A44830 L-2-haloalkanoic acid dehalogenase hadL = HADL_PSEPU (Q52087)	Pseudomonas putida AJ1	37, 53	216	146
				COG1011 Predicted hydrolases of the HAD superfamily COG0546 Predicted phosphatases COG0637 Predicted phosphatase/phosphohexomutase				
				PFAM Domains: PF00702 haloacid dehalogenase-like hydrolase				
				BLOCKS: PR00413A, D - G Haloacid dehalogenase/epoxide hydrolase family signature				
				Automatically derived EC numbers: PIR:A38452 3.8.1.2 2-Haloacid dehalogenase PIR:B44856 3.8.1.3 Haloacetate dehalogenase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:A38452 hydrolase				

Tabelle 39: Sequenzanalyse des Dehalogenase-aktiven Klons KL24 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL24								
Insert: 4298 bp, 62 % GC, AY660873								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf24	228	3891-3205	62,6	BLAST: PIR:S29096 2-haloacid halidohydrolase IVa (Hdl IVa) (EC 3.8.1.2) = HAD4_BURCE (Q51645)	Pseudomonas cepacia MBA4	50 70	219	224
				BLAST: PIR:A38452 2-haloacid dehalogenase I (DehCI) (EC 3.8.1.2) = HAD1_PSEUC (P24069)	Pseudomonas sp. (strain CBS3)	48 67	215	210
				BLAST: SWISSPROT:HAD_PSEUY 2-haloalkanoic acid dehalogenase (L-DEX) (EC 3.8.1.2) (Q53464)	Pseudomonas sp. (strain YL)	51 64	212	207
				BLAST: PIR:A44830 L-2-haloalkanoic acid dehalogenase hadL = HADL_PSEPU (Q52087)	Pseudomonas putida AJ1	45 59	215	185
				COG1011 Predicted hydrolases of the HAD superfamily COG0546 Predicted phosphatases COG0637 Predicted phosphatase/phosphohexomutase				
				PFAM Domains: PF00702 haloacid dehalogenase-like hydrolase				
				BLOCKS: PR00413A bis PR00413G Haloacid dehalogenase/epoxide hydrolase family signature				
				Automatically derived EC numbers: PIR:A38452 3.8.1.2 2-Haloacid dehalogenase PIR:B44856 3.8.1.3 Haloacetate dehalogenase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:A38452 hydrolase				

Tabelle 40: Sequenzanalyse des Dehalogenase-aktiven Klons KL25 (Erklärung s. Tabelle 20)

KL25								
Insert: 3240 bp, 64 % GC, AY660874								
orf	AS	Pos.	GC [%]	Beschreibung	Organismus	Ident./Ähnl. [%]	R. id. AS	Score
orf25	229	549-1238	64,2	BLAST: PIR:S29096 2-haloacid halidohydrolase IVa (Hdl IVa) (EC 3.8.1.2) = HAD4_BURCE (Q51645)	Pseudomonas cepacia MBA4	47 64	223	213
				BLAST: PIR:A38452 2-haloacid dehalogenase I (DehCI) (EC 3.8.1.2) = HAD1_PSEUC (P24069)	Pseudomonas sp. (strain CBS3)	46 63	222	207
				BLAST: SWISSPROT: HAD_PSEUY 2-haloalkanoic acid dehalogenase (L-DEX) (EC 3.8.1.2) (Q53464)	Pseudomonas sp. (strain YL)	46 61	198	182
				COG1011 Predicted hydrolases of the HAD superfamily COG0546 Predicted phosphatases				
				PFAM Domains: PF00702 haloacid dehalogenase-like hydrolase				
				BLOCKS: PR00413A, C - G Haloacid dehalogenase/epoxide hydrolase family signature				
				Automatically derived EC numbers: PIR:A38452 3.8.1.2 2-Haloacid dehalogenase PIR:B44856 3.8.1.3 Haloacetate dehalogenase				
				Automatically derived PIR keywords: PIR:A38452 hydrolase				

