

**Metagenomanalyse eines Multispezies-Biofilms:
Biochemische Charakterisierung und Kristallisierung
der ersten multimeren Esterase aus einem bisher
nicht kultivierten Mikroorganismus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christel Schmeißer
aus Hamburg

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. W. Streit

Korreferent: Prof. Dr. W. Liebl

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	v
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	6
<u>2.1 Bakterienstämme und Plasmide</u>	6
<u>2.2 Nährmedien</u>	7
2.2.1 LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Sambrook et al., 1989)	8
2.2.2 TB-Medium	8
2.2.3 Qualitative Bestimmung der lipolytischen Aktivität	8
2.2.4 Antibiotika und sonstige Medienzusätze	9
<u>2.3 Wachstumsbedingungen und Stammhaltung</u>	9
2.3.1 Zellanzucht	9
2.3.2 Stammkulturen	9
2.3.3 Messung der optischen Dichte	10
<u>2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren</u>	10
2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	10
2.4.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	10
2.4.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	10
2.4.2.2 Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol	10
2.4.2.3 Dialyse von Gesamt-DNA	11
2.4.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	11
2.4.3 Methoden zur Charakterisierung von DNA-Fragmenten	12
2.4.3.1 Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung von DNA	12
2.4.3.2 Fragmentlängenbestimmung von DNA	13
2.4.4 Isolierung von DNA	13
2.4.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus einem Trinkwasser-Biofilm	13
2.4.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	14
2.4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep“	16
2.4.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Midiprep“	16
2.4.4.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	16
2.4.5 Enzymatische Modifikationen von DNA	17
2.4.5.1 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen	17
2.4.5.2 Partieller Verdau von Gesamt-DNA	17
2.4.5.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden	17
2.4.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.4.6 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.4.7 Ligation von PCR Produkten in das TOPO [®] -TA Vektor-System (Invitrogen)	20
2.4.8 Ligation von PCR Produkten in den pDrive Klonierungs-Vektor (Qiagen, Hilden)	21
2.4.9 Ortsspezifische Mutagenese	21

2.4.10 Transposonmutagenese	21
<u>2.5 Transformationsverfahren</u>	22
2.5.1 Hocheffiziente Transformation von <i>E. coli</i>	22
2.5.1.1 Herstellung von kompetenten Zellen mit Hilfe der CaCl ₂ Methode	22
2.5.1.2 Transformation von kompetenten Zellen	22
2.5.2 Elektroporation	23
2.5.2.1 Herstellung „kompetenter Zellen“ für die Elektroporation	23
2.5.2.2 Transformation mittels Elektroporation	24
2.5.3 Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Klone durch X-Gal-Test	24
2.5.4 <i>Screening</i> auf lipolytische Aktivität	24
2.5.5 Transduktion	25
2.5.5.1 Herstellung des „Freeze-Thaw“ Lysates aus <i>E. coli</i> BHB 2688	25
2.5.5.2 Herstellung des Ultraschall-Lysates aus <i>E. coli</i> BHB 2690	26
2.5.6 Verpackung	27
2.5.7 Herstellung phagenkompetenter Zellen	27
2.5.8 Titerbestimmung	28
<u>2.6 Sequenzierung und Analyse der Sequenzen</u>	28
<u>2.7 Herstellung von Protein-Rohextrakten</u>	29
2.7.1 Zellaufschluß mit der „ <i>French pressure cell</i> “	29
2.7.2 Zellaufschluß durch Ultraschall	29
<u>2.8 Proteinaufreinigung durch Immobilisierte Metal Ionen Affinitäts Chromatography (IMAC)</u>	30
<u>2.9 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)</u>	30
2.9.1 Geräte und Säulen	30
2.9.2 Gelfiltration	31
<u>2.10 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)</u>	32
<u>2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (modifiziert nach Laemmli, 1970)</u>	32
2.11.1 Molekularmassenbestimmung von Proteinen in SDS-Gelen	35
<u>2.12 Färbung von Proteinen</u>	36
2.12.1 Coomassie-Färbung	36
2.12.2 Proteinfärbung mit Ponceau S Rot	36
2.12.3 Aktivitätsfärbung lipolytischer Enzyme (Sommer et al., 1997)	37
<u>2.13 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot; Towbin et al., 1979)</u>	37
<u>2.14 Nachweis von Proteinen mit aufeinanderfolgenden Histidinen</u>	38
2.14.1 Detektion	39

<u>2.15 Bestimmung von Enzymaktivitäten</u>	40
2.15.1 Bestimmung der Esteraseaktivität	40
2.15.2 Bestimmung der Substratspezifität	41
2.15.3 Bestimmung der Substratspezifität	41
2.15.4 Bestimmung der Thermostabilität	41
2.15.5 Bestimmung des pH-Optimums/Stabilität	42
2.15.6 Einfluss verschiedener Salze und EDTA auf die Enzymaktivität	42
2.15.7 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Enzymaktivität	42
III. Ergebnisse	44
<u>3.1 Phylogenetische Analyse des Model-Biofilms</u>	44
3.1.1 Isolierung der Biofilm-DNA	44
3.1.2 Klonierung der 16S rRNA-Gene aus der Biofilm-DNA	45
3.1.3 Sequenzanalyse der 16S rRNA-Klone	46
<u>3.2 DNA-Sequenzanalyse des Biofilm-Metagenoms</u>	49
3.2.1 Konstruktion von Plasmid-Banken	49
3.2.2 Statistische Analyse der Sequenzdaten	49
3.2.2.1 Funktionale Verteilung der BlastX Ergebnisse	51
3.2.2.2 Phylogenetische Verteilung der BlastX Ergebnisse	54
<u>3.3 Aktivitätsbasierende Analyse des Biofilm-Metagenoms</u>	57
3.3.1 Konstruktion von Cosmid-Banken	57
3.3.2 <i>Screening</i> der Cosmid-Genbanken auf lipolytische Aktivität	58
3.3.3 Klonierung von <i>EcoRI</i> -Fragmenten	60
3.3.4 Identifizierung der lipolytischen ORFs mittels Transposonmutagenese	60
<u>3.4 Sequenzanalyse der lipolytischen ORFs</u>	61
3.4.1 Sequenzanalyse von pCS-A3/pCosCS2-A3	61
3.4.2 Sequenzanalyse von pCS-E5	65
3.4.3 Sequenzanalyse von pCS-C5	68
<u>3.5 Klonierung der Metagenom-Esterase EstA3</u>	71
3.5.1 Konstruktion von pCS-EstA3	71
3.5.2 Aufreinigung von EstA3 über Protino® Ni 2000 <i>prepacked</i> Säulen	74
3.5.3 Aufreinigung von EstA3 über die <i>Superdex 200 prep grade</i>	75
3.5.4 Nachweis der Multimerisierung von EstA3	77
<u>3.6. Biochemische Charakterisierung von EstA3</u>	79
3.6.1 Charakterisierung der β -Laktamaseaktivität von EstA3	79
3.6.2 Bestimmung des Temperaturoptimums von EstA3	80
3.6.3 Bestimmung der Thermostabilität von EstA3	81
3.6.4 Bestimmung der Substratspezifität von EstA3	82
3.6.5 Einfluss verschiedener Salze und EDTA auf die Aktivität von EstA3	83
3.6.6 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Aktivität von EstA3	85
3.6.7 Bestimmung des pH-Optimums von EstA3	85
3.6.8 Bestimmung der pH-Stabilität von EstA3	86
3.6.9 Bestimmung des Substratspektrums von EstA3	87

3.6.10 Kristallisierung von EstA3	91
<u>3.7. Ortsspezifische Mutagenese des aktiven Zentrums von EstA3</u>	91
3.7.1 Gerichtete Mutagenese des Serin ₆₁ von EstA3	92
3.7.2 Sequenzanalyse der EstA3-Mutante	92
3.7.3 Expression und Aufreinigung der Mutante pCS-EstA3-Mut	93
IV. Diskussion	96
<u>4.1 Phylogenetische Analyse des Model-Biofilms anhand der 16S rDNA</u>	96
4.1.1 Klonierung und Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene aus der Biofilm-DNA	97
<u>4.2 Sequenzbasierende Analyse des Biofilm-Metagenoms</u>	101
4.2.1 Statistische Analyse der Sequenzdaten aus der Plasmid-Genbank	101
4.2.1.1 Funktionale Analyse der Sequenzdaten	102
4.2.1.2 Phylogenetische Verteilung der Sequenzdaten	104
<u>4.3. Aktivitätsbasierende Analyse des Biofilm-Metagenoms</u>	107
4.3.1. Durchmusterung der Cosmid-Banken nach lipolytischen Enzymen	108
4.3.2 Charakterisierung der lipolytischen Gene	109
<u>4.4 Aufreinigung und Charakterisierung einer Esterase aus dem Biofilm-Metagenom</u>	112
V. Zusammenfassung	116
VI. Literaturverzeichnis	118
VII. Anhang	131

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
b	Basen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cm	Chloramphenicol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
DNase	Desoxyribonuklease
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
Gram (+)	Grampositives Bakterium
IPTG	Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani (ein Nährmedium)
M	molar
MCS	Multi-Cloning-Site
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute

mind.	mindestens
ml	Milliliter
μ	Mikro- (1×10^{-6})
mM	millimolar
ms	Millisekunde(n)
NBT	Nitroblau-Tetrazolin
n	Nano- (1×10^{-9})
o.a.	oben aufgeführten
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
<i>P:</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
r	Resistenz
R.	<i>Rhizobium, Ralstonia</i>
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Sinorhizobium</i>
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl. Sodium-Dodecylsulfat)
Sp	Spectinomycin
Std.	Stunden
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
ü. N.	über Nacht
V	Volt

v/v Volumeneinheit pro Volumeneinheit

w/v Masseneinheit pro Volumeneinheit

X. Xanthomonas campestris

X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

I. Einleitung

Prokaryonten gehören zu den in der Natur am häufigsten vorkommenden Organismen und zeigen hinsichtlich ihrer physiologischen, metabolischen und genetischen Eigenschaften eine sehr große Vielfalt. Sie spielen eine zentrale Rolle in allen funktionierenden Ökosystemen. Trotzdem sind bis heute nur ca. 6.200 Arten bekannt (Oren, 2004). Dies entspricht selbst nach vorsichtigen Schätzungen nicht einmal 1 % der *Bacteria* und *Archaea* unserer Umwelt (Amann et al., 1995; Pace, 1997). Die Mehrheit der Mikroorganismen ist demnach mit den herkömmlichen Kultivierungsmethoden bisher nicht zu identifizieren. In den letzten Jahren wurde daher mit der Metagenomik eine Methode entwickelt, die es möglich macht metabolische, biochemische und biotechnologisch relevante Eigenschaften von Mikroorganismen aufgrund ihres genetischen Potentials zu erfassen. Als Metagenom bezeichnet man die Gesamtheit aller Genome der in einem Habitat vorkommenden Mikroorganismen (Handelsman et al., 1998). Um ein Metagenom zu erschließen, wird die Gesamt-DNA direkt aus der Umweltprobe isoliert, womit herkömmliche Kultivierungsmethoden, wie z. B. Anreicherungskulturen, umgangen werden. Somit wird es möglich das genetische Potential der Mikroorganismen zu erfassen, die mit klassischen Methoden bisher nicht kultiviert werden konnten. Die gereinigte Metagenom-DNA kann dann für entsprechende Untersuchungen weiterverwendet werden.

Für phylogenetische Analysen werden in der Regel die 16S rRNA-Gene als Marker verwendet, die in der kleinen Untereinheit der Ribosomen in allen prokaryotischen Organismen vorkommen. Mit Hilfe universeller Primer können die 16S rRNA-Gene direkt aus der Umwelt DNA amplifiziert werden. Zum einen führte die Klonierung der 16S rRNA-Gene zur Identifizierung zahlreicher bisher nicht kultivierbarer Mikroorganismen (Pace et al, 1986) und zum anderen wurde die Analyse der 16S rRNA Gene dazu genutzt, einen Einblick in die Diversität unterschiedlicher Habitate zu erlangen, wobei auch neue Phyla innerhalb der *Bacteria* und *Archea* identifiziert werden konnten (Hugenholtz et al., 1998, Chelius et al., 2001; Derakshani et al., 2001). Mehr als die Hälfte der über 70.000 rRNA-Sequenzen aus den Datenbanken stammen von bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen (Cole et al., 2003). Auch mehr als ein Drittel der 40 - 50 Hauptabstammungslinien der Domäne der *Bacteria* basieren nur auf der Identifizierung der 16S rRNA-Gene und die entsprechenden Mikroorganismen konnten bisher nicht kultiviert werden (Harris et al., 2004). Die Analyse der 16S rRNA-Gene gibt somit einen Einblick in die Diversität der

unterschiedlichen mikrobiellen Gemeinschaften und macht deutlich wie klein unser bisheriges Wissen über die in der Natur vorkommenden Mikroorganismen ist.

Eine weitere häufig angewandte Methode zur Analyse von Metagenomen ist das Anlegen der metagenomischen DNA in Genbanken (Abb. 1). Die isolierte und aufgereinigte Umwelt-DNA wird dazu fragmentiert und nach Größenselektion in die geeigneten Vektoren kloniert. Die Wahl der Vektoren ist abhängig von der Insert-Größe der klonierten DNA-Fragmente. Eine klassische Methode stellt hierbei die Erstellung von Plasmid-Genbanken dar. Hierzu werden DNA-Fragmente, die kleiner als 10 kb sind, in Standard-Vektoren kloniert und in *E. coli* als Wirt transformiert (Henne et al., 1999). Diese Genbanken dienen z. B. der Sequenzierung einzelner Gene. Durch die Sequenzierung von Plasmid-Genbanken konnten z. B. die Genome aus einem

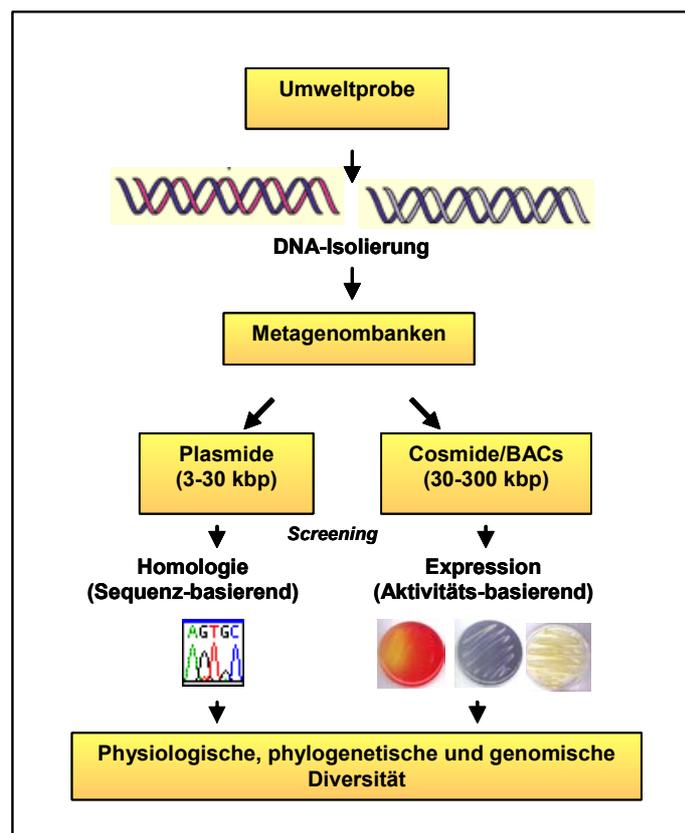


Abb. 1: Strategie der Metagenomik

azidophilen Biofilm fast komplett rekonstruiert werden ohne die Organismen zu kultivieren (Tyson et al., 2004). Auch Sequenzierungs-Projekte von Metagenomen, wie beispielsweise die Sargasso See, führten zur Identifizierung zahlreicher neuartiger Gene (Venter et al., 2004). Für die Identifizierung ganzer Gen-Kluster bzw. Operons durch Aktivitätstests sind Plasmid-Banken jedoch eher ungeeignet. Zu diesem Zweck werden Genbanken mit größeren DNA-Fragmenten, wie z. B. Cosmid-Banken, mit Insert-Größen zwischen 20 und 35 kb (Entcheva et al., 2001) oder BAC (*Bacterial Artificial Chromosom*)-Genbanken, mit Insert-Größen bis zu 200 kb (Beja et al., 2000; Rondon et al., 2000) angelegt. Durch die Verfügbarkeit des Metagenoms in Form von klonierten Genomfragmenten erschließt sich eine immense Ressource für neue Biokatalysatoren und Wirkstoffe. Auf der Basis von Sequenzähnlichkeit oder konservierter Sequenzmotive kann beispielsweise eine solche Standort-Genbank durch Hybridisierung oder PCR-Amplifikation mit entsprechenden Sonden durchmustert werden. Auf diesem Wege wurde es möglich neuartige Gene aus Metagenomen zu isolieren, wie beispielsweise Dehalogenasen, die nur geringe Ähnlichkeit zu den Dehalogenasen zeigten, die aus Anreicherungskulturen gewonnen werden konnten (Marchesi und Weightman, 2003) oder auch Gene, die für neuartige Lipasen kodieren (Bell et al., 2002). Ein ebenso großes Interesse gilt der Durchmusterung der Genom-Banken nach neuartigen Enzymen und Wirkstoffen durch Aktivitäts-*Screenings*. Mit dieser Methode konnten bisher eine Vielzahl funktioneller Gene identifiziert werden, die für unterschiedliche Enzyme wie beispielsweise Chitinasen (Cottrell et al.; 1999), Amylasen (Richardson et al., 2002; Rondon et al.; 2000), Agarasen (Voget et al., 2003), Lipasen/Esterasen (Henne et al., 2000; Rondon et al., 2000; Rees et al.; 2003) oder auch antibakterielle Wirkstoffe (Rondon et al., 2000; Gillespie et al., 2002) kodieren.

Bei der Durchmusterung von Cosmid-Genbanken in dieser Arbeit sollte der Fokus auf Gene mit lipolytischen Aktivitäten gerichtet werden. Lipasen und Esterasen stellen eine der wichtigsten Gruppen von Biokatalysatoren für die biotechnologische Anwendung dar. Ein großer Vorteil dieser Enzyme liegt darin, dass sie keine Co-Faktoren benötigen und in organischen Lösungsmitteln sehr stabil und zumeist aktiv sind. Sie zeigen eine hohe Regio- und Stereospezifität und werden daher bei der biokatalytischen Herstellung enantiomeren-reiner Substanzen eingesetzt (Jäger, 1998, 1999, 2002). Hierzu zählen vor allem Pharmazeutika, aber auch Herbizide, Insektizide und Duftstoffe für die Kosmetikindustrie. Bei der Synthese stereospezifischer Zwischenstufen während der Synthese des Schmerzmittels Ibuprofen beispielsweise kommen Lipasen zum Einsatz. Bisher kultivierte Bakterien produzieren

unterschiedliche Klassen von lipolytischen Enzymen, dazu gehören Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1), die wasserlösliche kurzkettige Substrate bevorzugen, die „echten“ Lipasen (EC 3.1.1.3) zeigen dagegen hohe Aktivität gegenüber wasserunlöslichen, langkettigen Triglyceriden. Zusammen gehören sie in die Gruppe der Hydrolasen und katalysieren sowohl die Spaltung als auch die Bildung von Esterbindungen. Viele der bisher isolierten Enzyme zeigen ein weites Substratspektrum, dies lässt die Vermutung zu, dass sie bei der Verwertbarkeit von C-Quellen oder in anderen Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle spielen (Bornscheuer, 2002).

Biofilme als Modell-Metagenome

Biofilme stellen für die Untersuchung von physiologischen Zusammenhängen in komplexen Konsortien sehr geeignete Habitate dar. Zum einen sind Biofilme im Gegensatz zu anderen Habitaten relativ leicht zugänglich, und auch die Gewinnung von reiner DNA aus Biofilmen ist zumeist unkomplizierter als die von anderen Standorten, wie z.B. Bodenproben, wo Huminsäuren die DNA-Aufreinigung oft stören können. Zum anderen können Biofilme unter modifizierten Bedingungen im Labor nachgezüchtet werden, wodurch man in der Lage ist Populationsstrukturen, zu untersuchen und die Gen- bzw. Proteinexpression in mikrobiellen Konsortien zu analysieren.

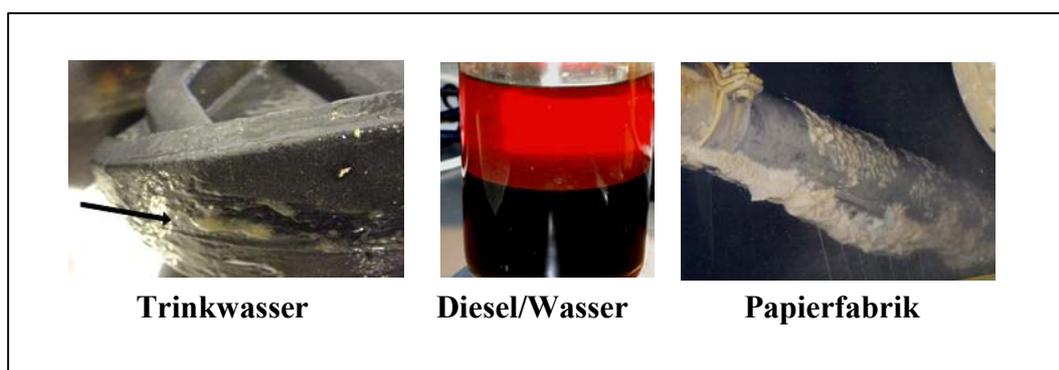


Abb. 2: Drei typische Biofilme, wie sie an unterschiedlichen Standorten vorkommen.

An allen Grenzflächen in der Natur und technischen Systemen, die ausreichend Wasser enthalten, kommt es zur Anheftung von Mikroorganismen und zur Bildung von

Biofilmen. Heute weiß man, dass die Mehrheit der Mikroorganismen in Form von Biofilmen in den meisten natürlichen (Costerton et al.; 1987) und pathogenen (Costerton et al., 1999) Ökosystemen vorkommt. Sie stellen zum Teil sehr diverse mikrobielle Lebensgemeinschaften dar und sind entscheidend an wichtigen Stoffumwandlungen und Stoffkreisläufen beteiligt. Der Vorteil, der das Leben in Biofilmen für die Mikroorganismen mit sich bringt, ist die bessere Versorgung metabolisierbarer Substanzen an Oberflächen durch die ständige Adsorption und die damit verbundene Konzentration der Moleküle (Antenneneffekt) (Szewzyk et al., 2000). Auch die relativ enge räumliche Anordnung der unterschiedlichen Organismen in einem Biofilm kann gerade bei dem Abbau schwer zugänglicher organischer Moleküle einen Vorteil darstellen (Costerton et al., 1995). Auch aus extrem oligothrophen Ökosystemen wie dem Trinkwasser sind Biofilme seit langem bekannt. Die Untersuchungen dieser Biofilme zielten dabei meist jedoch nicht darauf ab, die gesamte Mikroflora der Trinkwassersysteme zu erfassen (Block et al., 1992), sondern konzentrierten sich auf die hygienisch relevanten Arten. Der in dieser Arbeit untersuchte Biofilm wuchs auf EPDM (Ethylen-Propylen-Dien-Monomer) beschichteten Absperrschiebern in Trinkwasserverteilungssystemen (Abb. 2) (Kilb et al., 2003).

Intention dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Metagenom eines Trinkwasser-Biofilms molekularbiologisch analysiert werden, um einen Überblick über die phylogenetische sowie metabolische Vielfalt komplexer Konsortien zu erhalten und auf diesem Weg neuartige, biotechnologisch interessante Biokatalysatoren zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt. (I) Eine phylogenetische Analysen des Konsortiums erfolgte über Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene. (II) Zusätzlich wurde die Biofilm-DNA in Plasmid- bzw. Cosmid-Banken kloniert. Diese Metagenombanken wurde mittels Sequenzähnlichkeit und auf Enzymaktivität basierender Verfahren nach neuartigen lipolytischen Enzymen durchmustert. (III) Beispielhaft sollte eine der identifizierten Metagenomesterase biochemisch charakterisiert und zur Kristallisierung vorbereitet werden.

II. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1, die verwendeten Plasmide in Tab. 2a und die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide in Tab. 2b aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>thi1, endA1, gyrA96 (Nal^r), supE 44, recA1, hsdR17, λ, lac, rpsL(Sm^r), [F' traD36, proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(Tc^r)]</i>	Bullock et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal, dcm, λDE3</i>	Novagen
<i>Escherichia coli</i> VCS257	DP50 Derivat: <i>tonA53 dapD8 lacY1glnV44(supE44) (gal-uvrB)47 tyrT58 (supF58) gyrA29 (thyA57) hsdS3(rk-mk-) mcrA</i>	Sambrook et al., 1989
<i>Escherichia coli</i> BHB 2688	(N205 <i>recA [λimm434 cIts b2 red Eam Sam/λ]</i>)	Hohn, 1979
<i>Escherichia coli</i> BHB 2690	(N205 <i>recA [λimm434 cIts b2 red Dam]</i>)	Hohn, 1979

Tab. 2a: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pBlueskript SK(+)	Amp ^r , <i>lacP OZ'</i>	Stratagene, San Diego, Cal., USA
pET24c	Amp ^r , Expressionsvektor	Stratagene, San Diego, Cal., USA
pTZ19	<i>lacZ, Cm^r</i>	MBI, Fermentas
pWE15	<i>Apr, Neor, λ-cos</i>	Stratagene (Heidelberg)
pDrive	pUC ori, P _{lac} <i>lacZ^l, Kan^r, Amp^r</i>	Qiagen (Hilden)
pCR [®] 4-TOPO [®]	pUC ori, P _{lac} , <i>lacZ-ccdB, Kan^r, Amp^r</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 2b: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Konstrukt	Vektor	Merkmal
pCosCS2-A3	pWE15	17,571 kb Fragment mit potentiellen lipolytischen Genen aus Trinkwasser-Biofilmen (komplett sequenziert)
pCosCS5-E5	pWE15	23 kb Fragment mit potentiellen lipolytischen Genen aus Trinkwasser-Biofilmen
pCosCS1-C5	pWE15	29 kb Fragment mit potentiellen lipolytischen Genen aus Trinkwasser-Biofilmen
pCosCS7-G4	pWE15	25,3 kb Fragment mit potentiellen lipolytischen Genen aus Trinkwasser-Biofilmen
pCosCS3-B1	pWE15	27,5 kb Fragment mit potentiellen lipolytischen Genen aus Trinkwasser-Biofilmen
pCosCS3-B8	pWE15	26,7 kb Fragment mit potentiellen lipolytischen Genen aus Trinkwasser-Biofilmen
pCS-A3	pTZ19	Subklon von pCosCS2-A3, <i>EcoRI</i> -Fragment mit potentiell lipolytischen Genen
pCS-C5	pTZ19	Subklon von pCosCS1-C5, <i>EcoRI</i> -Fragment mit potentiell lipolytischen Genen
pCS-E5	pTZ19	Subklon von pCosCS5-E5, <i>EcoRI</i> -Fragment mit potentiell lipolytischen Genen
pCS-EstA3	pET24c	<i>estA3</i> (lipolytischer ORF; 1.191 bp) aus pDrive::EstA3, <i>BamHI/HindIII</i> kloniert
pDrive::EstA3	pDrive	<i>estA3</i> (lipolytischer ORF; 1.191 bp) aus pCS2-A3, PCR-Produkt <i>BamHI/HindIII</i> kloniert
pCS-EstA3-Mut	pET24c	<i>estA3</i> (lipolytischer ORF; 1.191 bp) aus pDrive::EstA3, <i>BamHI/HindIII</i> kloniert, Aminosäureaustausch an Position 61 (Ser → Ala)

2.2 Nährmedien

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf ein Endvolumen von 1 Liter in demineralisiertem Wasser. Zur Herstellung von Festmedien wurde jeweils 1,5 % (w/v) Agar hinzugegeben.

Alle Lösungen und Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

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

Trypton:	10 g
Hefe-Extrakt:	5 g
NaCl:	5 g

2.2.2 TB-Medium

Trypton:	12 g
Hefe-Extrakt:	24 g
Glycerin:	4 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren:

Zugabe von 100 ml Phosphat-Puffer (1x), ebenfalls steril

KH ₂ PO ₄	0,17 M	2,31 g
K ₂ HPO ₄	0,72 M	12,54 g
H ₂ O _{dest.}		ad 100 ml

2.2.3 Qualitative Bestimmung der lipolytischen Aktivität

Für das Durchsuchen der Cosmid- bzw. Plasmid-Banken nach Enzymen mit lipolytischer Aktivität wurde LB-Medium (2.2.1) mit 1 % Tributyrin versetzt. Das Tributyrin (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) wurde mit Hilfe eines Ultra-Tuurax Homogenisators (Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen) in ca. 60 °C warmes Medium emulgiert.

Trypton:	10 g
Hefeextrakt:	5 g
NaCl:	5 g
Tributyrin (99 %, v/v)	10 ml

2.2.4 Antibiotika und sonstige Medienzusätze

Von den Medienzusätzen (Tab. 3) wurden Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika und anderer hitzelabiler Medienbestandteile erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlung der Medien auf ca. 55°C .

Tab. 3 Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und anderer Medienzusätze

Medienzusatz	Lösungsmittel	Stammlösung (mg/ml)	Arbeitskonzentration ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	100	100
Kanamycin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	20	20
Tetracyclin	Ethanol	10	10
Chloramphenicol	Ethanol	34	25
IPTG	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	24	0,1-1mM
X-Gal	Dimethylformamid	20	0,002 % ig (v/v)

2.3 Wachstumsbedingungen und Stammhaltung

2.3.1 Zellanzucht

E. coli-Stämme wurden über Nacht in LB-Flüssigmedium in Reagenzgläsern (5 ml) oder Erlenmeyerkolben (30 ml bis 2 l Kulturen) angezogen. Plasmidhaltige Stämme wurden durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums unter Selektivdruck gehalten. Hauptkulturen wurden 1-3 % (v/v) mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur angeimpft. Bei der Verwendung von Überexpressionsstämmen wurde die Expression der Proteine mit IPTG bei einer OD_{595} von 0,3 bis 0,6 induziert. Die Inkubation von *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 30°C bzw. 37°C auf einem Schüttler.

2.3.2 Stammkulturen

E. coli konnte bis zu vier Wochen auf festem Komplexmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 4°C gelagert werden. Für eine längere Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Frische Übernachtskulturen wurden mit sterilem Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -70°C eingefroren.

2.3.3 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen unbeimpftes Medium photometrisch bestimmt (Pharmacia Biotec; Ultraspec 3000). Um Meßungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Proben mit unbeimpftem Medium entsprechend verdünnt sobald eine Extinktion von 0,3 überschritten wurde.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Thermostabile Lösungen, Glaswaren und andere Geräte wurden zur Inaktivierung von Nukleasen für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit 70 °C (v/v) Ethanol gespült oder abgeflammt.

2.4.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.4.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Extraktion von Proteinen wurden die DNA-Lösungen im Verhältnis 1:1 mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 (v/v/v)) versetzt und gründlich durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze 20 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert und die wässrige DNA-haltige Oberphase vorsichtig abgehoben. Zur Entfernung von Phenolresten wurde noch eine 1:1 Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA mit Ethanol.

2.4.2.2 Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol

Zum Fällern von DNA wurde die DNA-Lösung mit 0,3 Volumen einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung und 0,7 Volumen Isopropanol oder 2,5 Volumen eiskaltem unvergälltem Ethanol (96 % (v/v)) versetzt. Nach Durchmischung (bei Ethanol-Fällung Lagerung bei -20 °C für 0,5-12 h) konnte die DNA durch Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15-30 min) gefällt werden. Das Pellet wurde zweimal mit unvergälltem 70 %igen Ethanol gewaschen und dann in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac[®]Plus SC110A

Savant) für 5-10 min getrocknet. Die DNA wurde nun im gewünschten Volumen H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer

Tris-Cl: 10 mM
EDTA: 1 mM
pH 7,4

2.4.2.3 Dialyse von Gesamt-DNA

Aus Umweltproben isolierte DNA (s. 2.4.4) enthält oftmals zu hohe Salzkonzentrationen, die bei weiteren Anwendungen stören könnten. Sie muß daher zunächst einer Dialyse unterzogen werden. Dazu wurden Dialyseschlauch-Stücke in TE-Puffer (s. 2.4.2.1) autoklaviert. Anschließend konnte die DNA-Lösung in die Schlauch-Stücke eingefüllt werden, die an beiden Enden mit Dialyseschlauch-Klammern verschlossen wurden. Die Dialyse der DNA erfolgte bei 4 °C für 24 h gegen TE-Puffer, der nach etwas 4-5 h ausgewechselt wurde. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA mit Ethanol (s. 2.4.2.1).

2.4.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Ermittlung der Konzentration wurde die OD₂₆₀ einer DNA-Lösung in einer Quarzküvette gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit konnte durch die Bildung der Quotienten von Absorptionwerten bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt werden. Für reine DNA-Lösungen gelten folgende Richtwerte: OD₂₆₀ : OD₂₈₀ ≥ 1,8 (Sambrook et al., 1989), niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.4.3 Methoden zur Charakterisierung von DNA-Fragmenten

2.4.3.1 Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung von DNA

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Charakterisierung von DNA ist die Agarosegelelektrophorese. Mit Hilfe dieser Technik können DNA-Moleküle im Gel aufgetrennt werden. Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit eines DNA-Fragmentes von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der Größe des DNA-Moleküles, der Größe der Gelporen, bestimmt durch die Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und den Salzkonzentrationen des Puffers. Es wurden 0,8 %ige Gele für die Analyse von Restriktionsspaltungen und 1 %ige oder 1,2 %ige Gele zur Auftrennung von PCR-Produkten in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wurde, gegossen. Vor Beladen der Geltaschen wurde die DNA mit Ladepuffer im Verhältnis 10:1 vermischt, was zum einen der Beschwerung und zum anderen durch den enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau der Markierung der Lauffront bei ca. 500 bp diente. Die Auftrennung erfolgte im Minigel (Hofer® HE33 Mini Horizontal Submarine Unit) bei einer Spannung von 60-100 V und einer Laufzeit von 45-90 min. Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgte die Färbung der DNA durch Überführung des Gels in ein Ethidiumbromidbad für ca. 10 min und anschließender Entfärbung im Wasserbad für ebenfalls 10 min. Mit Hilfe der Gel-Dokumentationsanlage (BioRad® GelDoc 1000) wurde die DNA bei UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht, fotografisch dokumentiert und eventuell bearbeitet („Multi-Analyst-V.1.1.1.“-Dokumentationsprogramm). Mittels eines Thermodruckers (Mitsubishi Video Copy Prozessor P66DE) konnten diese Bilder ausgedruckt werden.

50 x TAE-Puffer:

Tris:	242 g
Eisessig:	57,1 ml
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O:	37,2 g
H ₂ O:	ad 1 l
<u>pH 8,5:</u>	

10 x DNA-Ladepuffer:

Ficoll 400:	20 g
Bromphenolblau:	0,25 g
SDS:	1 g
EDTA:	0,1 M, pH 8
H ₂ O:	ad 100 ml

Ethidiumbromid-Färbebad:

2 Tropfen einer 2 mg/ml Ethidiumbromidlösung wurden mit 500 ml H₂O vermischt.

2.4.3.2 Fragmentlängenbestimmung von DNA

Zur Ermittlung der Länge von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Molekülen diente ein Längenmarker mit bekannten Fragmentgrößen. Dieser Längenstandard wurde parallel zur analysierenden DNA im Agarosegel mit aufgetrennt. Es wurde der GeneRuler 1 kb DNA-Ladder der Firma MBI, Wilna, Litauen benutzt.

Tab. 4: Fragmentgrößen des verwendeten Markers 1 kb-Leiter (GeneRuler™ von MBI)

Längenstandard	Fragmentgrößen bp
Marker (Firma MBI)	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

2.4.4 Isolierung von DNA

2.4.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus einem Trinkwasser-Biofilm

Der Biofilm, der nach der Ernte mit 30 %igem Glycerin überschichtet wurde, wurde zunächst für 5 min bei 4 °C und 13000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 1M NaCl-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (20 min bei 13.000 Upm und 4 °C) wurde das Pellet in 500 µl TE-Saccharose-Lösung (20 %, w/v) aufgenommen und die Zellen in 400 µl DEP mit 100 µl SDS (1 %) für 2-4 h bei 37 °C lysiert. Anschließend wurden der DNA-Extrakt mit 100 µl Sarkosyl-Proteinase K-Lösung versetzt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe

von 300 µl eines Phenol/Chloroform Gemisches (Verhältnis 1:1) wurde der Ansatz gründlich durchmischt und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde für 20 min bei 13.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert und die wässrige Phase vorsichtig in ein neues E-Cup überführt. Dieser Vorgang wurde mit dem Phenol/Chloroform-Gemisch und abschließend mit reinem Chloroform wiederholt. Der Überstand wurde ü. N. in einem Dialyseschlauch gegen 1 x TE-Puffer dialysiert (s. 2.4.2.3).

DNA-Extraktionspuffer (DEP):

Tris	100 mM
Na ₂ -EDTA	100 mM
Na ₂ -HPO ₄	100 mM
NaCl	1,5 M
CTAB	1 %
pH 8	

TE-Saccharose-Puffer:

20 % Saccharose in TE-Puffer

Sarkosyl-Proteinase K-Lösung:

25 µl einer 25 %igen Proteinase K-Lösung (w/v) wurden auf 1 ml 5 %ige Sarkosyl-Lösung gegeben

2.4.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Diese Methode wurde eingesetzt, um eine große Anzahl von Klonen/Transformanten auf das Vorhandensein positiver rekombinanter Plasmide zu überprüfen. Der Vorteil dieser Methode liegt bei den im Vergleich zu den Kits geringen Kosten. Die Bakterien werden durch SDS in Gegenwart von NaOH in der Kälte lysiert, hierbei herrschen denaturierende Bedingungen für RNA, DNA und Proteine. Durch anschließende Neutralisation erfolgt Kopräzipitation von SDS, chromosomaler DNA und Protein. Die Plasmid-DNA kann renaturieren und verbleibt in Lösung, sie kann daraus durch Ethanol-Fällung gewonnen werden. Die isolierte Plasmid-DNA kann dann zur Restriktionsanalyse oder als *template* für die PCR verwendet werden.

Durchführung:

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 1 min im Eppendorfgefäß bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer P2, dreimaliges Invertieren des Eppendorfgefäßes und 5 min Inkubation auf Eis. Durch Zugabe von 200 µl Puffer P3 erfolgte die Fällung der Proteine (2-3 sec vortexen; bei größeren Plasmiden Eppendorfgefäß vorsichtig dreimal invertieren) und 5 min auf Eis inkubieren. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 13.000 Upm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bei Bedarf an sehr reiner Plasmid-DNA wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion zur Verminderung von Proteinkontaminationen durchgeführt; dazu wurde jeder Ansatz mit 200 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches versetzt, gevortext und nach 5 min Zentrifugieren der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Isopropanol und 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA gefällt und nach 20 minütigem Zentrifugieren bei 13.000 Upm zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und in 50-100 µl TE-Puffer oder H₂O_{dest.} resuspendiert.

Puffer P1 (Resuspensionslösung):

Tris-HCl:	50 mM
EDTA:	10 mM
pH 8	

RNA konnte durch Zusatz von RNaseA (1 mg/ml) zu Puffer 1 entfernt werden.

Puffer P2 (Lysepuffer):

NaOH:	0,2 M
SDS:	1 % (w/v)

Puffer P3 (Neutralisierungslösung):

Eisessig:	29,5 ml
KOH-Plätzchen:	ad pH 4,8
H ₂ O _{dest.} :	ad 100 ml

2.4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep“

Das Plasmidisolierungskit von Qiagen (Hilden) ermöglichte die Präparation kleinerer Mengen hochreiner DNA. Dabei wurden bis zu 25 µg Plasmid-DNA (bei hoher Kopienzahl) aus 3-5 ml *E. coli*-Kulturen gewonnen. Das Prinzip beruht ebenfalls auf alkalischer Lyse der Zellen mit nachfolgender Adsorption an eine Silicagelmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die in H₂O_{bidest.} eluierte DNA war für die PCR und Sequenzierungen verwendbar.

2.4.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Midiprep“

Das Plasmidisolierungskit der Firma Qiagen (Hilden) ermöglicht die Aufreinigung größerer Plasmidmengen. Abhängig von der Kopienzahl wurde eine 25-500 ml Kultur ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach der Zellernte wurde das Pellet in einem vom Hersteller vorgeschriebenen Volumen P1-Puffer gelöst. Nach der Zugabe der gleichen Menge P2-Puffer durfte der Ansatz nicht länger als 5 min bei RT inkubiert werden. Anschließend wurde P3-Puffer hinzugegeben und das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4 °C, 30 min, 13.000 Upm) wurde der Überstand abgenommen und zur vollständigen Entfernung der Proteine erneut für 15 min zentrifugiert. Es folgte eine Reinigung über eine Qiagen Tip 100-Säule (Anionenaustauschchromatographie). Der Überstand aus der letzten Zentrifugation wurde auf die mit Niedrigsalzpuffer (QBT) äquilibrierte Säule aufgetragen und nach einem Waschschrift (QC-Puffer) mit salzhaltigem Tris-Puffer (QF) unter schwach alkalischen Bedingungen eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt, gewaschen (70 % w/v Ethanol), getrocknet und in TE-Puffer oder H₂O_{bidest.} aufgenommen.