7 Literatur

- Altenbuchner, J., Viell, P. und Pelletier, I. (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol* **216**, 457-466
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402
- Amann, R. I., Krumholz, L. und Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**, 762-770
- Amann, R. I., Ludwig, W. und Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169
- Arnold, F. H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**, 253-257
- Arpigny, J. L. und Jaeger, K. E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**, 177-183
- Atlas, R. M. (1984) Diversity in microbial communities. *Adv Microb Ecol* **7**, 1-47
- Atlas, R. M., Horowitz, A., Krichevsky, M. und Bej, A. K. (1991) Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb Ecol* **22**, 249-256
- Attwood, T. K., Bradley, P., Flower, D. R., Gaulton, A., Maudling, N., Mitchell, A. L., Moulton, G., Nordle, A., Paine, K., Taylor, P., Uddin, A. und Zygouri, C. (2003) PRINTS and its automatic supplement, prePRINTS. *Nucleic Acids Res* **31**, 400-402
- Bachoon, D. S., Otero, E. und Hodson, R. E. (2001) Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization. *J Microbiol Methods* **47**, 73-82
- Bairoch, A. (1995) Unpublished observations. *PROSITE: PDOC00903*
- Bakken, L. R. (1985) Separation and purification of bacteria from soil. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1482-1487
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W. und Pace, N. R. (1994) Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1609-1613
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Ewinger, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M. und Sonnhammer, E. L. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **30**, 276-280
- Baumann, M. (2002) Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen für den industriellen Einsatz. Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. und Wheeler, D. L. (2004) GenBank: update. *Nucleic Acids Res* **32 Database issue**, D23-D26

- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. und Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147
- Bergmann, J. G. und Sanik, J. (1957) Determination of trace amounts of chlorine in naphta. *Anal Chem* **29**, 241-243
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-242
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474
- Blume, H.-P., Brümmer, G. W., Schwertmann, U., Horn, R., Kögel-Knabner, I., Stahr, K., Auerswald, K., Beyer, L., Hartmann, A., Litz, N., Scheinost, A., Stanjek, H., Welp, G. und Wilke, B.-M. (2002) Organische Substanz und Bodenbiologie, pp. 51-102 in: Lehrbuch der Bodenkunde (Scheffer, F. und Schachtschabel, P., eds.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M. C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M. J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., Pilbout, S. und Schneider, M. (2003) The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* **31**, 365-370
- Boel, E., Høge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L. und Fiil, N. P. (1988) *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids* **23**, 701-706
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Nienhuis, J. und Triplett, E. W. (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1935-1943
- Bornscheuer, U. T. (1999) Neue Strategien zum Einsatz von Lipasen und Esterasen in der organischen Synthese. Habilitation, Universität Stuttgart
- Bornscheuer, U. T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 73-81
- Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. J. (1999) Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Boshoff, H. I. und Mizrahi, V. (1998) Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **180**, 5809-5814
- Boynton, Z. L., Bennet, G. N. und Rudolph, F. B. (1996) Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **178**, 3015-3024

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L. und et al. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770
- Braid, M. D., Daniels, L. M. und Kitts, C. L. (2003) Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *J Microbiol Methods* **52**, 389-393
- Brenner, S. (1988) The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* **334**, 528-530
- Breton, C., Bordenave, M., Richard, L., Pernollet, J. C., Huet, J. C., Perez, S. und Goldberg, R. (1996) PCR cloning and expression analysis of a cDNA encoding a pectinacetylsterase from *Vigna radiata* L. *FEBS Lett* **388**, 139-142
- Bruce, K. D. (1997) Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4914-4919
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. und Heckelman, P. E. (eds.) (1989) Merck Index - An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals (11th edition). Merck u. Co. Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A.
- Bull, A. T., Goodfellow, M. und Slater, J. H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol* **46**, 219-252
- Calamia, J. und Manoil, C. (1990) *lac* permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4937-4941
- Chang, C. H., Schindler, J. F., Unkefer, C. J., Vanderberg, L. A., Brainard, J. R. und Terwilliger, T. C. (1999) In vivo screening of haloalkane dehalogenase mutants. *Bioorg Med Chem* **7**, 2175-2181
- Chatzinotas, A., Sandaa, R. A., Schonhuber, W., Amann, R., Daae, F. L., Torsvik, V., Zeyer, J. und Hahn, D. (1998) Analysis of broad-scale differences in microbial community composition of two pristine forest soils. *Syst Appl Microbiol* **21**, 579-587
- Clarke, L. und Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**, 91-99
- Clausen, I. G. (1997) Aspects in lipase screening. *J Mol Catal B: Enzymatic* **3**, 139-146
- Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. und Freeman, A. (2001) In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. *Trends Biotechnol* **19**, 507-510
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B. G. und et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544