2.4.4.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach PCR oder Restriktionsverdau und Überprüfung der Ergebnisse auf einem Agarosegel konnten DNA-Fragmente, die für eine Ligation benötigt wurden, unter Verwendung des „QiaQuick Gel Extraktion Kits“ (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert werden.

2.4.5 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.4.5.1 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Diese Methode beruht auf der hohen Spezifität der aus verschiedenen Prokaryonten isolierten Restriktionsendonukleasen (TypII) zu ihrer (meist) palindromischen Erkennungssequenz in einem DNA-Doppelstrang. An definierter Stelle hydrolysieren die Enzyme nach Bindung an diese Sequenz die Phosphodiesterbindung zwischen je zwei Basen in beiden Strängen, wobei überhängende oder glatte Enden entstehen können. Es wurden überwiegend Restriktionsenzyme und die mitgelieferten 10fachen Inkubationspuffer der Firmen Boeringer[®], Pharmacia[®], USB[®] und MBI[®] verwendet. In der Regel wurden Spaltungsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet.

DNA in TE-Puffer oder H₂O:

10 x Spaltungspuffer:	2 µl
Restriktionsenzym:	0,5µl 1-5 U/µg DNA
H ₂ O:	ad. 20 µl

Die Inkubation erfolgte 2-3 h oder auch über Nacht bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur, meist 37°C. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze 10 min bei 75 °C inkubiert oder mit Chloroform extrahiert.

2.4.5.2 Partieller Verdau von Gesamt-DNA

Der partielle Verdau von Gesamt-DNA aus Umweltproben wurde in einer Verdünnungsreihe durch das Enzym *Bsp143I* (ein Isoschizomer von *Sau3AI*) durchgeführt. Es wurden 10 U Enzym 8-10 fach verdünnt. Die eingesetzte DNA-Menge sollte nicht mehr als 250 ng DNA betragen. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurde der Verdau gestoppt und auf einem 0,8 %igem Agarosegel überprüft.

2.4.5.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Vermeidung von Selbstligationen konnten die 5'-Phosphatgruppen von restriktionsverdauter Vektor-DNA enzymatisch durch alkalische Phosphatase abgespalten werden. Nach der Restriktion wurden zu 20 µl eines Restriktionsansatzes 1 µl „Shrimps“ alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim GmbH) pipettiert und 20

min bei 37 °C inkubiert. Ein spezieller Puffer war für diese Reaktion nicht nötig. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Chloroform und anschließender Extraktion oder durch Erhitzen für 10 min auf 75 °C gestoppt. Nach einer Ethanolfällung konnte die DNA zur Ligation eingesetzt werden.

2.4.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende in doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Promega, Deutschland GmbH, Mannheim) wurden DNA-Fragmente ligiert. Die Ligationen wurden in möglichst wenig Volumen durchgeführt, mit einem Überschuß an Insert-DNA. Ligationen von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden erfolgten bei 16 °C und solche mit stumpfen Enden (Zugabe von 0,1 Vol. 50 %igem (v/v) Polyethylenglykols (PEG) zur Erhöhung der Viskosität) bei Raumtemperatur, jeweils über Nacht. Die Ligationsansätze konnten ohne weitere Behandlung zur Transformation eingesetzt werden.

Ein 20 µl-Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

Vektor:	3-5 µl
T4-Ligase-Puffer 10 x :	2 µl
T4-Ligase:	0,5 µl (= 1U)
Insert-DNA:	12,5-14,5 µl

2.4.6 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Amplifikation von DNA durch PCR wurde in einem Thermocycler Primus (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Für die PCR wurden die *Tag*- und die *Pfu*-Polymerase (Stratagen, Heidelberg) verwendet. Die *Pfu*-Polymerase zeichnet sich durch eine 3'- 5' Korrekturlese-Aktivität (*proof reading* Funktion) aus. Die eingesetzten Startnukleotide (Primer) wurden bei MWG Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Eine optimale Amplifikation wurde gewährleistet, wenn beide Primer den gleichen Schmelzpunkt hatten und in gleicher Konzentration vorlagen. Die Berechnung des Schmelzpunktes (T_m) erfolgte nach der Formel:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/L$$

wobei % GC-Gehalt den prozentualn GC-Gehalt des Primers angibt und L die Länge des Primers (Chester und Marshak, 1993). Der Ansatz für die PCR wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen auf Eis aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

PCR-Ansatz	Matrizen-DNA	0,5–1,0 µg
	je Primer	20–100 pmol
	dNTP-Lösung (10 mM)	2 µl
	10 x Puffer für Polymerase	10 µl
	Polymerase	1–2 U
	DMSO	10 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 100 µl

Die Reaktion erfolgte in 30 – 35 Zyklen nach folgendem Reaktionsschema:

	95 °C	10 min
Zyklus:	$\left(\begin{array}{l} 95 \text{ °C} \\ T_m - 5 \text{ bis } 10 \text{ °C} \\ 72 \text{ °C} \end{array} \right)$	$\left(\begin{array}{l} 1 \text{ min} \\ 45 \text{ sek} \\ 1 \text{ min}/1000\text{bp} \end{array} \right)$
	72 °C	10 min
	nach Beendigung Kühlung auf 4 °C	

Die DNA wurde zunächst 10 min vollständig denaturiert. Anschließend begann der Zyklus mit den Schritten Denaturierung, Anlagerung und Synthese. Der Wert für die Anlagerungstemperatur ergab sich aus der Schmelztemperatur (T_m) des Primers mit dem niedrigsten Wert abzüglich 5 bis 10 °C. Die Syntheserate der neuen DNA Stänge betrug bei der *Pfu*-Polymerase etwa 1.000 bp/min für die *Taq*-Polymerase etwa 2.500 bp/min. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde ein weiterer 10 minütiger Polymerisationsschritt angeschlossen, um der verwendeten DNA-Polymerase zu ermöglichen, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen. Die Reinigung des PCR-Amplifikats von Primern, Polymerase, dNTP's und evtl. Nebenprodukten erfolgte anschließend mit dem ‚QiaQuick PCR Purifikation Kit‘ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.4.7 Ligation von PCR Produkten in das TOPO[®]-TA Vektor-System (Invitrogen)

Mit dem TOPO TA Cloning Kit ist es möglich, ein mit der *Taq*-Polymerase amplifiziertes PCR Produkt in einem Schritt in den TOPO[®] TA Plasmid-Vektor zu ligieren. Der lineare Vektor trägt 3'-Deoxythimidine-Überhänge, die es möglich machen, ein PCR-Produkt mit Deoxyadenosine-Überhängen am 3'-Ende zu ligieren. Hierfür ist eine TopoisomeraseI des *Vaccinia* Virus kovalent an den Vektor gebunden. Diese Topoisomerase bindet an doppelsträngige DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat hinter dem 5'CCCTT-Ende des Vektors (Shuman, 1991) Durch die freigewordene Energie des abgespaltenen Phosphodiesters findet eine kovalente Bindung zwischen dem 3'-Phosphatende des gespaltenen Stranges und dem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I statt.

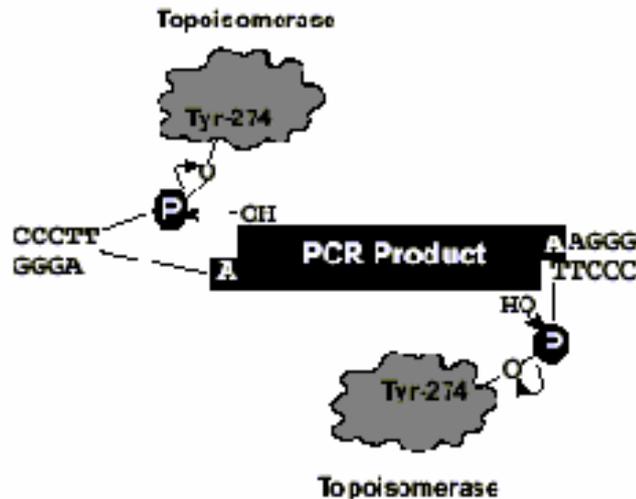


Abb. 3: Schematische Darstellung des Funktionsmechanismus des TOPO[®] TA Cloning Kits (Invitrogen).

Der Phospho-Tyrosyl-Test kann anschließend von der 5'-Hydroxylgruppe des Original Stranges angegriffen werden, was die Reaktion rückgängig macht und die Topoisomerase freisetzt (Shuman, 1994). Diese Reaktion wird ausgenutzt, um PCR-Produkte effizient zu klonieren (Abb. 3).

Um eine schnelle und effektive Klonierung amplifizierter 16S rRNA-Genen zu ermöglichen, wurde dieses Kit verwendet und dabei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.4.8 Ligation von PCR Produkten in den pDrive Klonierungs-Vektor (Qiagen, Hilden)

Der pDrive Klonierungs Vektor wird in einer linearen Form geliefert und enthält an jedem Ende einen U-Überhang, der eine spezifische Bindung mit dem PCR-Produkt möglich macht. Ebenfalls besitzt der Vektor einen T7 und einen SP6 Promotor an jeder Seite der Klonierstelle, so dass eine *in vitro* Transkription des PCR-Produktes möglich wird. Für die PCR wurde die *Tag*-Polymerase verwendet, da diese A-Überhänge an den Enden des PCR-Produkts erzeugt, die für eine anschließende Ligation in den pDrive Vektor benötigt werden.

2.4.9 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen und dem gezielten Austausch von Aminosäuren wurde der *QuikChange® Site Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Zwei synthetischen Primern, die in der Mitte die gewünschte Mutation aufwiesen und jeweils komplementär zu den antiparallelen DNA-Strängen des Vektors mit dem Ziel-Insert waren, wurden mit Hilfe der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase verlängert. Der Einbau dieser Primer erzeugte ein mutiertes Plasmid mit Strangbrüchen. Im Anschluß an die PCR wurde das parental DNA-*template* mittels *DpnI* abgedaut. Die *DpnI*-Endonuklease ist spezifisch für (halb-)methylierte DNA und damit für DNA aus fast allen *E. coli*-Stämmen, so dass die neu synthetisierte DNA, die keine Methylierung aufwies, selektioniert wurde. Die verbleibende mutierte zirkuläre DNA wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert, in dem die Strangbrüche des mutierten Plasmids repariert wurden.

2.4.10 Transposonmutagenese

Um funktionelle Gene zu identifizieren, wurde das EZ::TN™ <KAN-2> Transposon der Firma Epicentre (Madison, Wisconsin) verwendet. Das Transposon inserierte zufällig in die Ziel-DNA (*in vitro*). Mittels einer Kanamycinresistenz, die durch das Transposon vermittelt wurde, konnte die mutagenisierte DNA selektioniert werden. Die Mutagenese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Transposon enthielt ebenfalls Primerbindestellen für die Primer KAN-2 FP-1 *Forward* und KAN-2

RP-1 *Reverse* (Tab. 5). Diese Primer ermöglichten eine bidirektionale Sequenzierung des DNA-Abschnitts, in den das Transposon inseriert hatte.

Tab. 5: EZ::TNTM <KAN-2> Transposon Primer für eine bidirektionale Sequenzierung

Primer	Sequenz	T _m [°C]
KAN-2 FP-1 <i>Forward</i> Primer	5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3'	73
KAN-2 RP-1 <i>Reverse</i> Primer	5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3'	69

2.5 Transformationsverfahren

2.5.1 Hocheffiziente Transformation von *E. coli*

2.5.1.1 Herstellung von kompetenten Zellen mit Hilfe der CaCl₂ Methode

200 ml LB-Medium wurden 1 %ig (v/v) mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₉₅ von ca. 0,4 angezogen. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte die Pelletierung der Zellen bei 4 °C und 4.000 Upm für 7 min. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10 ml eiskalter CaCl₂ -Lösung und wurde anschließend für 5 min bei 4 °C und 4.000 Upm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 2 ml eiskalter CaCl₂ -Lösung resuspendiert und in 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße portioniert. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation verwendet werden oder wurden sofort bei -70 °C schockgefroren.

Calciumchloridlösung: pH 7

CaCl ₂ :	60 mM
Glycerol:	15 % (v/v)
PIPES:	10 mM

2.5.1.2 Transformation von kompetenten Zellen

Eingefrorene kompetente Zellen (200µl) wurden 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 10-150 ng DNA und vorsichtigem Mischen erfolgte eine Adsorption der DNA an die Zellen durch 30 minütige Inkubation auf Eis. Durch einen Hitzeschock für

90 sec bei 42 °C sollte die DNA in die Zellen aufgenommen werden. Anschließend wurden die Zellen für 3-5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium wurden die Zellen zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 45-60 min bei 37 °C inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmte Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz zur Selektion plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.2 Elektroporation

Durch kurze elektrische Impulse wurde die Zellmembran für DNA passierbar gemacht. Die Transformationseffizienz bei dieser Methode lag bei ca. 10^9 - 10^{10} Transformanten pro µg eingesetzter DNA. Entscheidende Parameter sind die Stärke des elektrischen Feldes, die Dauer des Pulses und die Konzentration an DNA. Dabei mußte ein Kompromiss zwischen der Erhöhung der Transformationseffizienz und dem Absinken der Lebensfähigkeit der Zellen durch höhere Feldstärken und längere Pulszeiten gefunden werden.

2.5.2.1 Herstellung „kompetenter Zellen“ für die Elektroporation

Alle Lösungen und Gefäße mußten eisgekühlt verwendet werden. Vornehmliche Aufgabe der Zellpräparation war die Beseitigung von Salzen, um die Ionenstärke der Suspension zu verringern. Die Zellpellets sollten nur äußerst vorsichtig resuspendiert werden.

500 ml Medium wurden mit 2,5 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{595} von 0,5-0,7 unter starkem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10–15 min auf Eis gelagert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 5.000 Upm im GSA-Rotor für 20 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden mit 500 ml sterilem $H_2O_{bidest.}$ gewaschen und erneut bei 5.000 Upm im GSA-Rotor für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellets wurde in 40 ml 10 % Glycerin gut gemischt und abermals abzentrifugiert (4.000 Upm, GSA-Rotor, 10 min, 4 °C). In ca. 1 Volumen 10 %igem Glycerin wurden die Zellen resuspendiert und aliquotiert (60µl). Eine Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.5.2.2 Transformation mittels Elektroporation

In einer Elektroporationsküvette wurden 0,1-1 µg DNA mit 60 µl Zellsuspension gemischt und auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2.500 V, 25 µF und 200 Ω. Die Entladungszeit sollte zwischen 3 und 5 msec liegen. Die Kontakte sollten trocken sein. Nach der Elektroporation erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium und sofortiges Umfüllen des Ansatzes in E-Cups. Die Zellen wurden für ca. 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert und anschließend 25 µl auf Selektionsmedium ausplattiert. Eine Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.5.3 Selektion rekombinanter *E. coli* Klone durch X-Gal-Test

Die verwendeten *E. coli* Klonierstämme DH5α und XL1-Blue wurden durch eine Deletion im *lacZ*-Gen gekennzeichnet und konnten daher keine aktive β-Galaktosidase mehr bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pBlueskript SK+ oder pTZ19R, die über die α-Untereinheit der β-Galaktosidase verfügen, in der sich wiederum die Multiklonierungsstelle befindet, kommt es zur Bildung eines aktiven Enzyms. Dies kann auf X-Gal und IPTG haltigen Platten sichtbar gemacht werden, auf denen das *lacZ*-Gen durch IPTG induziert wird und die β-Galaktosidase das Glukoseanalogon X-Gal spaltet, wonach durch Luftoxidation ein blauer Farbstoff entsteht. Soll in die Multiklonierungsstelle des Plasmides ein Insert ligiert werden, kann man den Erfolg der Insertion nach Transformation anhand der Kolonienfarbe sehen. Plasmide mit einer Insertion in der Multiklonierungsstelle und damit im *lacZ*-Gen können keine aktive β-Galaktosidase bilden und erscheinen weiß (Blau/Weiß-Selektion).

2.5.4 Screening auf lipolytische Aktivität

Die rekombinanten *E. coli*-Klone der Cosmid-Bank des Trinkwasserbiofilms wurden mit einem Tributyrin-Agar (s. 2.2.3) auf die lipolytische Aktivität von kurzkettigen Triglyceriden getestet. Der Agar enthielt neben LB-Medium das emulgierte kurzkettige Triglycerid Tributyrin. Die zur Hydrolyse des Tributyrins fähigen *E. coli*-Klone bildeten einen klaren Hof um die Kolonie. Für ein *Screening*

wurden die DNA-Banken auf Test-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) und dem entsprechenden Antibiotikum ausgestempelt und bei 37 °C 2 bis 5 Tage inkubiert.

2.5.5 Transduktion

Um Genbanken mit relativ großen Fragmenten (~30 kb) herzustellen, wurden Cosmidvektoren verwendet. Diese konnten, falls sie dementsprechend große Inserts trugen, *in vitro* in λ -Phagen Köpfe verpackt und in dafür geeignete *E. coli*- Stämme transduziert werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, Heidelberg) als auch ein Zwei-Komponenten-*in vitro*-Verpackungssystem verwendet. Dieses Zwei-Komponenten System bestand aus den Lysaten der Stämme *E. coli* BHB 2688 und *E. coli* BHB 2690, die nur gemeinsam die Verpackung der Ligationsansätze ermöglichten (Sambrook et al., 1989).

2.5.5.1 Herstellung des „Freeze-Thaw“ Lysates aus *E. coli* BHB 2688

Zunächst wurde ein Lysogenie-Test vorgenommen. Von einer auf LB-Platte (s. 2.2.1.) gewachsenen Einzelkolonie des Stammes *E. coli* BHB 2688 wurden Ausstriche auf zwei LB-Platten gemacht. Eine davon wurde bei 30 °C und die andere bei 42 °C inkubiert. Für weitere Arbeiten wurden solche Kolonien genommen, die ein Wachstum nur bei 30 °C zeigten. Eine 10-ml Vorkultur in LB-Medium wurde mit einer Einzelkolonie von der 30 °C- Platte angezogen und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine 500-ml Hauptkultur mit 3 ml der Vorkultur beimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 inkubiert. Die Kultur wurde bei 45 °C für 15 min in einem Schüttelwasserbad induziert und weiter bei 37 °C unter Schütteln (160-220 Upm) inkubiert. Danach wurde 1 ml dieser Kultur in ein 2-ml E-Cup überführt und einem Chloroform-Test durch die Zugabe von 1 Vol. Chloroform unterzogen. Die Lösung wurde innerhalb kurzer Zeit klar. Die Hauptkultur wurde auf Eis für 15 min abgekühlt und abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 4.000 Upm, GSA-Rotor). Das gesamte Pellet wurde in 0,8 ml frischer Saccharose-Lösung resuspendiert und auf zwei gekühlte Schraubdeckel-E-Cups verteilt. Es folgte die Zugabe von je 30 μ l frisch angesetzter Lysozym-Lösung. Nachdem die Proben durchmischt waren, wurden die E-Cups mit geöffneten Deckel zum Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff gehalten. Nach Auftauen

der Lysate auf Eis (ca. 30 min) wurden je 100 µl frisch vorbereiteter M1-Puffer zugegeben, gut gemischt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (2 °C, 1 h, 13.000 Upm) entfernt. Der Überstand wurde auf Eis in vorgekühlten E-Cups aliquotiert, in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -70 °C aufbewahrt.

M1-Puffer:

Tris-HCl (pH 7,4)	6 mM
Spermidin	30 mM
Putrescin	30 mM
MgCl ₂	18 mM
ATP	15 mM
Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)

Saccharose-Lösung:

Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
Saccharose	10 % (w/v)

Lysozym-Lösung:

Tris-HCl (pH 7,4)	250 mM
Lysozym	10 mg/ml

2.5.5.2 Herstellung des Ultraschall-Lysates aus *E. coli* BHB 2690

Der Stamm *E. coli* BHB 2690 wurde bis zur Anzucht der 500 ml Hauptkultur ebenso behandelt wie es für den Stamm *E. coli* BHB 2688 beschrieben wurde (s. oben). Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₅₇₈ von 0,2 bei 30 °C inkubiert. Es folgte eine Induktion für 15 min bei 45 °C im Wasserbad und eine Inkubation für 1,5 Std. bei 37 °C. Im Falle eines positiven Chloroform-Tests (s. 2.5.5.1) wurde die Kultur wie beschrieben abgekühlt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Ultraschall-Puffer aufgenommen und auf zwei eiskalte 2 ml E-Cups verteilt. Es folgte die Ultraschallbehandlung in einem NaCl-Eisbad. Die E-Cups wurden in die Ultraschall-Anlage (UP 200s, Dr. Hielscher GmbH) eingespannt und die Zellsuspension jeweils 30 bis 40 mal für 5 sec mit einer Amplitude von 20 bis 25 Micron beschallt. Zwischen den Beschallungen lagen jeweils 20 s Pause. Anschließend wurden die beiden Lösungen zentrifugiert (2 °C, 10 min, 7.000 Upm), um die Zelltrümmer zu entfernen. Es erfolgte

die Zugabe von je 0,6 ml M1-Puffer (s 2.5.5.1). Die Proben wurden in eiskalte E-Cups aliquotiert. Die Lysate wurden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und waren für mehrere Monate haltbar.

Ultraschall-Puffer:

Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
MgCl ₂	3 mM
Mercaptoethanol	10 mM
EDTA-Na ₂	1 mM

2.5.6 Verpackung

Zur *in vitro*-Verpackung von Ligationsansätzen (oder Konstrukten) in Cosmidvektoren wurden die bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Lysate (s. 2.5.5.1 und 2.5.5.2) oder ein Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA) auf Eis aufgetaut (für ca. 5 min) und mit dem Ligationsansatz in vorgekühlten E-Cups mit ebenso vorgekühlten Spitzen wie folgt luftblasefrei gemischt:

Ultraschall-Lysat	4 μl
„Freeze-Thaw“-Lysat	14 μl
Ligationsansatz	2 μl

Nach einer Inkubation für 2 h bei $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 500 μl SM-Puffer und 20 μl Chloroform zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 30 sec. So vorbereitete Verpackungsmixe waren mehrere Tage bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ haltbar.

SM-Puffer:

NaCl	10 mM
MgSO ₄	8 mM
Tris-HCl, pH7,5	50 mM
Gelatine	0,01 % (w/v)

2.5.7 Herstellung phagenkompetenter Zellen

Als Wirtstamm diente *E. coli* VCS 257. Von einer frisch ausgestrichenen LB-Platte wurden die Zellen in 10 ml LB-Medium mit 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM

MgSO₄ bis zu einer OD₅₉₅ von 1 angezogen. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 2.000 Upm). Das Pellet wurde zur Hälfte des ursprünglichen Volumens in 10 mM MgSO₄ aufgenommen. Die Suspension wurde weiter bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 verdünnt, um die Infektion durchzuführen.

2.5.8 Titerbestimmung

Der Verpackungs-Mix wurde 1:5, 1:10 und 1:50 mit SM-Puffer (s.o.) verdünnt und davon jeweils 25 µl mit 25 µl kompetenten Zellen (OD₅₉₅ = 0,5) vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 22 °C wurden je 200 µl LB-Medium hinzugegeben. Die Proben wurden für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf LB-Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert. Um die Bank anzulegen, wurde die effektivste Verdünnung verwendet.

2.6 Sequenzierung und Analyse der Sequenzen

Die Sequenzierungen der Plasmid- und Cosmid-DNA wurden, nach Bereitstellung der hochreinen DNA (s. 2.4.4.3), vom Laboratorium für Genomanalyse (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen) durchgeführt. Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden und Cosmiden wurde an ABI PRISM337 Geräten (Applied Biosystems, Weiterstadt) oder am MegaBACE 1000 System (Amersham Bioscience, Molecular Dynamics) mit dem firmeninternen Verfahren durchgeführt.

Mit dem Programm Artemis, das im Internet angeboten wird, konnten die offenen Leserahmen ermittelt werden, ebenfalls konnten mit diesem Programm Proteinsequenzen abgeleitet werden. Die Auswertung der Sequenzdaten wurde mit dem im Internet angebotenen Service von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Die Analyse der 16S rDNA-Sequenzen und die Erstellung von Stammbäumen erfolgte mit Hilfe des Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

2.7 Herstellung von Protein-Rohextrakten

2.7.1 Zellaufschluß mit der „French pressure cell“

Diese Methode eignet sich, um größere Zellkulturvolumina aufzuschließen, wobei der Aufschluß der Zellen in der „French pressure cell“ (American Instrument Company, Silver Spring, USA) dadurch erfolgt, dass die Zellsuspension zunächst einem Druck von 6,9 MPa ausgesetzt wird, der absinkt, wenn ein kleines Ventil geöffnet wird und die Zellen hindurchgepreßt werden. Der plötzliche Druckabfall bewirkt das Platzen und somit die Lyse der Zellen. Das zähflüssige Lysat wird aufgefangen und zentrifugiert, wobei Zelltrümmer sedimentieren und von dem cytoplasmatischen Überstand getrennt werden. Der Überstand mit löslichen, intrazellulären Proteinen wird als Rohextrakt bezeichnet.

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurde *E. coli* über Nacht in 100 ml - 2 l LB-Medium bei 37 °C auf einem Schüttler angezogen. Die Zellen wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 10.000 Upm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 5-10 ml Tris-Puffer resuspendiert. Die Zellen konnten mit Hilfe einer French-Press in einer gekühlten Druckzelle in zwei oder drei Durchgängen aufgeschlossen werden. Das Lysat wurde 30 min zentrifugiert (10.000 Upm und 4 °C) und der Proteinextrakt bei -20 °C gelagert.

Tris-Puffer:

Tris-HCl:	50 mM
NaCl:	100 mM
MgSO ₄ :	100 mM
pH 7,4	

2.7.2 Zellaufschluß durch Ultraschall

Kleinere Kulturvolumina (bis 5 ml) wurden durch Ultraschallaufschluß unter Verwendung einer Ultraschall-Sonde (Ultraschallprozessor UP 200S, 24 kHz, 200 W, Fa. Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Sonotrode S2, 2 mm) lysiert. Die Zellsuspension wurde in einem E-Cup auf Eis 5 x 45 sec. beschallt (50 %ige Amplitude, Cycle 0,5), wobei zwischen zwei Beschallungen jeweils eine Kühl-Pause von 15 sec. eingelegt wurde. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer erfolgte bei 13.000 Upm für 15 min. in

einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Kendro, Osterode). Der Überstand wurde in ein neues E-Cup überführt.

2.8 Proteinaufreinigung durch Immobilisierte Metal Ionen Affinitäts Chromatography (IMAC)

Die in *E. coli* BL21 (DE3) exprimierte potentiellen Esterasen sollte aufgrund der 6 C-terminalen Histidinreste mittels des Protino® Ni *prepacked columns kit* von Machery-Nagel aufgereinigt werden. Je nach Größe der Anzucht wurden Protino® Ni 1000 *prepacked* Säulen oder Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen verwendet. Die Säulen waren mit Protino® Ni Silica Resin gepackt, das sich zwischen zwei Filtern befand. Auf die Silica-Perlen sind Metal-Chaletoren mit gebundenem Ni²⁺ aufgelagert. Durch die Interaktion des Histidinrestes des rekombinanten Proteins mit dem immobilisierten Ni²⁺ Ionen kam es zu einer Bindung des Proteins an die Säule. Die Chalet Gruppe des Protino® Ni Resin basierte auf TED (Tris(carboxymethyl)ethylendiamin), einem starken Metal Chelator, der fünf von sechs Bindestellen der Ni²⁺ Ionen besetzte. Die sechste Bindstelle blieb für die Bindung des rekombinante Proteins zugänglich. Die Chaletisierung mit dem TED sollte, im Vergleich zu anderen Chelat Gruppen wie z.B. NTA (Nitrilotriessigsäure), eine Metallauswaschung während der Aufreinigung minimalisieren und die Spezifität des Histidin markierten Proteins erhöhen. Das Protein konnte, nachdem unerwünschte Proteine von der Säule gewaschen wurden, mit Imidazol von der Säule eluiert werden. Anzucht und Aufschluß der Zellen sowie die Aufreinigung über die Säule erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.9 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

2.9.1 Geräte und Säulen

Allgemeine Regeln beim Umgang mit der FPLC:

- Proben vor dem Auftragen auf eine Säule immer durch Filtration (0,2 µm bzw. 0,45 µm Porenweite) oder hochtouriger Zentrifugation partikelfrei machen.
- Sämtliche Laufmittel und Puffer vor Gebrauch ebenfalls filtrieren.

- Individuelle Parameter der Säulen bezüglich der Bindungskapazität, optimale Flußrate, Rückdruck, chemische und physikalische Stabilität sowie Regenerierung beachten (siehe Begleitblätter).
- Säulen in 20 % (v/v) Ethanol lagern; direkte Umpufferung der Säulen von 20 % (v/v) Ethanol zu einem salzhaltigen Eluenten oder umgekehrt vermeiden, dazwischen mit H₂O_{bidest.} spülen.
- Besonders wichtig für die Gelfiltration ist das „drop to drop“ Verbinden der Anschlüsse, um das Eindringen von Luft in das System zu verhindern.

2.9.2 Gelfiltration

Bei dieser nicht adsorptiven Methode erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe. Größeren Molekülen steht ein vergleichsweise kleines Verteilungsvolumen in der jeweiligen Gelmatrix zur Verfügung, so dass sie früher als kleinere Proteine eluieren. Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200 High Load 16/60 – Säule verwendet. Empfohlen wird für diese Säule eine Flußrate von 10-50 cm/h bei maximal 0,3 MPa Rückdruck.

Molekularmassenbestimmung eines Proteins: Da das Elutionsvolumen mit der Größe des jeweiligen Proteins korreliert, kann die Gelfiltration nicht nur als Reinigungsschritt, sondern auch zur Molekülmassenbestimmung herangezogen werden. Hierzu wurde der Verteilungskoeffizient ermittelt K_{av} eines Proteins ermittelt

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

V_t = gesamtes Säulenvolumen

V_o = Ausschlußvolumen der Säule

V_e = Elutionsvolumen des Proteins

Durch Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Eichproteinen, Ermittlung des jeweiligen Verteilungskoeffizienten und Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekularmasse gegen den K_{av} -Wert, konnte eine Eichgerade erstellt werden, aus der die Molekularmasse eines beliebigen Proteins anhand seines Verteilungskoeffizienten errechnet wurde.

2.10 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die quantitative Proteinbestimmung wurde basierend auf der Methode von Bradford (1976) mit dem BioRad Protein Assay durchgeführt. In diesem Test nutzt man die Interaktion der in phosphorsaurem Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 mit den positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Durch die Bindung an das Protein wird die rotbraune Leuko-Form in die intensiv blau gefärbte Form des Farbstoffes überführt, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa 1 µg Protein pro Ansatz, außerdem werden nur Polypeptide mit einem Molekulargewicht über 3.000 Da erfasst.

1 ml Farbstofflösung wurde im Reagenzglas vorgelegt und 20 µl Probe dazugegeben und gevortext. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Ansatz ohne Protein in einer Einmalküvette im Photometer (vorher wurde erneut gemischt) gemessen. Eine direkte Korrelation zwischen OD und Proteinkonzentration war nur im Linearitätsbereich der Eichkurve gegeben. Proben, die über dem linearen Bereich lagen, mußten mit H₂O_{bidest.} verdünnt werden. Zur Ermittlung einer Eichgeraden wurde eine BSA-Stammlösung (10 mg/ml) hergestellt. Aus einer 1:10-Verdünnung der Stammlösung wurden verschiedene Konzentrationen von 0-20 µg BSA mit je 20 µl H₂O_{bidest.} vermischt und in 1 ml Farbstofflösung nach 10-minütiger Inkubation (RT) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Eine Eichgerade erhielt man durch graphische Auftragung der OD₅₉₅ gegen die Proteinkonzentrationen. Die Proteinkonzentration einer unbekanntem Lösung ließ sich direkt durch Multiplikation ihrer Extinktion mit dem inversen Steigungsfaktor der Geraden ermitteln.

Lösungen:

- Biorad „Protein Assay Kit“: Farbstoffkonzentrat (Coomassie Brilliant Blue G-250 in Phosphorsäure und Methanol; 5fach konzentriert)
- Protein-Standard BSA (Bovine Serum Albumin)

2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (modifiziert nach Laemmli, 1970)

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden alle Proteine durch die Einlagerung des amphipatischen, negativ geladenen SDS (Natriumdodecylsulfat)

denaturiert und mit einer identischen Ladungsdichte versehen. Dies folgt aus der Einlagerung eines SDS-Moleküls pro 2 Aminosäuren, so dass die negative Gesamtladung der Größe des Proteins proportional ist. Durch die identische Ladungsdichte ist nun eine Auftrennung der Proteine nach der Masse in einem Polyacrylamid-Netzwerk möglich. Für die Elektrophorese wurde eine Minigel-Elektrophorese-Kammer verwendet. Es wurden ausschließlich diskontinuierliche Gele gegossen, die aus einem Trenngel und einem darüber liegendem Sammelgel bestanden, was zu einer besseren Auftrennung der Proben führte. Für die Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich ist der Vernetzungsgrad des SDS- Gels entscheidend. Proteine mit einer Masse von 10.000- 180.000 Da werden in einem 10 %igen Gel am effektivsten getrennt. In einem Massenbereich von 30.000 bis 250.000 empfiehlt sich eher ein 7,5 %iges Gel.

Lösungen:

Acrylamid- Stammlösung (AA):

Acrylamid	30,0 g
Bisacrylamid	0,8 g
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

durch einen Faltenfilter filtrieren und lichtgeschützt bei 4 °C lagern
(lag als 40 %ige Fertiglösung vor, (Biomol))

Trenngel- Stammlösung:

Tris	18,2 g
SDS	0,4 g
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml
pH 8,8	

Sammelgel- Stammlösung (SG):

Tris	6,1 g
SDS	0,4 g
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

10 x Elektrophorese- Puffer :

Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
pH 8,4	

4 x Probenpuffer:

Glycerin	7,5 ml
β- Mercaptoethanol	2,5 ml
SDS	1,2 g
Bromphenolblau (2%)	0,5 ml
Tris	0,4 g
H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml

Ammoniumpersulfat (APS):

10 % in H₂O_{bidest}

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)Gelherstellung:

Für ein Gel wurden je eine große und eine kleine Glasplatte mit 70 %igem Ethanol gereinigt und mit dazwischenliegenden Abstandhaltern in eine Gelapparatur eingesetzt. Danach wurde das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten gegossen und vorsichtig mit H₂O überschichtet, um eine gerade Geloberfläche zu erhalten. Nach mindestens 45 minütiger Polymerisation des Trenngel wurde das Wasser mit saugfähigem Papier entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Sofort danach wurde der Kamm luftblasenfrei eingesetzt und das Gel konnte nach dem Auspolymerisieren und Ziehen des Kammes für die Gelelektrophorese verwendet werden. Bei zwei Gelen wurden die Proben konstant bei 40 mA eingezogen. Die Elektrophorese wurde schließlich konstant bei 60 mA durchgeführt (Bei einem Gel mit 20 mA einziehen und bei 30 mA die Elektrophorese durchführen).

Tab. 6: Pipettierschema (ausreichend für 2 Gele):

Lösung	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
AA	2,0 ml	0,4 ml
TG	2,0 ml	--
SG	--	0,96 ml
H ₂ O _{bidest.}	4,0 ml	2,64 ml
TEMED	6 µl	4 µl
APS max.	60 µl	30 µl

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden, sofern nicht anders angegeben, 1:4 mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen mindestens 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert.

2.11.1 Molekularmassenbestimmung von Proteinen in SDS-Gelen

Bei der Elektrophorese von Proteinen wurden Marker mit definierten Molekularmassen mit auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Wanderungsstrecken der verschiedenen Proteine konnten gegen den dekadischen Logarithmus ihre Molekülmassen aufgetragen werden. Aus der so erhaltenen Eichgerade wurde die Molekularmasse eines mit aufgetragenen unbekanntes Proteins ermittelt. Verwendet wurden der „High Molecular Weight Standard Mixture“ Stock No. SDS-6H (Sigma)

„High Molecular Weight Standard Mixture“:

Markerproteine:	Molekularmasse [Da]
Myosin, Kaninchenmuske	205.000
β-Galatosidase, E.coli	116.000
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97.400
Albumin, Rind	66.000
Albumin, Hühnerei	45.000
Carboanhydrase, Rinder- Erythrocyten	29.000

Für SDS-Polyacrylamidgele, die anschließend zum Protein-Transfer im Western-Blot eingesetzt wurde, wurde der Proteinstandard „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“ der Firma GibcoBRL eingesetzt.

2.12 Färbung von Proteinen

2.12.1 Coomassie-Färbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele mit Coomassie-Blue-Färbelösung versetzt und ca. 30 min lang auf einer Laborwippe leicht geschwenkt. Entfärbt wurden die Gele mit einer Entfärberlösung, die mehrmals gewechselt wurde, solange bis der Hintergrund der Gele farblos war. Die Gele wurden bis zum Trocknen mit dem BIORAD Gelrockner in $H_2O_{\text{dest.}}$ aufbewahrt.

Färbelösung:

Coomassie Blue R-250:	1 g/ 0,1 % (w/v)
Methanol 100 % (v/v):	400 ml
Essigsäure 100 % (v/v):	100 ml
$H_2O_{\text{dest.}}$:	500 ml

Entfärberlösung:

Methanol 100 % (v/v):	400 ml
Essigsäure 100 % (v/v):	100 ml
$H_2O_{\text{dest.}}$:	500 ml

2.12.2 Proteinfärbung mit Ponceau S Rot

Diese Methode konnte zur schnellen, reversiblen Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose-Blotmembranen genutzt werden. Hierbei wurde die geblottete Membran (s. 2.13) 10 min mit Ponceau S gefärbt (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 %iger Trichloressigsäure (w/v)). Nach dem Färbeschritt konnte die Membran durch Spülen unter Wasser langsam entfärbt werden.

2.12.3 Aktivitätsfärbung lipolytischer Enzyme (Sommer et al., 1997)

Der Nachweis der lipolytischen Aktivität rekombinanter Proteine erfolgte nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. Das Testsystem beruht auf der Umsetzung des in den Lipaseaktivitäts-Testagar emulgierten Triglycerids (Tributyrin) zu Glycerin und freien Fettsäuren. Die Substrathydrolyse führt zur Aufklärung des weißlichen Testagars. Nach der SDS-PAGE (s. 2.11) wurde das SDS-Polyacrylamidgel 20 min in 20 % (v/v) Isopropanol und zweimal 10 min in H₂O_{dest.} gewaschen. Anschließend wurde es auf dem Lipaseaktivitäts-Testagar für 16 h bei RT inkubiert.

Lipaseaktivitäts-Testagar:

Tris:	20 mM
CaCl ₂ :	5 mM
Triglycerid:	1 % (v/v)
Agar:	1,5 % (w/v)
pH 8,0	

2.13 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot; Towbin et al., 1979)

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE konnten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau eines Western-Blots: Die Übertragung erfolgte dabei elektrophoretisch unter Verwendung einer Western-Blot-Kammer nach dem Semi-Dry-Verfahren. 6 Lagen Whatmanpapier und eine Nitrocellulosemembran (Fa. Sartorius AG, Göttingen) wurden, nachdem sie auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren, zusammen mit dem SDS-Gel in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurden auf die Anodenplatte in folgender Reihenfolge 3 Lagen Whatmanpapier, die Nitrocellulosemembran, das Gel und wiederum 3 Lagen Whatmanpapier, jeweils unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Danach rollte man mit einer Glaspipette mehrmals über den Stapel, um überschüssigen Transferpuffer mit saugfähigem Papier zu entfernen, legte die Kathodenplatte auf und beschwerte die Apparatur mit einem Gewicht (etwa 1 kg). Nach Anschluß an ein Netzgerät (Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia, Freiburg)

wurden die Proteine bei konstanter Spannung und beginnend mit 5 mA/cm^2 Membranfläche solange übertragen, bis die Stromstärke auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes abgesunken war (nach ungefähr 20 min).