- Copley, S. D. (1998) Microbial dehalogenases: enzymes recruited to convert xenobiotic substrates. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 613-617
- Cottrell, M. T., Moore, J. A. und Kirchman, D. L. (1999) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2553-2557
- Courtois, S., Cappellano, C. M., Ball, M., Francou, F. X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S. J., Hopke, J., Osburne, M. S., August, P. R., Nalin, R., Guerineau, M., Jeannin, P., Simonet, P. und Pernodet, J. L. (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* **69**, 49-55
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P. und Simonet, P. (2001) Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol* **3**, 431-439
- Dalboge, H. und Lange, L. (1998) Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts. *Trends Biotechnol* **16**, 265-272
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. und Pace, N. R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360-1363
- Demirjian, D. C., Shah, P. C. und Moris-Varas, F. (1999) Screening for novel enzymes. *Top Curr Chem* **200**, 1-29
- Deng, S., Elkins, J. G., Da, L. H., Botero, L. M. und McDermott, T. R. (2001) Cloning and characterization of a second acid phosphatase from *Sinorhizobium meliloti* strain 104A14. *Arch Microbiol* **176**, 255-263
- Denoya, C. D., Skinner, D. D. und Morgenstern, M. R. (1994) A *Streptomyces avermitilis* gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 5312-5319
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. und Streit, W. R. (2001) Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* **67**, 89-99
- Eschenfeldt, W. H., Stols, L., Rosenbaum, H., Khambatta, Z. S., Quate-Randall, E., Wu, S., Kilgore, D. C., Trent, J. D. und Donnelly, M. I. (2001) DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4206-4214
- Faegri, A., Torsvik, V. L. und Goksoyr, J. (1977) Bacterial and fungal activities in soil: Separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol Biochem* **9**, 105-112
- Feller, G., Thiry, M. und Gerday, C. (1991) Nucleotide sequence of the lipase gene *lip2* from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA Cell Biol.* **10**, 381-388
- Fetzner, S. (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 633-657

- Fetzner, S. und Lingens, F. (1994) Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev* **58**, 641-685
- Frazer, J. W., Balaban, D. J., Brand, H. R., Robinson, G. A. und Lanning, S. M. (1983) Determination with ion selective electrodes in the low-level, non-nernstian response region. *Anal Chem* **55**, 855-861
- Frey, J., Bagdasarian, M., Feiss, D., Franklin, F. C. und Deshusses, J. (1983) Stable cosmid vectors that enable the introduction of cloned fragments into a wide range of gram-negative bacteria. *Gene* **24**, 299-308
- Frishman, D., Albermann, K., Hani, J., Heumann, K., Metanomski, A., Zollner, A. und Mewes, H. W. (2001) Functional and structural genomics using PEDANT. *Bioinformatics* **17**, 44-57
- Frishman, D. und Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **23**, 566-579
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. und Phillips, G. B. (eds.) (1981) Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC
- Gilbert, E. J. (1993) Pseudomonas lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 634-645
- Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M. und Handelsman, J. (2002) Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4301-4306
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. und Field, K. G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., Plante, C., Pollard, J. W., Fan, M. Z., Hayes, M. A., Laursen, J., Hjorth, J. P., Hacker, R. R., Phillips, J. P. und Forsberg, C. W. (2001) Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* **19**, 741-745
- Guilbault, G. G. und Hieserman, J. (1969) Fluorometric substrate for sulfatase and lipase. *Anal Chem* **41**, 2006-2009
- Gundlach, G. und Muhlhausen, B. (1980) [Coupling of 1-naphthol with fast-red-TR. Studies on the optimization of a continuous determination of acid phosphatase, I. (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem* **18**, 603-610
- Hagan, C. E. und Warren, G. J. (1983) Viability of palindromic DNA is restored by deletions occurring at low but variable frequency in plasmids of *Escherichia coli*. *Gene* **24**, 317-326
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. und Goodman, R. M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**, R245-249

- Hartel, A., Banauch, D. und Helger, R. (1971) [A detection method for serum lipase (author's transl)]. *Z Klin Chem Klin Biochem* **9**, 396-397
- Hatamoto, O., Watarai, T., Kikuchi, M., Mizusawa, K. und Sekine, H. (1996) Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene* **175**, 215-221
- Henikoff, J. G., Greene, E. A., Pietrokovski, S. und Henikoff, S. (2000) Increased coverage of protein families with the blocks database servers. *Nucleic Acids Res* **28**, 228-230
- Henikoff, S. und Henikoff, J. G. (1994) Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19**, 97-107
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A. und Gottschalk, G. (1999) Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3901-3907
- Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G. und Daniel, R. (2000) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3113-3116
- Hespell, R. B. und O'Bryan-Shah, P. J. (1988) Esterase activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1917-1922
- Hill, K. E., Marchesi, J. R. und Weightman, A. J. (1999) Investigation of two evolutionarily unrelated halocarboxylic acid dehalogenase gene families. *J Bacteriol* **181**, 2535-2547
- Hilton, S., McCubbin, W. D., Kay, C. M. und Buckley, J. T. (1990) Purification and spectral study of a microbial fatty acyltransferase: activation by limited proteolysis. *Biochemistry* **29**, 9072-9078
- Hisano, T., Hata, Y., Fujii, T., Liu, J. Q., Kurihara, T., Esaki, N. und Soda, K. (1996) Crystal structure of L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. An alpha/beta hydrolase structure that is different from the alpha/beta hydrolase fold. *J Biol Chem* **271**, 20322-20330
- Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K. und Tiedje, J. M. (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **54**, 703-711
- Holloway, P., Trevors, J. T. und Lee, H. (1998) A colorimetric assay for detecting haloalkane dehalogenase activity. *J Microbiol Methods* **32**, 31-36
- Holt, S. J. und Withers, R. F. (1958) Studies in enzyme cytochemistry. V. An appraisal of indigogenic reactions for esterase localization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **148**, 520-532
- Hong, K. H., Jang, W. H., Choi, K. D. und Yoo, O. J. (1991) Characterization of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase: cloning and expression of the esterase gene in *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* **55**, 2839-2845
- Hunter-Cevera, J. C. (1998) The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol* **1**, 278-285

- Iwasaki, I., Utsumi, S., Hagino, K. und Ozawa, T. (1956) A new spectrophotometric method for the determination of small amounts of chloride using the mercuric thiocyanate method. *Bull Chem Soc Jpn* **29**, 860-864
- Jacks, T. J. und Kircher, H. W. (1967) Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Anal Biochem* **21**, 279-285
- Jacobsen, C. S. und Rasmussen, O. F. (1992) Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2458-2462
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. und Reetz, M. T. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**, 315-351
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. und Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63
- Jaeger, K. E. und Reetz, M. T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**, 396-403
- Jaeger, K. E. und Wohlfarth, S. (1993) Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung. *Bioengineering* **9**, 39-46
- Janes, L. E., Löwendahl, C. und Kazlauskas, R. J. (1998) Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: Identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem Eur J* **4**, 2324-2331
- Janssen, D. B., Oppentocht, J. E. und Poelarends, G. J. (2001) Microbial dehalogenation. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 254-258
- Janssen, D. B., Pries, F. und van der Ploeg, J. R. (1994) Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annu Rev Microbiol* **48**, 163-191
- Junge, W. (1984) 1.3 Lipases. 1.3.1 Pancreatic Lipase. 1.3.1.1 Titrimetric Method, pp. 15-25 in: *Enzymes 2: Esterases, Glycosidases, Lyases, Ligases* (3rd edition) (Bergmeyer, H. U. und Moss, D. W., eds.), *Methods of Enzymatic Analysis IV* (Bergmeyer, J. und Grassl, M., eds.) Verlag Chemie GmbH, Weinheim
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. und Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**, 331-338
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**, 205-213; 227-253
- Kauffmann, I. M. (2002) Erhöhung der mikrobiellen und molekularen Diversität von Carotinoiden. Dissertation, Universität Stuttgart

- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Choe, S., Yoo, O. J. und Suh, S. W. (1997) Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. *Structure* **5**, 1571-1584
- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Venter, J. C. und et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-370
- Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G. und Daniel, R. (2003a) Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3048-3060
- Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. und Daniel, R. (2003b) Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1408-1416
- Knippers, R., Philippsen, P., Schäfer, K. P. und Fanning, E. (1990) Molekulare Genetik (5. Auflage). Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Koonin, E. V. und Tatusov, R. L. (1994) Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J Mol Biol* **244**, 125-132
- Kurihara, T., Liu, J. Q., Nardi-Dei, V., Koshikawa, H., Esaki, N. und Soda, K. (1995) Comprehensive site-directed mutagenesis of L-2-halo acid dehalogenase to probe catalytic amino acid residues. *J Biochem (Tokyo)* **117**, 1317-1322
- Kuske, C. R., Barns, S. M. und Busch, J. D. (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3614-3621
- La Du, B. N. und Zannoni, V. G. (1963) Oxidation of homogentisic acid catalyzed by horseradish peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **67**, 281-287
- Lassen, S. F., Breinholt, J., Ostergaard, P. R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. und Fuglsang, C. C. (2001) Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4701-4707
- Lawrence, R. C., Fryer, T. F. und Reiter, B. (1967) Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* **213**, 1264-1265
- Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V. und Shimkets, L. J. (1995) Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1141-1143
- Leung, D. W., Chen, E. und Goeddel, D. V. (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1**, 11-15