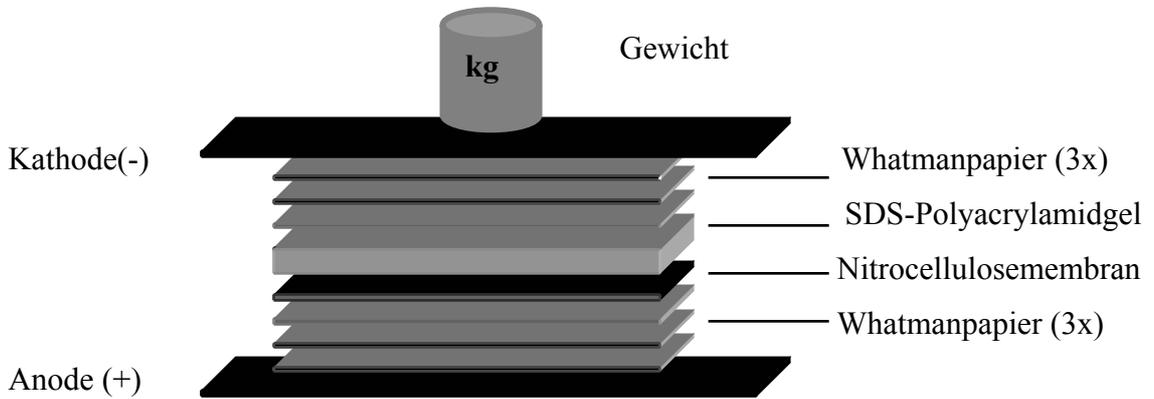


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Western-Blots

Transferpuffer:

Tris (125 mM)	15,14 g
Glycin (192 mM)	14,40 g
Methanol, 100 % (v/v)	200 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH 8,6	
Lagerung bei 4 °C.	

2.14 Nachweis von Proteinen mit aufeinanderfolgenden Histidinen

Proteine mit mindestens fünf aufeinanderfolgenden Histidinresten in ihrer Aminosäuresequenz können durch spezifische Antikörper (Polyklonaler Anti-His-Tag Kaninchen-Antikörper der Firma MoBiTec, Göttingen) nachgewiesen werden. Dazu wurde die Western-Blot-Membran zunächst 2 x 10 Minuten in 1 x TBS-Puffer gewaschen und dann für 1h bis ü.N. in Blockierungs-Puffer (TBST mit 3 % (w/v) BSA) inkubiert, um alle unspezifischen Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurde 3 x 10

Minuten in 1 x TBST-Puffer gewaschen, um die Membran danach 1 Stunde lang mit dem primären Penta-His-Antikörper (~1:5000 in TBST-Puffer) inkubieren lassen zu können. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde 3 x 10 Minuten lang mit TBST-Puffer gewaschen. Der sekundäre, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper (Anti-Rabbit-IgG-AP der Firma SIGMA) wurde 1:2.500 in TBST-Puffer aufgenommen und konnte während einer 30-minütigen Inkubation an die bereits spezifisch gebundenen primären Antikörper binden. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer (3 x 10 Minuten) erfolgte schließlich die Detektion.

TBS-Puffer:

Tris: 100 mM
NaCl: 0,9 % (w/v)
pH 7,5

TBST-Puffer:

Tris: 100 mM
NaCl: 0,9 % (w/v)
Tween-20: 0,1 % (v/v)
pH 7,5

Blockierungs-Puffer:

3 % BSA in TBS-Puffer

2.14.1 Detektion

Proteine mit konjugierter alkalischer Phosphatase (AP), wie zum Beispiel der während dieser Arbeit als sekundäre Antikörper eingesetzte Anti-Kaninchen-IgG-AP (s. 2.14), konnten durch Zugabe einer Färbelösung sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Membranen, auf der sich die indirekt gebundenen und AP gekoppelten Proteine befanden, 3 min in Detektionspuffer äquilibriert. Nach Zugabe der BCIP/NBT Färbelösung zur Membran wurde solange im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert, bis Signale in Form von dunkelbraunen präzipitiertem Substrat zu erkennen waren. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit Leitungswasser gestoppt.

Detektionspuffer:

Tris-HCl: 100 mM
 NaCl: 100 mM
 pH 9,5

Färbelösung:

NBT-Lösung: 66 µl
 BCIP-Lösung: 33 µl
 Detektionspuffer: ad 10 ml

Die Färbelösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt, wobei 10 ml für eine Membran eingesetzt wurden.

NBT-Lösung: 75 mg/ml NBT in 70%-igem Dimethylformamid

BCIP-Lösung: 50 mg/ml BCIP in Dimethylformamid

2.15 Bestimmung von Enzymaktivitäten2.15.1 Bestimmung der Esteraseaktivität

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität wurden para-Nitrophenyl-Acylester verwendet. Die enzymatische Abspaltung des p-Nitrophenol konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm nachgewiesen werden.

<u>Lösung A:</u>	KP _i -Puffer	100 mM
	Mg ₂ SO ₄	10 mM
	pH 7,2	

<u>Lösung B:</u>	p-Nitrophenyl-Caproat*	25 mg
	Ethanol	5 ml

*oder ein anderer p-Nitrophenyl-Acylester in gleicher Menge

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden Lösung A (100 ml) und Lösung B (5 ml) gemischt. Die Substratemulsion ist bis zu 2 Stunden stabil (Autohydrolyse) und wurde bis zu der jeweiligen Messung im Dunkel aufbewahrt. Nach Zugabe des Enzyms zu 1,5

ml der vorgewärmten Emulsion erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C. Danach wurde die Hydrolyse durch Messung der Extinktion bei 410 nm (Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt. Als Referenz diente ein Ansatz ohne Enzym.

2.15.2 Bestimmung der Substratspezifität

Die Substratspezifität wurde durch die Verwendung anderer p-Nitrophenyl-Acylester (-Acetat, -Butyrat, -Valerat, -Octanoate, -Decanoate und -Palmitat) in gleicher Menge und den gleichen Testbedingungen (s. 2.15.1) untersucht.

2.15.3 Bestimmung der Substratspezifität

Die Enzymaktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Esterase EstA3 wurden in dem Bereich zwischen 4 °C und 70 °C nach der unter 2.15.1 beschriebenen Methode gemessen. Für den Enzymtest wurden 0,01-0,02 µg der rekombinante Esterase eingesetzt. Der verwendete Testansatz wurde vorher auf die entsprechende Inkubationstemperatur gebracht. Bezogen auf die höchste gemessene Aktivität erfolgte die Angabe der Aktivitätswerte als relative Enzymaktivitäten.

2.15.4 Bestimmung des Thermostabilität

Die Thermostabilität von EstA3 wurde unter Abwesenheit des Substrates über den Zeitraum von 60 min zwischen 37 °C und 60 °C bestimmt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden dem Testansatz Aliquots entnommen und die Enzymaktivitäten, wie unter 2.15.1 beschrieben, bei dem zuvor bestimmten Temperaturoptimum (s. 2.15.2) gemessen. Als Referenz diente ein nicht vorinkubierter Testansatz. Die Aktivität wurde als relative Aktivität angegeben, bezogen auf den ersten gemessenen Wert der jeweiligen Vorinkubationstemperatur.

2.15.5 Bestimmung des pH-Optimums/Stabilität

Zur Bestimmung des pH-Optimums bzw. der Stabilität von Lipasen/Esterasen wurde ein Titrator vom Typ Metrohm, 718 STAT Titrino verwendet. Zur Messung wurden 20 ml Puffer (2,5 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 6,9) unter Rühren konstant auf 37 °C gebracht und 5 ml des ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten Puffers wurden mit dem jeweiligen Lipasesubstrat versetzt (geschüttelt oder bei Bedarf emulgiert) und mit dem Gesamtansatz vereinigt. Die Substratsuspension wurde auf pH 7,0 titriert. Die Autohydrolyse des Substrats und die Entstehung der entsprechenden Fettsäuren wurde durch die automatische Gegentitration von 0,01 M NaOH bei konstantem pH Wert 7,0 über 2 min dokumentiert und diente als Kontrolle. Anschließend wurde Enzym (in 10 mM Tris/HCl) hinzugefügt und der Verbrauch von 0,01 M NaOH über einen Zeitraum von 4 min dokumentiert. Über den Verbrauch an NaOH ließ sich der Substratumsatz in U/mg eingesetzten Enzyms errechnen.

Zur Bestimmung der pH-Stabilität wurden die Puffer jeweils auf die unterschiedlichen pH-Werte titriert.

2.15.6 Einfluss verschiedener Salze und EDTA auf die Enzymaktivität

Für die Untersuchung des Einflusses von Metallionen auf die Aktivität der Esterase wurden Lösungen mit einer Endkonzentration von 0,5 mM – 10 mM der verschiedenen Metallchloride verwendet. Die verwendeten Konzentrationen wurden an den entsprechenden Stellen vermerkt. Für den Aktivitätstest (s. 2.15.1) wurde statt KP_i -Puffer Tris-Puffer (20 mM, pH 8,0) verwendet. Aufgrund der Färbung einiger Salzlösungen wurde die Enzymaktivität jedes Ansatzes mit einer eigenen Nullprobe mit dem entsprechenden Salz gemessen.

2.15.7 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Enzymaktivität

Um den Einfluß verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Aktivität von EstA3 zu untersuchen, wurde das Enzym mit dem entsprechenden Lösungsmittel bei 30 °C über den Zeitraum von 60 min inkubiert und anschließend die Restaktivität des Enzyms gemessen (s. 2.15.1). Die Lösungsmittel wurden in einer Konzentration von 15

% und 30 % eingesetzt. Als Referenz diente ein Ansatz ohne den entsprechenden Lösungsmitteln.

III. Ergebnisse

Aktuellen Schätzungen zu Folge konnten bisher mit klassischen Labormethoden nur etwa 1 % aller in der Natur vorkommenden Mikroorganismen kultiviert werden (Amann et al., 1995). In den bisher nicht kultivierten Mikroorganismen steckt daher ein unerschöpfliches Reservoir an genetischer Information, das für das Verständnis ökologischer und physiologischer Zusammenhänge in mikrobiellen Konsortien von großer Bedeutung ist. Um dieses Potential zu erschließen, wurden in den vergangenen Jahren Methoden entwickelt, mit denen versucht wurde, die Gesamtheit aller in einem Habitat vorkommenden Genome, die sogenannten Metagenome (Handelsman et al., 1998), zu erfassen. Dazu wurde die DNA direkt aus den Umweltproben isoliert und in Genbanken angelegt. Der Vorteil der Metagenomik besteht darin, dass die gesamte DNA eines beliebigen Habitats erfasst wird, ohne von der Kultivierung einzelner Organismen abhängig zu sein.

3.1 Phylogenetische Analyse des Model-Biofilms

3.1.1 Isolierung der Biofilm-DNA

Die DNA wurde aus drei Biofilmproben (BioI, BioII und BioIII) von unterschiedlichen Trinkwasserschiebern gesammelt und wie unter 2.4.4.1 beschrieben isoliert. Für die folgenden Untersuchungen wurden diese drei DNA-Proben gepoolt.

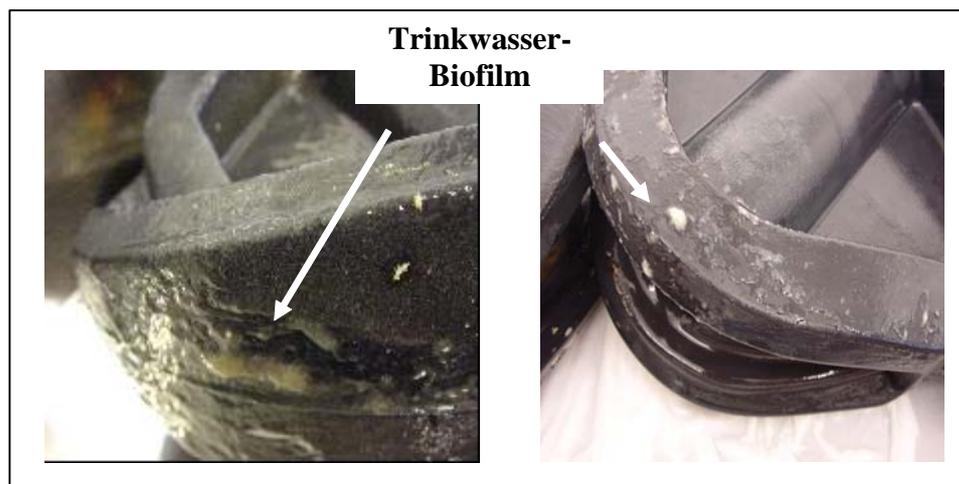


Abb. 5: EPDM beschichtete Trinkwasserschieber, die von Biofilmen bewachsen sind.

3.1.2 Klonierung der 16S rRNA-Gene aus der Biofilm-DNA

Die 16S rRNA-Gene sind ca. 1.520 bp groß und sollten unter Verwendung universeller Primer, die in Tabelle 7 angegeben sind, aus der Gesamt-DNA des Biofilms mittels PCR amplifiziert werden. Mit dem Primer-Paar 616V und 1492R wurden die bakteriellen 16S rRNA-Gene amplifiziert. Die Primer 23FPL und 927R richteten sich gegen archeale 16S rRNA-Gene, diese konnten in dem Trinkwasser-Biofilm jedoch nicht nachgewiesen werden. Mit den Primern E4 und E1688 sollten eukaryontische 18S rRNA-Gene amplifiziert werden, aber auch diese waren in der gepoolten Biofilm-DNA nicht nachweisbar.

Tab. 7: Verwendete Primer zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene des Trinkwasser-Biofilms

Bezeichnung	Ziel-Gruppe	Primersequenz	T _m [°C]	Referenz
616V	Bacteria	5'-AGA GTT TGA T(CT)(AC) TGG CTC AG-3'	55	Juretschko et al., 1998
1492R	Bacteria	5'-CGG (CT)TA CCT TGT TAC GAC-3'	55	Kane et al., 1993
GM1F	Bacteria	5'-CCA GCA GCC GCG GTA AT-3'	58	Muyzer et al., 1993
23FPL	Archaea	5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG A(CT)C TGG T(CT)G AT(CT) CTG CC -3'	> 75	Barns et al., 1994
927R	Archaea	5'-CC(GC) TTG TGG TGC TCC C-3'	57	Barns et al., 1994
E4	Eucarya	5'-CTG GTT GAT TCT GCC AGT-3'	54	Van Hannen et al., 1999
E1688	Eucarya	5'-CGA CGG GCG GTG TGT A-3'	57	Van Hannen et al., 1999

Für die PCR wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Die *Taq*-Polymerase erzeugt Desoxyadenosin Überhänge an den 3'-Enden, die für eine weitere Klonierung in das TOPO-System (Abb. 3) notwendig waren. Die entstandenen PCR-Produkte, die sich aus den 16S rRNA-Genen unterschiedlicher prokaryontischer Organismen des Trinkwasser-Biofilms zusammensetzten, wurden auf einem 0,8 % Agarose-Gel überprüft und, wie unter 2.4.4.5 beschrieben, aus dem PCR Ansatz gereinigt. Die amplifizierten 16S rRNA-Gene aus dem Trinkwasser-Biofilm wurden entsprechend der Anleitung des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen) in den TOPO-Vektor kloniert (s. 2.4.7) und

anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die so erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein der klonierten 16S rRNA-Gene stichprobenartig überprüft. Positive Klone wurden anschließend mit dem Primer GM1F sequenziert (Tab. 7). Durchgeführt wurden die Sequenzierungen vom Labor für Genomanalyse (LGA, Göttingen).

3.1.3 Sequenzanalyse der 16S rRNA-Klone

Die 16S rRNA-Gene von 650 Klonen wurden sequenziert und mit den vorhandenen Sequenzen in der Datenbank des *Ribosomal Database Projekt* (RDP; Larsen et al., 1993) verglichen. Aus den 650 Sequenzen konnten 81 unterschiedliche Klone identifiziert werden, wobei Klone als unterschiedlich angesehen wurden, deren Ähnlichkeit sequenzbasierend unter 97 % lag. Die Verteilung der 81 Klone in die unterschiedlichen Bakteriengruppen ist in Tabelle 8 dargestellt. 70 % der 81 16S rRNA-Klone konnten dabei der Gruppe der Proteobakterien zugeordnet werden. 36 % der sequenzierten 16S rRNA-Klone wurden den β -Proteobakterien zugeordnet, 28 % den α -Proteobakterien und 19 % γ -Proteobakterien. Drei der identifizierten Klone waren den δ -Proteobakterien am ähnlichsten. Die 11 verbleibenden Klone fanden ihre nächsten Verwandten in anderen Gruppen, wie der *Cytophaga-Flavobakterium-Bakteroides*-Gruppe (CFB-Gruppe), den Acidobakterien und den Actinobakterien. Ebenfalls wurde ein Gram-positiver Klon gefunden, sowie zwei Klone, die höchste Ähnlichkeit zu bisher nicht identifizierten Mikroorganismen aufwiesen. Mit Hilfe des Programms zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen (Phylip; Version 3.5) wurde aus den partiell sequenzierten 16S rRNA-Genen, unter Einbezug der nächsten Nachbarn, ein Stammbaum erstellt, der die Vielseitigkeit des Biofilm-Konsortiums darstellt (Abb. 6). In Abbildung 6 wird deutlich, dass es sich bei dem mikrobiellen Trinkwasser-Biofilm um eine sehr diverse Gemeinschaft handelte. Das Konsortium wurde von keiner Bakteriengruppe dominiert. In der Gruppe der β -Proteobakterien wurden besonders hohe Ähnlichkeiten zu Bakterien der Gattung *Aquabakterium* und *Acidovorax* gefunden. Unter den α -Proteobakterien waren die 16S rDNA-Klone zu *Sphingomonas*, *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* sehr ähnlich. In der Gruppe der γ -Proteobakterien wurden als nächste Verwandte zu den sequenzierten 16S rDNA-Klonen hauptsächlich *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und auch *Legionella* gefunden.

Tab. 8: Phylogenetische Einteilung der unterschiedlichen^a 16S rDNA-Klone, die aus dem Trinkwasser Biofilm gewonnen wurden.

Bakterien Gruppen	Anzahl der Klone	prozentuale Verteilung (%)
Total	81	100
Proteobakterien	70	86
Alpha-Untereinheit	23	28
Beta-Untereinheit	29	36
Gamma-Untereinheit	15	19
Delta-Untereinheit	3	4
Andere Gruppen	11	14
Actinobakterien	1	1,2
Niedriger G+C-Gehalt, Gram positiv	1	1,2
<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>	4	4,9
Acidobakterien	3	3,7
Unklassifizierte Bakterien	2	2,5

^a Klone wurden als unterschiedlich behandelt, wenn ihre Ähnlichkeit auf DNA Ebene weniger als 97 % betrug. Insgesamt wurden 81 unterschiedliche Klone identifiziert, die aus der Analyse von 650 16S rRNA-Klonen hervorgingen.

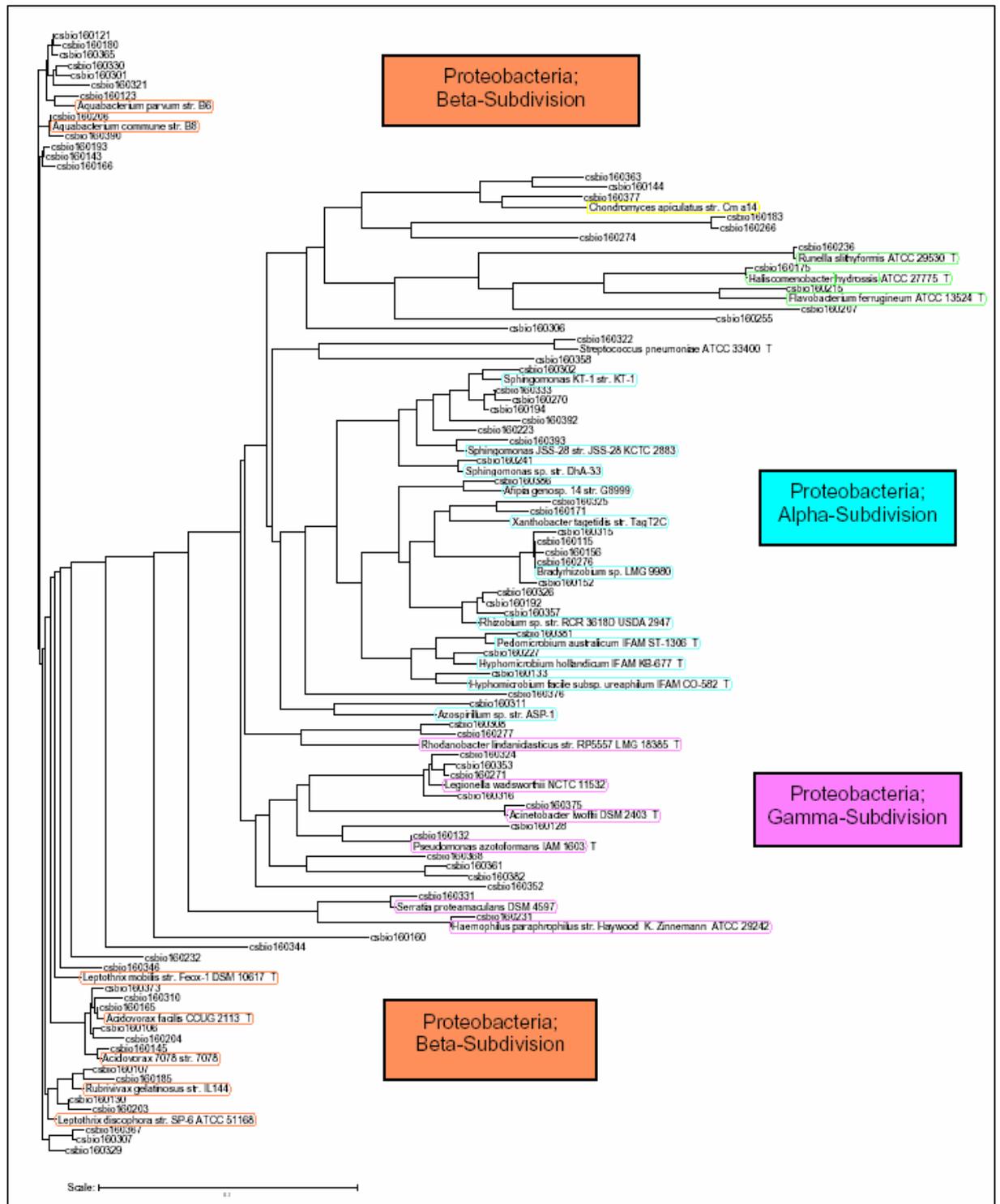


Abb. 6: Phylogenetische Analyse des Trinkwasser-Biofilms durch Sequenzierung der 16S rRNA-Gene. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der *neighbour-joining* Methode erstellt (Maidak et al., 2001) mit dem Kimura 2-Parameter Model für Nukleotidaustausche. Die Abbildung zeigt 81 unterschiedliche 16S rRNA-Klone (**abio** und **gbio**) mit ihren phylogenetisch nächsten Verwandten. Im Anhang sind die Stammbäume zu den Proteobakterien nochmals einzeln dargestellt.

3.2 DNA-Sequenzanalyse des Biofilm-Metagenoms

Aus der Analyse der 16S rRNA-Gene des Trinkwasser-Biofilms gingen 81 unterschiedliche Spezies hervor. Bei einer durchschnittlichen Genomgröße von 6 Mb würde dies einer Gesamtgröße des Metagenoms von ca. 486 Mb entsprechen. Um einen ersten Einblick in das genetische Potential zu erlangen und eine Aussage über die mikrobielle Ökologie sowie die Stoffwechselfähigkeit dieses Trinkwasser-Konsortiums machen zu können, wurden Plasmid-Genbanken der Metagenom-DNA angelegt und die klonierten DNA-Fragmente sequenziert und analysiert.

3.2.1 Konstruktion von Plasmid-Banken

Für das Anlegen der Plasmid-Genbanken sollten DNA-Fragmente von 1 bis 5 kb kloniert werden. Hierzu wurde die Gesamt-DNA des Biofilms zunächst mit dem Restriktionsenzym *Bsp143I* partiell verdaut (s. 2.4.5.2). Die verdaute DNA wurde in einem 0,8 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend DNA-Fragmente in der Größenordnung von 1-5 kb aus dem Gel eluiert (s. 2.4.4.5). Die verdaute und gereinigte DNA wurde zur Ligation (s. 2.4.5.4) in den zuvor mit *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten (s. 2.4.5.3) Plasmid-Vektor pTZ19R eingesetzt. Nach erfolgter Transformation in *E. coli* XL1 blue (s. 2.5.1.2) wurden die Transformanten zur Selektion auf LB-Chloramphenicol-Agar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das im pTZ19R vorhandene *lacZ*-Gen machte die Identifizierung von rekombinanten Plasmiden mit Hilfe des X-Gal-Tests möglich (s. 2.5.3). Stichprobenartig wurden einige der Transformanten überprüft. Positive Klone wurden in 96 Mikrotiter-Well Platten mit LB, Chloramphenicol und Glycerin überpickt und konnten so bei -70 °C gelagert werden.

3.2.2 Statistische Analyse der Sequenzdaten

2.500 rekombinante Klone der Plasmid-Genbank wurden mit Standard-Primern des LGA (Labor für Genomanalyse, Göttingen) partiell sequenziert. Die daraus resultierenden Nukleotid-Sequenzen wurden auf ihre Qualität überprüft und die qualitativ hochwertigen Sequenzen mit den Daten der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) im sogenannten BlastX-Search abgeglichen. Hierbei

wurden die Nukleotid-Sequenzen zunächst in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und anschließend mit denen der Datenbank von NCBI verglichen. Ein ebenfalls durchgeführter Sequenzvergleich auf Nukleotid-Ebene führte zu keinen signifikanten Ergebnissen.

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Qualität der generierten Sequenzen und zugleich einen ersten Aufschluss über die Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen in den Datenbanken. Von den 5.000 generierten Sequenzen konnten 49,9 % in eine weitere Analyse einbezogen werden. Bei 2.504 Sequenzen, die von geringer Qualität waren, was bedeutete, dass entweder die Sequenzen zu kurz (unter 800 bp) waren oder der *Confidence Value*, der Aussagen über die Zuverlässigkeit der Sequenzen macht, unter 15 lag, wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die verbleibenden 2.496 Sequenzen konnten für weitere Analysen verwendet werden. Bei einer durchschnittlichen Sequenzlänge von 800 bp und einer Anzahl von 2.496 Sequenzen wurden mit der Plasmid-Genbank mehr als 2 Mb an hochwertiger Nukleotid-Sequenz gesammelt und ausgewertet. In Bezug auf das gesamte Metagenom des Trinkwasser-Biofilms, dessen Größe schätzungsweise bei 486 Mb lag, entsprach dies einem Anteil von ca. 0,5 % an generierten Sequenz-Daten. Der G+C Gehalt für die auswertbaren Sequenzen lag bei 62 %. Von den 2.496 generierten Sequenzen, die im weiteren analysiert und statistisch ausgewertet wurden, konnten 1.344 Sequenzen signifikante Treffer in den Datenbanken zugeordnet werden. Als signifikante Treffer wurde ein *E-value* von $< 10^{-4}$ festgesetzt, alle Werte die darüber lagen wurden nicht mehr als signifikant angesehen. Neben den 856 Sequenzen, denen keine signifikanten Treffer in den Datenbanken zugeordnet werden konnten, wurden 256 Sequenzen generiert, die keine Ähnlichkeit in den Datenbanken fanden. Diese erste Analyse zeigte, dass sich fast 50 % der auswertbaren Sequenzen in den Datenbanken nicht zuordnen liessen und somit genetisch bisher noch unerschlossen sind. Mit der Analyse der 1.344 Sequenzen, denen eine Proteinähnlichkeit zugeordnet werden konnte, wurde in zwei Schritten weiter vorgegangen. Zum einen sollten die Sequenzen unter einem phylogenetischen Aspekt untersucht werden und zum anderen unter einem physiologischen Aspekt.

Tab. 9: Überblick über die generierten Sequenzen aus der Plasmid-Genbank eines Trinkwasser-Biofilms.

	Anzahl der Sequenzen	%
Generierte Sequenzen	5.000	100,0
Sequenzen mit guter Qualität und einer Länge von über 800 bp	2.496	49,9
Sequenzen mit geringer Qualität (sind in weitere Analysen nicht mit eingeflossen)	2.504	50,1
Sequenzen mit signifikanten Ähnlichkeiten (E value < 10 ⁻⁴)	1.344	26,9
Sequenzen mit geringen Ähnlichkeit (E value >10 ⁻⁴)	856	17,0
Anzahl der Sequenzen ohne Treffer in den Datenbanken	296	6,0

Sequenzen wurden als qualitativ hochwertig angesehen, wenn sie eine Länge von über 800 bp hatten und der *Confidence value* über 15 lag. Die Sequenzen wurden im automatischen BlastX Search in der Datenbank von NCBI abgeglichen. Der E-value musste unter 10⁻⁴ liegen, damit die BlastX Ähnlichkeiten als signifikant angesehen wurden.

3.2.2.1 Funktionale Verteilung der BlastX Ergebnisse

Durch den Vergleich der generierten Sequenzen der Plasmid-Genbank mit den bekannten Proteinen der Datenbank von NCBI, konnte 1.344 Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu proteinkodierenden offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) zugeordnet werden (Tab. 9). Um einen Einblick in die genetische Organisation dieses Biofilms zu erhalten, wurden die proteinkodierenden Sequenzen in neun funktionelle Gruppen unterteilt (Abb. 7). 318 dieser Sequenzen (24 %) fanden Ähnlichkeit zu hypothetischen Genen, denen noch keine entsprechenden Funktionen zugeordnet werden konnten. Der größte Anteil der analysierten Sequenzen wurde dem Metabolismus zugeordnet. Insgesamt 455 (33 %) der 1.344 generierten Sequenzen kodiert vermutlich für am Stoffwechsel beteiligte Proteine. 10 % der BlastX Treffer liessen sich in die Gruppe der Zellprozesse und Zellstruktur einordnen. Hierunter konnten 39 Gene bzw. Genfragmente gefunden werden, die für membranassoziierte Proteine kodieren. Ebenfalls wurden 20 Treffer mit BlastX Ähnlichkeiten zu Proteinen der Biosynthese von Lipopolysacchariden (LPS) und Exopolysacchariden (EPS) gefunden.

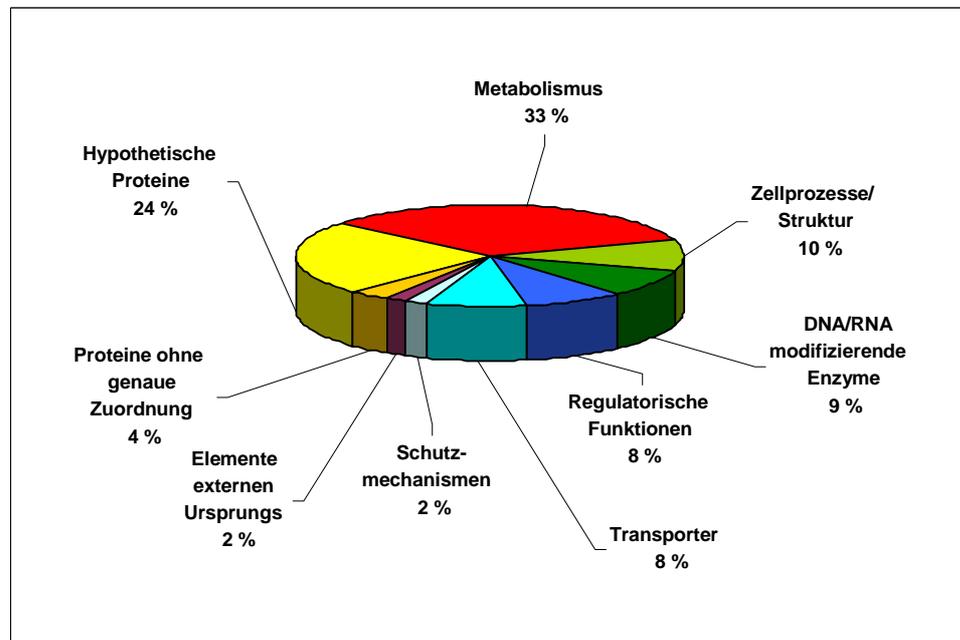


Abb. 7: Funktionale Gruppen und mögliche ORFs innerhalb des Biofilm-Metagenoms. 1.344 generierte Sequenzen aus der Plasmid-Genbank des Biofilm-Metagenoms wurden in neun unterschiedliche funktionale Gruppen eingeteilt, die sich durch den BlastX Vergleich in den Datenbanken ergaben.

13 der identifizierten Genfragmente sind Glykosyltransferasen sehr ähnlich. Es wurden auch einige Sequenzen gefunden, die an chemotaktischen, ribosomalen oder Prozessen der Zellteilung und der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, und ebenso Gene, die für Proteine kodieren, die an der Proteinfaltung mitwirken. In die Gruppe der DNA/RNA modifizierenden Enzyme konnten 9 % der analysierten Gene eingeteilt werden. Hier handelt es sich vor allem um Topoisomerasen, DNA und RNA-Polymerasen sowie Helikasen. Ebenfalls konnten Proteine gefunden werden, die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Interessanterweise gab es auch einige Treffer zu Proteinen, die an dem Transfer von Plasmiden beteiligt sind, wie z. B. dem Plasmid Transfer Faktor *traG* aus *Mesorhizobium meliloti*. Insgesamt 8 % der proteinkodierenden Gene konnten regulatorische Funktionen in dem Biofilm-Metagenom zugeordnet werden. Es wurden 56 Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu Sensor/Response Regulatoren gefunden. 29 der Sequenzen kodieren möglicherweise für Transkriptionsregulatoren und 10 Sequenzen haben Ähnlichkeiten zu Sigma Faktoren. Ebenfalls 8 % der proteinkodierenden Fragmente, die in der Plasmid-Genbank gefunden wurden, sind am Stofftransport beteiligt. Darunter wurden 47 Gene bzw. Genfragmente identifiziert, die der Gruppe der ABC-Transporter zuzuordnen sind. 2 % der identifizierten Sequenzen kodieren möglicherweise für Schutzmechanismen wie

Antibiotika-Resistenzen oder Metall-Detoxifizierung. Darunter waren acht Klone, die eine mögliche Resistenz gegenüber Tetracyclin und sechs Klone, die eine mögliche Resistenz gegenüber β -Laktam Antibiotika vermitteln. Weitere 2 % der analysierten Sequenzen in dem Biofilm-Metagenom konnten der Gruppe der Elemente externen Ursprungs wie Transposasen, Integrasen und phagenverwandte Gene zugeordnet werden. Unter den 1.026 Gensequenzen, denen mittels BlastX *Search* Funktionen zugeordnet werden konnten, wurden keine Gene gefunden, die für Proteinen kodieren, die an Pathogenitätsprozessen beteiligt sind.

33 % der analysierten Sequenzen aus dem Biofilm-Metagenom wurden dem Metabolismus zugeordnet. Darunter ließen sich die meisten proteinkodierenden Gene dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel zuordnen (Tab. 10). Eine große Anzahl der identifizierten Gene kodiert vermutlich für Proteine des zentralen Stoffwechsels, wie dem Citrat-Zyklus, dem 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg, der Glykolyse und dem Glyoxylat-Zyklus. Interessanterweise konnten 36 Sequenzen identifiziert werden, die große Ähnlichkeit zu Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens* zeigen. Unter den Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu Esterasen fanden vier der fünf Sequenzen signifikante Ähnlichkeit zu einer Polyurethan-Esterase aus *Pseudomonas chlororaphis*. Weiterhin konnten in dem Biofilm-Metagenom Gene identifiziert werden, die für Proteine mit proteolytischen Eigenschaften kodieren. Darunter befinden sich insgesamt 10 Genfragmente mit hohen Ähnlichkeiten zu potentiellen Proteasen. Ebenfalls wurden zehn Genfragmente gefunden, die für Proteine kodieren, die am Abbau von Polysacchariden beteiligt sind, darunter auch eine mögliche α -Amylase mit hoher Ähnlichkeit zu einer Amylase aus *Rhodobacter sphaeroides*. Dieser Klon zeigte ebenfalls auf stärkehaltigen Platten Aktivität und konnte für weitere Untersuchungen verwendet werden. Gene, die dem Aromatenabbau zugeordnet werden konnten, schienen vor allem an dem Abbau von Benzoat beteiligt zu sein.

Eine erste Analyse der Plasmid-Genbank des Trinkwasser-Biofilms zeigt, dass es sich um eine sehr vielseitige Gemeinschaft, besonders hinsichtlich der Verwertung von Nährstoffen, handelte. Die Sequenzanalyse zeigt, dass die Mikroorganismen in diesem Konsortium in der Lage waren, viele unterschiedliche C- und andere Energie-Quellen zu nutzen. Mit den generierten Sequenzdaten wurde eine Datenbank erstellt, die im Internet <http://wwwuser.gwdg.de/~biofilm/biofilm/index.html> abgerufen werden kann.

Tab. 10: Verteilung der sequenzierten Gene bzw. Genfragmente über funktionelle Gruppen innerhalb des Metabolismus

Funktionelle Gruppen innerhalb des Metabolismus	Anzahl der Gene bzw. Genfragmente
Lipasen	36
Esterasen	5
Amidasen/Amidotransferasen	14
Polysaccharidabbau	10
Proteolytische Enzyme	26
Aminosäureabbau	32
Aromatenabbau	17
Kohlenhydrat-Stoffwechsel, Dehydrogenasen, usw.	118
Energiemetabolismus	31
Vitamin/Co-Faktor Biosynthese	29
Eisen-Schwefel-Metabolismus	13
Carboxylasen, Carbonhydrasen, usw.	10
Bakterielle Photosynthese und Lichtemission	4
Stickstoff-Metabolismus	30
Hydrogenasen	2
Fettsäure-Metabolismus	37
Polyketidsynthasen	3
NTP modifizierende Enzyme	28
Enzyme ohne genaue Zuordnung	10
Total	455

3.2.2.2 Phylogenetische Verteilung der BlastX Ergebnisse

Im vorangegangenen Abschnitt wurden die 1.026 Sequenzen der Plasmid-Genbank nach ihren möglichen Funktionen unterteilt. In dieser zweiten Analyse sollten die proteinkodierenden Sequenzen den Bakteriengruppen zugeordnet werden, zu denen die potentiellen Proteine am ähnlichsten sind. In Abbildung 8 ist die statistische Verteilung der proteinkodierenden Sequenzen in die unterschiedlichen Bakteriengruppen dargestellt.

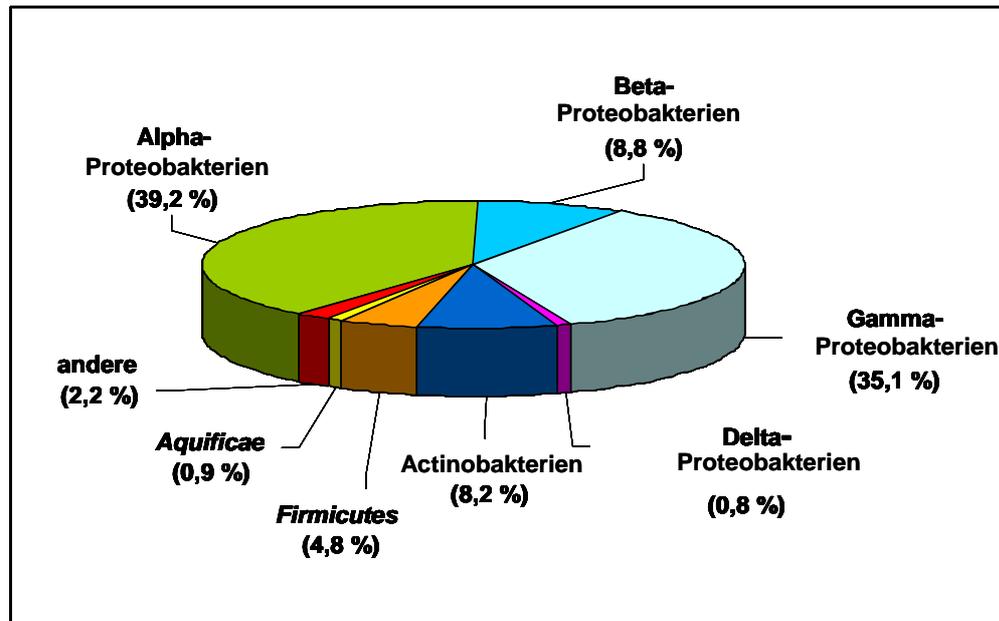


Abb. 8: Statistische Verteilung der BlastX Ähnlichkeiten über die Bakterienstämme.