- Li, Y. F., Hata, Y., Fujii, T., Hisano, T., Nishihara, M., Kurihara, T. und Esaki, N. (1998) Crystal structures of reaction intermediates of L-2-haloacid dehalogenase and implications for the reaction mechanism. *J Biol Chem* **273**, 15035-15044
- Liesack, W. und Stackebrandt, E. (1992) Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol* **174**, 5072-5078
- Lin, L. L. und Thomson, J. A. (1991) Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 73 kDa xylanase enzyme from the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Mol Gen Genet* **228**, 55-61
- Lindsey, J. C. und Leach, D. R. (1989) Slow replication of palindrome-containing DNA. *J Mol Biol* **206**, 779-782
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. und Eck, J. (2002) Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 572-577
- Lorenz, P. und Schleper, C. (2002) Metagenome—a challenging source of enzyme discovery. *J Mol Catal B: Enzymatic* **19-20**, 13-19
- MacNeil, I. A., Tiong, C. L., Minor, C., August, P. R., Grossman, T. H., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., Phillips, T., Narula, S., Sundaramoorthi, R., Tyler, A., Aldredge, T., Long, H., Gilman, M., Holt, D. und Osburne, M. S. (2001) Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 301-308
- Marrs, B., Delagrave, S. und Murphy, D. (1999) Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr Opin Microbiol* **2**, 241-245
- Marti, T., Hu, Z., Pohl, N. L., Shah, A. N. und Khosla, C. (2000) Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist. Insights into an unusual priming mechanism. *J Biol Chem* **275**, 33443-33448
- Marvanova, S., Nagata, Y., Wimmerova, M., Sykorova, J., Hynkova, K. und Damborsky, J. (2001) Biochemical characterization of broad-specificity enzymes using multivariate experimental design and a colorimetric microplate assay: characterization of the haloalkane dehalogenase mutants. *J Microbiol Methods* **44**, 149-157
- Mewes, H. W., Albermann, K., Heumann, K., Liebl, S. und Pfeiffer, F. (1997) MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Res* **25**, 28-30
- Michaelis, S., Inouye, H., Oliver, D. und Beckwith, J. (1983) Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **154**, 366-374
- Milcamps, A. und de Bruijn, F. J. (1999) Identification of a novel nutrient-deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* gene (*hmgA*) involved in the degradation of tyrosine. *Microbiology* **145 (Pt 4)**, 935-947
- Miller, C. A. (2000) Advances in enzyme discovery technology: capturing diversity. *Inform* **11**, 489-495

- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. und Ghiorse, W. C. (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4715-4724
- Mizuuchi, K., Mizuuchi, M. und Gellert, M. (1982) Cruciform structures in palindromic DNA are favored by DNA supercoiling. *J Mol Biol* **156**, 229-243
- Moré, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W. C. und Madsen, E. L. (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1572-1580
- Mörsberger, F. (1990) Verfahrenstechnische Aspekte der enzymatischen Dehalogenierung. Reinigung und Charakterisierung der in *Escherichia coli* Hb101 klonierten 2-Halogencarbonsäure-Dehalogenase II aus *Pseudomonas sp.* CBS3. Dissertation, Universität Hohenheim
- Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Barrell, D., Bateman, A., Binns, D., Biswas, M., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Copley, R. R., Courcelle, E., Das, U., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Griffiths-Jones, S., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lopez, R., Letunic, I., Lonsdale, D., Silventoinen, V., Orchard, S. E., Pagni, M., Peyruc, D., Ponting, C. P., Selengut, J. D., Servant, F., Sigrist, C. J., Vaughan, R. und Zdobnov, E. M. (2003) The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Res* **31**, 315-318
- Müller, H.-J. und Bruchhaus, I. (1997) Problematik der Isolierung genomischer DNA. *Biospektrum* **1/97**, 68-73
- Müller, R. und Lingens, F. (1986) Mikrobieller Abbau halogenierter Kohlenwasserstoffe: Ein Beitrag zur Lösung vieler Umweltprobleme? *Angew Chem* **98**, 778-787
- Müller, R. und Lingens, F. (1988) Der mikrobielle Abbau von chlorierten Kohlenwasserstoffen. *Das Gas- und Wasserfach/Wasser, Abwasser* **129, H1**, 55-60
- Murdiyatmo, U., Asmara, W., Tsang, J. S., Baines, A. J., Bull, A. T. und Hardman, D. J. (1992) Molecular biology of the 2-haloacid halidohydrolase IVa from *Pseudomonas cepacia* MBA4. *Biochem J* **284 (Pt 1)**, 87-93
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. und Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* **247**, 536-540
- Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**, 317-322
- Nardi-Dei, V., Kurihara, T., Okamura, T., Liu, J. Q., Koshikawa, H., Ozaki, H., Terashima, Y., Esaki, N. und Soda, K. (1994) Comparative studies of genes encoding thermostable L-2-halo acid dehalogenase from *Pseudomonas sp.* strain YL, other dehalogenases, and two related hypothetical proteins from *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3375-3380

- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Alley, M. R., Ohta, N., Maddock, J. R., Potocka, I., Nelson, W. C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N. D., Ely, B., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M. L., Haft, D. H., Kolonay, J. F., Smit, J., Craven, M. B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S. L., Venter, J. C., Shapiro, L., Fraser, C. M. und Eisen, J. (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4136-4141
- Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. und Frenken, L. G. (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* **331**, 123-128
- Oehme, F. (1991) Ionenselektive Elektroden: CHEMFETs - ISFETs - pH-FETs; Grundlagen, Bauformen und Anwendungen (2. erw. Auflage). ABC der Mess- und Analysentechnik (Oehme, F., ed.) Hüthig Buch Verlag GmbH, Heidelberg
- Ogram, A. (2000) Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biol Biochem* **32**, 1499-1504
- Ogram, A., Saylor, G. S. und Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* **7**, 57-66
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. und et al. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**, 197-211
- Olsen, M., Iverson, B. und Georgiou, G. (2000) High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 331-337
- Otto, M. K., Mörsberger, F., Müller, R., Lingens, F., Chmiel, H. und Kulbe, K. D. (1987) Simplified detection of biological halogenation and dehalogenation with a halide sensor, pp. 279-280 in: Biosensors International Workshop 1987 (Schmid, R. D., ed.), GBF monographs **10**, VCH Verlag, Weinheim
- Ovreas, L., Jensen, S., Daae, F. L. und Torsvik, V. (1998) Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2739-2742
- Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740
- Pandey, A., Szakacs, G., Socol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A. und Socol, V. T. (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour Technol* **77**, 203-214
- Paul, E. A. und Clark, F. E. (1996) Formation of soil organic matter, pp. 145-155 in: Soil Microbiology and Biochemistry (Paul, E. A. und Clark, F. E., eds.) Academic Press, London
- Pelletier, I. und Altenbuchner, J. (1995) A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* **141** (Pt 2), 459-468
- Phillips, T. M., Seech, A. G., Lee, H. und Trevors, J. T. (2001) Colorimetric assay for Lindane dechlorination by bacteria. *J Microbiol Methods* **47**, 181-188

- Porteous, L. A. und Armstrong, J. L. (1991) Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. *Curr Microbiol* **22**, 345-348
- Purdy, R. E. und Kolattukudy, P. E. (1973) Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani f. pisi*: isolation and some properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* **159**, 61-69
- Reetz, M. T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 145-150
- Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J. M., Robertson, D. E. und Miller, C. (2002) A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem* **277**, 26501-26507
- Ridder, I. S., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Janssen, D. B. und Dijkstra, B. W. (1997) Three-dimensional structure of L-2-haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 complexed with the substrate-analogue formate. *J Biol Chem* **272**, 33015-33022
- Ritz, K., Griffiths, B. S., Torsvik, V. L. und Hendriksen, N. B. (1997) Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. *FEMS Microbiol Lett* **149**, 151-156
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. und Goodman, R. M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2541-2547
- Rondon, M. R., Goodman, R. M. und Handelsman, J. (1999) The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol* **17**, 403-409
- Rouhi, A. M. (1999) Chemistry from unknown microbes. *Chem Eng News* **77**, 21-23
- Rozzell, J. D. (1999) Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorg Med Chem* **7**, 2253-2261
- Ruetschi, U., Odelhog, B., Lindstedt, S., Barros-Soderling, J., Persson, B. und Jornvall, H. (1992) Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Primary structure of the *Pseudomonas* enzyme. *Eur J Biochem* **205**, 459-466
- Ruttloff, H. (ed.) (1994) Industrielle Enzyme (2. Auflage). Behr's Verlag, Hamburg
- Saber, D. L. und Crawford, R. L. (1985) Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1512-1518
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
- Sarda, L. und Desnuelle, P. (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim Biophys Acta* **30**, 513-521

- Schanstra, J. P., Rink, R., Pries, F. und Janssen, D. B. (1993) Construction of an expression and site-directed mutagenesis system of haloalkane dehalogenase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **4**, 479-489
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. und Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-268
- Schmid, R. D. (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Schneider, B., Müller, R., Frank, R. und Lingens, F. (1991) Complete nucleotide sequences and comparison of the structural genes of two 2-haloalkanoic acid dehalogenases from *Pseudomonas* sp. strain CBS3. *J Bacteriol* **173**, 1530-1535
- Schrag, J. D., Li, Y. G., Wu, S. und Cygler, M. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**, 761-764
- Sekine, M., Watanabe, K. und Syono, K. (1989) Nucleotide sequence of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. *Nucleic Acids Res* **17**, 6400
- Seow, K. T., Meurer, G., Gerlitz, M., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C. R. und Davies, J. (1997) A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *J Bacteriol* **179**, 7360-7368
- Short, J. M. (1997) Recombinant approaches for accessing biodiversity. *Nat Biotechnol* **15**, 1322-1323
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. und Huse, W. D. (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 7583-7600
- Sigrist, C. J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. und Bucher, P. (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* **3**, 265-274
- Slater, J. H., Bull, A. T. und Hardman, D. J. (1997) Microbial dehalogenation of halogenated alkanic acids, alcohols and alkanes. *Adv Microb Physiol* **38**, 133-176
- Slater, J. H., Lovatt, D., Weightman, A. J., Senior, E. und Bull, A. T. (1979) The growth of *Pseudomonas putida* on chlorinated aliphatic acids and its dehalogenase activity. *J Gen Microbiol* **114**, 125-136
- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L. C., Wolters, A. und Van Elsas, J. D. (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J Appl Bacteriol* **74**, 78-85
- Stach, J. E., Bathe, S., Clapp, J. P. und Burns, R. G. (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 139-151
- Stackebrandt, E., Liesack, W. und Goebel, B. M. (1993) Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *Faseb J* **7**, 232-236