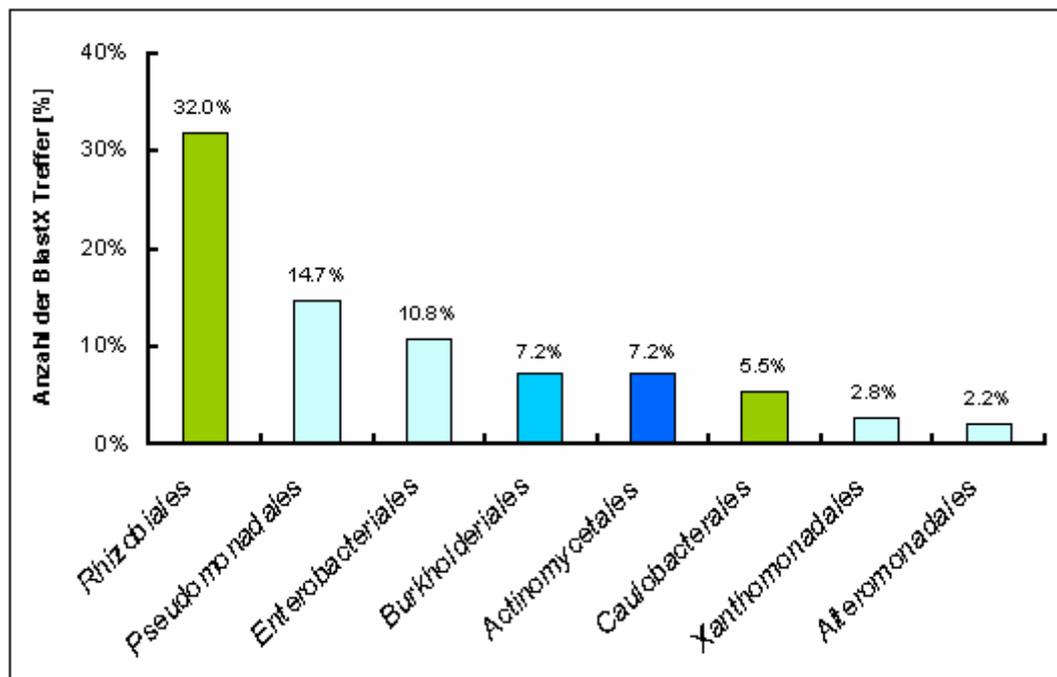
In die Auswertung wurden die über den BlastX ermittelten höchsten Ähnlichkeiten der 1.026 proteinkodierenden Sequenzen aus der Plasmid-Genbank einbezogen, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte. Diese Proteine wurden hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit in die Bakterienstämme eingeteilt.

Der größte Anteil (39,2 %) der proteinkodierenden Sequenzen, denen in der Plasmid-Genbank funktionelle Proteine zugeordnet werden konnten, war in die Gruppe der α -Proteobakterien einzuordnen. Den zweitgrößten Anteil nahmen die γ -Proteobakterien mit 35,1 % ein. Nach dieser Analyse wurden nur 8,8 % der Proteine den β -Proteobakterien zugeordnet. Ebenfalls waren einige Proteine aus der Gruppe der δ -Proteobakterien (0,8 %) vertreten. Insgesamt wurden die meisten proteinkodierenden DNA-Sequenzen aus der Plasmid-Genbank den Proteobakterien (83,9 %) zugeordnet. Neben den Proteobakterien konnten 8,2 % der DNA-Sequenzen den Actinobakterien zugeordnet werden. Actinobakterien gehören in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt und sind als Bewohner des Bodens bekannt. 4,8 % der proteinkodierenden Sequenzen zeigen hohe Ähnlichkeiten zu Vertretern der *Firmicutes*, auch hier handelt es sich zum größten Teil um Gram-positive Bakterien. Ein kleiner Anteil (0,9 %) der BlastX Ergebnisse konnte den *Aquificae* zugeordnet werden, vor allem dem Organismus *Aquifex aeolicus*, der als hyperthermophiles Bakterium bekannt ist.

Innerhalb der α -Proteobakterien konnten die meisten proteinkodierenden Gene rhizobiellen Proteinen zugeordnet werden (Abb. 8, in grün dargestellt). Insbesondere

wurden sehr viele Gene gefunden, die signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen aus *Sinorhizobium meliloti* und *Mesorhizobium loti* zeigten. In der Gruppe der α -Proteobakterien waren ebenfalls 5,5 % der BlastX Treffer dem Süßwasser-Organismus *Caulobacter crescentus* sehr ähnlich. In der Gruppe der γ -Proteobakterien (Abb. 8, hellblau gekennzeichnet) wurden signifikante Ähnlichkeiten zu Vertretern der Ordnung *Pseudomonadales* und *Enterobacteriales*, insbesondere zu *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* gefunden. Vertreter der Gattung *Pseudomonas* sind als Biofilmbildner bekannt. Unter den β -Proteobakterien wurden hauptsächlich Proteine mit Ähnlichkeiten zu den *Burkholderiales* identifiziert. Davon wurden 6,8 % der proteinkodierenden Gene mit großer Ähnlichkeit zu Proteinen des pflanzenpathogenen Bakteriums *Ralstonia solanacearum* gefunden. In der Familie der *Actinomycetales*, die in die Klasse der Actinobakterien gehört, und in Abbildung 8 in dunkelblau dargestellt wurde, konnten aus dem Biofilm-Metagenom 3,4 % der offenen Leserahmen Ähnlichkeiten zu Proteinen aus *Streptomyces* und 2,2 % der Art *Mycobacterium tuberculosis* zugeordnet werden.

A)



B)

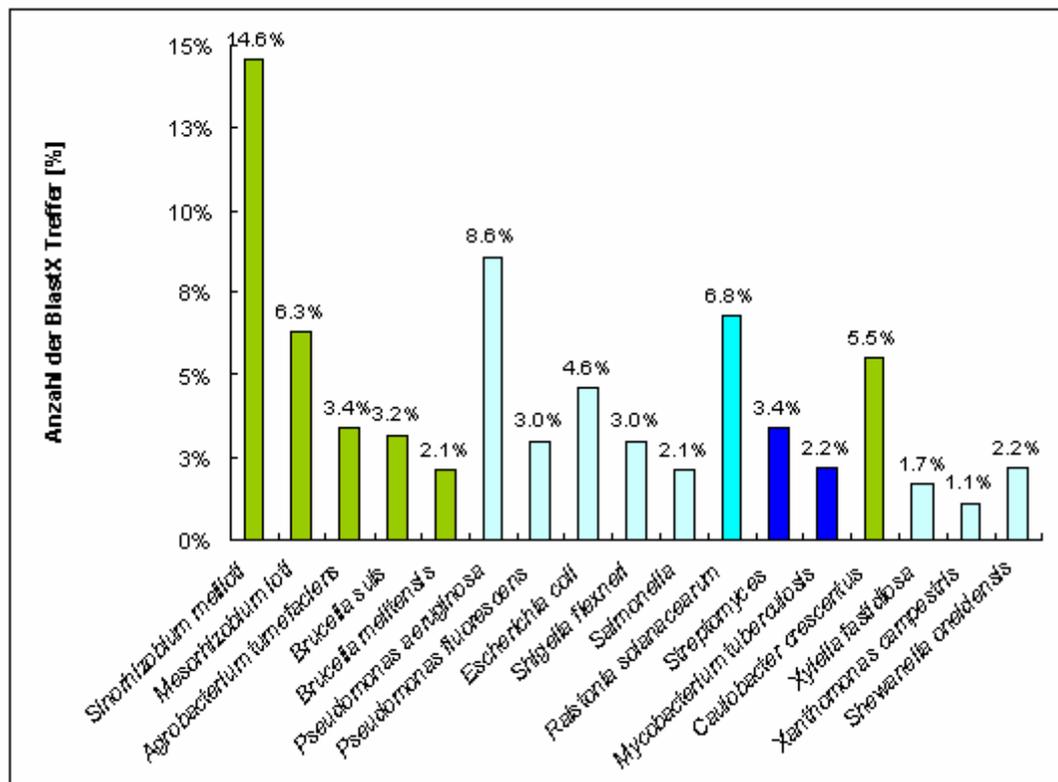


Abb. 9: Statistische Verteilung der BlastX Ähnlichkeiten in die Bakterienordnungen A) und über die Bakteriengattungen und -arten B).

In diese Auswertung wurden nur die Ordnungen aufgenommen, von denen mehr als 20 (2 %) (A) bzw. 10 Treffer (1 %) (B) der 1.026 protein-kodierenden Sequenzen der Plasmid-Genbank über den BlastX ermittelten werden konnten.

3.3 Aktivitätsbasierende Analyse des Biofilm-Metagenoms

3.3.1 Konstruktion von Cosmid-Banken

Die chromosomale DNA des Biofilm-Metagenoms wurde zur Konstruktion einer Genbank in *E. coli* VCS257 eingesetzt, um diese auf Enzymaktivitäten hin zu untersuchen. Es wurde angestrebt, DNA-Fragmente mit einer Größe von 20 – 35 kb in den Cosmid-Vektor pWE15 zu klonieren. Wie schon für das Anlegen der Plasmid-Genbank wurde die genomische DNA des Biofilms zunächst mit dem Enzym *Bsp143I* partiell verdaut (s. 2.4.5.2) und anschließend unter Verwendung des „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in den zuvor mit *Bam*HI verdauten Cosmid-Vektor pWE15 ligiert (s. 2.4.5.4). Mit Hilfe des Stratagene® Gigapack III Gold Packaging-Kits konnte die DNA in den Wirtstamm

E. coli VCS257 transduziert und eine Cosmid-Genbank mit ca. 1.600 Klonen erstellt werden. Zur Kontrolle wurden 40 Cosmid-Klone mit Miniprep Methode (s. 2.4.4.2) überprüft. Die Größe der Inserts variierte zwischen 20 und 35 kb und die Inserthäufigkeit lag bei 85 %.

3.3.2 Screening der Cosmid-Genbanken auf lipolytische Aktivität

Die Analyse der Plasmid-Genbank hat gezeigt, dass 37 (8,1 %) der gefundenen proteinkodierenden Gene bzw. Genfragmente vermutlich am Fettstoffwechsel beteiligt sind. Es konnten 36 Genfragmente identifiziert werden (Tab. 10), die für mögliche Lipasen kodieren und 5 Genfragmente kodieren für potentielle Esterasen. Esterasen (EC 3.1.1.1) katalysieren die Hydrolyse von organischen Esterbindungen. Lipasen (EC 3.1.1.3) sind den Esterasen sehr ähnlich, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihres Substratspektrums. Esterasen spalten bevorzugt wasserlösliche, kurzkettige Substrate. Die bevorzugten Substrate der Lipasen hingegen sind wasserunlösliche, langkettige Triglyceride, die zu Di- bzw. Monoglyceriden, Fettsäuren und Glycerin umgesetzt werden. Da Esterasen und Lipasen als nützliche Biokatalysatoren für die industrielle Anwendung gelten und in dem Biofilm-Genom vermehrt Gene gefunden wurden, die auf lipolytische Aktivitäten hindeuten, wurde die Cosmid-Bank aus dem Biofilm-Metagenom zunächst auf lipolytische Aktivitäten untersucht.

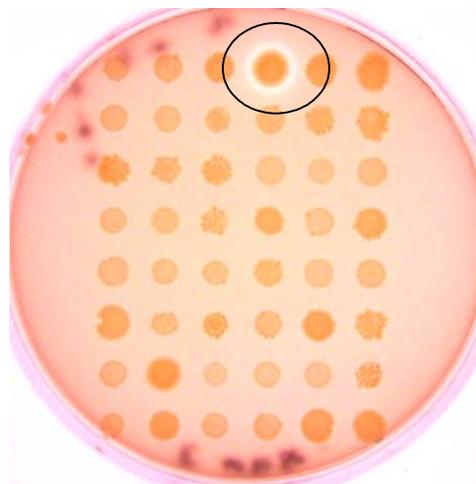


Abb. 10: Phänotyp eines positiven rekombinanten *E. coli*-Klons mit lipolytischer Aktivität auf Tributyrin Platten (eingerahmt dargestellt).

Das *Screening* der Biofilm-Genbank wurde auf LB-Tributyryl-Agarplatten durchgeführt. Rekombinante *E. coli*-Klone, die zur Hydrolyse des Tributyrins (1,2,3-Tributyrylglycerol) in der Lage waren, konnten durch eine Aufklärung der Tributyrin-Agarplatte um die Kolonie erkannt werden (Lawrence et al., 1967). Die ca. 1.600 Cosmid-Klone wurden dafür von den Mikrotiterplatten auf LB-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) und Ampicillin als Selektivmarker überstempelt und bei 37 °C inkubiert. Nach zwei bis fünf Tagen wurden bei insgesamt sechs der 1.600 Cosmid-Klone ein Aufklärung des Agars sichtbar. Diese Cosmid-Klone wurden mit pCosCS2-A3, pCosCS5-E5, pCosCS1-C5, pCosCS7-G4, pCosCS3-B1 und pCosCS3-B8 bezeichnet (Tab. 11). Die Insertgröße der Cosmide wurde mittels Restriktionsverdau ermittelt. Dazu wurden die Cosmide isoliert (s. 2.4.4.2) und anschließend mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* bei 37 °C für 3–4 h verdaut (s. 2.4.5.1). Der Restriktionsansatz wurde auf einem 0,8 %igem Agarosegel überprüft und die Größe der Inserts anhand der Bandenmuster ermittelt. Die Klonierung und anschließende Sequenzanalyse wurde beispielhaft an den drei ausgewählten Cosmiden pCosCS2-A3, pCosCS5-E5 und pCosCS1-C5 vorgenommen.

Tab. 11: Dargestellt sind die sechs lipolytischen Cosmide aus dem Trinkwasser-Biofilm und ihre ermittelte Insert-Größe.

Ebenfalls angegeben sind die Gene, denen die lipolytische Aktivität durch Transposonmutagenese (s. 3.3.4) zugeordnet werden konnte.

Cosmid-Klon	Insert-Größe (kbp)	Identifizierte lipolytischer ORF
pCosCS2-A3	17,571 (komplett sequenziert)	<i>estA3</i> (1191 bp)
pCosCS5-E5	23	<i>estE5</i> (1262 bp)
pCosCS1-C5	29	<i>estC5</i> (960 bp)
pCosCS7-G4	25,3	-
pCosCS3-B1	27,5	-
pCosCS3-B8	26,7	-

3.3.3 Klonierung von *EcoRI*-Fragmenten

Zur Identifizierung der lipolytischen ORFs, wurden die Inserts der Cosmid-Klone mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (s. 2.4.5.1) und in den Plasmid-Vektor pTZ19R kloniert. Hierfür wurden die drei Cosmide pCosCS2-A3, pCosCS5-E5 und pCosCS1-C5 verwendet. Die Cosmid-DNA wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (s. 2.4.5.1). Die Inserts ließen sich aus der multiplen Klonierungsstelle des Cosmids ausschneiden. *EcoRI* schnitt ebenfalls innerhalb der inserierten DNA, wodurch die Fragmente verkleinert wurden. Die Restriktionsbanden wurden aus dem Restriktionsansatz gereinigt und dephosphoryliert (s. 2.4.5.3) und anschließend in den ebenfalls mit *EcoRI* liniarisierten Plasmid-Vektor pTZ19R subkloniert. Nach der Transformation in *E. coli* XL1-Blue wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) und Chloramphenicol als Selektionsmarker ausplattiert. Die Subklone, die ein DNA-Fragment mit dem entsprechenden Gen enthielten, welches die lipolytische Aktivität bewirkte, konnten durch die Hofbildung um die Kolonie identifiziert werden. Auf diese Weise war es möglich, den Bereich um den entsprechenden ORF einzugrenzen. Aus jedem der drei Cosmide konnten aktive *EcoRI*-Klone subkloniert werden. Die so entstandenen Plasmid-Klone wurden, abgeleitet von den Cosmiden, mit pCS-A3, pCS-E5 und pCS-C5 bezeichnet.

3.3.4 Identifizierung der lipolytischen ORFs mittels Transposonmutagenese

Die DNA der aktiven *EcoRI*-Klone pCS-A3, pCS-E5 und pCS-C5 wurde isoliert (s. 2.4.4.3) und zur *in vitro* Transposonmutagenese eingesetzt (s. 2.4.9). Das Transposon EZ::TNTM <KAN-2> der Firma Epicentre (Madison, Wisconsin) inseriert willkürlich in die Ziel-DNA. Der Ablauf der Mutagenese erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach erneuter Transformation der mutierten Ziel-DNA in *E. coli* XL1-Blue Zellen (s. 2.5.1.2) konnten die Transformanten auf LB-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) und dem Selektivmarker Kanamycin durchmustert werden. Klone, die nach mehrtägiger Inkubation bei 37 °C keine Aufklärung des Agars zeigten, hatten die Fähigkeit zur Hydrolyse des Tributyrins verloren und wurden weiter analysiert. Für die *EcoRI*-Klone pCS-A3, pCS-E5 und pCS-C5 konnten inaktive Mutanten gefunden werden. Die jeweiligen Insertionsorte des Transposons wurde mit Hilfe der bidirektionalen Primer KAN-2 FP-1 *Forward* und KAN-2 RP-1 *Reverse* (Tab. 5) mittels Sequenzierung identifiziert. Aus den so ermittelten Sequenzdaten konnten weitere Oligonukleotide

abgeleitet, synthetisiert und für weitere Sequenzierungen eingesetzt werden. Über das sogenannte „*primer walking*“ war es möglich, die lipolytischen ORFs sowie ihre benachbarten Gene zu identifizieren.

3.4 Sequenzanalyse der lipolytischen ORFs

3.4.1 Sequenzanalyse von pCS-A3/pCosCS2-A3

Neben der Sequenzierung des *EcoRI*-Klons pCS-A3 wurde das Ursprung-Cosmid pCosCS2-A3 vollständig sequenziert. Die Insertgröße des Cosmids pCosCS2-A3 betrug 17.571 bp, wovon 4.013 bp über den *EcoRI*-Klon abgedeckt wurden. Nach Analyse der Sequenzdaten konnten unter Verwendung des im Internet verfügbaren Annotations Programms Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) auf dem Cosmid pCosCS2-A3 17 vollständige offene Leserahmen identifiziert werden (s. Abb. xx). Die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der offenen Leserahmen wurden mit den Sequenzen in den Datenbanken verglichen. Die proteinkodierenden Gene wurden nach ihren höchsten Ähnlichkeiten in verschiedene Bakteriengruppen eingeteilt, wobei 14 der 17 identifizierten ORFs nach den höchsten Proteinähnlichkeiten in die Klasse der α -Proteobakterien einzuordnen waren (s. Abb. xxx). Die drei abgeleiteten Proteinsequenzen der verbleibenden offenen Leserahmen zeigen große Ähnlichkeiten zu Proteinen der γ -Proteobakterien.

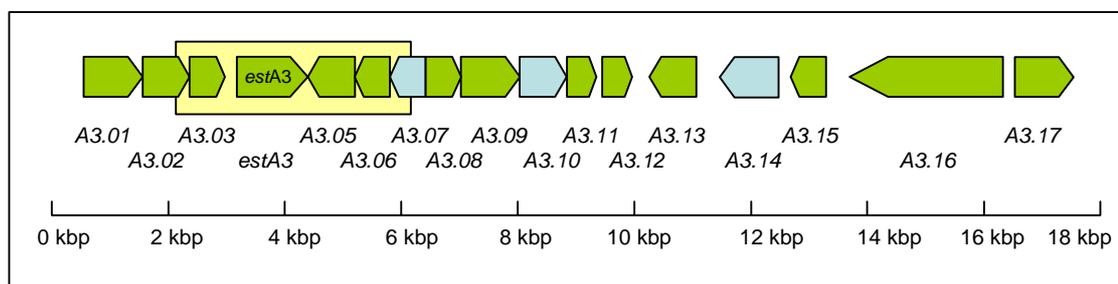


Abb. 11: Schematische Darstellung der offenen Leserahmen des Cosmids pCosCS2-A3.

Die Pfeile stellen die offenen Leserahmen mit ihrer Transkriptionsrichtung dar. Die Farben stehen für die jeweilige Gruppe, zu der die abgeleitete Proteinsequenz die höchsten Ähnlichkeiten ergab, Legende s. Abb. 16. Der Bereich, der über den *EcoRI*-Klon pCS-A3 ermittelt wurde, ist eingerahmt dargestellt.

Tab. 12: Cosmid pCosCS2-A3

Offene Leserahmen (ORFs) und deren Ähnlichkeiten zu Proteinen in den Datenbanken. Der Bereich der den *EcoRI*-Klon umfaßt ist grau unterlegt.

ORF	Größe des potentiellen Proteins (AA)	Funktion, bester Treffer	GenBank Nr. des besten Treffers	Alignment Region des ORFs (AA)	Alignment Region (AA) Bereich/gesamte AA)	% Ähnlichkeit
A3.001	359	Potentielle Aminoglycoside Phosphotransferase [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00095924.1	3-359	262-618/618	76
A3.002	253	Oxidoreduktase, short-chain Dehydrogenase/Reductase family [<i>Caulobacter crescentus</i> CB15]	NP_421870.1	1-253	1-254/254	73
A3.003	265	blr5444, potentiell Oxidoreduktase Protein [<i>Bradyrhizobium japonicum</i>]	NP_772084.1	3-254	2-255/261	56
EstA3	396	Beta-Laktamase Klasse C und andere Penicillin-binde-Proteine [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>]	ZP_00096236.1	4-394	7-405/410	54
A3.005	301	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00096544.1	5-298	4-296/296	50
A3.006	171	konserviertes hypothetisches Protein, mögliches Transmembran Signalpeptide Protein [<i>Caulobacter crescentus</i> CB15]	NP_420120.1 (NP_385993.1)	45-170	45-170/172	33
A3.007	153	Thiol-Disulfide Isomerase und Thioredoxine [<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon]	ZP_00038739.1	20-152	20-147/154	29
A3.008	108	Histon Acetyltransferase HPA2 und verwandte Acetyltransferase [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00096541.1	4-105	20-152/167	82
A3.009	379	Enzym des Deoxyxylulose Pathways der Isoprenoid Biosynthese [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00096554.1	1-365	21-385/394	87
A3.010	343	Asparaginase [<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913]	NP_635624.1	43-343	2-309/311	52
A3.011	147	Hypothetisches Protein [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00095531.1	1-147	1-143/144	51
A3.012	91	Hypothetisches Protein [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00095820.1	6-89	18-97/100	43
A3.013	302	Membranprotease Untereinheiten, Stomatin/Prohibitin Homologe [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00095818.1	13-207	107-301/302	80
A3.014	303	Haloalkane Dehalogenase At Ph 5.0 chloridhaltig [<i>Xanthobacter autotrophicus</i>]	pdb 1B6G 	3-301	2-308/310	53
A3.015	197	Transkriptionsregulator [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>]	ZP_00010490.1	7-196	16-199/199	35
A3.016	677	Peptidyl-Dipeptidase Dep [<i>Caulobacter crescentus</i> CB15]	NP_422496.1	52-720	1-672/677	51
A3.017	326	Hypothetisches Protein [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>]	ZP_00093589.1	21-312	7-316	34

Für das Gen, das durch Transposonmutagenese ermittelt wurde und die lipolytische Aktivität bewirkte, konnte ein Leserahmen ermittelt werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine signifikante Ähnlichkeit zu einer β -Laktamase aus *Rhodopseudomonas palustris* zeigte (Identität 54 %; Ähnlichkeit 68 %) (Tab. 12). Aufgrund der lipolytischen Aktivität, die durch dieses Enzym bewirkt wurde, wurde das potentielle Gen mit *estA3* bezeichnet. Bei den offenen Leserahmen, die *estA3* umgeben,

handelt es sich stromabwärts um ein proteinkodierendes Gen mit einer Ähnlichkeit von 56 % zu einer potentiellen Oxidoreduktase aus *Bradyrhizobium japonicum* und stromaufwärts um eine Permease bzw. einen Metabolit-Transporter aus *Novosphingobium aromaticivorans*, zu der das Genprodukt von *estA3* eine Ähnlichkeit von 50 % zeigt. In Tabelle 12 sind die 17 potentiellen Gene mit ihren Ähnlichkeiten aufgelistet. Der Bereich, der dem *EcoRI*-Klon pCS-A3 entspricht, ist grau unterlegt.

Für *estA3* konnte ein offener Leserahmen von 1.191 bp ermittelt werden, der einem Protein von 396 Aminosäure und einer kalkulierten Molekularmasse von 43.270 Da entspricht. In Abbildung 12 ist die DNA-Sequenz mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz dargestellt. In der Aminosäuresequenz von EstA3 findet man nicht die für die meisten Esterasen und Lipasen typischen Konsensus-Sequenzen, die das aktive Serin umgeben, wie z. B. Gly-X-Ser-X-Gly (Petersen und Drablos, 1994) oder Gly-Asp-Ser-Leu (Upton und Buckley, 1995). Vielmehr findet man das für β -Laktamasen der Klasse C typische konservierte Motiv Ser-X-X-Lys (Abb. 12). Nach der Klassifizierung von Arpigny und Jäger (1999), die die bakteriellen Esterasen und Lipasen nach ihren konservierten Domänen und den biologischen Eigenschaften in acht Gruppen eingeteilt haben, ließ sich EstA3 demnach in die Familie VIII einteilen.

```

1751 gttgacggcg gcctttcaag ctgcgatcca gtaaccgcc aattgacagg
1801 acaaaccgcg gtatgagcgc cgaagaacta gggttcctgc ccgaccgcct
      M S A E E L G F L P D R
      >>.....EstA3.....>

1851 agcgcggatc agcgatcata tccagaccaa ctatctcgac aatggcaagc
      L A R I S D H I Q T N Y L D N G K
      >.....EstA3.....>

1901 tgccttttgc gtcgctgctg atcggtcgcg gcgacgacat cgccttgcaa
      L P F A S L L I G R G D D I A L Q
      >.....EstA3.....>

1951 tggagttcgg gcgtcgccga cgatgctatt tcccgcattg catcgatgac
      W S S G V A D D A I F R I A S M
      >.....EstA3.....>

2001 caaaaccggtc acctcggttg cgttcatgca actggtcgaa cagggcaaag
      T K P V T S V A F M Q L V E Q G K
      >.....EstA3.....>

2051 tcgccctgac cgaccgggtc gccaaagtata tccccgaatt tgccaagctc
      V A L T D P V A K Y I P E F A K L
      >.....EstA3.....>

2101 ggcgttttcg ttgcccggcg cgccaatata ccctttgtca gtcgcccgcc
      G V F V A G G G N I P F V S R P
      >.....EstA3.....>

```

```
2151  gacaatgccg atgcggattg tcgatgtggt gcggcacaca acgggtttta
      P T M P M R I V D V L R H T T G F
      >.....EstA3.....>

2201  cctatagctt tcaggaacga agcaacatcg acgcggccta ccggaagacc
      T Y S F Q E R S N I D A A Y R K T
      >.....EstA3.....>

2251  gatgtcgaga gctggacaag aagcacgtca cagagcttca tcgacacgct
      D V E S W T R S T S Q S F I D T
      >.....EstA3.....>

2301  ggctgaaatc ccgctcgagt tcgaccctgg cacgcagtgg aattattcgg
      L A E I P L E F D P G T Q W N Y S
      >.....EstA3.....>

2351  tttcgaccga tgtattgggc atattgatcg agcgaatcag cgggcaatcg
      V S T D V L G I L I E R I S G Q S
      >.....EstA3.....>

2401  cttcctgact atttccgcca ccatatcttc gcgccgctcg ggatggtcga
      L P D Y F R D H I F A P L G M V
      >.....EstA3.....>

2451  cacgtgcttt accgttcccg ccgacaaggc agcgcgaatc ccgcaatgct
      D T C F T V P A D K A A R I P Q C
      >.....EstA3.....>

2501  ttgccttcga cccggcaacc aaaatgaaat tgttcgatga agctggcgca
      F A F D P A T K M K L F D E A G A
      >.....EstA3.....>

2551  agtagcctgt ggaccaaagg ctggctgctt aattcaggcg gaggcgggct
      S S L W T K G W S F N S G G G G
      >.....EstA3.....>

2601  ggcttcgagc gtcgcggatt atcaccgggt ctgccggatg ctgctgaacg
      L A S S V A D Y H R F C R M L L N
      >.....EstA3.....>

2651  gcggcgcact tgacggatc cagatcatca gccgaaaac actcgaactg
      G G A L D G I Q I I S P K T L E L
      >.....EstA3.....>

2701  atgaccgcca accatttacc gggcgggcaa gacctcacgc aaatgtcgaa
      M T A N H L P G G Q D L T Q M S
      >.....EstA3.....>

2751  atccttgctt agcgaggccg aaatggcggg catcggcttt ggcctggggt
      K S L F S E A E M A G I G F G L G
      >.....EstA3.....>

2801  ttgccaccac gatcgatagc gtagegacgc tcaccccatg ctctacgggc
      F A T T I D S V A T L T P C S T G
      >.....EstA3.....>

2851  gatttttact ggggcggcat gtattcgacc gcgttcttcg tcgatccggt
      D F Y W G G M Y S T A F F V D P
      >.....EstA3.....>

2901  cgaggatatc atcatgatct ttatgactca attgatgccg tcgagcacct
      V E D I I M I F M T Q L M P S S T
      >.....EstA3.....>
```

```

2951  atccggtgcg ggcgcgaaatc aagacgatga tctacagcgc gctcgccgcc
      Y P V R R E I K T M I Y S A L A A
      >.....EstA3.....>
3001  taa
      -

```

Abb. 12: DNA- und Aminosäuresequenz von *estA3*.

Dargestellt ist die DNA-Sequenz von *estA3*. Die aus dem *estA3*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz ist unterstrichen und das Start- sowie das Stopkodon kursiv und fett gedruckt dargestellt. Das für β -Laktamasen typische konservierte Motiv des Proteins ist eingerahmt.

3.4.2 Sequenzanalyse von pCS-E5

Auf dem *EcoRI*-Klon pCS-E5 wurde ein 3.441 bp langes Fragment sequenziert. Mittels Transposonmutagenese konnte auf diesem Klon ein 1.262 bp großer offener Leserahmen identifiziert werden, dem die lipolytische Aktivität zugeordnet werden konnte. Das Gen kodiert für 420 Aminosäuren mit einer daraus abgeleiteten Molekularmasse von 44.967 Da. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt im Proteinabgleich signifikante Ähnlichkeit (Identität 57 %, Ähnlichkeit 73 %) zu einer D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase bzw. einem Penicillin-Binde-Protein aus *Polaromonas* sp. JS666. Der identifizierte ORF wurde aufgrund seiner lipolytischen Aktivität mit *estE5* bezeichnet. Wie für EstA3 konnten auch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EstE5 keine klassische Esterase bzw. Lipase Konsensus-Sequenzen gefunden werden. Vielmehr fand man auch hier das für β -Laktamasen der Klasse C typische konservierte Motiv Ser-X-X-Lys (Abb.13). Stromaufwärts von *estE5* konnten zwei weitere offene Leserahmen identifiziert werden (Abb. 14). Das Gen *e5001* umfaßt einen DNA-Bereich von 642 bp und kodiert für ein Protein von 213 Aminosäuren. E5001 zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu einem potentiellen Transmembran-Protein aus *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (Identität 37 %, Ähnlichkeit 53 %). Der ORF, der stromaufwärts an *e5001* angrenzte wurde mit *e5002* bezeichnet und kodiert für 242 Aminosäuren. E5002 weist Ähnlichkeiten (Identität 47 %, Ähnlichkeit 58 %) zu einem vermutlich inaktiven homologen Protein einer metall-abhängigen Protease aus *Polaromonas* sp. JS666 auf. Stromabwärts von *estE5* konnte kein weiteres komplettes Gen sequenziert werden, da an dieser Stelle sowohl auf dem Plasmid, als auch auf dem Cosmid der Vektor folgt. In Abbildung 13 sind die drei möglichen Leserahmen mit ihrer Orientierung angegeben. Die abgeleiteten

Aminosäuresequenzen der drei identifizierten Leserahmen zeigen signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen der β -Proteobakterien.

```

2001  cgggggatta tcggcgggcc gggcaggccg tgccggtggt gggcgataga
2051  ctccctgccc atgttgtccg tacgcctggt gacctgtctg cccagccat
      M L S V R L L T C L P Q P
      >>.....EstE5.....>

2101  ccttcgcgcc ttcgcggcgc cttgccgccc cgctggccgt gctgtggtgc
      S F A P S R R L A A P L A V L W C
      >.....EstE5.....>

2151  ctggcgcttc ccggcgccca tgcccaggcg cccaccccct cgcccctgcc
      L A L P G A H A Q A P T P S P L
      >.....EstE5.....>

2201  gcccgaggtg gaggccgcgc tctcccgtgc ggcctgccg cgcgaggcgc
      P P E V E A A L S R A R L P R E A
      >.....EstE5.....>

2251  tctcggtgct ggtggtcgac gcccagggcg gtgcgcggca ggcgcctcgg
      L S V L V V D A Q G G A R Q A P R
      >.....EstE5.....>

2301  ctggcgcacc gcgcccaggt gcccatgaac ccggcctcgg tgatgaagct
      L A H R A Q V P M N P A S V M K
      >.....EstE5.....>

2351  ggtcaccacc tatgcggcgc tcgaccagct cgcccggcc tatgctgga
      L V T T Y A A L D Q L G P A Y A W
      >.....EstE5.....>

2401  acacccccgt ctacgtgcag ggcacgggtgc aggacggcag cctgcgcggc
      N T P V Y V Q G T V Q D G S L R G
      >.....EstE5.....>

2451  aacgtctaca tccagggcca gggcgatccc aagctggtga tggaacggct
      N V Y I Q G Q G D P K L V M E R
      >.....EstE5.....>

2501  gtggtgctg ctgcgccgcc tgcagggcca gggcatccag gtcatcgtgg
      L W L L L R R L Q G Q G I Q V I V
      >.....EstE5.....>

2551  gcgacatcgt gctcgaccgc accgccttcg acgtgcccga gcaggacccc
      G D I V L D R T A F D V P E Q D P
      >.....EstE5.....>

2601  ggcagctttg acaacgagcc cctgcggccc tacaacgcct cgcccgatgc
      G S F D N E P L R P Y N A S P D
      >.....EstE5.....>

2651  actgctggtg aactacaagt cgcaggtgat gaccttcgtg ccggacgtgg
      A L L V N Y K S Q V M T F V P D V
      >.....EstE5.....>

2701  ccgcaggcct ggctcgcata cagtacgacc cgccgatggc cggcgtgcag
      A A G L A R I Q Y D P P M A G V Q
      >.....EstE5.....>

```

```

2751  cgccaggctt ccgtggcgct ggcccggccc ggggcggact gcggcgactg
      R Q A S V A L A A P G A D C G D
      >.....EstE5.....>

2801  gcgcggcgcc ctgcgcgctg agctttccga cccggcgcgc attgccttcc
      W R G A L R A E L S D P A R I A F
      >.....EstE5.....>

2851  agggcggtgtt cccggccaac tgcggcgagc gcgtgtggcc catcgcgccg
      Q G V F P A N C G E R V W P I A P
      >.....EstE5.....>

2901  gccgatccgc gcggctttgc ggcgcgcgcg gtggagggca tgtggcgcgca
      A D P R G F A A R A V E G M W R
      >.....EstE5.....>

2951  gttggggcggc aagctcacgg gcagcgtgcg cgacggcaag gtgccggccg
      E L G G K L T G S V R D G K V P A
      >.....EstE5.....>

3001  ggctcaaacc cgccttcatg gccacctcgc ccgcgctggc cgaggtggtg
      G L K P A F M A T S P A L A E V V
      >.....EstE5.....>

3051  cgcgacgtca acaagtacag caacaacgtc atggcgcagc aggtgttctt
      R D V N K Y S N N V M A Q Q V F
      >.....EstE5.....>

3101  cacgctggcg ctgggggaaca agggcgcgcc tgccacgttc gatggtgcac
      L T L A L G N K G A P A T F D G A
      >.....EstE5.....>

3151  gcgacgcctt gcgccgctgg tggcaactgc gctttggcga taccgaccag
      R D A L R R W W Q L R F G D T D Q
      >.....EstE5.....>

3201  cccgtggccg acaacggcgc cggcctctcc cgcgatgcgc gcatcaccgc
      P V A D N G A G L S R D A R I T
      >.....EstE5.....>

3251  gcagggcctg gggcgcatgc tgcaatcggc ctgggcctcg ccggtgatgc
      A Q G L G R M L Q S A W A S P V M
      >.....EstE5.....>

3301  cccgagctgg atcgcggcct tga
      P R A G S R P -
      >.....EstE5.....>

```

Abb. 13: DNA- und Aminosäuresequenz von *estE5*.

Dargestellt ist die DNA-Sequenz von *estE5*. Die aus dem *estE5*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz ist unterstrichen und das Start- sowie das Stopkodon kursiv und fett gedruckt dargestellt. Das konservierte Motiv des Proteins, welches für β -Laktamasen typisch ist, ist eingerahmt.

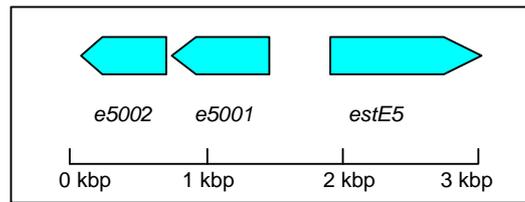


Abb. 14: Schematische Darstellung der offenen Leserahmen des EcoRI-Klons pCS-E5.

Die Pfeile stellen die offenen Leserahmen mit ihrer Transkriptionsrichtung dar. Die Farben stehen für die jeweilige Gruppe, zu der die abgeleitete Proteinsequenz die höchsten Ähnlichkeiten ergab, Legende s. Abb. 16.

Tab. 13: Benachbarte Gene von *estE5*.

Dargestellt sind drei auf dem Klon pCS-E5 identifizierte offene Leserahmen (ORFs) und deren Ähnlichkeiten zu Proteinen in den Datenbanken

ORF	Größe des potentiellen Proteins (AA)	Funktion, bester Treffer	GenBank Accession Nr. des besten Treffers	Alignment Region des OFRs (AA)	Alignment Region (AA) Bereich/ gesamte AA)	% Ähnlichkeit
E5002	242	Inaktives Homolog einer metall-abhängigen Protease, potentiell Chaperon [<i>Polaromonas</i> sp. JS666]	ZP_00365020	11-241	8-255/260	47
E5001	332	potentielles Transmembranprotein [<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472]	AAQ57741	91-311	70-284/302	35
estE5	417	D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase (Penicillin-Binde Protein 4) [<i>Polaromonas</i> sp. JS666]	ZP_00365019	31-414	14-413/496	57

3.4.3 Sequenzanalyse von pCS-C5

Auf dem *EcoRI*-Klon pCS-C5 wurde ein 2.866 bp langes Fragment sequenziert, um den Bereich des potentiellen lipolytischen ORFs und seiner benachbarten Gene abzudecken. Durch die Transposonmutagenese konnte ein 960 bp großer offener Leserahmen identifiziert werden. Das mutmaßliche Gen kodiert für 319 Aminosäuren mit einer kalkulierten Molekularmasse von 35.036 Da. Der potentielle offene Leserahmen ist in Abbildung 15 dargestellt. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt im Proteinabgleich signifikante Ähnlichkeit zu einer Esterase/Lipase aus *Magnetospirillum magnetotacticum* (Identität 40 %, Ähnlichkeit 50 %). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu einer Esterase und der nachgewiesenen Aktivität auf Tributyrin-

Testplatten wurde der ORF mit *estC5* bezeichnet. Im Gegensatz zu *EstA3* und *EstE5* beinhaltet *EstC5* das für Esterasen und Lipasen typische konservierte Motiv Gly-X-Ser-X-Gly (Petersen und Drablos, 1994). In Abbildung 16 ist *estC5* in seiner Orientierung zu den benachbarten Genen dargestellt. Stromaufwärts von *estC5* konnte ein 828 bp großer offener Leserahmen identifiziert (*c5001*) werden, der für ein Protein mit einer Molekularmasse von 29.218 Da kodiert und Ähnlichkeiten (Identität 54 %, Ähnlichkeit 71 %) zu einer potentiellen *short-chain* Dehydrogenase aus *Acinetobacter* sp. ADP1 zeigt. Der mutmaßliche ORF der stromaufwärts von *estC5* identifiziert werden konnte und mit *c5002* bezeichnet wurde, befand sich nicht vollständig auf dem sequenzierten Plasmid-Klon pCS-C5. Die abgeleitete Aminosäuresequenz aus den 860 sequenzierten bp, die auf dem Plasmid identifiziert werden konnten, weisen auf ein mögliches Flavoprotein hin, welches am K^+ -Transport in *Burkholderia cepacia* R1808 beteiligt ist.

```

1001 ccgtcggcga gacctatcgc ctgctggcca actgaatccg ggagaccccc
1051 atggcgtcac ttgctgcaaa aatcatcaag cccctgttcc gcgctatcat
      M A S L A A K I I K P L F R A I
      >>.....EstC5.....>

1101 gaagcgcgac attcaggacc ctgatcatct ggtccgtcat ttacgcaggg
      M K R D I Q D P D H L V R H L R R
      >.....EstC5.....>

1151 tcatgaatgc cccgctgatg ccctcccaaa taccctgtgg cgtcagcctg
      V M N A P L M P S Q I P R G V S L
      >.....EstC5.....>

1201 cgcaatggac gcgtggccga tgttcctggc cagtggatga gcaccgtcaa
      R N G R V A D V P G Q W M S T V
      >.....EstC5.....>

1251 tcctgtggcg accgtgctgt tcctccatgg aggagcgttc gtcgggggtc
      N P V A T V L F L H G G A F V G G
      >.....EstC5.....>

1301 gtctcgatac ctatcaccat ttctgcgcca cgctggcaaa agcactcaat
      R L D T Y H H F C G T L A K A L N
      >.....EstC5.....>

1351 gcccgtgttt ttctcgcaga ttatcgactg gcaccggaac accctttccc
      A R V F L A D Y R L A P E H P F
      >.....EstC5.....>

1401 ggcggcaacc gatgatgcct ttgctgtata tagcgccttg attaaagaat
      P A A T D D A F A V Y S A L I K E
      >.....EstC5.....>

1451 ccttgccact agtggtgget ggcgattccg ctggcggaaa tctgactctg
      S L P L V V A G D S A G G N L T L
      >.....EstC5.....>

```

```

1501  gcgacgttgc tgcgtgcccg cgacgagcaa cagctcatgc cagtgtgcgc
      A T L L R A R D E Q Q L M P V C
      >.....EstC5.....>

1551  agtggccatt tcacccggcg ccgatgcaac cgggaagctg atgtccaggg
      A V A I S P G A D A T G K L M S R
      >.....EstC5.....>

1601  atgcgaataa tgacagcgac ccgatgctgt cgcggtgat gattgatggc
      D A N N D S D P M L S R V M I D G
      >.....EstC5.....>

1651  gccaccagaa tctacctgca gggagccgat ccgttccatc cctacgcgtc
      A T R I Y L Q G A D P F H P Y A
      >.....EstC5.....>

1701  cccgacgcag ggtgactatc agggctgcc accgttgatg ctgacggtaa
      S P T Q G D Y Q G L P P L M L T V
      >.....EstC5.....>

1751  gtgaagagga atgcctgcgc gatgattcct atgtcgttgc agaacaagct
      S E E E C L R D D S Y V V A E Q A
      >.....EstC5.....>

1801  cgccgtgcga gcgtgccggt cacgctgtta tcacgacagg acatgccgca
      R R A S V P V T L L S R Q D M P
      >.....EstC5.....>

1851  cgtctggcca attttctgc tgctgctacc agaagcccgt caggacacac
      H V W P I F L L L L P E A R Q D T
      >.....EstC5.....>

1901  gcaaaatagt ccgatttatg cagtcccatc tggataatca acggcataac
      R K I V R F M Q S H L D N Q R H N
      >.....EstC5.....>

1951  gatctgcatc atcttgcccg atccagtgca tcaccgacca cgcaggaggc
      D L H H L A R S S A S P T T Q E
      >.....EstC5.....>

2001  tgttgcatga
      A V A -
      >.EstC5.>>

```

Abb. 15: DNA- und Aminosäuresequenz von *estC5*

Dargestellt ist die DNA-Sequenz von *estC5*. Die aus dem *estC5*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz ist unterstrichen und das Start- sowie das Stopkodon kursiv und fett gedruckt dargestellt. Das für Esterasen typische konservierte Motiv des Proteins ist eingerahmt.