- Stader, J. (1995) Gene expression in recombinant *Escherichia coli*, pp. 1-51 in: Gene expression in recombinant microorganisms (Smith, A., ed.), Bioprocess Technology **22** (McGregor, W. C., ed.) Marcel Dekker, Inc., New York
- Staley, J. T. und Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**, 321-346
- Steffan, R. J. und Atlas, R. M. (1988) DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2185-2191
- Steffan, R. J., Goksoyr, J., Bej, A. K. und Atlas, R. M. (1988) Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2908-2915
- Stemmer, W. P. (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10747-10751
- Stemmer, W. P. (1994b) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Leinonen, R., Lin, Q., Lombard, V., Lopez, R., Mancuso, R., Nardone, F., Stoehr, P., Tuli, M. A., Tzouvara, K. und Vaughan, R. (2003) The EMBL Nucleotide Sequence Database: major new developments. *Nucleic Acids Res* **31**, 17-22
- Strotmann, U. und Röschenthaler, R. (1987) A method for screening bacteria: aerobically degrading chlorinated short-chain hydrocarbons. *Curr Microbiol* **15**, 159-163
- Swanson, P. E. (1999) Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 365-369
- Tatusov, R. L., Koonin, E. V. und Lipman, D. J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637
- Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U. T., Rao, B. S., Kiryutin, B., Galperin, M. Y., Fedorova, N. D. und Koonin, E. V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 22-28
- Tebbe, C. C. und Vahjen, W. (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2657-2665
- Thayer, A. M. (2001) Biocatalysis. *Chem Eng News* **79**, 27-34
- Tholey, A. und Heinzle, E. (2002) Methods for biocatalyst screening. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **74**, 1-19
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680

- Thornton, J., Howard, S. P. und Buckley, J. T. (1988) Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin-cholesterol acyltransferase and other lipases. *Biochim Biophys Acta* **959**, 153-159
- Tien, C. C., Chao, C. C. und Chao, W. L. (1999) Methods for DNA extraction from various soils: a comparison. *J Appl Microbiol* **86**, 937-943
- Torsvik, V., Goksoyr, J. und Daae, F. L. (1990a) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**, 782-787
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R. und Goksoyr, J. (1990b) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**, 776-781
- Torsvik, V. L. (1980) Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol Biochem* **12**, 15-21
- Tsai, Y. L. und Olson, B. H. (1991) Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1070-1074
- Tsai, Y. L. und Olson, B. H. (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2292-2295
- Ueda, T., Suga, Y. und Matsuguchi, T. (1995) Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *Eur J Soil Sci* **46**, 415-421
- Upton, C. und Buckley, J. T. (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20**, 178-179
- Vermelho, A. B., Meirelles, M. N., Lopes, A., Petinate, S. D., Chaia, A. A. und Branquinha, M. H. (1996) Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**, 755-760
- Vitzthum, F. (2000) Entwicklung und Untersuchung automatisierungsgerechter physikalisch-mechanischer Desintegrationsverfahren für eine Nukleinsäure-gestützte, humanmedizinische Infektionsdiagnostik. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Vitzthum, F., Geiger, G., Bisswanger, H., Brunner, H. und Bernhagen, J. (1999) A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem* **276**, 59-64
- Vitzthum, F., Geiger, G., Brunner, H., Bisswanger, H. und Bernhagen, J. (2001) DNA quantification by SYBR Green I fluorescence. *Bio World* **1**, 18-20
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B. und Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213-229
- Wahler, D. und Reymond, J. L. (2001a) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 535-544
- Wahler, D. und Reymond, J. L. (2001b) Novel methods for biocatalyst screening. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 152-158