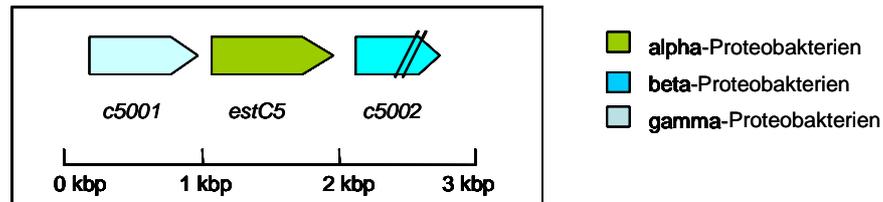


Abb. 16: Schematische Darstellung der offenen Leserahmen des *EcoRI*-Klons pCS-C5.

Die Pfeile stellen die offenen Leserahmen mit ihrer Transkriptionsrichtung dar. Die Farben stehen für die jeweilige Klasse zu der die abgeleitete Proteinssequenz die höchsten Ähnlichkeiten ergab.

Tab. 14: Benachbarte Gene von *estC5*

Offene Leserahmen (ORFs) und deren Ähnlichkeiten von *estC5* und seinen benachbarten Genen.

ORF	Größe des potentiellen Proteins (AA)	Funktion, bester Treffer	GenBank Accession Nr. des besten Treffers	Alignment Region des OFRs (AA)	Alignment Region (AA Bereich/ gesamte AA)	% Ähnlichkeit
C5001	275	Mögliche short-chain Dehydrogenase [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	YP_046395	8-273	11-274/275	54
<i>estC5</i>	319	Esterase/Lipase [<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>]	ZP_00052730	28-281	31-293/319	40
C5002	-	Potentiell Flavoprotein, beteiligt am K ⁺ -Transport [<i>Burkholderia cepacia</i> R1808]	ZP_00222306	39-246	34-241/816	50

3.5 Klonierung der Metagenom-Esterase EstA3

3.5.1 Konstruktion von pCS-EstA3

Für weitere Untersuchungen von EstA3 wurde das Gen *estA3* in den Expressionsvektor pET24c (Fa. Novagen, Madison, USA) kloniert, um es mittels des C-terminalen His-Tags aufzureinigen zu können. Die klonierten Zielgene stehen unter der Kontrolle eines starken T7-Promotors und können mit IPTG induziert werden. Der offene Leserahmen für *estA3* ist in Abbildung 12 dargestellt. Über PCR wurde das Gen amplifiziert. Verwendet wurden hierfür die Primer EstA3-for und EstA3-rev (Tab. 15). Dem Primer EstA3-for wurde am 5'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle angefügt und dem Primer EstA3-rev eine *Hind*III-Schnittstelle, desweiteren wurde der Primer EstA3-rev so ausgewählt, dass das Stop-Codon von *estA3* nicht amplifiziert wurde. Die PCR

wurde mit einer *annealing* Temperatur von 58 °C durchgeführt (s. 2.4.6), verwendet wurde die *Taq*-Polymerase, da für eine anschließende Klonierung in einen Zwischenvektor, den pDrive Vektor von Qiagen (Hilden), A-Überhänge an den Enden des PCR-Produktes benötigt wurden. Als *template* diente das Cosmid pCosCS2-A3. Das PCR-Prudukt entsprach der erwarteten Größe von ca. 1.200 bp (s. 3.4.1). Das amplifizierte DNA-Fragment wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt (s. 2.4.6) und zur Klonierung in den pDrive Vektor eingesetzt (s. 2.4.8).

Tab. 15: Verwendete Primer zur Amplifikation von *estA3*. Schnittstellen sind unterstrichen

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle	T _m [°C]
EstA3-for	5'-GCG <u>GAT CCA</u> TGA GCG CCG AAG AAC TAG GG-3'	<i>Bam</i> HI	72,3
EstA3-rev	5'-CGA <u>AGC TTG</u> GCG GCG AGC GCG CTG TA-3'	<i>Hind</i> III	72,7

Nach der Ligation des PCR Produktes von *estA3*, erfolgte eine Transformation in *E. coli* XL1-Blue. Die Transformanten wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin sowie IPTG und X-Gal ausplattiert. Die Plasmide einiger Klone wurden mittels alkalischer Lyse isoliert (s. 2.4.4.2) und mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Bam*HI überprüft. Positive Klone wurden nochmals auf LB-Platten, die zusätzlich zu Ampicillin als Selektionsmarker Tributyrin (1 %) enthielten, auf die Fähigkeit zur Hydrolyse des Tributyrins getestet. Der positive Klon mit dem weitergearbeitet werden konnte, erhielt die Bezeichnung pDrive::*EstA3*. Zur weiteren Klonierung in den Expressionsvektor pET24c wurde der positive pDrive::*EstA3*-Klon nochmals mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Die Bande von ca. 1.200 bp wurde, nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel überprüft, aus diesem isoliert und in den ebenfalls zuvor mit *Bam*HI und *Hind*III liniarisierten Expressionsvektor pET24c ligiert. Da pET24c keine Blau/Weiß Selektion möglich machte, wurden Klone nach einer Elektroporation (s. 2.5.2.2) in den *E. coli* Wirtsstamm BL21(DE3) auf LB-Agarplatten mit Kanamycin als Selektionsmarker und Tributyrin (1 %) ausplattiert. Die Platten enthielten ebenfalls IPTG, um die Expression von *estA3* zu

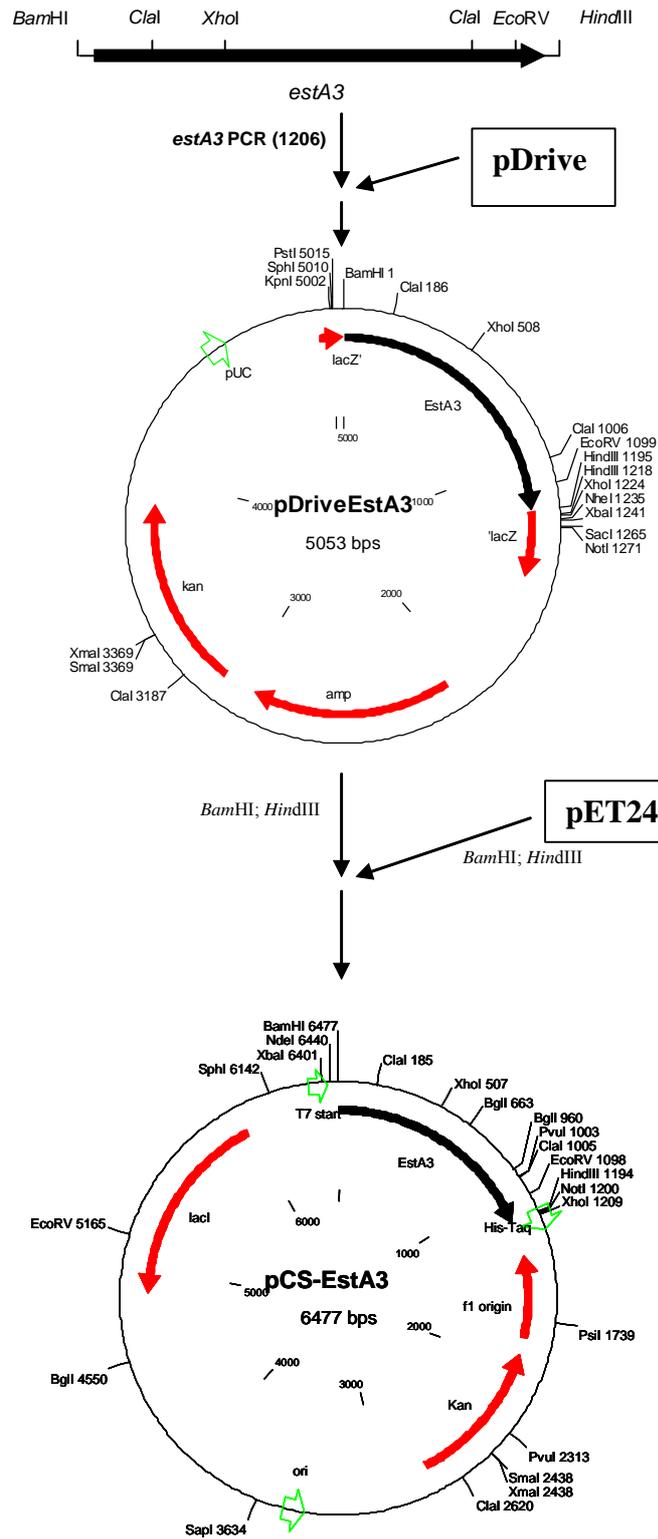


Abb. 17: Klonierungsschema des *estA3*-Gens in den Expressionsvektor pET24c
 Das *estA3*-Gen, das für die lipolytische Aktivität kodiert, ist in schwarz gekennzeichnet.

induzieren. Transformanten, die eine Hofbildung um die Kolonie zeigten wurden mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III abermals auf das Vorhandensein des *estA3*-Gens überprüft. Der positive Klon, mit dem im Folgenden weitergearbeitet wurde, erhielt die Bezeichnung pCS-EstA3 (Abb. 17).

3.5.2 Aufreinigung von EstA3 über Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen

Die Anzucht von pCS-EstA3 erfolgte in 2 l flüssig Kulturen LB-Medium unter Zugabe von Kanamycin als Selektionsmarker. Die Hauptkulturen wurden 1 %ig mit Übernachtskulturen angeimpft und bei einer OD₅₉₅ von 0,5–0,6 mit IPTG induziert (0,1 mM Endkonzentration). Die Kulturen wurden bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert. Die Kultur, mit einer Inkubationstemperatur von 37 °C, wurde nach 4-5 Stunden geerntet, die 30 °C Kultur wurde über Nacht (ca. 16 h) inkubiert und die Zellen anschließend geerntet. Der Aufschluss erfolgte mit der French Press (s. 2.7.1) und nach dem Aufreinigungsprotokoll der Firma Machery und Nagel zur anschließenden Aufreinigung von EstA3 mittels *Kit* (s. 2.8). Das Volumen des nach der Zellernte und – aufschluss erhaltenen Rohextrakts betrug für die Anzucht bei 37 °C 9 ml mit einer Proteinkonzentration von 44,2 mg/ml und für die Anzucht bei 30 °C ein Volumen von 10 ml bei einer Proteinendkonzentration von 44,6 mg/ml. Eine signifikante Überexpression von EstA3 ließ sich sowohl bei der Anzucht bei 37 °C, als auch bei der Anzucht bei 30 °C im SDS-PAGE nicht detektieren. Der Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des Induktors IPTG führte ebenfalls zu keiner sichtbaren Überexpression des Proteins. Es zeigte sich jedoch, dass durch die Aufreinigung über die Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen, sowohl bei der Anzucht bei 37 °C, als auch bei 30 °C die Aufreinigung eines Proteins von ca. 43 kDa über das Histidin-*Tag* stattfand (Abb. 18). Die Induktion bei 30 °C über Nacht ergab in einem Endvolumen von 9 ml 7 mg Protein und bei Induktion bei 37 °C 4,2 mg Protein. In Abbildung 18 ist die Anzucht und die Aufreinigung bei 30 °C wiedergegeben, die ebenfalls der Aufreinigung bei 37 °C entsprach. Weitere Aufreinigungen wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Abbildung 18 zeigt, dass zwischen der Spur 1, in der der Rohextrakt vor der Induktion aufgetragen wurde, und der Spur 2, in der der Rohextrakt nach der Induktion aufgetragen wurde, keine sichtbare Überexpression eines Proteins bei 43 kDa zu erkennen war. In Spur 3, in der die gepoolten Eluate nach der Aufreinigung über die Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen aufgetragen wurden, ist jedoch ein der Größe von EstA3 entsprechendes Protein

erkennbar. Zur Größenbestimmung und weiteren Aufreinigung von EstA3 wurde eine Reinigung über die Gelfiltrationssäule *Superdex 200 prep grade* angeschlossen.

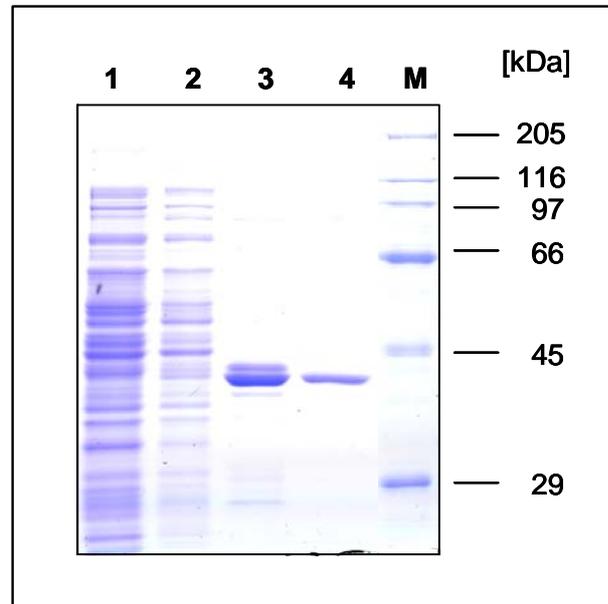


Abb 18: Expression und Aufreinigung von EstA3 (10 % SDS-PAGE).

Spur 1: Rohextrakt vor Induktion (aufgetragenes Protein, 15 μg); Spur 2: Rohextrakt nach Induktion mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) (aufgetragenes Protein, 12 μg); Spur 3: EstA3 nach Aufreinigung über Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen (aufgetragenes Protein, 5 μg); Spur 4: EstA3 nach Gelfiltration (aufgetragenes Protein, 2 μg); M: HMW-Marker

3.5.3 Aufreinigung von EstA3 über die *Superdex 200 prep grade*

Nach der Aufreinigung von EstA3 über Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen wurden die gepoolten Eluate zunächst eingengt, da es bei einer Auftrennung über eine Gelfiltrationssäule ratsam war, ein möglichst kleines Volumen einzusetzen, was eine scharfe Trennung der Proteine bewirkte. Dies erfolgte unter Verwendung der Amicon® Ultra-15 Zentrifugal Filter der Firma Millipore (Billerica, Mass., USA). In einer Eppendorf Zentrifuge des Typs 5804R unter Verwendung eines A-4-44 Rotors wurde das Protein bei 4 °C und 3.000 Upm auf ein Volumen von 1 ml mit einer Proteinmenge von 6,4 mg eingengt. Proteine, die kleiner als 10 kDa waren, wurden dabei ausgeschlossen. Im Anschluß an die Einengung des Proteins wurde eine Dialyse durchgeführt, um überflüssige Salze zu entfernen. Das verbleibende Protein wurde anschließend mittels präparativer Gelfiltration über die *Superdex 200 prep grade*

aufgetrennt. Die Kalibrierung der Säule mit sechs Eichproteinen fand unter identischen Bedingungen statt. In Abbildung 19 ist die mit den Kalibrierungsdaten erstellte Regressionsgerade für die präparative Aufreinigung von EstA3 wiedergegeben. Das Elutionsvolumen für EstA3 konnte bei 62 ml ermittelt werden (Abb. 20). Mit Hilfe der

Parameter:

Medium	: Superdex 200 prep grade
Säule	: HiLoad 16/60
Säulenvolumen	: 121 ml
Laufmittel	: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl
Flußrate	: 1 ml/min
Fraktion	: 1,5 ml
Protein	: 6,4 mg

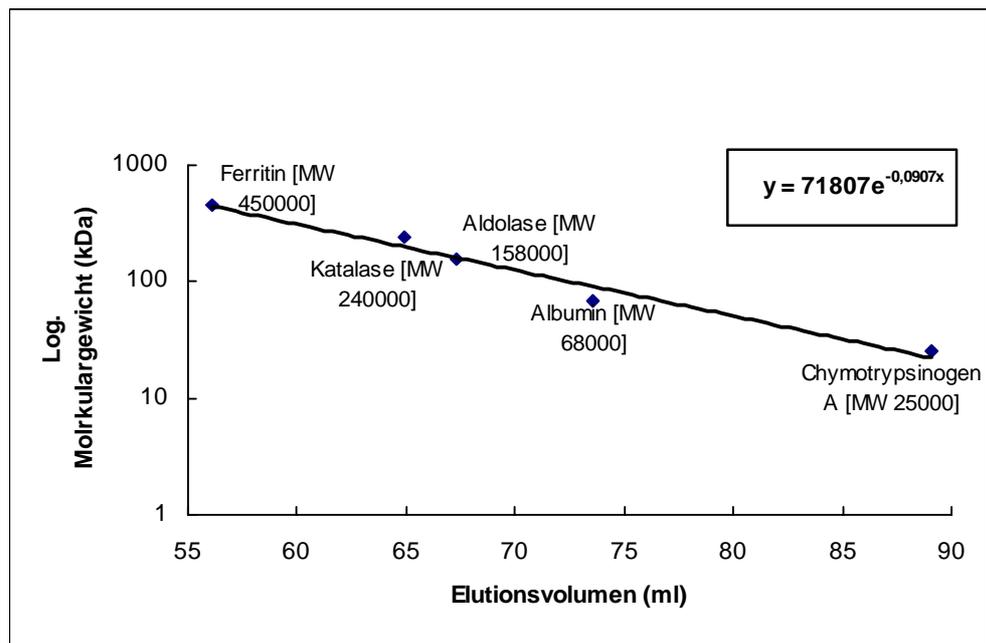


Abb. 19: Eichgerade für die präparative Gelfiltration mit einer Superdex 200 pg HiLoad 16/60- Säule.

berechneten Ausgleichsgrade aus den Kalibrierungsdaten ergab sich für EstA3 eine Größe von 260 kDa. Aliquots von 20 µl der gesammelten Fraktionen von EstA3 wurden auf LB-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) hinsichtlich ihre Aktivität untersucht. Es zeigte

sich die typische Aufklärung des Agars für die Fraktionen in denen EstA3 gesammelt wurde. Dies zeigt, dass EstA3 in seiner aktiven Form wesentlich größer als erwartet

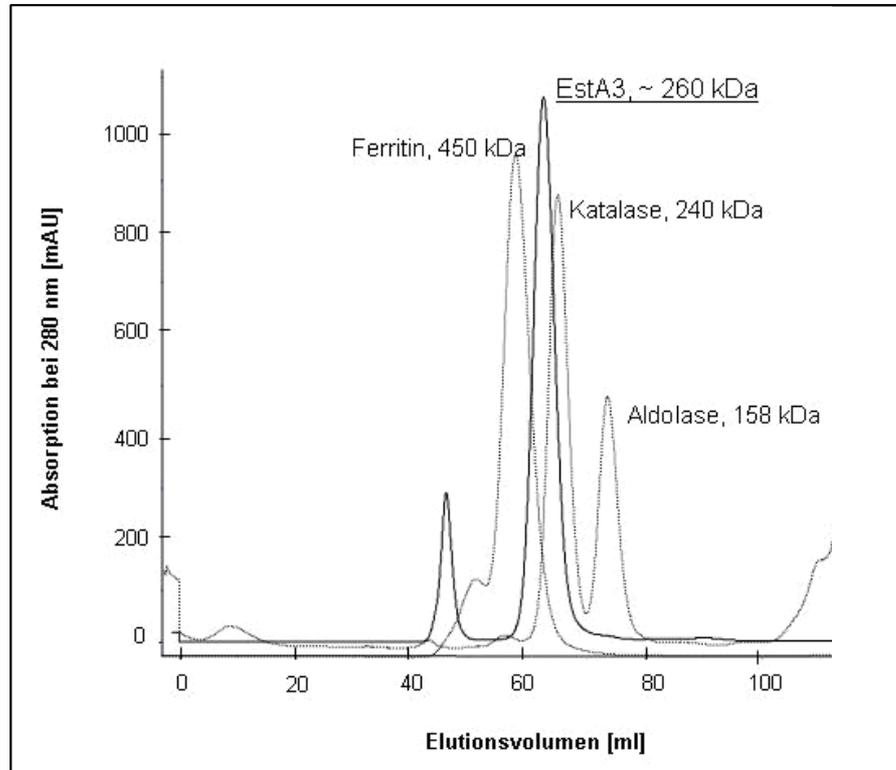


Abb. 20: Chromatogramm des Säulenlaufs über die *Superdex 200 prep grade* zur Reinigung und Größenbestimmung des rekombinanten EstA3-Proteins. Der aufgetrennte Proteinextrakt ist durch die schwarze Linie dargestellt. Die unterbrochenen grauen Linien geben drei der Eichproteine wieder.

vorliegt. Die monomere Größe, die aus der Aminosäuresequenz von EstA3 abgeleitet wurde, betrug 43,27 kDa. Bei der ermittelten Größe von 260 kDa liegt EstA3 als Hexamer vor. In Abbildung 18 wurden 2 µg des gereinigten Proteins auf ein 10 %iges SDS-PAGE aufgetragen. In denaturierter Form wurde eine Bande (Spur 4) von ca. 43 kDa sichtbar, die das gereinigte und monomere EstA3 darstellt.

3.5.4 Nachweis der Multimerisierung von EstA3

Um die Vermutung zu bestätigen, dass EstA3 in seiner aktiven Form als Multimer vorliegt, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde

EstA3 in einem 10 % SDS-PAGE sowohl in seiner denaturierten Form, als auch in seiner nativen Form aufgetragen (Abb. 21 A-C). In Spur 1 ist das gereinigte EstA3-Protein zu erkennen, in seiner denaturierten Form läuft es wie erwartet bei ca. 43 kDa.

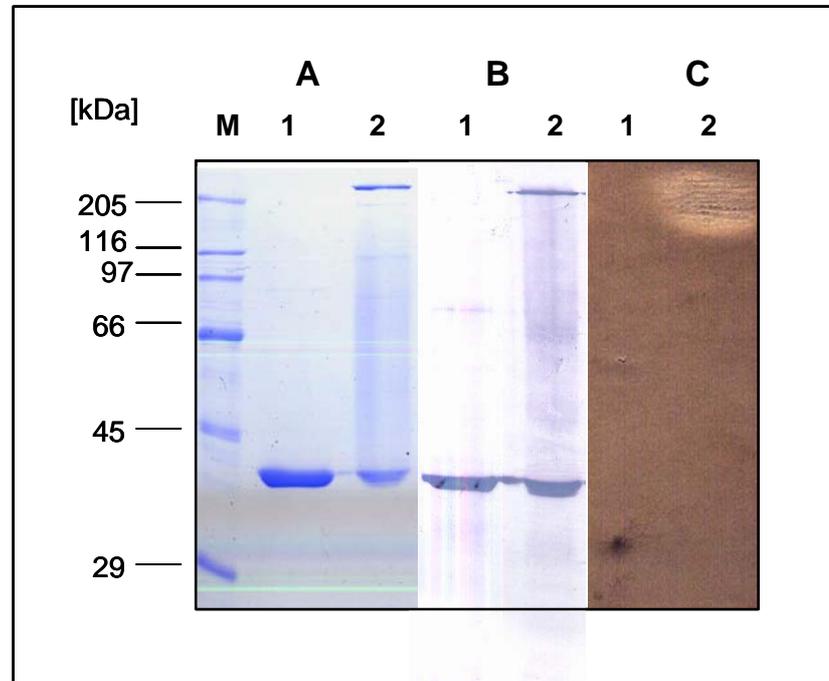


Abb. 21: Nachweis der Multimerisierung von EstA3

A, 10 %ige SDS-PAGE; B, Western Blot; C, Aktivitätsgel; in Spur 1 wurde EstA3 vor dem Auftragen auf das Gel aufgeköcht, in Spur 2 wurde EstA3 unaufgeköcht und in nativem Ladepuffer aufgetragen

In Spur 2 wurde zusätzlich zu der Bande bei 43 kDa noch eine weitere Bande sichtbar, die oberhalb von 205 kDa läuft. Hierbei handelt es sich vermutlich um das native EstA3, das durch das SDS in dem Gel und dem Laufpuffer nicht denaturiert wurde. Dies unterstützte die Vermutung, dass EstA3 als Multimer vorkommt. In Abbildung 21 B ist der Western-Blot (s. 2.13) zu dem 10 %igen SDS-PAGE dargestellt. Der verwendete Antikörper (Anti-His-Antikörper; MoBiTec, Göttingen) richtete sich gegen das sechsfache His-Tag des rekombinanten Fusionproteins. Die Spur 1 zeigt das denaturierte EstA3, die Bande, die in dem Western-Blot zu sehen ist, ist mit der Bande im SDS-PAGE identisch, ebenfalls ließ sich die Bande, die zusätzlich in dem nativen Proteinextrakt (Spur 2) zu sehen ist, mit dem His-Tag-Antikörper nachweisen. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei diesem Protein ebenfalls um EstA3 handelte und es hier als Multimer vorkam. Zum Nachweis der Aktivität von EstA3 wurde zusätzlich eine Aktivitätsfärbung nach Sommer et al. (1997) durchgeführt (s. 2.12.3). In

Abbildung 21 C ist das Aktivitätsgel dargestellt. Der denaturierte Proteinextrakt in Spur 1 zeigt wie erwartet keine Aufklärung des Agars, in Spur 2 dagegen wurde eine Aufklärung in Höhe der Bande oberhalb von 205 kDa sichtbar. Dies zeigte, dass EstA3 nur in seiner multimeren Form aktiv ist. Um auszuschließen, dass die Multimerisierung durch das His-Tag hervorgerufen wurde, wurde dieser Test ebenfalls mit dem pDrive::EstA3 Klon durchgeführt, in dem EstA3 ohne His-Tag exprimiert wurde. Der aktive Rohextrakt zeigte im Aktivitätsgel eine identische Bande wie das aufgereinigte EstA3.

3.6. Biochemische Charakterisierung von EstA3

3.6.1 Charakterisierung der β -Laktamaseaktivität von EstA3

Die Sequenzanalyse von EstA3 (s 2.4.1) zeigte signifikante Ähnlichkeit zu einer β -Laktamase aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (RP) mit der typischen Konsensus Sequenz des aktiven Zentrums von β -Laktamasen. Daher sollte EstA3 zunächst auf seine Aktivität gegenüber einiger β -Laktam-Antibiotika getestet werden. Zu den β -Laktam-Antibiotika gehören Penicilline und Cephalosporine. Chemisch sind sich Penicilline und Cephalosporine ähnlich; sie besitzen den gleichen β -Laktam-Ring. Bei den Cephalosporinen ist dieser jedoch mit einem sechsgliedrigen, bei den Penicillinen mit einem fünfgliedrigen Ring fusioniert. β -Laktamasen sind in der Lage, den β -Laktam-Ring hydrolytisch zu spalten, so dass die antibiotische Wirkung verloren geht. Um zu untersuchen, ob auch EstA3 diese hydrolytische Aktivität besitzt, wurde pCS-EstA3 in *E. coli* BL21 (DE3) angezogen und bei einer OD₅₉₅ von 0,5 auf LB-Agar-Platten mit IPTG (0,1 mM Endkonzentration) ausplattiert. Durch das IPTG sollte eine Expression des rekombinanten Enzyms gewährleistet werden. Mittels Antibiotikaplättchen, die auf die LB-Platten aufgelegt wurden, sollte nach Inkubation bei 37°C über Nacht über die Größe der Hemmhöfe ermittelt werden, ob das rekombinante Protein dem *E. coli* Stamm eine erhöhte Resistenz gegenüber den verwendeten β -Laktam-Antibiotikum vermittelte. Als Kontrolle diente der leere Expressionsvektor pET24c. Getestet wurden die β -Laktame Amoxicillin, Ampicillin, Cefaclor, Cefixime, Cefitibuten Ceftriaxone, Cefazidim, Cefoxitin, Cefadroxil, Cefotaxime, Cefamandole, Loracarbef, Meropenem, Mezlocillin und Penicillin G der Firma Oxoid. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse dargestellt. Im Vergleich zu der Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde, waren keine signifikanten Abweichungen in der

Hemmhofgröße zu erkennen. Es schien, als würden die Antibiotika Ampicillin, Loracarbef, Ceftazidim und Cefamandole den Wirtsstamm eher etwas sensitiver gegenüber dieser Wirkstoffe werden lassen.

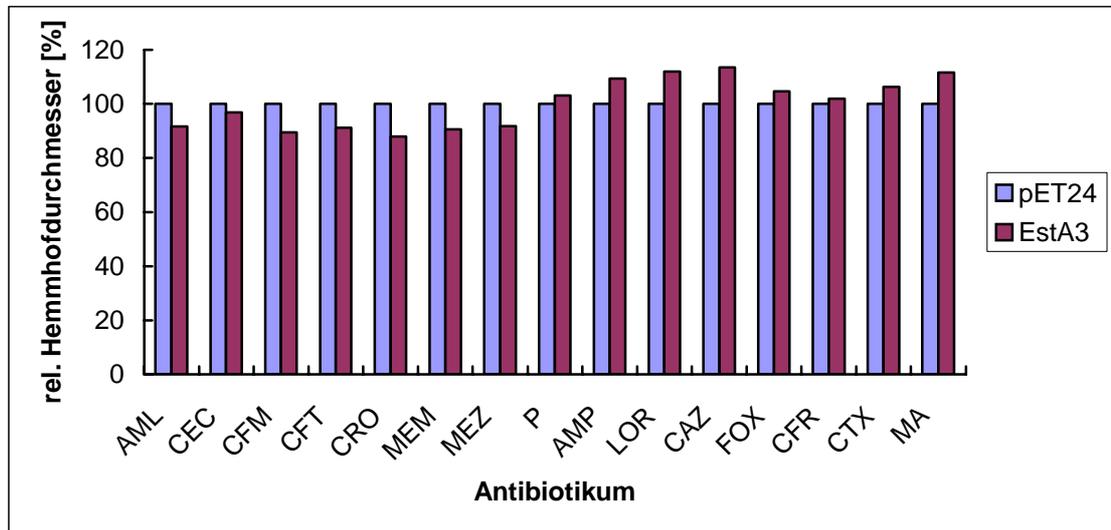


Abb. 22: Schematische Darstellung der Hemmhofbildung. Verglichen wurde die Hemmhofgröße des rekombinanten Proteins EstA3 gegenüber der Hemmhofbildung des leeren Expressionsvektors pET24c in *E. coli* BL21 (DE3), diese Höfe wurden auf 100 % gesetzt

β-Laktam-Antibiotika

AML Amoxicillin, **CEC** Cefaclor, **CFM** Cefixime, **CFT** Ceftributen, **CRO** Ceftriaxone, **MEM** Meropenem, **MEZ** Mezlocillin, **P** Penicillin, **AMP** Ampicillin, **LOR** Loracarbef, **CAZ** Ceftazidim, **FOX** Cefoxitin, **CFR** Cefadroxil, **CTX** Cefotaxime, **MA** Cefamandole

3.6.2 Bestimmung des Temperaturoptimums von EstA3

Bestimmt wurde der Temperaturbereich, in dem EstA3 seine größte Aktivität hatte. Als Substrat diente dazu p-Nitrophenyl-Caproat. Die Tests wurden wie unter 2.15.1 beschrieben durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 0,03 µg Enzym. Die höchste Aktivität von 450 U/mg konnte für EstA3 bei 50 °C ermittelt werden (Abb. 23). Die nachfolgenden Tests wurden daher bei 50 °C durchgeführt.

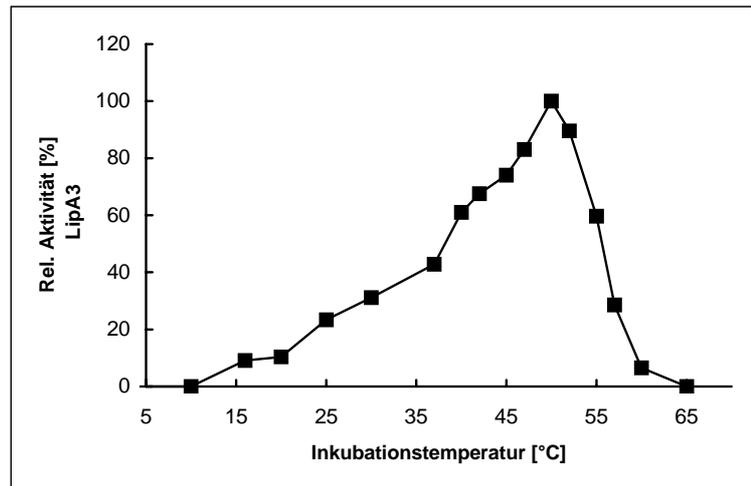


Abb. 23: Temperaturoptimum von EstA3.

Die gemessenen Werte wurden in Relation zum höchsten Meßwert der Versuchsreihe in Prozent angegeben.

3.6.3 Bestimmung der Thermostabilität von EstA3

Zur Bestimmung der Thermostabilität von EstA3 wurde wie unter 2.15.4 beschrieben vorgegangen. Das Enzym wurde bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und die verbleibende Aktivität durch Entnahmen von Aliquots zu unterschiedlichen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Die Aktivitätstests wurden bei 50 °C durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 0,03 µg Enzym in einem Testansatz von 1,5 ml. Als Substrat wurde p- Nitrophenyl-Caproat verwendet. Aus Abbildung 24 geht hervor, dass EstA3 bei 60 minütiger Inkubation bei 37 °C eine Restaktivität von 67 % aufwies. Je höher die Inkubationstemperatur gewählt wurde, umso schneller sank die Aktivität von EstA3. Bei 50 °C erreichte EstA3 seine höchste Aktivität (Abb. 24), die Halbwertszeit betrug bei dieser Temperatur ca. 40 min. Bei Anstieg der Inkubationstemperatur ließ die Aktivität von EstA3 sehr schnell nach. So betrug die Halbwertszeit bei einer Inkubationstemperatur von 55 °C weniger als 10 min, bei 60 °C war für EstA3 nach 10 minütiger Inkubation keine Aktivität mehr zu verzeichnen.

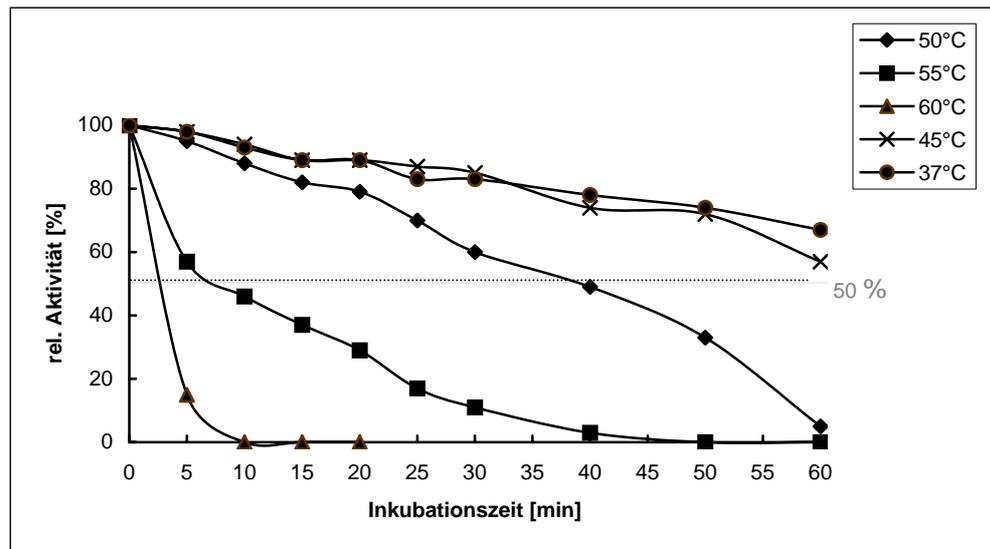


Abb. 24: Thermische Inaktivierung von EstA3 bei unterschiedlichen Temperaturen. Die relative Aktivität ist jeweils in Bezug auf den ersten Meßwert dargestellt.

3.6.4 Bestimmung der Substratspezifität von EstA3

In Abhängigkeit von der Acylkettenlänge unterschiedlicher p-Nitrophenyl (pNP)-Ester wurde die spezifische Enzymaktivität von EstA3 bestimmt (Tab. 16). Die Tests wurden wie unter 2.15.2 beschrieben bei 50 °C und einer Inkubationsdauer von 15 min durchgeführt. Für die kurzkettigen p-NP-Acylester, wie p-NP-Acetat, -Butyrat, -Valerat und -Caproat, konnten spezifische Aktivitäten nachgewiesen werden, wobei die höchsten Aktivitäten bei der Hydrolyse von para-Nitrophenyl-Butyrate gemessen wurden (513,6 U/mg). p-NP-Butyrat wurde um ein achtfaches stärker umgesetzt als p-NP-Acetat. Ebenfalls konnten p-NP-Valerate und -Caproat von EstA3 gut umgesetzt werden (jeweils 425,7 U/mg). Für p-NP-Oktanoat konnte eine spezifische Aktivität von 3,6 U/mg Enzym nachgewiesen werden. Für längerkettige Acylester wie p-NP-Dekanoat und -Palmitat, welche typische Lipasesubstrate darstellen, konnten keine Aktivitäten verzeichnet werden.

Tab. 16: Substratspezifität von EstA3

Enzymaktivität von EstA3 in Abhängigkeit der Acylkettenlänge unterschiedlicher para-Nitrophenyl Substrate. Die Tests wurden bei 50 °C und einer Inkubationsdauer von 15 min durchgeführt.

pNP-Substrat	Spezifische Aktivität (U/mg)
Acetat (C ₂)	74,0
Butyrat (C ₄)	513,6
Valerat (C ₅)	425,7
Caproat (C ₆)	425,7
Oktanoat (C ₈)	3,6

pNP-: para-Nitrophenyl-

3.6.5 Einfluss verschiedener Salze und EDTA auf die Aktivität von EstA3

Der Test wurde ohne eine Vorinkubation des Enzyms mit der entsprechenden Salzlösung durchgeführt (s. 2.15.6). In Abbildung 25 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Aktivität von EstA3 wurde in Anwesenheit fast aller getesteten Salzlösungen herabgesetzt. Durch die Zugabe von Magnesium in 1 mM Konzentration wurde die Aktivität von EstA3 um 90 % herabgesetzt, auch die Zugabe von Calcium in 1 mM Konzentration setzte die Aktivität von EstA3 um 80 % herab. Ebenso verhielt es sich bei der Zugabe von Kupfer. In Anwesenheit von EDTA wurde die Aktivität von EstA3 ebenfalls herabgesetzt. Bei einer Endkonzentration von 10 mM EDTA im Testansatz verlor EstA3 80 % seiner Aktivität. Nur durch die Zugabe von Cobalt konnte die Aktivität von EstA3 gesteigert werden. In 5 mM Konzentration wurde die Aktivität um 30 % erhöht.