- Ward, D. M., Weller, R. und Bateson, M. M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65
- Warren, G. J. und Green, R. L. (1985) Comparison of physical and genetic properties of palindromic DNA sequences. *J Bacteriol* **161**, 1103-1111
- Weightman, A. J., Weightman, A. L. und Slater, J. H. (1985) Toxic effects of chlorinated and brominated alkanic acids on *Pseudomonas putida* PP3: selection at high frequencies of mutations in genes encoding dehalogenases. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1494-1501
- White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K. S., Aravind, L., Daly, M. J., Fraser, C. M. und et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**, 1571-1577
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. und Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6578-6583
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774
- Woolley, P. und Petersen, S. B. (eds.) (1994) Lipases: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, Cambridge
- Wu, C. H., Huang, H., Arminski, L., Castro-Alvear, J., Chen, Y., Hu, Z. Z., Ledley, R. S., Lewis, K. C., Mewes, H. W., Orcutt, B. C., Suzek, B. E., Tsugita, A., Vinayaka, C. R., Yeh, L. S., Zhang, J. und Barker, W. C. (2002) The Protein Information Resource: an integrated public resource of functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **30**, 35-37
- Zhou, J., Bruns, M. A. und Tiedje, J. M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**, 316-322
- Zipper, H., Buta, C., Lämmle, K., Brunner, H., Bernhagen, J. und Vitzthum, F. (2003) Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Res* **31**, e39

Eigene Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen angefertigt:

Hauer, B., Matuschek, M., Schmid, R., Buta, C., Kauffmann, I., Lämmle, K., Zipper, H. (2003) Verfahren zur Herstellung einer normalisierten Genbank aus Nukleinsäure-Extrakten von Bodenproben und deren Verwendung. Patent EP1430301/WO03027669

Zipper, H., Buta, C., Lämmle, K., Brunner, H., Bernhagen, J. und Vitzthum, F. (2003) Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. Nucleic Acids Res 31, e39

In Bearbeitung:

Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Rupp, S., Brunner, H. und Buta, C. Improved recovery of novel enzymes by metagenomic expression cloning

Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Rupp, S., Brunner, H. und Buta, C. Activity-based screening of metagenomic soil DNA libraries for novel dehalogenases

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner und Frau Dr. Christiane Buta durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger bin ich sehr dankbar für die kurzfristige Übernahme des Koreferates.

Der BASF Aktiengesellschaft sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung des Screening-Center-Projektes.

Bei Herrn Dr. Michael Breuer von der BASF AG möchte ich mich besonders für die gute Zusammenarbeit und seine wertvollen Hinweise beim Screening der Genbanken sowie bei der Analyse der Klone danken, ebenso für die Bereitstellung der Materialien zur Lagerung der Genbank. Mein Dank gilt in diesem Zusammenhang auch seinen Mitarbeitern, die die Sequenzierung der Klone und weitere Arbeiten durchgeführt haben, insbesondere Herrn Jens Henninger. Herrn Dr. Haberhauer danke ich für die Durchführung der PEDANT-Analysen. Herrn Dr. Bernhard Hauer danke ich für die Koordination des Gesamtprojektes.

Frau Dr. Christiane Buta danke ich für die Betreuung der Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft, Anteilnahme und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Dr. Josef Altenbuchner möchte ich besonders für die Überlassung des Plasmids pJOE930 danken, das maßgeblich zum Erfolg der Erstellung der Genbanken beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Müller (Universität Hamburg-Harburg) danke ich für die freundliche Überlassung des Dehalogenase-Klons 1164.

Für die gute Kooperation bei der Entwicklung der Halogenid-Screening-Anlage möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Fraunhofer-Instituts für Produktionstechnik und Automatisierung bedanken. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Stefan Wößner und Herrn

Dr. Michael Fritsche, die die gesamte Anlage konzipiert und aufgebaut haben. Stefan Wößner danke ich besonders für die Mithilfe bei der Durchführung der Chloridmessungen, für die Erstellung der Fotos und die geduldige Beantwortung vieler Fragen. Gedankt sei außerdem Herrn Dipl.-Ing. Hans Lindner.

Herrn Dieter Haaf von der Firma Haaf Mess-Regeltechnik (Waibstadt) danke ich für die Entwicklung und Konstruktion der ionenselektiven Chloridelektroden.

Die Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung zur Förderung der Biotechnologie und Gentechnik hat durch ihre Finanzierung die Durchführung dieses Teilprojektes erst möglich gemacht.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Hubert Zipper für die kollegiale Zusammenarbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und seine Geduld, Hilfe und Unterstützung während aller Höhen und Tiefen des Laboralltags im Screening-Center bedanken.

Ganz herzlich danke ich auch den weiteren Mitgliedern des Screening-Centers, Peter Flemming, Britta Striegl, Gabriele Zelt und Stefanie Hölsch, für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ihnen sowie Georg Geiger, Thomas Schumacher, Christiane Buta und Hubert Zipper gebührt außerdem großer Dank für die tatkräftige Mithilfe beim Picken der Genbank.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Fraunhofer-Institutes für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.