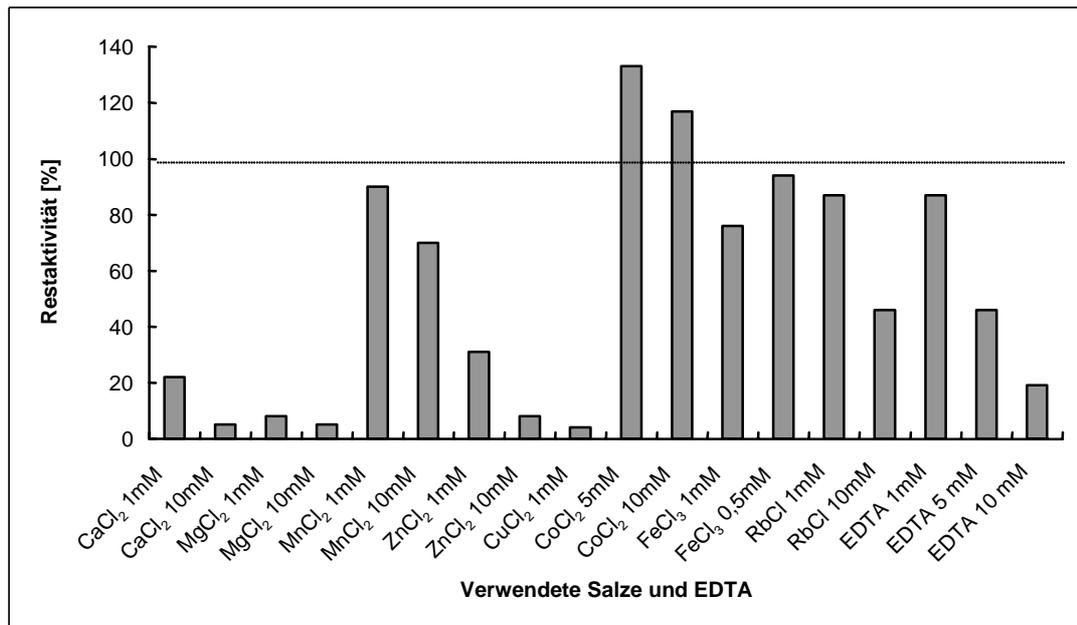


Abb. 25: Einfluß verschiedener Ionen und von EDTA auf die Aktivität von EstA3.

0,1 µg EstA3 wurden mit den entsprechenden Komponenten in den jeweiligen Konzentrationen in 1,5 ml Testansätzen mit 20 mM Tris-Puffer (pH 7,2) und p-NP-Caproat als Substrat für 15 min bei 50 °C inkubiert. Dargestellt ist die verbleibende Restaktivität von EstA3. Als Referenzwert diente ein Inkubationsansatz ohne Zugabe eines Salzes.

3.6.6 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Aktivität von EstA3

Für die Untersuchung der Aktivität von EstA3 in verschiedenen organischen Lösungsmitteln wurde EstA3 zunächst mit den entsprechenden Lösungsmitteln für 60 min bei 30 °C vorinkubiert. Die getestete Konzentration der jeweiligen Lösungsmittel im Inkubationsansatz betrug 15 % bzw. 30 % (v/v) (s. 2.15.7). Anschließend wurde die Restaktivität, wie unter 2.15.1 beschrieben, bestimmt. Als Referenz diente das in Abwesenheit des Lösungsmittels bei 30 °C für 60 min inkubierte Enzym.

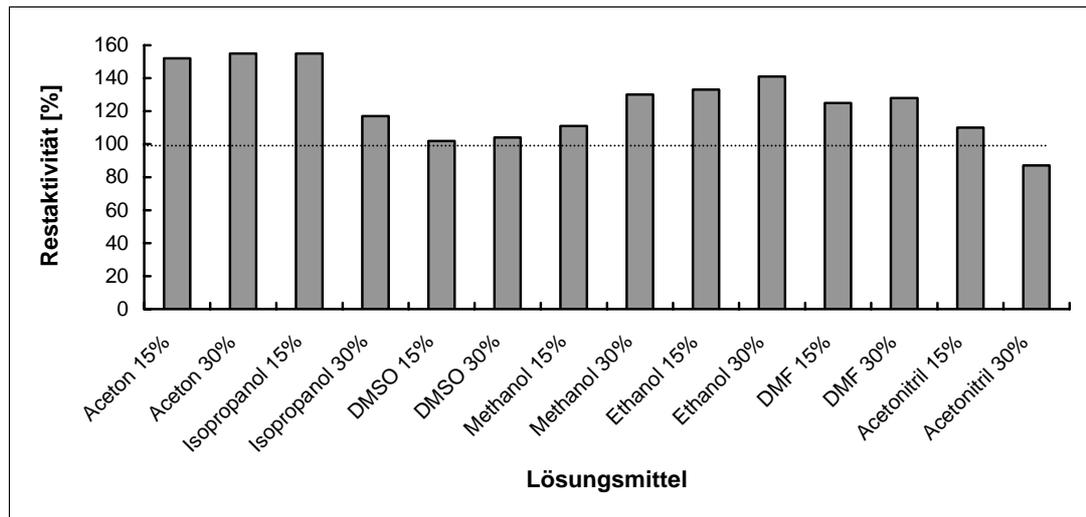


Abb. 26: Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Aktivität von EstA3.

EstA3 wurde 60 min bei 30 °C in den entsprechend konzentrierten Lösungsmitteln vorinkubiert. Dargestellt ist die verbleibende Aktivität in Relation zu dem ebenfalls vorinkubierten Enzym ohne Zusatz des Lösungsmittels.

Die Ergebnisse zeigen, dass EstA3 eine hohe Stabilität in den verwendeten Lösungsmitteln hatte, lediglich eine 30 % Acetonitril-Lösung hatte einen geringen aktivitätssenkenden Einfluß auf das Enzym. In einer 30 % Aceton-Lösung bzw. einer 15 % Isopropanol-Lösung konnte die Aktivität von EstA3 um fast 50 % gesteigert werden. Auch in Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol und DMF zeigte EstA3 eine deutlich gesteigerte Aktivität.

3.6.7 Bestimmung des pH-Optimums von EstA3

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die Aktivität von EstA3 in einem pH-Bereich von 4-11 gemessen (Abb. 27). Als geeignete Puffer wurde ein Na-Phosphat-Puffer (50 mM) im Bereich von pH 4-7 verwendet und im Bereich von pH 7-11 ein Tris-Puffer (50 mM). Die Titration erfolgte bei 37 °C mit Tributyrin als Substrat. Die Enzymaktivität von EstA3 wurde über einen Zeitraum von 5 min gemessen. In einem pH-Bereich von 8-10 konnte für EstA3 die höchste Aktivität ermittelt werden.

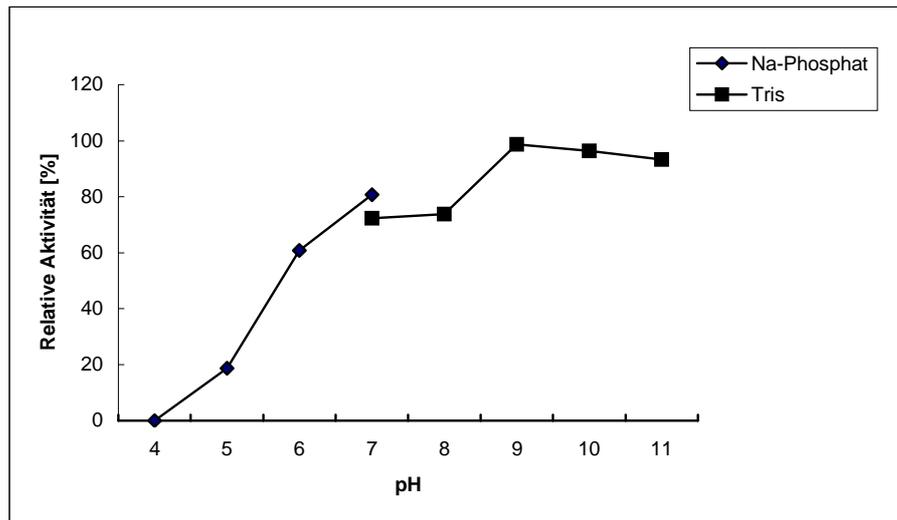


Abb. 27: Bestimmung des pH-Optimums von EstA3.

Die Titration (s. 2.15.6) erfolgte bei 37 °C in den entsprechenden Puffern über einen Zeitraum von 5 min. Als Substrat wurde Tributyrin verwendet. Eingesetzt wurden 2,5 µg Enzym.

3.6.8 Bestimmung der pH-Stabilität von EstA3

Zur Bestimmung der pH-Stabilität wurde EstA3 für 48 h bei RT in den jeweiligen Puffern inkubiert. In einem pH-Bereich von 2 und 3 und 10-13 wurde ein Glycin Puffer (50 mM) verwendet, für den Bereich von 4-6 ein Na-Phosphat-Puffer (50 mM) und in dem pH-Bereich von 7-9 ein Tris-Puffer (50 mM). Als Substrat wurde pNP-Caproat verwendet. die Messung der Enzymaktivität erfolgte über 15 min bei einer Temperatur von 37 °C. Die Messungen ergaben, daß EstA3 über einen pH-Bereich von 6-11 relativ stabil ist.

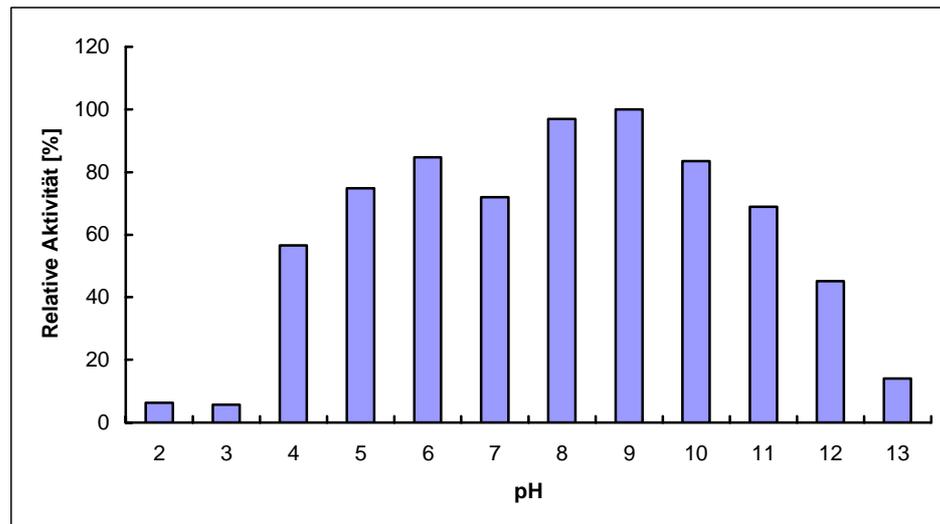


Abb. 28: Bestimmung der pH Stabilität von EstA3.

EstA3 wurde für 48 h in den jeweiligen Puffern bei dem entsprechenden pH-Wert inkubiert. pH 2-3 und 10-13 Glycin Puffer (50 mM); pH 4-6 Na-Phosphat-Puffer (50 mM); pH 7-9 ein Tris-Puffer (50 mM). Die Aktivitätsmessung erfolgt bei 37 °C über einen Zeitraum von 15 min. Verwendet wurde pNP-Caproat als Substrat. Eingesetzt wurden jeweils 2,5 µg Enzym.

3.6.9 Bestimmung des Substratspektrums von EstA3

In Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Jean-Louis Reymond an der Universität Bern (Schweiz) wurde ein Substratspektrum für bestimmte Modellsubstrate (Abb. 29 b) 1-20) von EstA3 mit dem anderer Esterasen/Lipasen verglichen. Untersucht wurde hierfür die Umsetzung 20 verschiedener Oktanoyl- bzw. Butanoylmonoester. Die unterschiedliche Substituenten der Ester waren mit UV-Chromophoren markiert, wodurch eine Trennung und sensitive Detektion der abgespaltenen Dirole durch die eingesetzten Lipasen bzw. Esterasen über RP-HPLC möglich wurde (Goddard und Reymond, 2004). Die für EstA3 ausgewerteten Daten konnten in farbigen *Fingerprints* dargestellt werden (Abb. 29). Der am stärksten umgesetzte Oktanoylmonoester (8) ist in rot eingerahmt. Es handelte sich hierbei um die R-enantiomere Form des Substrates, die S-enantiomere Form dieses Esters wurde nur wenig umgesetzt. Der Butanoylmonoester der am besten von EstA3 umgesetzt wurde, ist in gelb eingerahmt dargestellt (Abb. 29, b), 14). Die so erzeugten *Fingerprints* der Aktivität gegenüber ausgewählten Substraten von EstA3 wurden mit denen anderer Esterasen/Lipasen verglichen (Abb. 30). Aus der errechneten Distanzmatrix, die über die Substratspektren der anderen Esterasen/Lipasen ermittelt wurde, ging hervor, dass das Substratspektrum von EstA3 dem eukaryontischer Enzyme, wie Lipasen aus *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei* und einer Esterase aus Schweineleber sehr ähnlich ist.

Verwendete Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens* oder *Pseudomonas cepacia* unterscheiden sich dagegen stärker hinsichtlich ihrer Umsetzung gegenüber der verwendeten Substrate von EstA3.

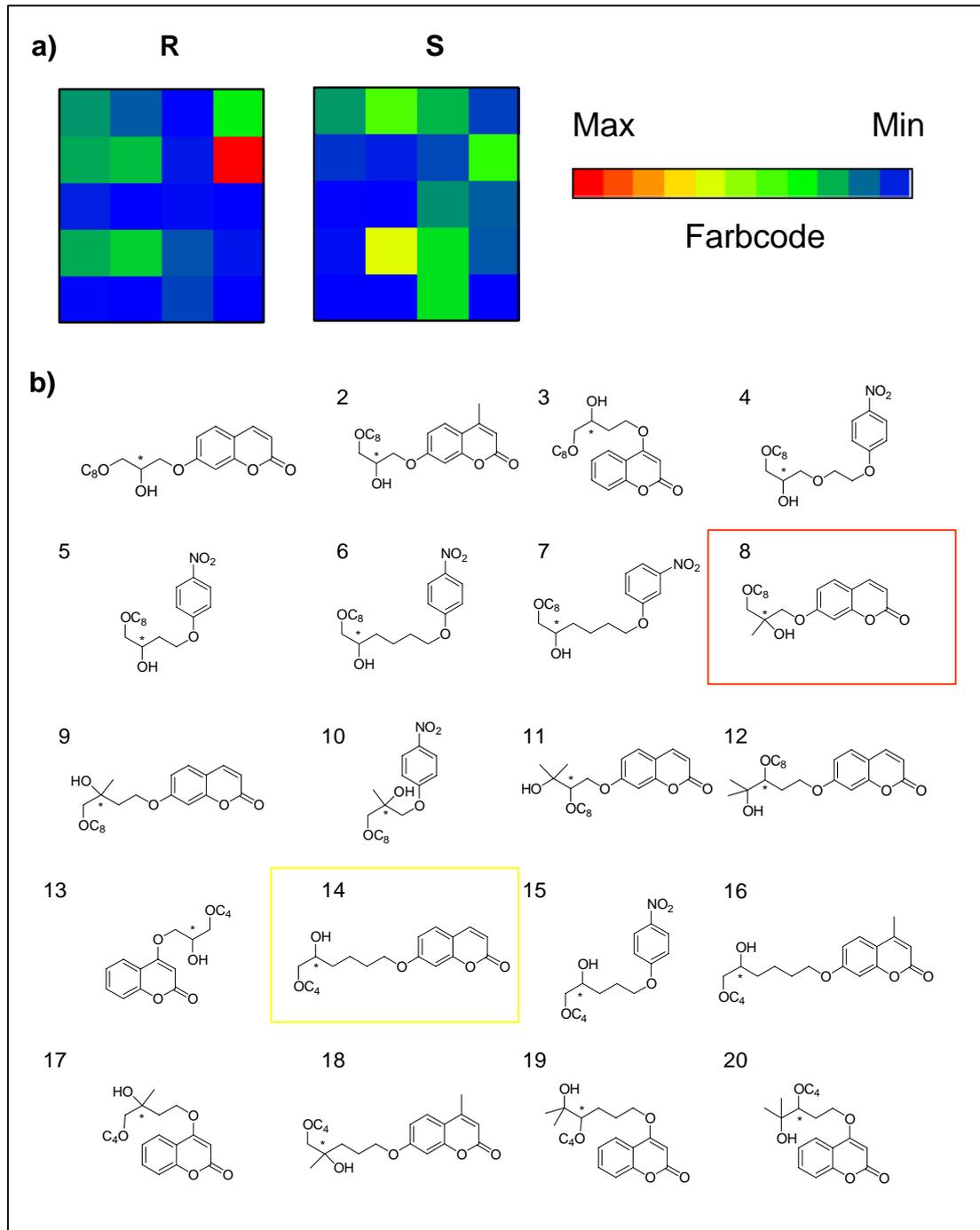


Abb. 29: Fingerprints der Esterase EstA3 von 20 Oktanoyl (C₈O)- bzw. Butanoylmonoestern (C₄O). **a)** Fingerprints von EstA3. Darstellung der Aktivität von EstA3 gegenüber der R- und S-Enantiomeren Form des Substrats. Der Farbcode spiegelt die Stärke der Umsetzung wieder. Eingerahmt sind die Produkte der am stärksten umgesetzten Substrate. **b)** Darstellung der 20 eingesetzten Substrate (1-20). Der anomere Kohlenstoff ist mit einem Stern markiert.

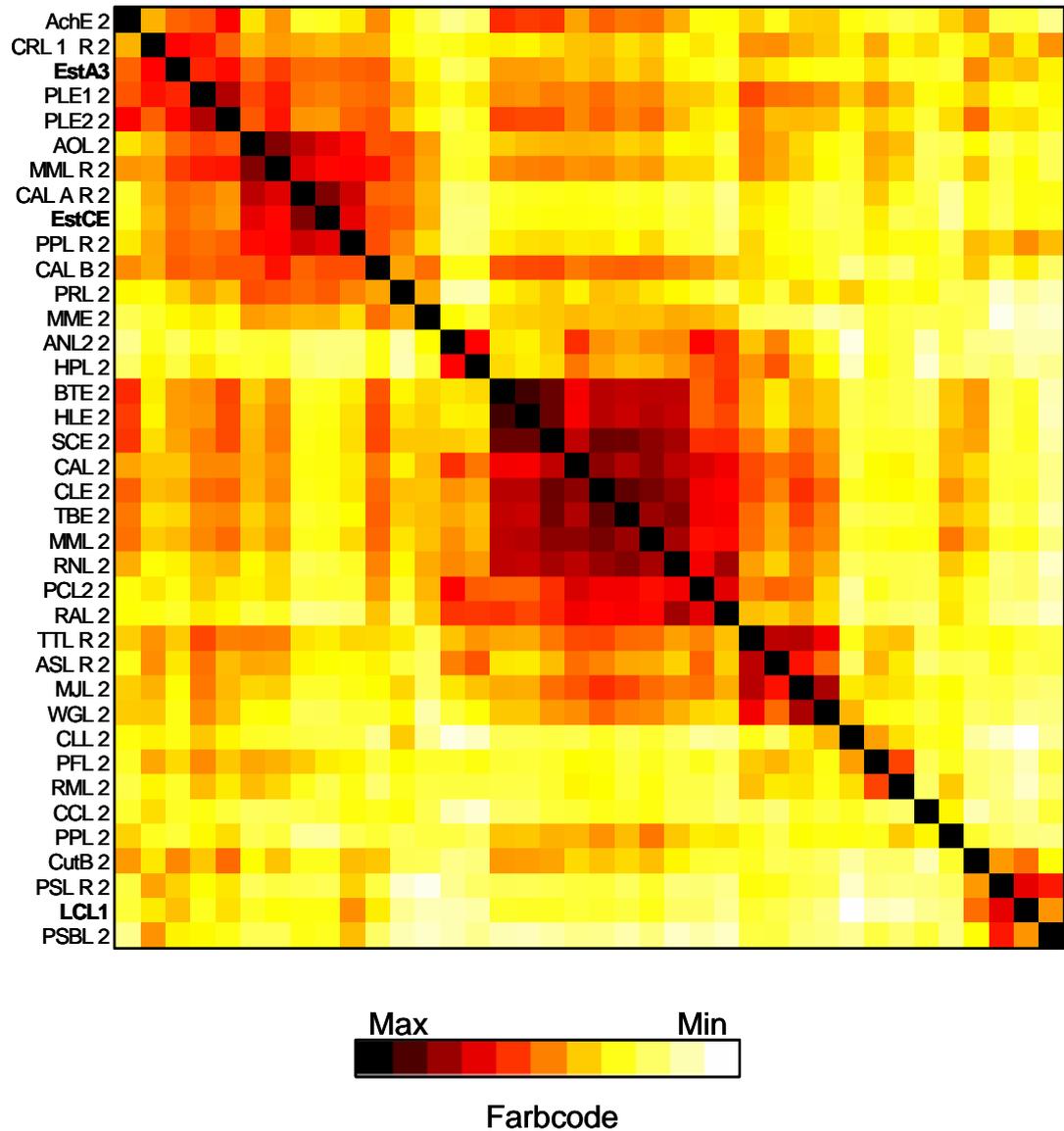


Abb. 30: Distanzmatrix aus verschiedenen enzymatischen *Fingerprints* unterschiedlicher Organismen. Die Ähnlichkeit zwischen den Proben wurde mittels Euklidischer Distanz errechnet, definiert durch jede Substrataktivität, die farblich dargestellt wurden (schwarz stellt höchste Aktivität dar und weiß die geringste), Die Abkürzungen für die Enzymnamen sind in Tab. 17 angegeben.

Tab. 17: Abkürzungsverzeichnis der Enzymnamen aus Abb. 29.

Abkürzung	Enzymname	Abkürzung	Enzymname
CAL B	<i>Candida antarctica</i> Lipase Fraktion B (Chirazyme L-2)	PSL	<i>Pseudomonas</i> sp. Lipase (Chirazyme L-6)
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipase (Chirazyme L-3)	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i> Lipase (F-62285)
CAL A	<i>Candida antarctica</i> Lipase Fraktion A (Chirazyme L-5)	PLE1	Esterase aus Schweineleber Fraktion 1 (Chirazyme E-1)
PPL1	pankreatische Lipase aus Schwein (Chirazyme L-7)	PLE2	Esterase aus Schweineleber Fraktion 2 (Chirazyme E-2)
TTL	<i>Thermomyces lanuginosa</i> Lipase (Chirazyme L-8)	ASL	<i>Alcaligenes</i> sp. Lipase (Chirazyme L-10)
CAL	<i>Candida antarctica</i> Lipase (F-62299)	ANL	<i>Aspergillus niger</i> Lipase (F-62294)
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> lipase (F-62291)	WGL	Lipase aus Weizenkeimen (F-62306)
MML1	<i>Mucor miehei</i> Lipase (F-62298)	MML2	<i>Mucor miehei</i> Lipase (Chirazyme L-9)
RAL	<i>Rhizopus arrhizus</i> Lipase (F-62305)	SCE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Esterase (F-46071)
CLE	<i>Candida lipolytica</i> Esterase (F-46056)	BSE	<i>Bacillus</i> sp. Esterase (F-46062)
PCL2	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase Fraktion 2 (F-62309)	MME	<i>Mucor miehei</i> Esterase (F-46059)
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Lipase (F-62321)	AchE	Acetylcholinesterase aus <i>electrophorus electricus</i> (C-2629)
HLE	Esterase aus Pferdeleber (F-46 069)	CCL	<i>Candida cylindracea</i> Lipase (F-62316)
Cut B	Cutinase B	RNL	<i>Rhizopus niveus</i> Lipase (F-62310)
PSBL	<i>Pseudomonas</i> sp. B Lipoprotein Lipase (F-62336)	PRL	<i>Penicillium roqueforti</i> Lipase (F-62308)
CLL	<i>Candida lipolytica</i> Lipase (F-62303)	PPL2	<i>Porcine pancreas</i> Lipase (F-62278)
TBE	<i>Thermoanaerobiumbrockii</i> Esterase (F-46061)	HPL	pankreatische Lipase vom Schwein (F-62300)
MJL	<i>Mucor javanicus</i> Lipase (F-62304)	EstCE	Metagenom-Esterase aus Boden-DNA
LCL	Metagenom-Esterase aus Biofilm-DNA		

Chirazyme Enzyme stammen von Roche, mit F markierte Enzyme von Fluka und AchE von Sigma

3.6.10 Kristallisierung von EstA3

In Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Bauke Dijkstra der Universität Groningen (Niederlande) konnten erste Kristalle von EstA3 (Abb. 31) gezüchtet werden. Die für eine Röntgenstrukturanalyse nötige Vereinzelung der Kristalle war bisher noch nicht möglich. Dazu werden die Kristallisationsbedingungen derzeit noch verbessert.

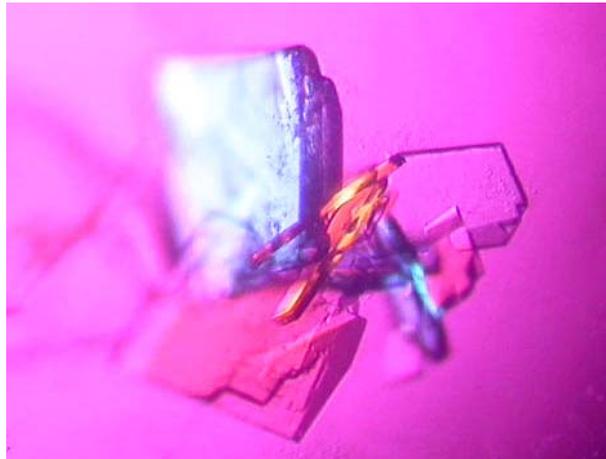


Abb. 31: Kristall der rekombinant in *E. coli* exprimierten Esterase EstA3 im polarisierten Licht.

Kristallisationsbedingungen:

20 % PEG4000, 100 mM Hepes pH 7.5, 0.1 M CaCl₂

3.7 Ortsspezifische Mutagenese des aktiven Zentrums von EstA3

Wie schon unter 3.3.5 beschrieben konnten in der Aminosäuresequenz von EstA3 die für Esterasen und Lipasen typische konservierte Sequenzen, die das aktive Serin umgeben, wie G-X-S-X-G (Petersen und Drablos, 1994) oder G-D-S-L (Upton und Buckley, 1995) nicht identifiziert werden. Vielmehr fand man eine hohe Ähnlichkeit zu β -Laktamasen der Klasse C mit der konservierte Sequenz S-X-X-K, die das mutmaßliche Serin₆₁ umgibt (Abb.12). Demnach ließ sich EstA3 nach Arpigny und Jäger (1999) in die Familie VIII der Esterasen einteilen. Um festzustellen, ob es sich bei dem Serin an Position 61 um das aktive Serin handelte, wurde eine gerichtete Mutagenese durchgeführt, wobei das Serin an Position 61 gegen ein Alanin ausgetauscht werden sollte.

3.7.1 Gerichtete Mutagenese des Serin₆₁ von EstA3

Für den gezielten Austausch von Aminosäuren wurde das *QuikChange® Site Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) verwendet (s. 2.4.9). Ziel war es, das Serin an Position 61 durch ein Alanin zu ersetzen (Abb. 32). Die für die Einführung der Punktmutation verwendeten Primer sind in Tab 18 dargestellt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Tab. 18: Verwendete Primer für die Einführung des Aminosäureaustauschs in EstA3.

Austausch des Serin an Position 61 gegen ein Alanin. Das mutagenisierte Codon ist in der Primersequenz jeweils unterstrichen.

Primer	Sequenz	T _m [°C]
S61A	5'-ATTTTCCGCATTGCAG <u>CG</u> GATGACCAAACCGGTC-3'	70,7
Antisense S61A	5'-GACCGGTTTGGTCAT <u>CG</u> CTGCAATGCGGAAAAT-3'	70,7

<u>PCR-Bedingungen:</u>	Erste Denaturierung	95 °C	2 min
	<u>30 Zyklen:</u>		
	1.) Denaturierung	94 °C	30 sec
	2.) Primer-Anlagerung	65 °C	30 sec
	3.) Synthese	72 °C	90 sec
	Letzter Syntheseschritt	72 °C	5 min

Als *template* für die PCR wurde das Plasmid pCS-EstA3 verwendet. Durch den Einbau der Primer wurde ein mutiertes Plasmid mit Strangbrüchen erzeugt. Unter Verwendung der *DpnI*-Endonuklease, die spezifisch für (halb-)methylierte DNA ist, wurde im Anschluss an die PCR das parentale DNA-*template* abgedaut. Die mutierte DNA, die keine Methylierung aufwies, konnte somit selektioniert werden. Die verbleibende mutierte zirkuläre DNA wurde anschließend nach *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (s. 2.5.1.2). Dort konnten die Strangbrüche des mutierten Plasmids repariert werden. Die Zellen wurden nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit Kanamycin als Selektionsmarker und Tributyrin (1 %) ausplattiert.

3.7.2 Sequenzanalyse der EstA3-Mutante

Klone, die nach 1-2 tägiger Inkubation bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) keine typische Aufklärung des trüben Agars zeigten, wurden weiter untersucht. Die Plasmide wurden mittels „QIAprep Spin Miniprep“ isoliert (2.4.4.3)

und sequenziert. Es konnte ein Klon identifiziert werden, der einen Aminosäureaustausch in der Sequenz zeigte. Der Klon wurde mit pCS-EstA3-Mut bezeichnet. Wie aus Abbildung 32 hervorgeht, wurde hier das Serin an Aminosäureposition 61 durch ein Alanin ausgetauscht. Der Verlust der hydrolytischen Aktivität, die sich darin zeigte, dass der Klon pCS-EstA3-Mut keine typische Hofbildung auf Tributyrin Agarplatten zeigte, läßt vermuten, dass es sich bei dem Serin an dieser Position tatsächlich um das aktive Serin handelt. Dies sollte in weiteren Versuchen untersucht werden.

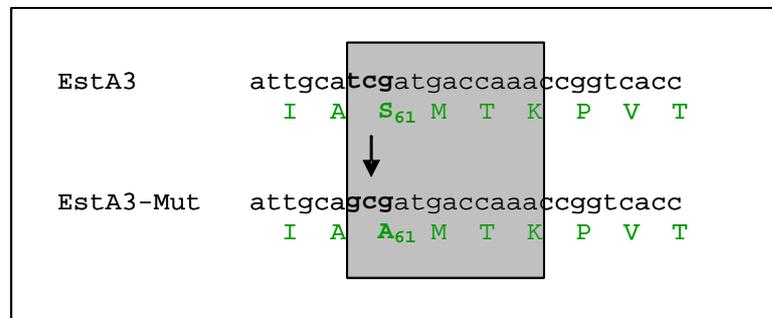


Abb. 32: Darstellung des Aminosäureaustauschs des Serin₆₁ im aktiven Zentrum von EstA3. Durch gerichtete Mutagenese wurde das Serin₆₁ durch ein Alanin (fettgedruckt) ersetzt. Der Bereich, der das aktive Zentrum bildet, ist grau hinterlegt.

3.7.3 Expression und Aufreinigung der Mutante pCS-EstA3-Mut

In dem Expressionsvektor pET24c konnte das mutierte EstA3 ebenfalls über das C-terminale His-Tag aufgereinigt werden. Die Anzucht erfolgte in 4 l flüssig Kultur unter Zugabe von Kanamycin als Selektionsmarker. Die Hauptkulturen wurden 1 %ig mit Übernachtskulturen angeimpft und bei einer OD₅₉₅ von 0,5–0,6 mit IPTG induziert (0,1 mM Endkonzentration). Die Inkubation der Kulturen wurden bei 30 °C durchgeführt und nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen geerntet. Der Aufschluss erfolgte mit der French Press (s. 2.7.1) und nach dem Aufreinigungsprotokoll der Firma Machery und Nagel zur anschließenden Aufreinigung von EstA3-Mut mittels *Kit* (s. 2.8). Das Volumen des nach der Zellernte und –aufschluss erhaltenen Rohextrakts betrug 10 ml bei einer Proteinendkonzentration von 41,3 mg/ml. Eine signifikante Überexpression von EstA3-Mut wurde im SDS-PAGE,

wie schon für EstA3, nicht sichtbar. Nach Aufreinigung über die Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen ließ sich jedoch eine deutliche Bande von ca. 43 kDa erkennen (Abb. 33), bei der es sich um EstA3-Mut handelte. Die Induktion bei 30 °C über Nacht ergab in einem Endvolumen von 9 ml 8,2 mg Protein. Der aufgereinigte Proteinextrakt zeigte auf LB-Agarplatten mit Tributyrin (1 %) keine typische Hofbildung. Durch den Aminosäureaustausch des Serins₆₁ schien EstA3 seine hydrolytische Aktivität verloren zu haben.

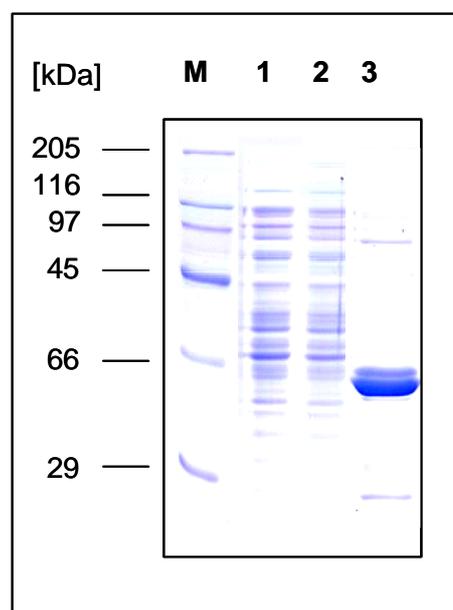


Abb. 33: Expression und Aufreinigung von EstA3-Mut (10% SDS-PAGE).

Spur 1: Rohextrakt vor Induktion (aufgetragenes Protein, 14 µg); Spur 2: Rohextrakt nach Induktion mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) (aufgetragenes Protein, 12 µg); Spur 3: EstA3 nach Aufreinigung über Protino® Ni 2000 *prepacked* Säulen (aufgetragenes Protein, 6 µg); M: HMW-Marker

In einer Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte Enzym EstA3-Mut im nativen Zustand auch keine multimeren Bande zeigt (Abb. 34). Für EstA3 konnte eine Bande, die deutlich höher als 205 kDa lief mit dem His-Tag Anti-Körper nachgewiesen werden. Auf Aktivitäts-Testagar konnte dieser Bande ebenfalls eine hydrolytische Aktivität zugeordnet werden (Abb. 34, B)). Es scheint als hätte die Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms ebenfalls Einfluss auf die Multimerisierung von EstA3. Hierzu werden derzeit weitere Untersuchungen durchgeführt. Ebenso wird

die Kristallstruktur von EstA3 Aufschluss über die Funktionsweise von EstA3 geben können.

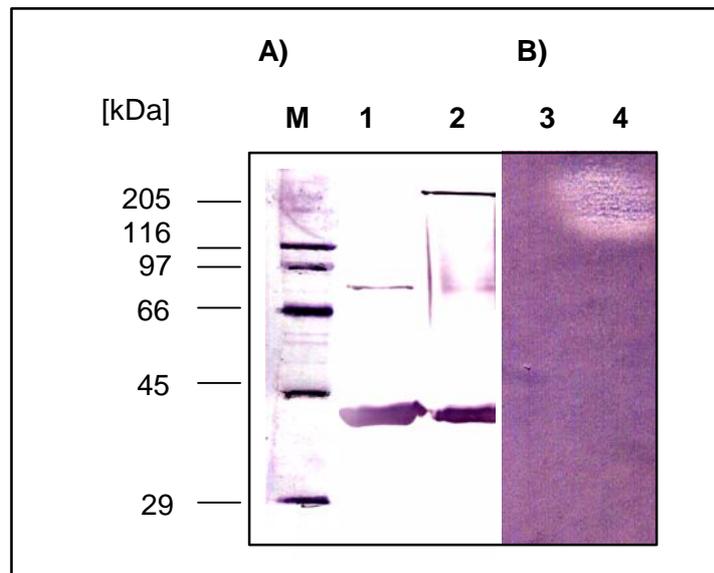


Abb. 34: Nachweis der Multimerisierung von EstA3

A) Western Blot; **B)** Aktivitätsgel; Spur 1 und 3: EstA3-Mut unaufgekocht und in nativem Ladepuffer (6 μ g); Spur 2 und 4: EstA3 unaufgekocht und in nativem Ladepuffer (6 μ g)

IV. Diskussion

Die Analyse der Metagenome von Umweltproben macht es möglich, bisher nicht kultivierbare Mikroorganismen zu identifizieren und das immense genetische Potential zu erschließen. Die Entwicklung neuer Technologien, die die Kultivierung einzelner Organismen umgeht, die sogenannte Metagenomik, führt zu einem immer weiter ansteigenden Pool an DNA-Sequenzen, deren Analyse für das Verständnis der genetischen Diversität, der Populationsstrukturen und deren ökologischer Funktionen in mikrobiellen Gemeinschaften von großem Wert ist.

In dieser Arbeit sollte anhand unterschiedlicher Strategien ein Model-Metagenom analysiert werden. Als Model dienten Biofilme aus einem Trinkwasserverteilungssystem, die dort auf EPDM (Ethylen-Propylen-Dien-Monomer) beschichteten Schieberkeilen auftraten. Biofilme sind überall in der Natur vorhanden und stellen zum Teil sehr komplexe Ökosysteme dar (Stoodley et al., 2003). Der Vorteil bei der Verwendung von Trinkwasser-Biofilmen besteht in der relativ leichten Zugänglichkeit der DNA. Humin- und Fulvinsäuren, die bei der DNA-Extraktion aus Bodenproben sehr störend sein können, treten hier z. B. nicht auf. Weiterhin ist es möglich Biofilme im Labor unter den entsprechenden Bedingungen nachzuzüchten, wodurch Expressions- und Populationsstudien kontrolliert durchgeführt werden können.

Ziel dieser Arbeit war es, über eine kombinierte Metagenomanalyse einen Einblick in die phylogenetische Zusammensetzung und die metabolischen Fähigkeiten dieser mikrobiellen Konsortien zu erlangen. Aufbauend auf diesen Analysen wurde der Biofilm bzw. die metagenomische DNA als Quelle für neuartige Biokatalysatoren genutzt.

4.1 Phylogenetische Analyse des Model-Biofilms anhand der 16S rDNA

Durch die Etablierung DNA-basierender Methoden wurde es möglich, mikrobielle Konsortien unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit zu charakterisieren. Woese und seine Mitarbeiter lieferten hierzu das Fundament, indem sie bisher unkultivierbare Mikroorganismen, basierend auf der Sequenzanalyse der rRNA-Gene, in ein phylogenetisches System eingliederten (Woese et al., 1990). Zur Identifizierung der unterschiedlichen Organismen innerhalb eines Habitats werden insbesondere die 16S rRNA-Gene oder die 16S rRNA als Marker verwendet, die in der kleinen Untereinheit der Ribosomen in allen prokaryontischen Organismen vorkommt. Anhand der DNA-Sequenz dieser 16S rRNA wird es möglich, Mikroorganismen bis auf die

Ebene der Spezies zu unterscheiden (Stackebrandt et al., 1994). Die Verwendung der 16S rRNA-Gene als Markergene zur Untersuchung der genetischen Vielfalt von Mikroorganismen in natürlichen Habitaten ist eine häufig angewandte Methode (Head et al, 1998; Power et al, 1998) und hat unser Wissen über die phylogenetische Diversität von Mikroorganismen und ihre evolutionären Zusammenhänge stark vorangetrieben. Zum Beispiel konnten in einer heißen Quelle (Obsidian Pool) im Yellowstone Nationalpark 12 neue Abstammungslinien identifiziert werden, die unter den bisher kultivierten Mikroorganismen nicht bekannt waren (Hugenholtz et al., 1998). Die 16S rRNA-Gene setzen sich aus konservierten und variablen Regionen zusammen. Die konservierten Regionen erlauben die Amplifikation der 16S rRNA-Gene aus bisher nicht kultivierten Organismen. Die aus der Umwelt-DNA amplifizierten 16S rRNA-Gene werden in die geeigneten Vektoren kloniert und sequenziert. Zur Identifizierung der Mikroorganismen dienen dann die variablen Regionen der 16S rRNA-Gene.

4.1.1 Klonierung und Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene aus der Biofilm-DNA

In dieser Arbeit wurden für die phylogenetische Analyse von Trinkwasser-Biofilmen 650 16S rRNA-Klone partiell sequenziert und die generierten Sequenzen mit denen des *Ribosomal Database Projects* (RDP, Larsen et al., 1993) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) verglichen. Aus dieser Sequenzanalyse gingen 81 unterschiedliche Klone hervor. Diese phylogenetische Auswertung zeigte, dass es sich bei den Trinkwasser-Biofilmen um sehr komplexe Konsortien handelte. Zudem konnte keine der 16S rDNA-Sequenzen einem bisher bekannten Mikroorganismus mit 100 %iger Übereinstimmung zugewiesen werden. Man kann davon ausgehen, dass es sich bei den Mikroorganismen in den untersuchten Biofilmen um unbekannte oder bisher noch nicht kultivierte Mikroorganismen handelt. Auch die Untersuchung an Trinkwasser-Biofilmen anderer Standorte, wie z. B. dem Verteilungssystem in Berlin, führte zu der Identifizierung neuer Bakterienstämme (Kalmbach et al., 1997). Dies zeigt, dass selbst in einem oligotrophen System wie dem Trinkwasser, die Mikroorganismen Überlebensstrategien entwickelt haben, die uns zum großen Teil bis heute unerschlossen sind.

Zur Klassifizierung der 81 16S rDNA-Klone wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abb. 6). In diesem Stammbaum wurden ebenfalls einige der nächsten Verwandten angegeben, um eine Einteilung in die unterschiedlichen Phyla zu

ermöglichen. Von den 81 identifizierten Klonen konnten 70 der Gruppe der Proteobakterien zugeordnet werden (Tab. 8). Bevor eine phylogenetische Analyse mittels 16S rRNA-Sequenzen möglich war, wurden hauptsächlich Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und *Bacillus* aus Trinkwasser-Biofilmen isoliert (Bois et al., 1997). Durch die Anwendung der DNA-basierenden Methoden wurde gezeigt, dass diese Organismen in Biofilmen jedoch eher in kleinerer Anzahl vertreten sind und damit auch für das Ökosystem Biofilm eine geringere Bedeutung haben. Untersuchungen an Trinkwasser-Biofilmen in Stockholm zeigten, dass Vertretern der β -Proteobakterien eine wesentlich größere Bedeutung zukommt als bisher angenommen (Manz et al., 1993). Diese Erkenntnisse wurden durch Analysen von Biofilmen aus Berliner Trinkwasserverteilungssystemen unterstützt. Bis zu 80 % der in den Biofilmen lebenden Mikroorganismen konnten den β -Proteobakterien zugeordnet werden (Kalmbach et al., 1997).

Unter den 81 analysierten 16S rDNA-Sequenzen aus den Trinkwasser-Biofilmen dieser Arbeit, konnten 36 % der Klone den β -Proteobakterien zugeordnet werden. Der zweitgrößte Anteil, 28 % der 16S rDNA-Klone, fand die höchsten Ähnlichkeiten zu Vertretern der α -Proteobakterien (Abb. 35). Die Analyse der 16S rRNA-Gene macht zwar keine Angaben über die Dominanz der verschiedenen Mikroorganismen innerhalb der Biofilme, sie zeigt jedoch, dass die Diversität innerhalb der Gruppe der α - und β -Proteobakterien sehr groß ist. Untersuchungen an Biofilmen anderer Standorte zeigten, dass auch Vertretern der α -Proteobakterien eine immer größere Bedeutung zukommt. Im Labor nachgestellte Versuche an Biofilmen aus fließenden Gewässern machten deutlich, dass nach einer anfänglichen Biofilmbildung, in der β -Proteobakterien die Population dominierten, ein schnelles Heranwachsen von α -Proteobakterien und Vertretern der *Cytophaga-Flavobacter*-Gruppe zu verzeichnen war. In ausgereiften Biofilmen stellen diese beiden Klassen dann die vorherrschenden Bakteriengruppen dar (Manz et al., 1999). Dies wurde auch in Biofilmen von Membranfiltern, die zur Wasserreinigung verwendet werden, beobachtet. Hier wurden ebenfalls die α -Proteobakterien als die dominierende Gruppe festgestellt (Chen et al., 2004). Interessanterweise waren in jedem der untersuchten Biofilme Vertreter der Gruppe der *Bradyrhizobien* zu finden. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die 16S rDNA-Analyse dieser Biofilme. Von den 23 sequenzierten 16S rDNA-Klonen, die den α -Proteobakterien zuzuordnen wurden (Abb. 39, A), Anhang), konnten 4 Klone als nahe

Verwandte von *Bradyrhizobium* sp. identifiziert werden. Desweiteren ließen sich drei Klone mit signifikanter Ähnlichkeit zu *Rhizobium* sp. isolieren.

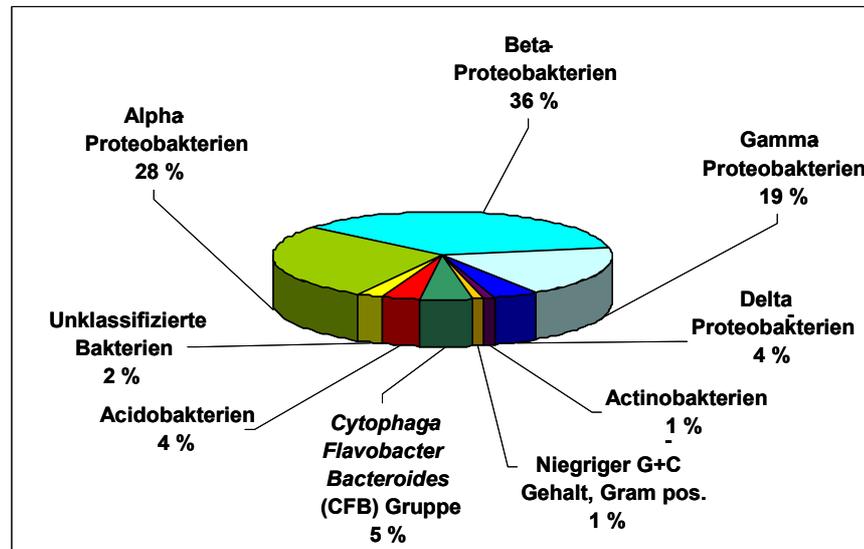


Abb. 35: Einteilung der 81 16S rDNA-Klone in die verschiedenen Bakterienklassen. Die 16S rRNA-Gene wurden aus gepoolter Biofilm-DNA amplifiziert.

Weitere Ähnlichkeiten konnten zu den Gattungen *Sphingomonas* und *Hyphomicrobium* festgestellt werden, die aus oligothrophen Wassersystemen bekannt sind (Szewzyk et al., 2000). Die Tatsache, dass in dem in dieser Arbeit untersuchten Biofilm die β -Proteobakterien in der 16S rDNA-Analyse mit 36 % den größten Anteil einnehmen, könnte zum einen darauf beruhen, dass es sich bei der untersuchten Biofilm-DNA um gepoolte DNA handelt, also von unterschiedlichen Standorten stammt, und zum anderen die saisonalen Umstände bei der Analyse nicht mit berücksichtigt wurden.

Neben den α - und β -Proteobakterien konnten 15 16S rDNA-Klone isoliert werden, die hohe Ähnlichkeiten zu Vertretern der γ -Proteobakterien zeigen. So konnten zwei Klone (csbio130316 und csbio160324) (Abb. 39, C), Anhang) mit einer Ähnlichkeit von 96 % einer *Legionella* Art zugeordnet werden. Ebenso wurde ein Klon (csbio160132) identifiziert der 97 %ige Ähnlichkeit zu *Pseudomonas* zeigt. *Legionella* spp. sind natürliche Bewohner von aquatischen Habitaten. Sie gelangen über das Quellwasser in das Trinkwasser und können dort unter geeigneten Bedingungen in kalten sowie warmen Verteilungssystemen oder auch in Erhitzern oder Kühltürmen überleben, aber nicht wachsen (Szewzyk et al., 2000). Die Untersuchungen an Biofilmen aus unterschiedlichen Verteilungssystemen in Deutschland zeigten, dass humanpathogene Legionellen, wie *Legionella pneumophila*, mit den gängigen Kultivierungsmethoden

nicht nachzuweisen sind (Wingender et al., 2004). Mittels 16S rDNA-Analysen konnten in Biofilmen anderer Verteilungssysteme zwar *Legionellen* nachgewiesen werden, aber auch hierbei handelte es sich nicht unbedingt um humanpathogene Arten (Schwartz et al., 1998). Auch *Pseudomonas aeruginosa* ist als typischer Biofilmbildner in aquatischen Systemen bekannt (Botzenhart und Döring, 1993; Grobe et al., 1995). Durch die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) ist er in Biofilmen oftmals gegen Desinfektionen geschützt. Trotzdem sind diesem Organismus nur wenige Infektionsfälle zuzuschreiben (Szewzyk et al., 2000). Das Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilmen ist dabei stark abhängig von der Beschaffenheit der Bewuchsfläche. So konnte auf rostfreiem Stahl, Kupfer, Polyvinylchlorid (PVC) und Polyethylen Flächen, die mit nicht gechlortem Trinkwasser behandelt wurden, *Pseudomonas aeruginosa* nicht nachgewiesen werden (Wingender et al., 2004). Auf gummibeschichteten Oberflächen dagegen konnte *Pseudomonas aeruginosa* in einem von 13 analysierten Biofilmen detektiert werden. Ebenso konnten in 11 der 13 untersuchten Biofilme weitere *Pseudomonas* Arten nachgewiesen werden (Kilb et al., 2003).

Neben den Proteobakterien, die durch die Sequenzanalyse der 16S rDNA-Klone identifiziert werden konnten, wurden auch einige Klone isoliert, die signifikante Ähnlichkeit zu Vertretern der Actinobakterien, der *Cytophage-Flavobakterium-Bakteroides*-Gruppe und Acidobakterien zeigten, die aus Trinkwasser bzw. Süßwassersystemen bekannt sind und teilweise auch in Biofilmen nachgewiesen werden konnten (Ultee et al., 2004; Martiny et al., 2003; Szewzyk et al., 2000; Manz et al., 1999).

Die Analyse der 16S rRNA-Klone, durch die zunächst ein Einblick in die Phylogenie der untersuchten Biofilme erlangt werden sollte, konnte zeigen, dass es sich bei den Konsortien um sehr diverse Gemeinschaften handelt. Die Daten deuten darauf hin, dass die Biofilme nicht von einzelnen Spezies dominiert werden. Weiterhin zeigt diese erste Analyse, dass es sich bei den meisten Mikroorganismen sehr wahrscheinlich um bisher nicht kultivierte Arten handelt. Für ein näheres Verständnis der komplexen Zusammenhänge in diesem Konsortium sind daher noch weitere Analysen notwendig.

4.2 Sequenzbasierende Analyse des Biofilm-Metagenoms

Mikrobielle Populationen, die im Trinkwasser von Verteilungssystemen vorkommen, einschließlich der Bakterien in Biofilmen, sind bisher eingehend untersucht worden (LeChevallier et al., 1987; Ridgway und Olson, 1981; Pedersen, 1990). Ein besonderer Fokus wurde dabei auf Arten gelegt, die Infektionskrankheiten auslösen, wie z. B. *Legionella pneumophila* (Rogers and Keevil, 1992; Storey et al., 2004) oder auf Indikatorstämme für fäkale Verunreinigungen, wie coliforme Bakterien (Kilb et al., 2003). Untersuchungen die auf molekularer Ebene durchgeführt wurden, ebenso wie die Analyse der 16S rDNA-Gene (s. 4.1), zielten auf die Erfassung des gesamten Spektrums an Organismen (Kalmbach et al., 1997; Manz et al., 1993).

4.2.1 Statistische Analyse der Sequenzdaten aus der Plasmid-Genbank

In dieser Arbeit wurden 2.496 hochwertige Sequenzen generiert. Dies entspricht, bei einer durchschnittlichen Sequenzlänge von 800 bp, einer genetischen Information von ca. 2 Mb. Basierend auf der Analyse der 16S rRNA-Gene, kann man davon ausgehen, dass das Konsortium aus mindestens 80 verschiedenen bakteriellen Arten besteht. Bei einer Genomgröße, die pro Organismus im Schnitt bei 6 Mb liegt, würde dies einem Metagenom von 480 Mb entsprechen. Bezogen auf das gesamte Metagenom dieses Trinkwasser-Biofilms konnte in der Plasmid-Genbank somit ein Anteil von ca. 0,5 % der gesamten genetischen Information dieses Habitates gespeichert werden. Der G+C Gehalt lag bei 62 %. Die generierten Sequenzdaten lassen zwar keine komplette Analyse der physiologischen sowie metabolischen Fähigkeiten dieses Konsortiums zu, man gewinnt jedoch einen ersten Einblick in die genomische Struktur und das metabolische Potential dieses Biofilms. In einem weitaus größer angelegten Sequenzierprojekt sollte das Metagenom der mikrobiellen Gemeinschaft in der nährstofflimitierten Sargasso See ebenfalls durch Sequenzierung von Plasmid-Banken und anschließender Assemblierung der Daten analysiert werden (Venter et al., 2004). Dabei wurden 1,0 Billionen bp an nicht-redundanter DNA-Sequenz generiert, die auf eine sehr diverse Population hindeuten. Es wird angenommen, dass die DNA-Sequenzen aus bis zu 1.800 Spezies stammen. Bei Genomgrößen die im Durchschnitt bei 6 Mb pro Organismus liegen, wären bei diesem Projekt ca. 10 % des genomischen Potentials des Metagenoms abgedeckt worden. Durch *shotgun* Sequenzierung eines Biofilms aus sauren Grubengewässern wurde es möglich zwei Genome von bisher nicht

kultivierten Organismen fast komplett zu rekonstruieren und drei weitere Genome partiell zu erfassen. Der untersuchte Biofilm wurde von diesen fünf Organismen dominiert. Diese geringe Diversität machte eine nahezu komplette Genomsequenzierung möglich (Tyson et al., 2004). Diese Arbeiten zeigen, dass man durch Sequenzierung von metagenomischer DNA, die zuvor in Plasmid bzw. Cosmid-Banken festgelegt wurde, durchaus in der Lage ist, Mikroorganismen oder auch ganze Habitate zu analysieren. Einer der größten limitierenden Faktoren bei diesen Arbeiten stellen jedoch nach wie vor die Kosten der Sequenzierung dar.

4.2.1.1 Funktionale Analyse der Sequenzdaten

Von den 2.496 generierten Sequenzen, die aus der Plasmid-Genbank hervorgingen, konnten 1.344 Sequenzen eine signifikante Ähnlichkeit zu proteinkodierenden offenen Leserahmen zugeordnet werden (Abb. 7). Dies entspricht ca. 54 % der qualitativ hochwertigen Sequenzen. Von den verbleibenden 46 % konnten 12 % der Sequenzen keine Ähnlichkeit in den Datenbanken zugewiesen werden und 34 % hatten nur eine geringe Ähnlichkeit (E-value $> 10^{-4}$) zu bisher bekannten Proteinen. Dies zeigt, dass in den 2 Mb an isolierter DNA dieses Metagenoms eine große Menge an bisher unbekannter genetischer Information steckt. Vergleicht man die Daten des Biofilm-Metagenoms mit Sequenzierprojekten anderer Metagenome, wie z. B. dem Genom von *Caulobacter crescentus*, einem typischen Süßwasserorganismus, so lassen sich ähnliche Größenordnungen erkennen. Auf dem Genom von *C. crescentus* konnten 53,9 % der identifizierten ORFs eine potentielle Funktion zugewiesen werden. 19,2 % zeigten Treffer zu hypothetischen Proteinen und 26,9 % der mutmaßlichen ORFs fanden keine Ähnlichkeit zu Proteinen der Datenbanken (Nierman et al., 2001). Ähnliche Vergleiche wurden auch mit den DNA-Sequenzdaten von dem Metagenom der Sargasso See durchgeführt (Venter et al., 2004) (Tab. 19). Die Anzahl ohne Treffer in den Datenbanken, die bei der Sequenzanalyse der Sargasso See gefunden wurden, liegt doppelt so hoch wie bei dem komplett sequenzierten Genom von *C. crescentus* und um das 1,5 fache höher als bei dem Metagenom des Biofilms dieser Arbeit. Dies zeigt, dass das genomische Potential, das in bisher nicht kultivierten Mikroorganismen und

Tab. 19: Vergleich der Metagenomdaten des Trinkwasser-Biofilms mit anderen sequenzierten Genomen.

Offene Leserahmen	Biofilm-Metagenom (Schmeisser et al., 2003)	Genom von <i>Caulobacter crescentus</i> (Nierman et al., 2001)	Sargasso See Metagenom (Venter et al., 2004)
Generierte Sequenzen (100 %)	2.496	3.767	1.242.430 ²
mit potentiellen Funktionen	41,2 %	53,9 %	33 %
Hypothetische Proteine	12,8 %	19,2 %	3 %
ohne Treffer in den Datenbanken	46 % ¹	26,9 %	64 %

¹in diesem Wert wurden die Sequenzen mit schwacher Ähnlichkeit in den Datenbanken mit denen ohne Ähnlichkeit zu bisher bekannten Proteinen zusammengelegt

²von den 1.242.430 zugeordneten Genen wurden 28.023 der Gene mehrerer Funktionen zugeordnet. Die Anzahl an generierten Sequenzen beträgt daher 1.214.207 und deckt über 700 Mb der gesamten Daten ab

damit in Metagenomen steckt, eine immense Resource an neuem Wissen darstellt. Allein durch das Metagenom der Sargasso See konnten fast 70.000 neue Gene identifiziert werden.

Die Sequenzen, denen Proteinähnlichkeiten in den Datenbanken zugewiesen werden konnten, wurden in neun funktionale Gruppen unterteilt, um die metabolischen Eigenschaften dieses Konsortiums zu untersuchen (Abb. 7). 33 % der generierten Sequenzen konnten dem Metabolismus zugeordnet werden. Die genomischen Informationen zeigten, dass das mikrobielle Konsortium innerhalb dieses Biofilms in der Lage ist, eine Vielzahl an komplexen Nährstoffen zu verwerten. Eine mögliche C-Quelle für die Mikroorganismen dieses Biofilms könnten die EPDM (Ethylene Propylene Diene Monomer, Synthetikgummi) beschichteten Trinkwasserschieber darstellen, auf denen sich die Biofilme gebildet haben. Diese gummielastischen Werkstoffe geben möglicherweise organische Substanzen wie Weichmacher (z. B. naphthenische Öle) ab, die den Mikroorganismen als Nährstoffquelle dienen können (Kilb et al., 2003). Interessanterweise konnten unter den generierten Sequenzen mehrere ORFs identifiziert werden, die hohe Ähnlichkeiten zu Genen haben, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind. Darunter waren alleine 36 partielle Lipase-Gene, mit hohen Ähnlichkeiten zu Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens* zu finden und ebenfalls fünf partielle Gene zu Esterasen. Vier der fünf Esterasen zeigten hohe Ähnlichkeit zu einer Polyurethan-Esterase aus *Pseudomonas chlororaphis*. Die Expression dieser Gene kann für die Organismen bei der Besiedlung der Oberfläche nützlich sein, da sie mit entsprechenden Enzymen in der Lage sind, die besiedelte Oberfläche oder deren

abgesonderte Substanzen als Nahrungsquelle zu nutzen. In dem gebildeten Biofilm kommt es dann zur Anreicherung weiterer Stoffwechselprodukte, die anderen Organismen eine Ansiedelung ermöglichen. Exemplarisch wurden solche Interaktionen z. B. für einen benzoatabbauenden Organismus und *E. coli* demonstriert (Szewzyk et al., 1994). Dies kann ebenfalls für Mikroorganismen mit hohen Nährstoffansprüchen eine Überlebensmöglichkeit in unwirtlichen Lebensräumen darstellen (Banning et al., 2003).

Eine weitere interessante Gruppe an funktionalen Genen innerhalb des Biofilms stellen die proteinkodierenden Gene dar, die dem Schutz der Zellen dienen. Es konnten 14 Klone identifiziert werden, die z. B. für Antibiotika-Resistenzen kodieren. Darunter auch sechs Klone mit potentiellen β -Laktamasegenen. Es ist bekannt, dass die Mikroorganismen durch die Ausscheidung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die zur Biofilmbildung führen, gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, wie z. B. Antibiotika, resistenter sind als die planktonischen Zellen (Costerton et al., 2001). Besonders gut sind in diesem Zusammenhang Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Man weiß, dass die Expression der β -Laktamase AmpC aus *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilmen eine entscheidende Rolle für die Resistenz gegenüber β -Laktamen spielt (Bagge et al., 2004). Insgesamt ließen sich 2 % der generierten Sequenzen des Biofilm-Metagenoms der Gruppe der Schutzmechanismen zuordnen, darunter waren jedoch keine Sequenzen die für potentielle Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren kodieren. Vergleicht man diese Daten mit denen pathogener Biofilme, wie z. B. Gallen-Stents, so ist zu erkennen, dass der Anteil an Genen, die für Schutz- bzw. Abwehrmechanismen kodieren, wesentlich höher ist (Wenderoth, D. F., mündliche Mitteilung). In diesen Biofilmen wird somit auch der Anteil an pathogenen Mikroorganismen wesentlich größer sein. Ein Anteil von 2 % an Genen die für Schutzmechanismen kodierenden, deutet daher eher auf einen als nichtpathogen einzuschätzenden Biofilm hin.

4.2.1.2 Phylogenetische Verteilung der Sequenzdaten

Nachdem die Sequenzdaten, die aus der Plamid-Genbank des Biofilm-Metagenoms hervorgegangen sind, nach ihren potentiellen Funktionen analysiert wurden, sollten die Sequenzen ebenfalls auf ihre möglichen phylogenetischen Abstammung hin analysiert werden. Die Abgleiche in den Datenbanken, die auf DNA-

Ebene durchgeführt wurden, zeigten keine oder nur sehr geringe Ähnlichkeiten zu den in den Datenbanken vorhandenen DNA-Sequenzen. Schon die Analyse der 16S rRNA-Klone, die aus dem Biofilm hervorgingen (4.1.1) zeigte, dass keiner der Klone eine 100 %ige Ähnlichkeit zu den bisher bekannten 16S rRNA-Klone in den Datenbanken hat. Man kann daher davon ausgehen, dass auch innerhalb dieses Biofilms eine Vielzahl an bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen existiert. Zur phylogenetischen Analyse der Sequenzen wurde die Ähnlichkeiten zu Organismen ausgewertet, die auf Proteinebene zu finden waren. Der größte Anteil (39,2 %) der Sequenzen war dabei innerhalb der Gruppe der α -Proteobakterien zu finden. Untersuchungen an unterschiedlichen Biofilmen zeigten, dass den α -Proteobakterien, besonders auch in herangereiften Biofilmen, eine größere Bedeutung zukommt, als bisher angenommen (Manz et al., 1999; Chen et al., 2004). Den β -Proteobakterien konnten bei dieser Analyse nur 8,8 % der Sequenzen zugeordnet werden. Die γ -Proteobakterien waren mit 35,1 % deutlich stärker vertreten. Untersuchungen von Trink- und Grundwasser, sowie der darin entstandenen Biofilme zeigten, dass α -, β - und γ -Proteobakterien zu den am meisten vorkommenden Vertretern gehören (Williams et al., 2004; Utee et al., 2004, Chen et al., 2004; Manz et al., 1999). Dies konnte auch für die Biofilme dieser Arbeit gezeigt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Auswertung mit der phylogenetischen Verteilung, die aus der Analyse der 16S rRNA-Gene hervorgegangen ist, so sind deutliche Unterschiede festzustellen (Abb. 36). Während die Analyse der 16S rDNA-Klone zeigte, dass der größte Teil der Klone den β -Proteobakterien zuzuordnen ist, so ließen sich die meisten proteinkodierenden Sequenz aus der Plasmid-Genbank den α -Proteobakterien zuteilen. Den β -Proteobakterien kam hierbei ein kleinerer Anteil zu, wohingegen bei der Analyse der 16S rDNA die meisten Klone Vertretern der β -Proteobakterien ähnlich waren. Die Anzahl der 16S rDNA-Klone mit Ähnlichkeiten zu den γ -Proteobakterien lag ebenfalls deutlich niedriger, als der Anteil an proteinkodierenden Sequenzen, die dieser Gruppe zuzuordnen waren. Ähnlichkeiten zu den *Firmicutes* und den *Aquificae* konnten nur über die BlastX Analyse der Plasmid-Bank nachgewiesen werden, während aus der Analyse der 16S rRNA-Gene auch Ähnlichkeiten zu Vertretern der CFB-Gruppe und den Acidobakterien gefunden werden konnten. Durch den Vergleich dieser beiden Analysen wird deutlich, dass man über die Ermittlung der 16S rDNA-Klone eine Vielfalt der vorkommenden Arten innerhalb der

unterschiedlichen Gruppen feststellen kann. So kann man wahrscheinlich davon ausgehen, dass in der gepoolten Biofilm-DNA die Diversität innerhalb der

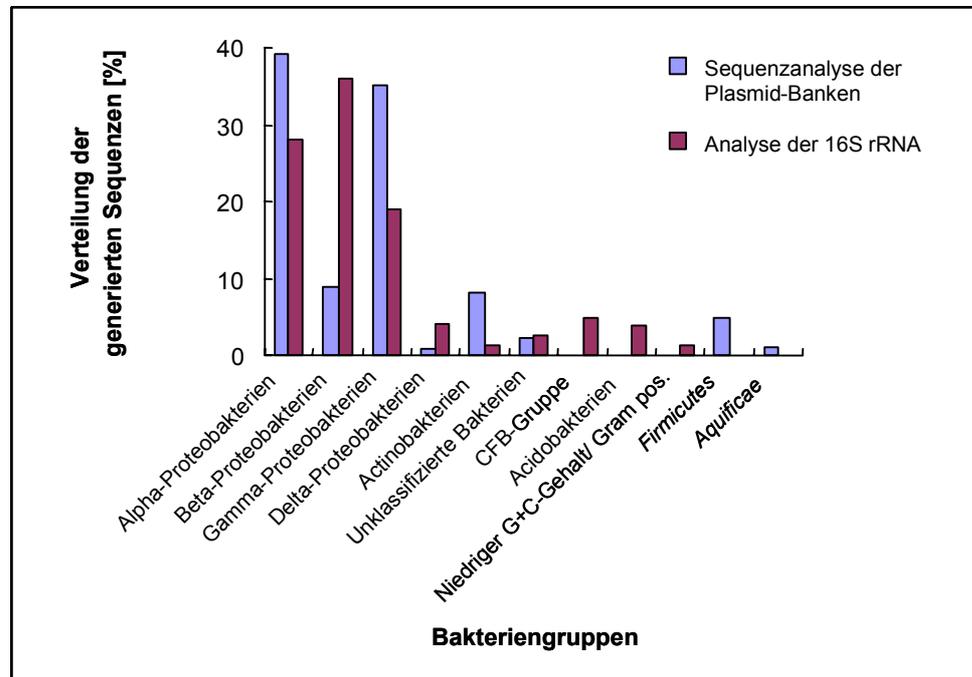


Abb. 36: Vergleich der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA-Gene mit der statistischen Auswertung der Plasmid-Genbank

β -Proteobakterien sehr groß ist, diese aber nur einen geringen Anteil der Population des Biofilms einnehmen, da über die Analyse der Sequenzdaten aus der Plasmid-Genbank relativ wenige Treffer mit Ähnlichkeiten zu Proteinen der β -Proteobakterien gefunden wurden. Es ist bekannt, dass sich mit dem Heranwachsen des Biofilms, bedingt durch die Veränderung der morphologische Struktur und den äußeren Einflüssen, auch die Zusammensetzung der Population verändert (Martiny et al., 2003). So ist anzunehmen, dass zum Zeitpunkt der Biofilmentnahme das Konsortium von den α - bzw. γ -Proteobakterien dominiert wurde.

Die Sequenzanalyse der Plasmid-Genbank zeigt, wie schon die Analyse der 16S rDNA-Daten, dass es sich bei dem Biofilm aus dem Trinkwasserverteilungssystem um ein sehr komplexes Konsortium handelt. Gerade in einem eher nährstoffarmen System wie dem Trinkwasser scheinen Biofilme eine ideale Lebensform darzustellen, die es den Mikroorganismen ermöglicht mit und voneinander zu leben. Die Auswertung der BlastX-Treffer hat gezeigt, dass die Bewohner des Biofilms in der Lage sind eine

Vielzahl an Substraten umzusetzen. Dennoch werden weitere Versuche notwendig sein, um eine Aussage über mögliche Stoffwechselforgänge machen zu können. Durch umfangreiche Sequenzierprojekte (Tyson et al., 2004; Venter et al., 2004;) erhält man einen enormen Einblick in die mikrobiellen Gemeinschaften, dennoch bleiben die Informationen, die man daraus ableiten kann, abhängig von den bislang annotierten Genen in den Datenbanken. Daher ist eine Kombination aus sequenzbasierten Methoden und funktionalen *Screenings* erforderlich, um die funktionale Vielfalt der Genen in den Datenbanken erschließen zu können.

4.3. Aktivitätsbasierende Analyse des Biofilm-Metagenoms

Durch die Verfügbarkeit des Metagenoms in Form von klonierten Genomfragmenten kann eine immense Ressource an neuen Biokatalysatoren und

Tab. 20: Funktionale Gene und Enzyme, die in Metagenomen identifiziert werden konnten und für industrielle und pharmazeutische Anwendungen von großem Nutzen sein können.

Funktionale Gene/Enzyme	Referenz
Lipasen/Esterasen	Voget et al., 2003; Rondon et al., 2000; Henne et al., 2000; Schmeisser et al., 2003; Bell et al., 2002
α -Amylasen	Voget et al., 2003; Rondon et al., 2000; Schmeisser et al., 2003; Richardson et al., 2002
Chitinasen	Cottrel et al., 1999
Cellulasen	Healy et al., 1995; Rees et al., 2003
Alkohol Oxidoreduktase	Knietsch et al., 2003
4-Hydroxybutyrat Dehydrogenasen	Henne et al., 1999
Proteasen	Santosa, 2001
Nitrilasen	DeSantis et al., 2002
Biotin Biosynthese	Entcheva et al., 2001
Polyketid Synthasen	Courtois et al., 2002; Piel, 2002
Turbomycin A,B	Gillespie et al., 2002
Violacein	Brady et al., 2001
Indirubin	MacNeil et al., 2001
Langkettige N-Acyltyrosine	Brady et al., 2002, 2003

Wirkstoffen erschlossen werden. Zum einen kann auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten oder konservierten Sequenzmotiven eine Umwelt-Genbank durch Hybridisierung oder PCR-Amplifikation mit entsprechenden Sonden durchmustert werden. Zum anderen kann eine Durchmusterung des Metagenoms aktivitätsbasierend erfolgen. In Tabelle 20 sind funktionale Gene und Enzyme dargestellt, die kürzlich aus Metagenomen identifiziert werden konnten und für die Industrie bzw. Pharmazie von großem Interesse sind. Die Funktionalität der Gene bzw. Enzyme konnte durch biochemische Versuche sowie genetische Komplementation gezeigt werden. Keines der identifizierten Gene bzw. Enzyme ist identisch zu einem bisher bekannten. So können über funktionale *Screening*-Methoden Gene identifiziert werden, die basierend auf ihrer Sequenz noch nicht identifiziert werden konnten.

4.3.1. Durchmusterung der Cosmid-Banken nach lipolytischen Enzymen

In dieser Arbeit wurden Cosmid-Banken aus der DNA der Trinkwasser-Biofilme angelegt, um das Metagenom nach neuartigen Biokatalysatoren zu durchmustern. *Small-Insert* Genbanken sind dazu geeignet Metagenome zu rekonstruieren oder sequenzbasierend Gene mit neuen metabolischen Funktionen zu identifizieren, die möglicherweise in dem verwendeten Wirtstamm nicht exprimiert werden können (Tyson et al., 2004; Venter et al., 2004). Im Gegensatz dazu eignen sich *Large-Insert* Genbanken, wie Cosmid-Banken, mögliche Stoffwechselwege zu identifizieren, an denen eventuell auch mehrere Gene beteiligt sein können. Die durchschnittliche Insert-Größe, der in dieser Arbeit angelegten Cosmid-Bank, lag zwischen 20 und 35 kb. Der Fokus bei der Durchmusterung der Klone richtete sich auf hydrolytische Enzyme wie Lipasen und Esterasen. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass sich Esterasen und Lipasen rekombinant aus *E. coli* isolieren ließen (Talker-Huiber et al., 2003; Ro et al., 2004; Petersen et al., 2001; Rashid et al., 2001). Lipasen und Esterasen katalysieren die Spaltung und Bildung von Esterbindungen. Sie sind in Tieren, Pflanzen (Huang, 1993; Mukherjee und Hills 1994), Pilzen (Iwai und Tsujisaka, 1984) und Bakterien (Brune und Goetz, 1992; Jeager et al., 1994; Jäger und Reetz, 1998) weit verbreitet. Als Biokatalysatoren in der organischen Industrie sind sie von großer Bedeutung, denn sie sind auch in organischen Lösungsmitteln zum Teil aktiv und zeichnen sich durch ihre hohe Regio- und Stereospezifität aus; ebenfalls benötigen diese Enzyme keine Co-Faktoren (Jäger und Reetz, 1998; Jäger et al., 1999; Jäger und Eggert, 2002). Die große

Vielseitigkeit von hydrolytischen Enzymen wie Esterasen und Lipasen hinsichtlich der Verwertbarkeit von Substraten und Reaktionsmechanismen macht sie für industrielle Anwendungen sehr interessant. Die beiden größten Gruppen der Hydrolasen stellen die Lipasen (EC 3.1.1.3, Triglycerol Hydrolasen) und die Esterasen (EC 3.1.1.1, Carboxylester Hydrolasen) dar. Die meisten der Lipasen, die in der Industrie Verwendung finden stammen aus Mikroorganismen. Die große Vielseitigkeit der aus Pilzen (*Candida*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Thermomyces*) stammenden Lipasen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie ist ausführlich beschrieben (Gandhi, 1997; Benjamin und Pandey, 1998; Pandey et al., 1999). Unter den bakteriellen Lipasen wurden besonders die Lipasen der Gattung *Pseudomonas* eingehend untersucht, die interessant für biotechnologische Anwendung sind (Gilbert, 1993; Svendsen et al., 1995) und die Esterasen, die an pathogenen Prozessen beteiligt sind (Upton et al., 1995). Jährlich werden beispielsweise über 1000 Tonnen an Lipasen in Reinigungsmittel zum Abbau von Fetten verwendet.

Die Durchmusterung der Cosmid-Genbank nach hydrolytischen Enzymen erfolgte auf Tributyrin enthaltenen Agarplatten. Aus 1.600 getesteten rekombinanten Klonen konnten sechs Cosmide identifiziert werden, die in der Lage waren Tributyrin zu hydrolysieren, was sich in einer Aufklärung des Agars um die Kolonie zeigte. Die sechs identifizierten Cosmide wurden mit pCosCS2-A3, pCosCS5-E5, pCosCS1-C5, pCosCS7-G4, pCosCS3-B1 und pCosCS3-B8 bezeichnet.

4.3.2 Charakterisierung der lipolytischen Gene

Die für die lipolytische Aktivität kodierenden Leserahmen wurden auf den Cosmiden pCosCS2-A3, pCosCS5-E5 und pCosCS1-C5 identifiziert (s. 3.4). Die abgeleiteten Genprodukte zeigten auf Aminosäurebasis keine Ähnlichkeiten untereinander. Dies zeigt, dass aus der Metagenom-Bank des Trinkwasser-Biofilms Enzyme isoliert werden konnten, die nicht miteinander verwandt sind. Mit Hilfe von Aminosäureabgleichen zu schon bekannten Enzymen in den Datenbanken und der Analyse von vorhandenen konservierten Bereichen innerhalb der Sequenzen ließen sich die potentiellen Genprodukte in entsprechende Familien der lipolytischen Enzyme einordnen.

Auf dem Cosmid-Klon pCosCS2-A3 konnte ein offener Leserahmen von 1.191 bp ermittelt werden, der für ein Protein von 396 Aminosäuren mit einem

errechneten Molekulargewicht von 43,3 kDa kodiert. Das entsprechende Enzym wurde mit EstA3 bezeichnet. Im Abgleich in den Datenbanken findet man die höchsten Ähnlichkeiten zu einer β -Laktamase der Klasse C aus *Rhodopseudomonas palustris* (Identität 54 %; Ähnlichkeit 68 %). Nach der Klassifizierung von Arpigny und Jäger (1999) gehören Esterasen mit Ähnlichkeiten zu β -Laktamasen der Klasse C in die Familie VIII der bakteriellen lipolytischen Enzyme. Ebenfalls findet man in der Aminosäuresequenz von EstA3 das für Vertreter dieser Familie typische konservierte Motiv Ser-X-X-Lys. In der Aminosäuresequenz der β -Laktamase aus *Rhodopseudomonas palustris* ist ebenfalls das für die Lipasen bzw. Esterasen typische konservierte Serin-Hydrolase Motiv Gly-X-Ser-X-Gly zu finden, welches in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EstA3 jedoch nicht vorkommt. Ein fehlendes Serin-Hydrolase-Motiv konnte ebenfalls für eine stereoselektive Esterase aus *Arthrobacter globiformis* gezeigt werden (Arpigny und Jäger, 1999). Die Esterasen aus *Arthrobacter globiformis*, *Streptomyces chrysomallus* und *Pseudomonas fluorescens*, die die Familie VIII bilden, bestehen aus ca. 380 Aminosäuren, womit auch EstA3 mit einer Länge von 396 Aminosäure-Resten dieser Gruppe zugeordnet werden kann. Interessanterweise findet man in der abgeleiteten Aminosäuresequenz (EstE5) des lipolytischen offenen Leserahmens auf dem Cosmid-Klon pCosCS5-E5 ebenfalls das konservierte Motiv Ser-X-X-Lys. Ansonsten weisen die potentiellen Aminosäuren von EstA3 und EstE5 keine Ähnlichkeiten zueinander auf. Der offene Leserahmen, der auf dem Cosmid pCosCS5-E5 ermittelt werden konnte, besteht aus 1.250 bp und ist mit einem errechneten Molekulargewicht von 44,6 kDa etwas größer als EstA3. In der Aminosäuresequenz von EstE5 fehlt ebenfalls das für Lipasen bzw. Esterasen typische konservierte Pentapeptid. Die größte Ähnlichkeit konnte für EstE5 zu einer D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase (Penicillin-Binde Protein 4) aus *Polaromonas sp.* JS666 (Identität 55 %; Ähnlichkeit 71 %) gefunden werden. Vergleiche des konservierten Bereichs um das aktive Serin der Esterasen EstA3 mit einer β -Laktamase der Klasse C aus *Rhodopseudomonas palustris* und der Esterase EstB aus *Burkholderia gladioli* (Abb. 37) zeigten, dass zwischen der β -Laktamase und EstA3 eine 100 %ige Übereinstimmung in der Aminosäureabfolge um das aktive Serin zu erkennen ist. In der Esterase EstB ist an der variablen Stelle, die auf das aktive Serin folgt, ein Valin anstelle eines Methionins zu finden. Ebenso ist die Ähnlichkeit über den gesamten konservierten Bereich zwischen EstA3 und der β -Laktamase größer als die Ähnlichkeit zu EstB. Trotz der Ähnlichkeit zu einer β -Laktamase konnte für EstA3 keine β -Laktamaseaktivität nachgewiesen werden (s. 3.6.1). Durch gerichtete Mutagenese

wurde für EstA3 das Serin aus dem konservierten β -Laktamase Motiv als aktives Serin identifiziert (s. 3.7). Dazu wurde das Serin an Position 61 gegen ein Alanin ausgetauscht, wodurch das Enzym inaktiviert werden konnte.

EstE5	88	M	N	P	A	S	V	M	K	L	V	T	T	Y	A	A	L	104
Carboxy	74	M	N	P	A	S	V	M	K	L	V	T	T	Y	A	A	L	90
EstB	70	F	R	L	A	S	V	T	K	P	I	V	A	L	A	V	L	86
EstA3	56	F	R	I	A	S	M	T	K	P	V	T	S	V	A	F	M	72
β -Lact	80	F	R	I	Y	S	M	T	K	P	I	T	S	V	A	L	M	96

Abb. 37: Alignment der konservierten Motive (Ser-X-X-Lys) der Esterasen EstA3 und EstE5 mit einer D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase (Carboxy) aus *Polaromonas sp.* JS666, einer Esterase (EstB) aus *Burkholderia gladioli* und einer β -Laktamase aus *Rhodopseudomonas palustris*. Dargestellt ist der konservierte Bereich von β -Laktamasen. Die dunkelgrauen Bereiche markieren die Aminosäuren, die in allen Sequenzen vorhanden sind, die hellgrau unterlegten Bereiche stellen Übereinstimmungen mit dem Konsensusmotiv von β -Laktamasen dar. Der Stern markiert das aktive Serin im Konsensus-Motiv.

Zwischen der Esterase EstE5 und der D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase aus *Polaromonas sp.* JS666 ist auf Aminosäureebene eine 100 %ige Übereinstimmung über den konservierten Bereich zu erkennen. Ebenso weisen alle fünf Enzyme einen Alaninrest an der variablen, 14. Position der Konsensussequenz auf. Eventuell liegt die variable 14. Position innerhalb dieser Gruppen von Enzymen sehr konserviert vor und deutet möglicherweise auf einen gemeinsamen Ursprung hin. Vergleiche einer D-Alanyl-D-Alanin Peptidase aus *Streptomyces* R61 mit einer β -Laktamase aus *Bacillus licheniformis* 749/C zeigten beispielweise, dass die beiden Enzyme trotz ihrer unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften und der fehlenden Ähnlichkeit auf Aminosäurebasis, mit Ausnahme des Bereichs um das aktive Serin, phylogenetisch verwandt sind. Durch Röntgen-Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die beiden Enzyme deutliche Ähnlichkeiten in der räumlichen Anordnung ihrer Sekundärstruktur haben (Kelly et al., 1986; Samraoui et al., 1986; Knox et al., 1996).

Der lipolytische offene Leserahmen, der auf dem Cosmid pCosCS1-C5 identifiziert werden konnte, ist 960 bp lang und kodiert für 319 Aminosäuren mit einer kalkulierten Molekularmasse von 35 kDa. Es ist somit das kleinste der drei identifizierten Enzyme. Anders als bei EstA3 und EstE5 liegt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EstC5 das in der Gruppe der lipolytischen Enzyme hoch konservierte Motiv Gly-X-Ser-X-Gly vor. Das in dem Motiv enthaltene Serin ist an der

EstA3 um ein Hexamer handelt. Aktivitätstests (s. 3.5.4) zeigten, dass EstA3 nur in dieser hexameren Form aktiv ist. Bisher sind durchaus Esterasen aus *Pseudomonas* bekannt, die als Homodimer vorkommen (Kim et al. 1997; Krebsfänger et al., 1998). Ebenfalls konnten Esterasen identifiziert werden, die als Tetramere aktiv sind, wie beispielsweise eine Heroin-Esterase aus *Rhodococcus* sp. H1 (Rathbone et al., 1997) oder eine 4-Hydroxybenzoyl-CoA Thioesterase aus *Arthrobacter* sp. (Thoden et al., 2003). Esterasen mit einer hexameren Struktur sind in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. EstA3 ist somit die erste Esterase, von der eine hexamere Form bekannt ist. Zur Aufklärung der Struktur und um Aufschlüsse über die Reaktionsmechanismen dieser neuartigen Esterase zu erhalten, wird die Kristallstruktur dieses Enzyms zur Zeit gelöst.

Biochemische Charakterisierungen zeigten, dass EstA3 Triglyceride und Nitrophenylester mit Acylketten bis C6 (s. 3.6.4) gut umsetzen kann. Dies spricht dafür, dass es sich bei EstA um eine typische Carboxylesterase handelt, denn Carboxylesterasen hydrolysieren vorzugsweise wasserlösliche kurzkettige Ester, während „echte“ Lipasen die längerkettigen Substrate bevorzugen. Einer der Gründe, warum lipolytische Enzyme für die Industrie von großem Interesse sind, ist die Tatsache, dass sie keine Co-Faktoren benötigen. Für EstA3 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivität in Anwesenheit von Co^{2+} (s. 3.6.5) um bis zu 40 % gesteigert werden kann, während andere Salze wie z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} einen stark hemmenden Einfluß auf die Aktivität von EstA3 haben. Als typischer Co-Faktor ist Cobalt aus dem Co-Enzym B12 bekannt, das entscheidender Bestandteil des Fettsäure-, Kohlenhydrat- und Nukleinsäure-Stoffwechsels ist. Im Gegensatz zu den Lipasen wurden Esterasen hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften bisher sehr wenig untersucht. Untersuchungen an einer extrazellulären Lipase, LipA, aus *Acinetobacter* sp. RAG-1 zeigten, dass Cobalt in 1 mM Konzentration ebenfalls einen aktivierenden Einfluß auf das Enzym nimmt (Snellman et al., 2002). Anders als bei EstA3 wird die Aktivität von LipA jedoch auch von Mg^{2+} und Ca^{2+} in 1mM Konzentration in geringen Maßen gesteigert, wohingegen die Aktivität von EstA3 durch Zugabe von Mg^{2+} und Ca^{2+} gehemmt wird. Es sind ebenfalls Beispiele aus der Literatur bekannt, bei denen Co^{2+} einen hemmenden Einfluß auf die enzymatische Aktivität nehmen kann, wie es für eine Lipase aus *Pseudomonas* sp. gezeigt werden konnte. Durch Zugabe von Cobalt (5 mM) wurde dieses Enzym bis auf 5 % seiner Aktivität gehemmt (Rashid et al., 2001). Es zeigte sich, dass die verschiedenen Salze sehr unterschiedlichen Einflüsse auf die Aktivität der Enzyme nehmen können. Für EstA3 ist anzunehmen, dass die hexamere

Form im Zusammenhang mit dem Einfluß der unterschiedlichen Salze auf die Aktivität steht.

Stabilität und Aktivität in organischen Lösungsmitteln sind entscheidende Charakteristika für lipolytische Enzyme, was vor allem für industrielle Anwendungen von großem Interesse ist. Bei Lipasen soll diese Eigenschaft jedoch stärker ausgeprägt sein als bei den Esterasen. Interessanterweise zeigte EstA3 eine hohe Aktivität in den in dieser Arbeit getesteten organischen Lösungsmitteln. Lediglich eine 30 %ige Acetonitril-Lösung hatte eine hemmende Wirkung auf die Aktivität von EstA3. In Isopropanol und Aceton ließ sich die Aktivität von EstA3 sogar noch um bis zu 50 % steigern (s. 3.6.6). Vergleiche der Stabilität bzw. Aktivität unterschiedlicher lipolytischer Enzyme zeigen, dass auch hier sehr große Differenzen zwischen den Enzymen bestehen. Die zuvor beschriebene Lipase, LipA, aus *Acinetobacter* sp. ist in 15 %igen und 30 %igen Isopropanol bzw. Aceton- Lösungen lediglich stabil (Snellman et al., 2002). Eine weitere Lipase aus *Pseudomonas* sp. zeigte in einer 15 %igen Methanol-Lösung eine Steigerung der Aktivität um fast 100 % (Choo et al., 1998). Natürlich sind die Reaktionsmechanismen zwischen Lipasen und Esterasen sehr unterschiedlich, denn Lipasen benötigen eine sogenannte Interphasenaktivierung, die zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt und das aktive Zentrum frei gibt. Diese Interphasenaktivierung konnte für Esterasen nicht beobachtet werden (Jäger und Wohlfahrt, 1993). Die hexamere Struktur von EstA3 kann ebenfalls eine wesentliche Rolle hinsichtlich seiner Stabilität und Aktivität in organischen Lösungsmitteln spielen. Die Kristallstruktur von EstA3 wird darüber Aufschlüsse geben können. Weiterhin ergaben die biochemischen Untersuchungen für EstA3 ein Temperaturoptimum von 50 °C (s. 3.6.2) und zeigten ebenfalls, dass EstA3 über einen relativ weiten pH-Bereich (pH 6-11) sehr aktiv ist (s. 3.6.8).

Neben der Fähigkeit in organischen Lösungsmittel stabil bzw. aktiv zu sein, zeichnen sich Lipasen bzw. Esterasen ebenfalls durch ein breites Substratspektrum und hohe Stereo- und Regioselektivität aus. Das Substratspektrum von EstA3 wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Jean-Louis Reymond an der Universität Bern untersucht. Interessanterweise konnte dabei für EstA3 ein Substratspektrum mit Ähnlichkeit zu eukaryontischen Enzymen ermittelt werden. Unter anderem zeigt EstA3 ein ähnliches Substratspektrum wie eine Esterase aus Schweineleber oder eine ebenfalls aus dem Pankreas von Schweinen stammende Lipase. Weitere signifikante Ähnlichkeiten traten auch zu Lipasen aus *Candida*, *Mucor* und zu einer Acetylcholinesterase aus *Electroporus electricus* auf (s. 3.6.9). Da man davon ausgehen

kann, dass schätzungsweise 99 % der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen bisher mit klassischen Kultivierungsmethoden nicht kultiviert werden konnten (Amann et al., 1995) und deren genomische Information daher bis heute unerschlossen ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei EstA3 um eine neuartige Esterase handelt, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften stark von den bisher bekannten bakteriellen Esterasen unterscheidet.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Biofilm-Metagenom durch Kombination unterschiedlicher DNA basierender Methoden phylogenetisch und physiologisch analysiert. Basierend auf diesen Daten konnte aus diesem Metagenom eine neuartige Esterase isoliert, aufgereinigt, charakterisiert und zur Kristallisierung vorbereitet werden. Um diese Ziele zu erreichen wurden unterschiedliche Strategien verfolgt:

- (I) Phylogenetische Analyse des Metagenoms
- (II) Konstruktion von DNA-Banken zur genomischen Analyse und Durchmusterung nach lipolytischen Enzymen
- (III) Heterologe Überexpression und biochemische Charakterisierung der Metagenomesterase EstA3

(I) Zur Metagenom-Analyse wurden Modell-Biofilme aus Trinkwasserssystemen verwendet. Die DNA aus drei Biofilmproben wurde isoliert und gepoolt. Die phylogenetische Analyse der 16S rDNA-Klone zeigte, dass es sich bei den untersuchten Biofilmen um hoch diverse Konsortien handelte. Aus 650 sequenzierten Klonen konnten 81 unterschiedliche identifiziert werden, von denen die meisten den nicht pathogenen Proteobakterien zugeordnet werden konnten. Bei dem Großteil der in diesem Biofilm vorkommenden Organismen handelte es sich um neue, bisher nicht kultivierte Arten. Interessanterweise konnten neben der Sequenzähnlichkeit zu typischen Süßwasserorganismen, wie z. B. *Caulobacter* oder *Aquabacterium* auch Ähnlichkeiten zu *Rhizobien* entdeckt werden, die in aquatischen Habitaten bisher eher unbekannt waren. Ein kleinerer Anteil der Klone zeigte große Ähnlichkeit zu 16S rRNA-Genen aus *Acinetobacter*, der *Cytophaga-Flavobacter-Bakteroides*-Gruppe und Organismen mit geringem GC-Gehalt bzw. Gram-positiven Organismen.

(II) Mit der Erstellung einer Plasmid-Bank wurden 2 Mb metagenomische DNA sequenziert. Die Sequenzen wurden auf mögliche Proteinähnlichkeiten in den Datenbanken hin verglichen. Der größte Teil der protein-kodierenden Gene zeigte Ähnlichkeit zu Proteinen aus *Rhizobium*, *Pseudomonas* und *Escherichia*. Weiterhin gaben diese Genom-Daten einen ersten Einblick in die physiologischen und metabolischen Fähigkeiten des Konsortiums. Die genetischen Informationen deuten darauf hin, dass die Mikroorganismen innerhalb des Konsortiums einen großen Teil an komplexen Nährstoffen verwerten können. Interessanterweise konnten relativ viele potentielle lipolytische Gene identifiziert werden. Dies könnte in Zusammenhang mit der Beschichtung der Oberflächen und den darin enthaltenen Weichmachern stehen, von

denen die Biofilme geerntet wurden. Unter den protein-kodierenden Genen gab es nur geringe Ähnlichkeit zu Proteinen, die an pathogenen Prozessen beteiligt sind.

Der Fokus bei der Durchmusterung der Cosmid-Genbank wurde auf Klone mit lipolytischer Aktivität gerichtet. Unter den untersuchten Cosmid-Klonen konnten sechs Klone identifiziert werden, die die Fähigkeit besaßen, Tributyrin zu hydrolysieren. Eine vollständige DNA-Sequenzanalyse wurde exemplarisch für das Cosmid pCosCS2-A3 durchgeführt. Weitere lipolytische Gene konnten auf den Cosmiden pCosCS5-E5 und pCosCS1-C5 durch Transposonmutagenese identifiziert werden. Die potentiellen Gene wurden entsprechend ihrer Aktivität mit *estA3*, *estE5* und *estC5* bezeichnet.

(III) Der ORF *estA3* auf dem Cosmid-Klon pCosCS2-A3 wurde kloniert und heterolog in *E. coli* überexprimiert. Das 396 Aminosäuren große Enzym (EstA3) mit einer kalkulierten Molekularmasse von 43,3 kDa wurde gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte signifikante Ähnlichkeit zu einer β -Laktamase aus *Rhodopseudomonas palustris*. EstA3 besitzt das für β -Laktamasen typische konservierte Motiv Ser-X-X-Lys und kann der Familie VIII der bakteriellen lipolytischen Enzyme zugeordnet werden.

Für EstA3 konnte ein Molekulargewicht von 260 kDa ermittelt werden, womit EstA3 in seiner aktiven Form vermutlich als Hexamer vorliegt und die erste Esterase ist, die in dieser multimeren Form vorkommt. EstA3 hat sein Temperaturoptimum bei 50 °C und ist über einen weiten pH-Bereich aktiv (6-11). Die höchste Aktivität zeigte EstA3 gegenüber p-NP-Butyrat (513,6 U/mg), aber auch längere Acylester wie p-NP-Valerat und -Caproat (je 425,7 U/mg) wurden von EstA3 umgesetzt. Interessanterweise war es möglich die Aktivität von EstA3 durch die Zugabe von Cobalt (5 mM) um bis zu 30 % zu erhöhen. Ebenso zeigte EstA3 eine sehr hohe Stabilität in vielen organischen Lösungsmitteln. In Aceton und Isopropanol konnte die Aktivität von EstA3 sogar noch um bis zu 50 % gesteigert werden. Durch gerichtete Mutagenese wurde das Serin an Position 61 in dem β -Laktamase Motiv (Ser-X-X-Lys) ausgetauscht und somit als aktives Serin₆₁ im katalytischen Zentrum nachgewiesen.

In einer Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Jean-Louis Reymond an der Universität Bern (Schweiz) wurde das Substratspektrum von EstA3 mit dem anderer Esterasen verglichen und detailliert charakterisiert. Die Analysen zeigten, dass EstA3 hinsichtlich seiner Substratverwertung große Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Lipasen bzw. Esterasen aufweist. In einer weiteren Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Bauke Dijkstra der Universität Groningen (Niederlande) wird die Struktur von EstA charakterisiert. Kristalle liegen vor und erste Strukturdaten werden zur Zeit ausgewertet.

VI. Literaturverzeichnis

Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995)

Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.*, 59(1):143-69.

Arpigny, J. L., Jaeger, K. E. (1999)

Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J.*, 1;343 1:177-83.

Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J. B., Ciofu, O., Givskov, M., Hoiby, N. (2004)

Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48(4):1168-74.

Banning, N., Toze, S., Mee, B. J. (2003)

Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology.*, 1:47-55.

Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., Pace, N. R. (1994)

Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1609–1613.

Beja, O., Suzuki, M. T., Koonin, E. V., Aravind, L., Hadd, A., Nguyen, L. P., Villacorta, R., Amjadi, M., Garrigues, C., Jovanovich, S. B., Feldman, R.A., DeLong, E.F. (2000)

Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ Microbiol.*, 2(5):516-29.

Bell, P. J., Sunna, A., Gibbs, M. D., Curach, N. C., Nevalainen, H., Bergquist, P. L. (2000)

Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology.*, 148(Pt 8):2283-91.

Benjamin, S., Pandey, A. (1998)

Candida rugosa lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14: 1069-1087.

Block, J.C. (1992)

Biofilms in drinking water distribution systems. In: Melo, L.M., Fletcher, M.M., Bott, T.R. and Capdeville, L. (eds.): *Biofilms - science and technology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht; 469-486.

Blow, D. (1990)

More of the catalytic triad, *Nature.*, 351:694-695.

Bois, F. Y., Fahmy, T., Block, J. C., Gatel, D. (1997)

Dynamic modeling of bacteria in a pilot drinking-water distribution system. *Water res.*, 31:3146-56.

Bornscheuer, U. T. (2002)

Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev.*, 26(1):73-81.

Botzenhart, K., Döring, G. (1993)

Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Plenum Press, New York, 1-18.

Bradford, M.M. (1976)

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

Brady, S. F., Chao, C. J., Handelsman, J., Clardy, J. (2001)

Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org Lett.*, 28;3(13):1981-4.

Brady, S. F., Clardy, J. (2003)

Synthesis of long-chain fatty acid enol esters isolated from an environmental DNA clone. *Org Lett.*, 23;5(2):121-4.

Brady, S. F., Chao, C. J., Clardy, J. (2002)

New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *J Am Chem Soc.*, 28;124(34):9968-9.

Brenner, S. (1988)

The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature.*, 11;334(6182):528-30.

Brune, K. A., Götz, F. (1992)

Degradation of lipids by bacterial lipases, 243-266 in: G. Winkelmann (ed): *Microbial degradation of natural products*; Verlag Chemie, Weinheim.

Buchholz-Cleven, B. E. E., Rattunde, B., Straub, K. L. (1997)

Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole cell hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20:301-309.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987)

XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA*-*Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *BioTechniques* 5, 345-381.

Chelius, M. K., Triplett, E. W. (2001)

The Diversity of *Archaea* and *Bacteria* in Association with the Roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol.*, 41(3):252-263.

Chen, C. L., Liu, W. T., Chong, M. L., Wong, M. T., Ong, S. L., Seah, H., Ng, W. J. (2004)

Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 63(4):466-73.

Choo, D. W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., Esaki, N. (1998)

A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol.*, 64(2):486-91.

Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. (2003)

The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.*, 31, 442-443.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J. (1987)

Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.*, 41:435-64.

Costerton, J. W. (1995)

Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol.*, 15(3):137-40.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999)

Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.*, 21;284(5418):1318-22.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. (2001)

Battling biofilms. *Sci Am.*, 285, 74.

Cottrell, M. T., Moore, J. A., Kirchman, D. L. (1999)

Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol.*, 65(6):2553-7.

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., Pernodet, J. L. (2003)

Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol.*, 69(1):49-55.

Derakshani, M., Lukow, T., Liesack, W. (2001)

Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol.*, 67(2):623-31.

DeSantis, G., Zhu, Z., Greenberg, W. A., Wong, K., Chaplin, J., Hanson, S. R., Farwell, B., Nicholson, L. W., Rand, C. L., Weiner, D. P., Robertson, D. E., Burk, M. J. (2002)

An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J Am Chem Soc.*; 7;124(31):9024-5.

Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T., 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(1):89-99.

Gandhi, N. N. (1997)

Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 621-634.

Gilbert EJ. (1993)

Pseudomonas lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb Technol.*, 15(8):634-45.

Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M., Handelsman, J. (2002)

Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol.*, 68(9):4301-6.

Goddard, J.-P., Reymond, J.-L. (2004).

Enzyme Activity Fingerprinting with Substrate Cocktails. *J Am Chem Soc.*, 15;126(36):11116-7.

Grobe, S., Wingender, J., Truper, H. G. (1995)

Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Bacteriol.*, 79(1):94-102.

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., Goodman, R. M. (1998)
Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.*, 5(10):R245-9.

Harris, J. K., Kelley, S. T., Pace, N. R. (2004)
New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol.*, 70(2):845-9.

Head, I. M., Saunders, J. R., Pickup, R. W. (1998).
Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.*, 35:1-21.

Healy, F. G., Ray, R. M., Aldrich, H. C., Wilkie, A. C., Ingram, L. O., Shanmugam, K. T. (1995)
Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 43(4):667-74.

Henne, A., R. Daniel, Schmitz, R. A., 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(9): 3901-7.

Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000)
Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 66(7):3113-6.

Hohn, B. (1979)
In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. *Methods Enzymol* 68, 299-309.

Huang, A. H. C. (1993)
In *Lipid Metabolism in Plants* (Moore, T. S., ed.), pp. 473–502, CRC Press, Boca Raton, FL.

Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., Pace, N. R. (1998)
Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol.*, 180(2):366-76.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998)
Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity *J Bacteriol.*, 180(18):4765-74.

Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1984)

Fungal lipases. In Lipases (edited by B. Borgstrom & H.L. Brockman). Pp. 443-466. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers.

Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Choe, S., Yoo, O. J., Suh, S. W. (1997)

Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. Structure.,15;5(12):1571-84.

Krebsfänger, N., Zocher, F., Altenbuchner, J., Bornscheuer, U. T. (1998)

Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Enzyme Microb Technol., 22, 641-646.

Jäger, K. E. und Reetz M. T. (1998)

Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol., 16(9):396-403.

Jäger, K. E., Wohlfahrt, S. (1993)

Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung, BioEngineering., 2/93:39-46.

Jäger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994)

Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev., 15(1):29-63.

Jäger, K. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (1999)

Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu Rev Microbiol., 53:315-51.

Jäger, K. E. und Eggert, T. (2002)

Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol., 13(4):390-7.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Roser A., Koops, H. P., Wagner M. (1998)

Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. Appl. Environ. Microbiol. 64:3042-3051.

Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. (1997)

Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. Appl Environ Microbiol., 63(11):4164-70.

Kane, M. D., Poulsen, L. K., Stahl, D. A. (1993)

Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:682-686.

Kelly, J. A., Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J. P., Libert, M., Moews, P. C., Knox, J. R., Duez, C., Fraipont, C., Joris, B., et al. (1986)

On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science.*, 21;231(4744):1429-31.

Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H. C., Wingender, J. (2003)

Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int J Hyg Environ Health.*, 206(6):563-73.

Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A., Daniel, R. (2003)

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(3):1408-16.

Knox, J. R., Moews, P. C., Frere, J. M. (1996)

Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem Biol.*, 3(11):937-47.

Laemmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, B. L., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Macke, T. J., Marsh, T. L., Woese, C. R. (1993)

The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.*, 1;21(13):3021-3.

Lawrence, R. C., Freyer, T. F., Reiter, B. (1967)

Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature*, 213:1264-1265.

LeChevallier, M. W., Babcock, T. M., Lee, R. G. (1987)

Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, 53(12):2714-24.

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., Osburne, M. S. (2001)

Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 3(2):301-8.

Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr., Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M. (2001)
The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.*, 1;29(1):173-4.

Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K. H., Stenstrom, T. A. (1993)
In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.*, 59(7):2293-8.

Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T. R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R. (1999)
Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms Investigated by Fluorescent in Situ Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microb Ecol.*, 37(4):225-237.

Marchesi, J. R. und Weightman, A. J. (2003)
Comparing the dehalogenase gene pool in cultivated alpha-halocarboxylic acid-degrading bacteria with the environmental metagene pool. *Appl Environ Microbiol* 69(8): 4375-82.

Martiny, A. C., Jorgensen, T. M., Albrechtsen, H. J., Arvin, E., Molin, S. (2003)
Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol.*; 69(11):6899-907.

Mukherjee, K. D., Hills, M. J. (1994)
In *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application* (Woolley, P. and Petersen, S. B., eds), pp. 49–75, Cambridge University Press, Cambridge.

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., Eisen, J. (2001)
Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 27;98(7):4136-41.

Oren, A. (2004)
Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;359(1444):623-38.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., (1986)

The analysis of natural population by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbial Ecol.*, 9:1-55.

Pace, N. R. (1997)

A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.*, 2;276(5313):734-40.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. (1999)

The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem.*, 29:119-31.

Petersen, S.B., Drablos, F. (1994)

A sequence analysis of lipases, esterases and related proteins. In: Wooley, P., Petersen, S.B. (Eds.), *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*. Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, 23–48.

Petersen, E. I., Valinger, G., Solkner, B., Stubenrauch, G., Schwab, H. (2001)

A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *J Biotechnol.*, 26;89(1):11-25.

Pedersen, K. (1990)

Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Wat. Res.* 24, 239-243.

Piel, J. A. (2002)

Polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 29;99(22):14002-7.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2001)

Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol.*, 67(9):4064-9.

Rathbone, D. A., Holt, P. J., Lowe, C. R., Bruce, N. C. (1997)

Molecular analysis of the *Rhodococcus* sp. strain H1 her gene and characterization of its product, a heroin esterase, expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 63(5):2062-6.

Rees, H. C., Grant, S., Jones, B., Grant, W.D., Heaphy, S. (2003)

Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles.*, 7(5):415-21.

Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J. M., Robertson, D. E., Miller, C. (2002)

A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem.*, 19;277(29):26501-7.

Ridgway, H. F., Olson, B. H. (1981)

Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking-water distribution system. *Appl Environ Microbiol.*, 41(1):274-87.

Ro, H. S., Hong, H. P., Kho, B. H., Kim, S., Chung, B. H. (2004)

Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases. *FEMS Microbiol Lett.*, 1;233(1):97-105.

Rogers, J., Keevil, C. W. (1992)

Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol.*, 58(7):2326-30.

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., Goodman, R. M. (2000)

Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol.*, 66(6):2541-7.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Samraoui, B., Sutton, B. J., Todd, R. J., Artymiuk, P. J., Waley, S. G., Phillips, D. C. (1986)

Tertiary structural similarity between a class A beta-lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase. *Nature.*; 27-Apr 2;320(6060):378-80.

Santosa, D. A. (2001)

Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies. *Mol Biotechnol.*, 17(1):59-64.

Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K. N., Wenderoth, D. F., Flemming, H. C., Liesegang, H., Schmitz, R. A., Jaeger, K. E., Streit, W. R. (2003)

Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol.*, 69(12):7298-309

Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U. (1998)

Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking-water systems. *Water Res.*, 32:2787-97.

Shuman, S. (1991)

Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;88(22):10104-8.

Shuman, S. (1994)

Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269, 32678-32684.

Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R. (2002)

Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur J Biochem.*, 269(23):5771-9.

Sommer, P., Bormann, C., Götz F. (1997)

Genetic and Biochemical Charakterisation of a New Extracellular Lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3553-3560.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W., (2002)

Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*, 56:187-209.

Storey, M. V., Langmark, J., Ashbolt, N. J., Stenstrom, T. A. (2004)

The fate of *legionellae* within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. *Water Sci Technol.*, 49(11-12):269-75.

Svendsen, A., Borch, K., Barfoed, M., Nielsen, T. B., Gormsen, E., Patkar, S. A. (1995)

Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim Biophys Acta.*, 26;1259(1):9-17.

Szewzyk, U., Manz, W., Amann, R., Schleifer, K.-H., Stenström, T.-A. (1994)

Growth and in situ detection of a pathogenic *E.coli* in biofilms of a herterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-tRNA directed fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Ecol.*13, 169-176.

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer KH. (2000)

Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol.*, 54:81-127.

Talker-Huiber, D., Jose, J., Glieder, A., Pressnig, M., Stubenrauch, G., Schwab, H. (2003)

Esterase EstE from *Xanthomonas vesicatoria* (Xv_EstE) is an outer membrane protein capable of hydrolyzing long-chain polar esters. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 61(5-6):479-87.

Thoden, J. B., Zhuang, Z., Dunaway-Mariano, D., Holden, H. M. (2003)

The structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from arthrobacter sp. strain SU. *J Biol Chem.*, 278(44):43709-16.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield, J. F. (2004)

Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature.* 4;428(6978):37-43.

Upton, C., Buckley, J.T. (1995)

A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem. Sci.* 20, 178–179.

Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, K., Konig, H. (2004)

Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *J Appl Microbiol.*, 96(3):560-8

van Hannen, E. J., Mooij, W., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Laanbroek, H. J. (1999)

Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.*, 65(6):2478-2484.

Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., Smith, H. O. (2004)

Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.* 2;304(5667):66-74.

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K. E., Streit, W. R. (2003)

Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol.*, 69(10):6235-42.

Williams, M. M., Domingo, J. W., Meckes, M. C., Kelty, C. A., Rochon, H. S. (2004)

Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J Appl Microbiol.*, 96(5):954-64.

Wingender, J., Flemming, H. C. (2004)

Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water Sci Technol.*, 49(11-12):277-86.

Wenderoth, D. F., Ferslev, B., Macarri, G., Molinari, G., Lunsdorf, H., Timmis, K. N. (2003)

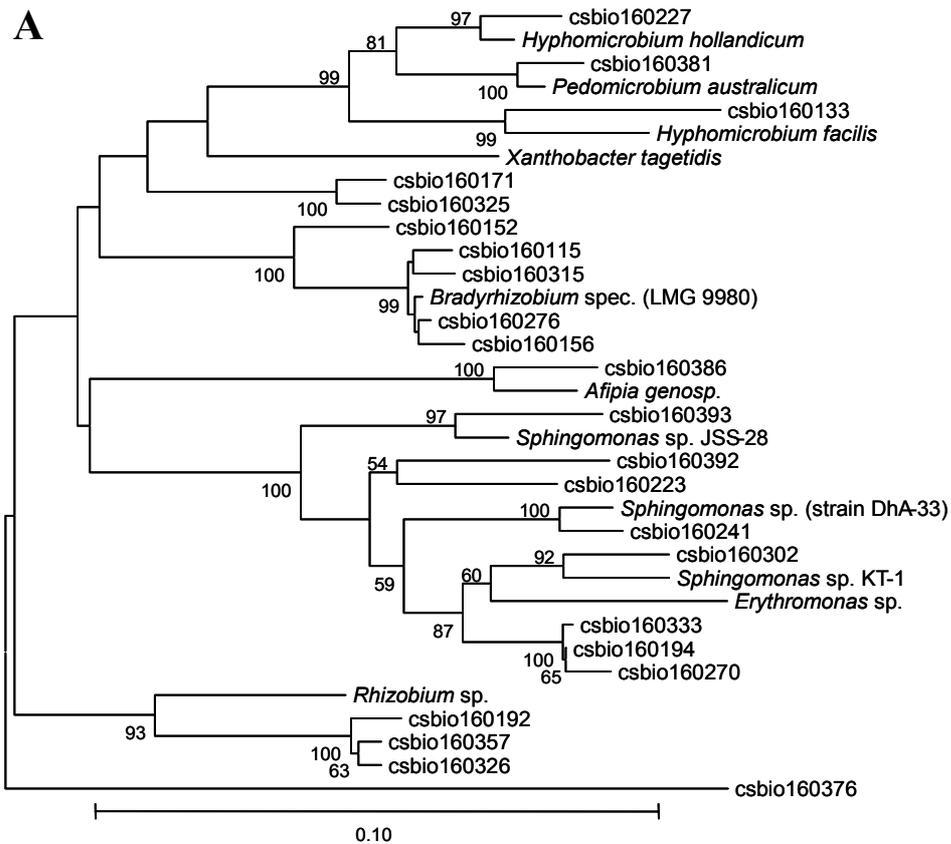
Leitbakterien of microbial biofilm communities causing occlusion of biliary stents. *Environ Microbiol.*, 5(10):859-66.

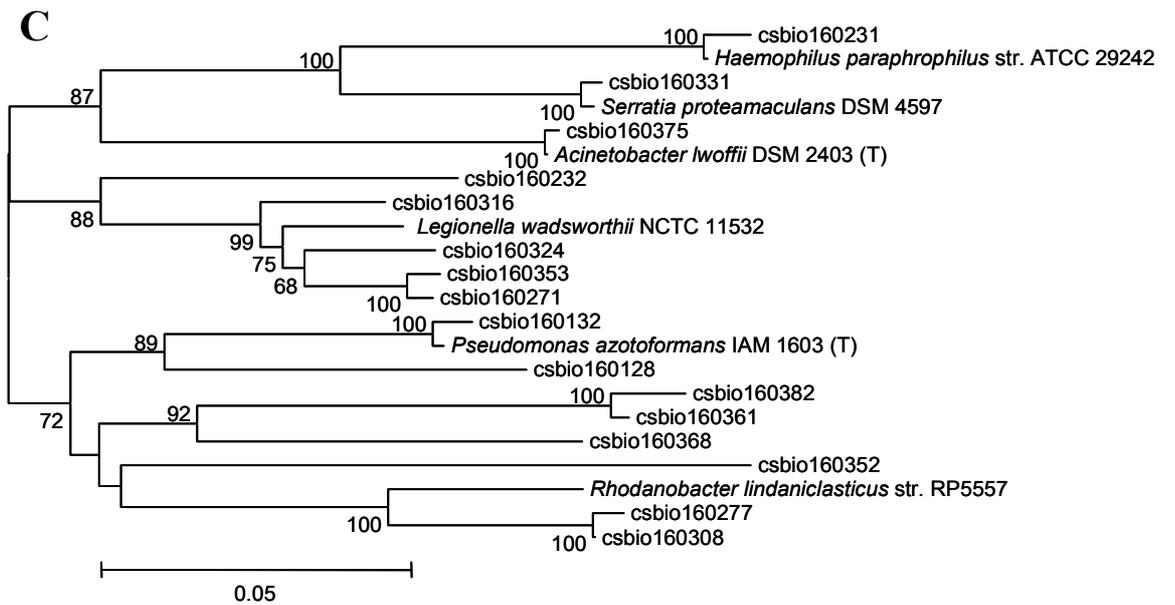
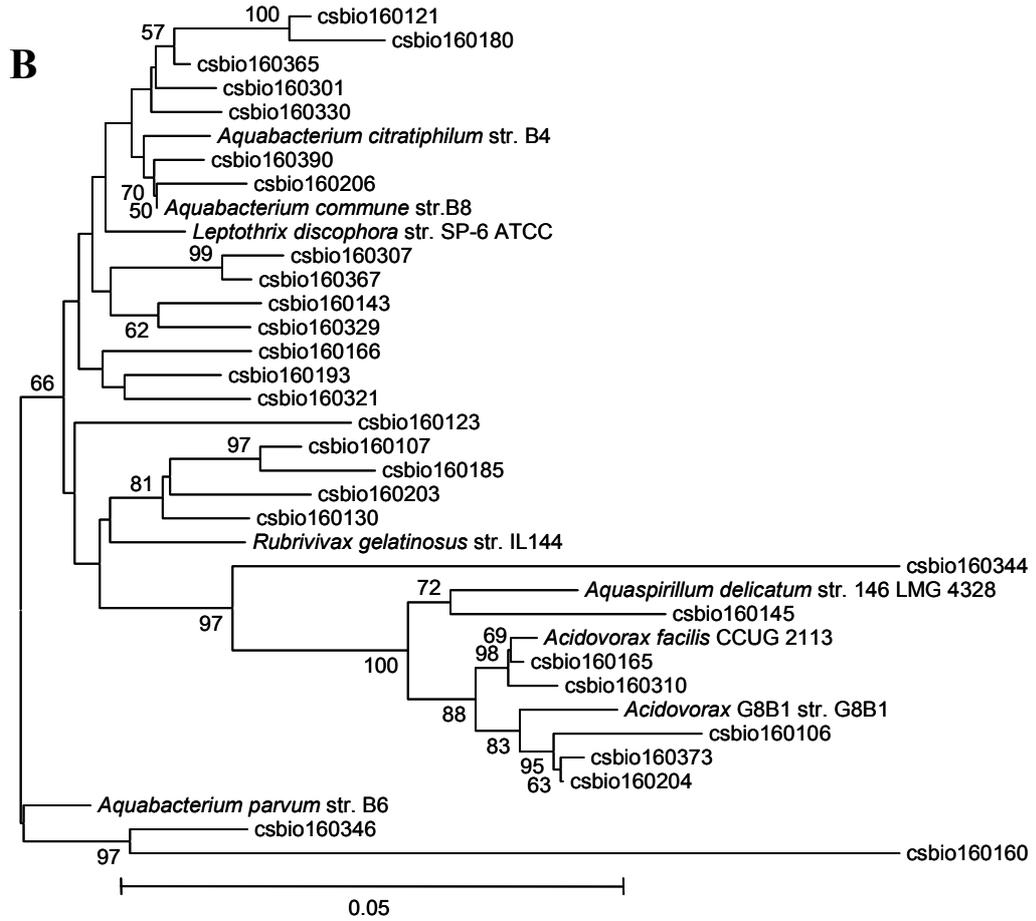
Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990)

Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87(12):4576-9.

VII. Anhang

In diesem Anhang sind die Stammbäume der α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien noch einmal ausführlich dargestellt (Abb. 39, A – D)). Ebenso liegt der Arbeit eine CD mit den Sequenzdaten der 16S rDNA-Analyse, der generierten Sequenzdaten der Plasmid-Genbank und der vollständig sequenzierten Cosmide bei.





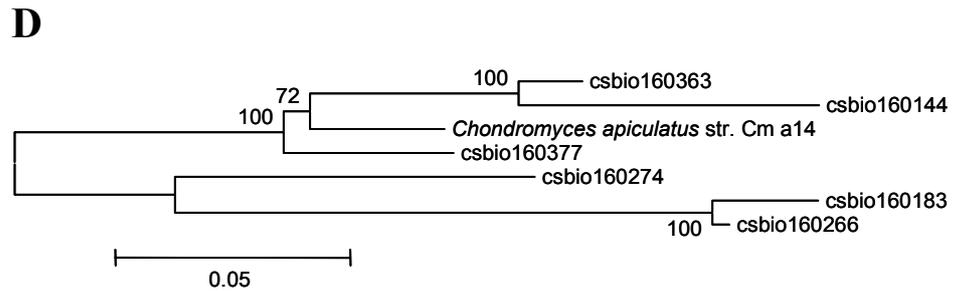


Abb. 39: Stammbaum der 16S rDNA-Klone (csbio) der untersuchten Trinkwasser-Biofilme im Verhältnis zu ihren nächsten Nachbarn. Dargestellt sind die Stammbäume der Proteobakterien, **A)** α -Proteobakterien, **B)** β -Proteobakterien, **C)** γ -Proteobakterien, **D)** δ -Proteobakterien. Diese Stammbäume wurden mit dem Programm MEGA Version 2.1 erstellt und mit dem Programm Phylip; Version 3.5 des *Ribosomalen Database Projekts* (RDP) verifiziert (Maidak et al., 2001). Die Nummern geben die *Bootstrap Values* wieder, Werte unter 50 % wurden nicht angegeben.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung einer selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit und dafür, dass er stets für die Beantwortung aller Fragen bereitstand.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats meiner Arbeit bedanken.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Labore 37/44 Ute Ludwig, Julia Busse, Plamena Entcheva, Martin Armbrrecht, Elke Heinz, Carsten Raasch, Ole Fütterer, Mladen Tzvetkov, Arnim Wiezer, Birgit Veith, Mechthild Bömeke, Susanne Keese, Christina Schipper, Sabrina Koßmehl, Jessica Jabin, Anika Appelles, Steve Klopffleisch, Alexandra Uesbeck, Angel Angelov, Krasimira Ivanova, Jörn Voss, Volker Hoffmann, Andrea Türmer, Christian Elend, Sonja Voget, Meike Ballschmiter, Jörg Kleine und Christian Stöckigt (dem assoziierten Mitglied) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und für den Spaß bei den Aktionen außerhalb des Laboralltags bedanken. Mein besonderer Dank gilt Christian und Sonja für die lustige Atmosphäre im „kleinen“ Labor, dem morgendlichen Kaffee, das Korrektulesen und die sonstige Unterstützung während meiner Arbeit. Meike, Jörg, Angel und Volker danke ich für die Einführung an der FPLC und die Beantwortung der diversen biochemischen und chemischen Fragen.

Bei Christian Leggewie aus dem Labor von Prof. Dr. Karl-Erich Jäger vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich möchte ich mich für die zahlreichen Tipps hinsichtlich lipolytischer Enzyme und der durchgeführten pH-Messungen zu EstA3 bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors von Prof. Dr. Jean-Louis Reymond an der Universität Bern (Schweiz), wo das in dieser Arbeit dargestellte Substratspektrum von EstA3 ermittelt wurde.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Gertie van Pouderooyen aus dem Labor von Prof. Dr. Bauke Dijkstra an der Universität Groningen (Niederlande), wo zur Zeit die Arbeiten zur Kristallisierung von EstA3 durchgeführt werden.

Den Mitarbeitern des G2L danke ich für die Sequenzierung der Plasmid-Banken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei dem Werkstatt-Team: Gerd Birke, Olaf Waase und Patrick Regin die bei allen notwendigen Reparaturen schnell zur Stelle waren.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben sowie meiner Familie und meinen Freunden die mir in jeder Hinsicht stets zu Seite standen.

Lebenslauf

5/09/1974	Geburt in Hamburg
1980 - 1984	Besuch der Grundschule Oststeinbek
1984 - 1993	Besuch des Gymnasiums Glinde
08/1993	Abitur
1993 – 1995	Abgeschlossene Ausbildung zur Kauffrau im Einzelhandel bei Peek & Cloppenburg in Hamburg
10/1995	Immatrikulation an der Georg-August Universität zu Göttingen im Studiengang Biologie (Diplom)
10/1997	Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Chemie und Physikalische Chemie
05/2000	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie Botanik
08/2000 – 05/2001	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Liebl und Dr. Wolfgang Streit mit dem Titel: Molekulare Charakterisierung von BirS, einer potentiellen Sensor-Kinase aus <i>Sinorhizobium meliloti</i> .
09/2001	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation